

СОДЕРЖАНИЕ

Том 56, номер 4, 2022

ОБЗОРЫ

Секвенирование геномов растений: современные технологии и новые возможности для селекции

А. А. Дмитриев, Е. Н. Пушкова, Н. В. Мельникова 531

Фактор рестрикции ВИЧ APOBEC3G и перспективы его использования в генной терапии ВИЧ-инфекции

А. С. Тихонов, Р. Р. Минтаев, Д. В. Глазкова, Е. В. Богословская, Г. А. Шипулин 546

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Белок CG9890 дрозофилы участвует в регуляции экдизонзависимой транскрипции

Ю. В. Николенко, Н. А. Фурсова, М. Ю. Мазина, Н. Е. Воробьева, А. Н. Краснов 557

Связанная с GTP форма Rab3D способствует росту липидных капель в адипоцитах

T. Wang, M. J. Jin, L. K. Li 564

NESTD2 супрессирует пролиферацию клеток колоректального рака, направляя LPCAT1 на убиквитинирование и деградацию

L. Ma, D. H. Li, Z. Xu 574

Делеция *Aldh4a1* приводит к нарушению созревания сперматозоидов у мышей

Y. Xiao, Z. Z. Wen, B. Wu, H. X. Zhu, A. Z. Zhang, J. Y. Li, J. G. Gao 585

Снижение экспрессии тканеспецифичной изоформы OCT-1L оказывает противоопухолевый эффект в клетках лимфомы Беркитта Namalwa

Т. Н. Порцева, А. П. Котнова, Е. В. Булавкина, А. А. Макарова, С. Г. Георгиева, А. Г. Степченко, Е. В. Панкратова 595

Эффективная вирусная доставка в нейрональную культуру генетических конструкций для моделирования и генной терапии GNAO1-энцефалопатии

Е. А. Лунев, А. А. Шмидт, С. Г. Васильева, И. М. Савченко, В. А. Логинов, В. И. Марина, Т. В. Егорова, М. В. Бардина 604

Инактивация терминальной оксидазы *bd-I* приводит к сверхчувствительности *E. coli* к антибиотикам классов хинолонов и бета-лактамов

Т. А. Серегина, К. В. Лобанов, Р. С. Шакулов, А. С. Миронов 619

Rpn4p без ДНК-связывающего домена обеспечивает устойчивость *Saccharomyces cerevisiae* к окислительному стрессу и циклогексимиду

Д. С. Карпов, Д. С. Спаская, В. В. Тютяева, В. Л. Карпов 628

Молекулярная диагностика вовлеченности в процесс малигнизации визуально нормальной слизистой при уротелиальном раке мочевого пузыря

Т. А. Богуш, А. А. Башарина, З. М. Сафаров, И. Э. Мизаева, А. Н. Гришанина, Е. А. Богуш, Я. В. Гриднева, М. И. Волкова, В. Б. Матвеев, В. С. Косоруков 642

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

Релевантность экспонированных на поверхности лакказы остатков лизина,
предназначенных для ее функционализации

*A. A. Arteaga-Castrejón, M. R. Trejo-Hernández, Y. Mekmouche, A. Amouric,
P. Rousselot-Pailley, V. Robert, T. Tron, F. Martínez-Morales*

652

БИОИНФОРМАТИКА

Анализ множественных выравниваний белков с использованием 3D-структурной
информации по ориентации боковых цепей аминокислот

Д. С. Тимонина, Д. А. Суплатов

663

МЕТОДЫ

Однодоменные антитела для предобработки протеома мочи человека
с целью анализа онкобиомаркеров

*С. В. Тиллиб, О. С. Горяйнова, А. М. Сачко, Т. И. Иванова,
М. Я. Гаас, Н. В. Воробьев, А. Д. Каприн, П. В. Шегай*

671

УДК 577.21

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ: СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ

© 2022 г. А. А. Дмитриев^а, Е. Н. Пушкова^а, Н. В. Мельникова^а, *^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: mny-4529264@yandex.ru

Поступила в редакцию 17.07.2021 г.

После доработки 24.08.2021 г.

Принята к публикации 24.08.2021 г.

Изучение геномов растений имеет огромное значение для фундаментальных изысканий и практической селекции. В 1977 году Ф. Сэнгером предложен метод секвенирования ДНК, позволивший установить полные нуклеотидные последовательности ряда геномов. Затем появились высокопроизводительные и экономически эффективные методы секвенирования нового/второго поколения, генерирующие до миллиардов коротких прочтений, что сделало возможным секвенирование геномов значительного числа видов и обеспечило прорыв в генетических исследованиях растений. Наконец, были разработаны технологии секвенирования третьего поколения, определяющие последовательности единичных молекул длиной до миллиона нуклеотидов, что имеет ключевое значение для получения высококачественных сборок геномов. Актуальной задачей является создание пангенома, включающего всю совокупность нуклеотидных последовательностей, представленных в различных генотипах одного вида. Секвенирование геномов растений позволило оценить внутривидовой полиморфизм, идентифицировать ключевые гены, влияющие на формирование значимых свойств, разработать молекулярные маркеры хозяйственно ценных признаков и стало основой для развития маркер-ориентированной и геномной селекции. В данном обзоре представлена информация о последних достижениях в области технологий секвенирования и сборки геномов растений, а также возможностей, которые они открывают для фундаментальных и прикладных работ.

Ключевые слова: растения, геном, пангеном, секвенирование, селекция

DOI: 10.31857/S0026898422040048

ВВЕДЕНИЕ

Растения – основные производители органических соединений и кислорода, они обеспечивают существование жизни на нашей планете и используются человеком для получения пищи, одежды, стройматериалов, топлива, лекарств и промышленного сырья [1]. За миллионы лет сформировалось огромное разнообразие видов растений, лишь немногие из которых активно возделываются человеком, однако значительно большее число видов играют важную роль в природных экосистемах и могут быть полезны человеку в будущем [2]. Направленный отбор ценных генотипов, а затем и научно обоснованная селекция позволили создать высокопродуктивные сорта растений, без которых сложно представить существование человечества. Изменения климата и рост населения Земли требуют интенсификации сельскохозяйственного производства, однако при этом необходимо сохранить биологическое разнообразие, что невозможно без разработки новых подходов к обеспечению баланса между удовлетворением потребностей челове-

ства и поддержанием сложившихся экосистем [3–6].

Изучение геномов растений является первоочередной задачей для фундаментальных исследований и практической селекции. История секвенирования полных геномов растений насчитывает более 20 лет, она началась в 2000 году с момента получения генома *Arabidopsis thaliana* с использованием секвенирования по Сэнгеру [7]. Этот метод активно применялся в 2000-е годы, он позволил определить последовательности полных геномов ряда важных сельскохозяйственных растений, в том числе риса [8], кукурузы [9] и сои [10]. Секвенирование по Сэнгеру характеризуется высокой стоимостью, трудозатратностью и низкой продуктивностью. На смену ему пришли высокопроизводительные и экономически выгодные методы секвенирования нового поколения (next-generation sequencing, NGS), чаще называемые методами секвенирования второго поколения (second-generation sequencing). Эти методы позволяют генерировать миллионы и миллиарды коротких высокоточных прочтений за один за-

пуск прибора (платформы 454, SOLiD, Ion Torrent/Proton, Illumina, BGI), что сделало возможным секвенирование и ресеквенирование геномов многих видов [11, 12]. Однако большинство геномов, секвенированных только с использованием коротких прочтений, собраны лишь до уровня контигов и скаффолдов, имеют недостаточное качество сборки (в первую очередь малую длину контигов) и содержат значительное число ошибок. Появление технологий секвенирования третьего поколения (third-generation sequencing), определяющих последовательности единичных молекул длиной до 1 млн. нуклеотидов (платформы Pacific Biosciences (PacBio) и Oxford Nanopore Technologies (ONT)), позволило частично преодолеть трудности сборки геномов из коротких прочтений [13, 14]. Однако платформы третьего поколения все еще уступают в точности секвенаторам второго поколения (отдельную проблему представляет секвенирование гомополимеров), а стоимость секвенирования 1 млрд.н. (gigabases, Gb) остается достаточно высокой [12, 15, 16]. В то же время, прогресс в технологиях третьего поколения стремителен, а точность прочтений значительно повышается: у PacBio появился вариант HiFi (high-fidelity), когда одна последовательность ДНК секвенируется многократно, благодаря чему средняя точность превышает 99% [17], а ONT в 2021 году анонсировала новые проточные ячейки R10.4 и химию Q20+, использование которых должно повысить среднюю точность до более чем 99%, в том числе благодаря решению проблемы с ошибками в секвенировании гомополимеров (по крайней мере длиной до 10 н.) [18]. Совершенствование технологий секвенирования позволило определить нуклеотидные последовательности геномов сотен видов растений, собрать референсные геномы и провести ресеквенирование геномов для десятков и сотен генотипов одного вида [19–21]. В последнее время появляются сборки высокого качества (вплоть до уровня хромосом) геномов все большего числа видов растений, при этом залогом успеха проекта является выбор оптимальных подходов к секвенированию и сборке генома с учетом особенностей изучаемого организма [16]. Стоит отметить, что понятие “высокое качество” геномной сборки весьма расплывчато и до сих пор отсутствует единая номенклатура, позволяющая однозначно оценивать качество сборки [22]. Сборка генома человека от теломеры до теломеры получена лишь в 2021 году [23], а сборки геномов растений уровня хромосом представляют собой преимущественно контиги, расположение которых друг относительно друга определяется посредством генетических и/или физических карт или даже выравнивания на референсный геном [24], однако точность и протяженность геномных сборок растений растут год от года [25].

СЛОЖНОСТИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ И СБОРКИ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ

Размеры геномов наземных растений варьируют от небольших (0.06 млрд.н.) до огромных значений (150 млрд.н.) [26, 27]. Многие растения, особенно культурные, являются алло- и автополиплоидами [28]. Кроме того, растительные геномы часто содержат большое количество повторяющихся элементов [21]. Секвенирование полных геномов большого размера требует серьезных финансовых вложений, а наличие повторов и полиплоидность могут существенно осложнять сборку и требовать увеличения глубины покрытия генома прочтениями на 50–100% [29]. Еще одна проблема – гетерозиготность, требующая увеличения покрытия при секвенировании по меньшей мере на 30% [16]. Кроме того, при секвенировании геномов растений около 5–10% данных могут составлять прочтения, полученные с ДНК органелл (пластид и митохондрий), что также осложняет сборку [29].

Известно, что генотипы одного вида растений могут значительно различаться не только однонуклеотидными полиморфизмами, но и копийностью генов и повторяющихся некодирующих участков, а также иметь последовательности, специфичные для определенного генотипа, включающие, в том числе, гены, кодирующие ценные признаки [15, 30–33], которые не будут идентифицированы при сборке геномов из коротких прочтений с использованием референсного генома. В связи с этим более предпочтительно получение высококачественных *de novo* сборок геномов с применением длинных прочтений.

ТЕХНОЛОГИИ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ СБОРОК ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ

Две основные платформы для секвенирования третьего поколения – PacBio и ONT – позволяют секвенировать длинные молекулы ДНК без предварительной амплификации, что важно для последующей сборки генома. При секвенировании на платформе ONT одноцепочечная ДНК проходит через белковые нанопоры, находящиеся в полимерной мембране, вызывая характерные изменения силы тока, детектируемые сенсором, что при последующей обработке данных (basecalling) позволяет получать информацию о последовательности нуклеотидов [34]. Технология PacBio SMRT (single molecule real-time) представляет секвенирование синтезом и дает возможность определять включение флуоресцентно меченных нуклеотидов в кольцевую цепь ДНК в реальном времени – детекция происходит на чипе SMRT cell в лунках zero-mode waveguide (ZMW) диаметром в десятки нанометров, на дне которых закреплена полимера-

за. При этом секвенирование одной и той же молекулы ДНК может происходить многократно в случае точных HiFi прочтений, длина которых составляет 15–20 т.п.н. [17, 35, 36]. Платформа ONT позволяет получать прочтения длиной до 1 млн.н. [37] и имеет больший выход данных при меньшей стоимости [38], однако до недавнего времени эта платформа уступала в точности PacBio (появление новых проточных ячеек R10.4 и химии Q20+ может изменить ситуацию [18]).

Секвенирование третьего поколения дает возможность получения информации не только о последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, но и об их модификациях, включая метилирование ДНК [39]. Модификации нуклеотидов влияют на кинетику полимеразы на платформе PacBio [40], а на платформе ONT вызывают отклонения в изменениях силы тока при прохождении определенного нуклеотида через пору [41, 42]. Важную роль в регуляции экспрессии генов играет метилирование ДНК, которое управляет множеством процессов, происходящих в клетках растений, в том числе ростом, развитием, ответом на стрессовые воздействия [43–45], поэтому данные с платформ третьего поколения могут быть использованы для расширения нашего представления о роли этой эпигенетической модификации в жизни растений.

Секвенирование третьего поколения предъявляет крайне высокие требования к чистоте ДНК; кроме того, для получения высококачественных сборок геномов необходима ДНК большой длины [16]. Выделение чистой высокомолекулярной ДНК из растений представляет сложную задачу, обусловленную присутствием полисахаридов клеточной стенки и различных метаболитов, включая фенолы, терпены, алкалоиды и флавоноиды, затрудняющих очистку [46]. При этом каждый вид растений содержит свой специфический спектр соединений, препятствующих выделению высококачественной ДНК, что затрудняет разработку универсальных протоколов экстракции ДНК. На сайте сообщества ONT можно найти ряд протоколов, хорошо зарекомендовавших себя при использовании на отдельных видах растений (https://community.nanoporetech.com/extraction_methods). Эти протоколы могут быть взяты за основу при оптимизации методики выделения ДНК из интересующего исследователя вида растений. На данный момент предложены различные подходы к экстракции ДНК, пригодной для секвенирования на платформах третьего поколения как с применением коммерческих наборов, так и буферов собственного приготовления. Часто используются модификации с ЦТАБ (цетилтриметиламмонийбромид) в составе лизирующего буфера, в том числе лизирующий буфер Carlson, рекомендованный в нескольких протоколах выделения ДНК из листьев растений ([\[traction_methods#plant&modal=plant\]\(https://community.nanoporetech.com/extraction_methods#plant&modal=plant\)\), с последующей дополнительной очисткой с помощью колонок Genomic-tips \(“Qiagen”, США\), магнитных частиц SPRI \(solid-phase reversible immobilization\), экстракция ДНК определенной длины из агарозного геля с использованием коммерческих наборов или системы BluePippin \(“Sage Science”, США\) \[46–51\]. Хорошо зарекомендовала себя экстракция ДНК из предварительно изолированных ядер \[52, 53\]. Для удаления коротких фрагментов ДНК перед секвенированием целесообразно использовать наборы Short Read Eliminator Kit \(“Circulomics”, США\). Чистоту ДНК обычно контролируют спектрофотометрически, например, с помощью NanoDrop \(“Thermo Fisher Scientific”, США; параметры 260/280 и 260/230 нм должны составлять 1.8–2.0 и 2.0–2.2 соответственно\), сравнивают также значения концентраций, измеренные на флуориметрах \(часто применяют Qubit, “Thermo Fisher Scientific”\) и спектрофотометрах – близость значений свидетельствует о высокой чистоте ДНК \[16, 48, 49, 51\].](https://community.nanoporetech.com/ex-</p></div><div data-bbox=)

Выбор оптимального подхода к секвенированию на платформах третьего поколения с целью *de novo* сборки генома зависит от размера генома и его сложности. При небольших и средних размерах эффективным может быть применение только секвенирования третьего поколения, однако, если размер генома превышает 1 млрд.п.н., то более целесообразным с финансовой точки зрения может быть использование гибридного подхода, когда получают как длинные, так и короткие NGS-прочтения [16]. Кроме того, в случае сложных геномов может потребоваться привлечение дополнительных методов, таких как Hi-C (chromosome conformation capture sequencing) [54], оптическое картирование (optical mapping) [55] или 10× Genomics [56], позволяющих более точно определить относительное расположение участков генома [13, 14].

СБОРКА ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ

Помимо прогресса в технологиях секвенирования, важную роль в получении высококачественных сборок геномов растений сыграло развитие методов биоинформатического анализа [57–61]. Выбор стратегии секвенирования и последующей сборки генома зависит от многих параметров, включая размер генома, ploидность, гетерозиготность, сложность выделения высококачественной ДНК и прочее. Возможна *de novo* сборка генома только из длинных прочтений с платформ ONT или PacBio, однако стоимость такого проекта может быть весьма значительной, особенно в случае геномов большого размера, так как для сборки высокого качества рекомендуется более чем 100-кратное покрытие. Еще один вариант *de novo* сборки геномов – гибридный, когда используются как длинные, так и короткие про-

чтения, полученные на разных платформах, что позволяет снизить покрытие длинными прочтениями (минимум до 60-кратного в случае геномов длиной до 3 млрд. п.н.) и избавиться от ряда ошибок в сборке благодаря коротким высокоточным прочтениям [29, 62].

Как правило, первичную сборку генома проводят на основе длинных прочтений с платформ третьего поколения. К настоящему времени разработано значительное количество сборщиков геномов, в том числе Canu [63], Flye [64], Shasta [65], wtdbg2 [66], MARVEL [67], MaSuRCA [59], FALCON [68], Minimap/miniasm [69], Raven [70], которые могут использоваться в исследованиях растений, однако отсутствует “идеальный” сборщик – в зависимости от размера и сложности генома и полученного объема и качества данных секвенирования лучшие результаты могут давать разные приложения [29, 48, 70–73]. Стоит также учитывать, что требования сборщиков к вычислительным ресурсам существенно различаются, например, одному из первых сборщиков, Canu, хорошо зарекомендовавшему себя в том числе при сборке геномов растений, необходимы значительные мощности и количество часов для обработки данных, в то время как вышедшие позже приложения (Flye, Shasta, wtdbg2, Raven и др.) требуют в разы меньше ресурсов [48, 72, 74]. Качество геномной сборки оценивают, используя различные параметры, из которых особенно важны размер полученной сборки, число и длина контигов, в первую очередь метрики N50 (максимальная длина, при которой суммарная длина контигов этой длины и более составляет не менее 50% длины сборки) и L50 (число контигов с длиной N50 и более, т.е. минимальное число контигов, суммарная длина которых составляет не менее 50% длины сборки), часто определяемые приложением QUAST [75]), а также метрики BUSCO (benchmarking universal single-copy orthologs), показывающие процент консервативных однокопийных генов-ортологов, характерных для подавляющего большинства представителей той или иной группы видов, и отражающие полноту сборки [76]. Повысить точность полученной сборки может “полировка” с использованием как длинных, так и коротких прочтений – программы RacoN [77], Pilon [78], POLCA [59], Nanopolish [79], Medaka (<https://github.com/nanoporetech/medaka>) и др. Дополнительным эффективным подходом к сравнительному анализу сборок генома, полученных с применением различных комбинаций сборщиков и полировщиков, и выбора наилучшей является их сопоставление с высококачественным геномом представителя того же или близкородственного вида (обычно с помощью QUAST) [49, 73, 80]. Кроме того, актуален вопрос определения гаплотипов и идентификации аллелей в сборке генома одного растения, что имеет особое значение в

эволюционных исследованиях, а также при изучении гетерозиса, в связи с чем в последнее время предложены различные подходы к фазированию гаплотипов (haplotype phasing) [81]. Существуют также приложения, которые, наоборот, позволяют слить разделенные гаплотипы, такие как Purge Haplotigs, что может быть необходимо, например, при использовании собранного генома в качестве референсного при поиске полиморфизмов или оценке экспрессии генов [82].

ВАЖНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ КАЧЕСТВЕННЫХ СБОРОК ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ

Получение высококачественных сборок геномов растений имеет ключевое значение для последующего анализа с целью идентификации интересующих исследователя генов и регуляторных областей, а также обнаружения гомологов [5].

Секвенирование третьего поколения сделало возможным определение нуклеотидных последовательностей участков генома, сборку и анализ которых затрудняет присутствие нескольких копий генов, повторов, а также транслокаций, в том числе для полового локуса двудомных растений и локуса самонесовместимости растений (self-incompatibility locus, S-locus) [83]. В качестве примера можно привести изучение детерминации пола у видов рода *Populus*, подавляющее большинство которых являются двудомными – на одних растениях развиваются только женские цветки, на других – только мужские. Секвенирование на платформе Illumina позволило выявить ассоциированные с полом полиморфизмы. Однако в качестве референсного в тот момент использовали геном только женского растения *Populus trichocarpa*, поэтому эти полиморфизмы оказались ошибочно локализованы на разных хромосомах, и собрать половой локус на основе данных секвенирования второго поколения не удалось [84, 85]. В 2020–2021 годах сразу несколько научных групп опубликовали результаты изучения видов тополя и осины, полученные с применением секвенирования третьего поколения, в которых был идентифицирован половой локус и показано, что ключевую роль в детерминации пола играет ген *ARR17*. Частичные повторы гена *ARR17* выявили в этом локусе только у мужских растений *P. trichocarpa*, *P. tremula*, *P. deltoides*, *P. davidiana*, *P. × sibirica*, *P. euphratica* и показали, что с двух из этих повторов синтезируются малые РНК, которые опосредованно метилируют ген *ARR17* или расщепляют его транскрипт, что приводит к подавлению экспрессии этого гена (локализованного не в половом локусе). Когда ген *ARR17* включен (активен), развиваются женские цветки, а когда он выключен – мужские. Гетерогаметным у перечисленных видов является мужской пол – система XY детерминации пола, а половой локус локализован в те-

ломерной (*P. trichocarpa*, *P. deltooides*, *P. × sibirica*) или перицентральной (*P. tremula*, *P. davidiana*) области хромосомы 19 или на конце хромосомы 14 (*P. euphratica*) [50, 80, 86–88]. В то же время показано, что *P. alba* имеет ZW систему детерминации пола, ген *ARR17* отсутствует у мужских растений, однако женские растения содержат три его копии [50]. Таким образом, использование для секвенирования геномов длинных прочтений сыграло решающую роль в установлении механизмов детерминации пола у видов *Populus* и выявлении разнообразия в локализации полового локуса.

Важное направление, существенно продвинутое на котором помогло знание полных геномов — изучение эволюции растений. Серия геномных исследований водорослей, мхов и папоротников позволила пролить свет на эволюцию стрептофитов [89–94]. Получение высококачественных сборок геномов роголистников и водяных лилий привело к выявлению уникальных биологических особенностей, которых нет у других растений, что значительно расширило представление об эволюции наземных растений [95, 96]. Получение генома *Ginkgo biloba* высокого качества и его анализ привнесли новые данные, касающиеся формирования жгутика сперматофора, необходимые для понимания эволюции голосеменных растений [97], а изучение геномов водяных лилий оказалось важным для установления ранних этапов эволюции цветковых растений [98, 99]. Наличие значительного числа высококачественных сборок геномов растений позволяет проводить сравнительный анализ как полногеномный, так и отдельных генов или их семейств, играющих ключевую роль в формировании признаков, интересующих исследователей. Полученные за последние годы геномы водорослей, мхов, ликофитов и папоротников не только расширили представление об эволюции наземных растений, но и позволили идентифицировать специфичные для бессемянных растений биологические особенности [100]. Использование геномных данных открыло новые возможности для понимания роли определенных генов в эволюции основных функциональных различий между голосеменными и покрытосеменными растениями [101], а полногеномный филогенетический анализ покрытосеменных растений, выполненный на основе микросателлитов, дал дополнительные сведения о спорных вопросах в установлении филогенетических отношений [102].

Еще одно направление, прогресс на котором достигнут благодаря развитию технологий секвенирования и биоинформатических подходов к анализу данных — изучение полных геномов сельскохозяйственных растений и их дикорастущих сородичей. Так, например, удалось значительно продвинуться в понимании эволюции геномов видов *Brassica* и процессов, происходящих при

полиплоидизации, что также важно для более эффективной селекции растений семейства Капустные [103, 104].

В последнее время появляется все больше геномов растений, собранных с высоким качеством отдельными научными группами, а также реализуются крупномасштабные проекты по получению референсных геномов для видов эукариот [105], что открывает новые возможности исследования растений, однако необходимы подходы, позволяющие максимально эффективно использовать имеющиеся данные [106].

ПАНГЕНОМЫ РАСТЕНИЙ

Высококачественные сборки геномов отдельных представителей видов используются в широком спектре исследований растений. Однако не менее важна оценка внутривидового полиморфизма на геномном уровне. В последнее время анализ так называемого пангенома (pan-genome, от греческого παν — “все”), включающего в себя всю совокупность нуклеотидных последовательностей, найденных в различных представителях одного вида или популяции, привлекает все больше внимания. Пангеномные исследования направлены не на изучение геномов индивидуальных растений, а на установление разнообразия геномных последовательностей на внутривидовом уровне. Первые подобные работы, проведенные на бактериях, показали, что штаммы существенно различаются по наличию/отсутствию значительного числа генов [107]. Изучение пангеномов эукариот, включая растения, расширило представление о пангеноме, в который помимо генов включили и некодирующие области, представленные, в том числе, промоторами и энхансерами. Пангеном разделяют на основной геном (core genome, эти последовательности найдены у всех представителей определенного вида), необходимый для выживания организма, и необязательный (вариабельный) геном (dispensable genome, эти последовательности встречаются у одних представителей вида, но отсутствуют у других), причем доля основного генома у разных видов растений существенно различается [108].

Выделяют следующие типы полиморфизмов: однонуклеотидные (single-nucleotide polymorphisms, SNP), непротивительные инсерции/делеции (менее 50 н.) и структурные вариации (structural variants, SV) длиной от 50 до миллионов нуклеотидов [109]. Изучение структурных вариаций, включая различия в наличии/отсутствии определенных последовательностей или их копийности, а также присутствие хромосомных перестроек, представляет важнейший аспект пангеномных исследований [110–112]. Благодаря развитию технологий секвенирования и подходов к сборке геномов стало возможным проводить пан-

геномный анализ при сравнении сборок геномов высокого качества.

Многие пангеномные работы сфокусированы на определении вариаций в наличии/отсутствии генов, но ценность представляют не только гены, но и регуляторные области, в том числе *cis*-регуляторные элементы (*cis*-regulatory elements) [113, 114], а также повторяющиеся последовательности. Изучение основного генома (*core genome*) необходимо для выявления генов, без которых организм не может существовать, однако нужно учитывать, что значимость гена для конкретного организма зависит от условий внешней среды и геномного окружения: так, один ген может компенсировать отсутствие другого [115].

Разработано несколько подходов к получению пангеномов, в том числе: 1) *de novo* сборка и последующее сравнение полных геномов множества представителей вида; 2) выравнивание прочтений для множества представителей на референсный геном с последующей сборкой невыравненных последовательностей и добавлением их в пангеном; 3) подход, основанный на графах (*graph-based pan-genome assembly*). Третий подход, вероятно, наиболее перспективен для пангеномных исследований растений, однако требует значительных вычислительных мощностей и имеет ограничения, связанные с размером генома и числом анализируемых генотипов [116].

К настоящему времени собраны пангеномы риса [117–119], пшеницы [120, 121], ячменя [122], кукурузы [123], рапса [124], сои и родственных ей видов [110, 125], *Brachypodium* [126] и других видов растений [108, 116, 127], что позволило получить новые данные о генах, влияющих на биомассу растения, вес и состав плодов и семян, цветение и созревание, устойчивость к патогенам и абиотическим стрессорам, другие хозяйственно ценные признаки, а также о генах, на которые оказали влияние процессы доместикизации и селекции, идентифицировать новые гены, отсутствующие в референсных геномах, а также выявить важную роль транспозонов в формировании генетического разнообразия растений.

Стоит также отметить получение значительного числа сборок геномов высокого качества грибных патогенов растений (База NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Fungi>). Использование этих данных, в том числе для сравнительного анализа образцов одного вида, характеризующихся различной вирулентностью, может помочь в понимании механизмов взаимодействия растений и патогенов, что будет способствовать созданию устойчивых к биотическим стрессорам сортов. Выполнены пангеномные исследования нескольких фитопатогенов с особым вниманием к генам-эффекторам, связанным с вирулентностью [128–130].

Известно, что применение в геномном анализе только одного, пусть даже хорошо собранного генома, может приводить к искажению результатов. Так, выбор референсного генома оказывает значительное влияние на результаты оценки экспрессии генов и полногеномного поиска ассоциаций (GWAS, genome-wide association studies) [73, 131]. Использование пангенома вместо генома индивидуального генотипа в качестве референсного позволяет с большей точностью идентифицировать полиморфизмы при ресеквенировании геномов и оценивать экспрессию при транскриптомных исследованиях представителей того же вида [116]. Таким образом, изучение пангеномов растений — это перспективное активно развивающееся направление.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

Успех селекционной работы во многом определяется ценностью и степенью изученности исходного материала, эффективный подбор которого позволит существенно ускорить создание сортов с заданными свойствами [132–135]. В условиях изменяющегося климата и роста населения нашей планеты необходимо совершенствование методов селекционной работы для получения достаточного объема качественной сельскохозяйственной продукции. Использование классических подходов, основанных на отборе наиболее ценных растений по их фенотипическим данным, требует значительных затрат времени, однако привлечение генетических маркеров может сделать процесс создания сортов более эффективным [136, 137]. Благодаря технологическому прогрессу, в том числе совершенствованию методов секвенирования, получены огромные массивы последовательностей геномов растений и собраны референсные геномы наиболее важных сельскохозяйственных культур, что является основой для идентификации генов и маркеров, ассоциированных с хозяйственно значимыми признаками [138]. Развитие маркер-ориентированной селекции, при которой отбор ценных генотипов проводят с использованием отдельных ДНК-маркеров, а затем и геномной селекции, когда селекционную значимость генотипа определяют на основе данных о тысячах ДНК-полиморфизмов, позволило существенно повысить эффективность подбора пар для скрещивания и последующего отбора ценных генотипов с целью создания улучшенных сортов [139–143].

Поиск ассоциаций между хозяйственно важными характеристиками и геномными последовательностями проводят с использованием QTL-анализа (*quantitative trait loci*, локусы количественных признаков), основанного на изучении картирующих популяций, полученных от скрещиваний ро-

дителей с контрастными проявлениями признаков, и полногеномного поиска ассоциаций (GWAS), представляющего собой мощный инструмент для изучения генетики комплексных характеристик в популяциях растений [140, 141, 144]. Эти подходы позволяют идентифицировать различные типы ДНК-маркеров, ассоциированных с интересующими исследователя признаками, такие как полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP, restriction fragment length polymorphism), полиморфизм длин амплифицируемых фрагментов (AFLP, amplified fragment length polymorphism), микросателлитные маркеры (SSR, simple sequence repeats), полиморфизм рестрикционных фрагментов амплифицированной ДНК (CAPS, cleaved amplified polymorphic sequences), вставки транспозонов (SSAP, sequence specific amplification polymorphism), однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), инсерции/делеции (InDel) [145]. Технологии высокопроизводительного секвенирования позволяют получать достаточно плотное покрытие генома маркерами, а полные геномы сделали возможным идентификацию не только ассоциированных с признаком ДНК-маркеров, но и определение вероятных генов, детерминирующих этот признак. В качестве примера использования полногеномной сборки для картирования ранее найденных QTL и предсказания генов-кандидатов, определяющих ценные характеристики, можно привести работу You и Cloutier, выполненную на растениях льна [146]. В настоящее время полногеномный поиск ассоциаций, направленный на изучение признаков, связанных с урожайностью, размером и архитектурой растений, временем цветения, биохимическим составом, устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессорам, проведен для большинства основных сельскохозяйственных культур, в том числе пшеницы, риса, кукурузы, сои, ячменя, сорго и хлопка, с применением различных методов анализа [141, 145].

Необходимо отметить, что использование ре-секвенирования и только одного генома в качестве референсного ограничивает возможность идентификации структурных вариаций (SV), которые часто встречаются в сельскохозяйственных культурах и играют важную роль в детерминации ценных признаков [112]. Проблему выявления структурных вариаций может решить пангеномный анализ. Необязательный (dispensable) геном содержит значительное число генов, ассоциированных с хозяйственно важными характеристиками, включая устойчивость к биотическим и абиотическим стрессорам, а его изучение поможет более точно и эффективно отобрать селекционный материал для создания сортов и линий с заданными свойствами [112]. Кроме того, структурные вариации могут вносить вклад в гетерозис, их выявление необходимо для классификации гетеротических групп [147, 148], что будет

способствовать более обоснованному выбору родительских линий и получению гибридов с улучшенными признаками. Более того, пангеномный анализ с привлечением староместных сортов и диких предков культивируемых растений перспективен для идентификации генов, важных для доместикации и адаптации, знания о которых представляют ценность для направленной селекционной работы по улучшению сельскохозяйственных растений с эффективным привлечением существующего генофонда [6, 112]. Таким образом, прогресс в технологиях секвенирования и анализа геномов растений предоставляет новые инструменты для более эффективного ведения селекции и создания высокопродуктивных сортов с комплексом хозяйственно ценных характеристик и улучшенными свойствами, необходимыми для удовлетворения потребностей растущего населения Земли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные технологии секвенирования открыли новые возможности проведения генетических исследований растений. Разработаны и развиваются подходы к получению высококачественных сборок геномов растений, а также пангеномов, служащих основой для функциональных исследований, изучения генетического разнообразия и селекционной работы. Сложно представить дальнейшее эффективное ведение сельского хозяйства без привлечения достижений современной науки, при этом нельзя забывать о балансе между удовлетворением потребностей человечества и сохранением нашей планеты.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-116-50144.

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. Schaal B. (2019) Plants and people: our shared history and future. *Plants, People, Planet*. **1**, 14–19.
2. Corlett R.T. (2016) Plant diversity in a changing world: status, trends, and conservation needs. *Plant Diversity*. **38**, 10–16.
3. Jimenez-Alfaro B., Frischie S., Stolz J., Galvez-Ramirez C. (2020) Native plants for greening Mediterranean agroecosystems. *Nat. Plants*. **6**, 209–214.
4. Zenda T., Liu S., Dong A., Duan H. (2021) Advances in cereal crop genomics for resilience under climate change. *Life*. **11**, 502.

5. Pourkheirandish M., Golicz A.A., Bhalla P.L., Singh M.B. (2020) Global role of crop genomics in the face of climate change. *Front. Plant Sci.* **11**, 922.
6. Razzaq A., Kaur P., Akhter N., Wani S.H., Saleem F. (2021) Next-generation breeding strategies for climate-ready crops. *Front. Plant Sci.* **12**, 620420.
7. The *Arabidopsis* Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. **408**, 796–815.
8. International Rice Genome Sequencing Project & Takuji Sasaki. (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature*. **436**, 793–800.
9. Schnable P.S., Ware D., Fulton R.S., Stein J.C., Wei F., Pasternak S., Liang C., Zhang J., Fulton L., Graves T.A., Minx P., Reily A.D., Courtney L., Krukowski S.S., Tomlinson C., Strong C., Delehaunty K., Fronick C., Courtney B., Rock S.M., Belter E., Du F., Kim K., Abbott R.M., Cotton M., Levy A., Marchetto P., Ochoa K., Jackson S.M., Gillam B., Chen W., Yan L., Higginbotham J., Cardenas M., Waligorski J., Applebaum E., Phelps L., Falcone J., Kanchi K., Thane T., Scimone A., Thane N., Henke J., Wang T., Ruppert J., Shah N., Rotter K., Hodges J., Ingenthron E., Cordes M., Kohlberg S., Sgro J., Delgado B., Mead K., Chinwalla A., Leonard S., Crouse K., Collura K., Kudrna D., Currie J., He R., Angelova A., Rajasekar S., Mueller T., Lomeli R., Scara G., Ko A., Delaney K., Wissotski M., Lopez G., Campos D., Braidotti M., Ashley E., Golser W., Kim H., Lee S., Lin J., Dujmic Z., Kim W., Talag J., Zuccolo A., Fan C., Sebastian A., Kramer M., Spiegel L., Nascimento L., Zutavern T., Miller B., Ambroise C., Muller S., Spooner W., Narechania A., Ren L., Wei S., Kumari S., Faga B., Levy M.J., McMahan L., Van Buren P., Vaughn M.W., Ying K., Yeh C.T., Emrich S.J., Jia Y., Kalyanaraman A., Hsia A.P., Barbazuk W.B., Baucom R.S., Brutnell T.P., Carpita N.C., Chaparro C., Chia J.M., Deragon J.M., Estill J.C., Fu Y., Jeddelloh J.A., Han Y., Lee H., Li P., Lisch D.R., Liu S., Liu Z., Nagel D.H., McCann M.C., SanMiguel P., Myers A.M., Nettleton D., Nguyen J., Penning B.W., Ponnala L., Schneider K.L., Schwartz D.C., Sharma A., Soderlund C., Springer N.M., Sun Q., Wang H., Waterman M., Westerman R., Wolfgruber T.K., Yang L., Yu Y., Zhang L., Zhou S., Zhu Q., Bennetzen J.L., Dawe R.K., Jiang J., Jiang N., Presting G.G., Wessler S.R., Aluru S., Martienssen R.A., Clifton S.W., McCombie W.R., Wing R.A., Wilson R.K. (2009) The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*. **326**, 1112–1115.
10. Schmutz J., Cannon S.B., Schlueter J., Ma J., Mitros T., Nelson W., Hyten D.L., Song Q., Thelen J.J., Cheng J., Xu D., Hellsten U., May G.D., Yu Y., Sakurai T., Umezawa T., Bhattacharyya M.K., Sandhu D., Valliyodan B., Lindquist E., Peto M., Grant D., Shu S., Goodstein D., Barry K., Futrell-Griggs M., Abernathy B., Du J., Tian Z., Zhu L., Gill N., Joshi T., Libault M., Sethuraman A., Zhang X.C., Shinozaki K., Nguyen H.T., Wing R.A., Cregan P., Specht J., Grimwood J., Rokhsar D., Stacey G., Shoemaker R.C., Jackson S.A. (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*. **463**, 178–183.
11. Reuter J.A., Spacek D.V., Snyder M.P. (2015) High-throughput sequencing technologies. *Mol. Cell*. **58**, 586–597.
12. Goodwin S., McPherson J.D., McCombie W.R. (2016) Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 333–351.
13. Li C., Lin F., An D., Wang W., Huang R. (2017) Genome sequencing and assembly by long reads in plants. *Genes*. **9**, 6.
14. Jiao W.B., Schneeberger K. (2017) The impact of third generation genomic technologies on plant genome assembly. *Curr. Opin. Plant Biol.* **36**, 64–70.
15. Jiao Y., Peluso P., Shi J., Liang T., Stitzer M.C., Wang B., Campbell M.S., Stein J.C., Wei X., Chin C.S., Guill K., Regulski M., Kumari S., Olson A., Gent J., Schneider K.L., Wolfgruber T.K., May M.R., Springer N.M., Antoniou E., McCombie W.R., Presting G.G., McMullen M., Ross-Ibarra J., Dawe R.K., Hastie A., Rank D.R., Ware D. (2017) Improved maize reference genome with single-molecule technologies. *Nature*. **546**, 524–527.
16. Li F.W., Harkess A. (2018) A guide to sequence your favorite plant genomes. *Appl. Plant Sci.* **6**, e1030.
17. Wenger A.M., Peluso P., Rowell W.J., Chang P.C., Hall R.J., Concepcion G.T., Ebler J., Fungtammasan A., Kolesnikov A., Olson N.D., Topfer A., Alonge M., Mahmoud M., Qian Y., Chin C.S., Phillippy A.M., Schatz M.C., Myers G., DePristo M.A., Ruan J., Marschall T., Sedlazeck F.J., Zook J.M., Li H., Koren S., Carroll A., Rank D.R., Hunkapiller M.W. (2019) Accurate circular consensus long-read sequencing improves variant detection and assembly of a human genome. *Nat. Biotechnol.* **37**, 1155–1162.
18. Sereika M., Kirkegaard R.H., Karst S.M., Michaelsen T.Y., Sørensen E.A., Wollenberg R.D., Albertsen M. (2021) Oxford Nanopore R10.4 long-read sequencing enables near-perfect bacterial genomes from pure cultures and metagenomes without short-read or reference polishing. *bioRxiv*. 2021.10.27.466057.
19. Брагина М.К., Афонников Д.А., Салина Е.А. (2019) Прогресс в секвенировании геномов растений – направления исследований. *Вавиловский журн. генет. селекции*. **23**, 38–48.
20. Chen F., Dong W., Zhang J., Guo X., Chen J., Wang Z., Lin Z., Tang H., Zhang L. (2018) The sequenced angiosperm genomes and genome databases. *Front. Plant Sci.* **9**, 418.
21. Kersey P.J. (2019) Plant genome sequences: past, present, future. *Curr. Opin. Plant Biology*. **48**, 1–8.
22. Lewin H.A., Graves J.A.M., Ryder O.A., Graphodatsky A.S., O'Brien S.J. (2019) Precision nomenclature for the new genomics. *GigaScience*. **8**, giz086.
23. Nurk S., Koren S., Rhie A., Rautiainen M., Bizkadze A.V., Mikheenko A., Vollger M.R., Altemose N., Uralsky L., Gershman A., Aganezov S., Hoyt S.J., Diekhans M., Logsdon G.A., Alonge M., Antonarakis S.E., Borchers M., Bouffard G.G., Brooks S.Y., Caldas G.V., Cheng H., Chin C.-S., Chow W., de Lima L.G., Dishuck P.C., Durbin R., Dvorkina T., Fiddes I.T., Formenti G., Fulton R.S., Fungtammasan A., Garrison E., Grady P.G.S., Graves-Lindsay T.A., Hall I.M., Hansen N.F., Hartley G.A., Haukness M., Howe K., Hunkapiller M.W., Jain C., Jain M., Jarvis E.D., Kerpedjiev P., Kirsche M., Kolmogorov M., Korlach J., Kremitzki M., Li H., Maduro V.V., Marschall T., McCartney A.M., McDaniel J., Miller D.E.,

- Mullikin J.C., Myers E.W., Olson N.D., Paten B., Peluso P., Pevzner P.A., Porubsky D., Potapova T., Rogaev E.I., Rosenfeld J.A., Salzberg S.L., Schneider V.A., Sedlazeck F.J., Shafin K., Shew C.J., Shumate A., Sims Y., Smit A.F.A., Soto D.C., Sović I., Storer J.M., Streets A., Sullivan B.A., Thibaud-Nissen F., Torrance J., Wagner J., Walenz B.P., Wenger A., Wood J.M.D., Xiao C., Yan S.M., Young A.C., Zarate S., Surti U., McCoy R.C., Dennis M.Y., Alexandrov I.A., Gerton J.L., O'Neill R.J., Timp W., Zook J.M., Schatz M.C., Eichler E.E., Miga K.H., Phillippy A.M. (2021) The complete sequence of a human genome. *bioRxiv*. 2021.05.26.445798.
24. Zwyrtkova J., Simkova H., Dolezel J. (2021) Chromosome genomics uncovers plant genome organization and function. *Biotechnol. Adv.* **46**, 107659.
25. Sun Y., Shang L., Zhu Q.H., Fan L., Guo L. (2021) Twenty years of plant genome sequencing: achievements and challenges. *Trends Plant Sci.* S1360-1385(21)00281-8.
26. Fleischmann A., Michael T.P., Rivadavia F., Sousa A., Wang W., Temsch E.M., Greilhuber J., Muller K.F., Heubl G. (2014) Evolution of genome size and chromosome number in the carnivorous plant genus *Genlisea* (Lentibulariaceae), with a new estimate of the minimum genome size in angiosperms. *Ann. Botany.* **114**, 1651–1663.
27. Hidalgo O., Pellicer J., Christenhusz M., Schneider H., Leitch A.R., Leitch I.J. (2017) Is there an upper limit to genome size? *Trends Plant Sci.* **22**, 567–573.
28. Adams K.L., Wendel J.F. (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 135–141.
29. Jung H., Winefield C., Bombarely A., Prentis P., Waterhouse P. (2019) Tools and strategies for long-read sequencing and *de novo* assembly of plant genomes. *Trends Plant Sci.* **24**, 700–724.
30. Thudi M., Khan A.W., Kumar V., Gaur P.M., Katta K., Garg V., Roorkiwal M., Samineni S., Varshney R.K. (2016) Whole genome re-sequencing reveals genome-wide variations among parental lines of 16 mapping populations in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC Plant Biol.* **16** Suppl. 1, 10.
31. Bayer P.E., Hurgobin B., Golicz A.A., Chan C.K., Yuan Y., Lee H., Renton M., Meng J., Li R., Long Y., Zou J., Bancroft I., Chalhoub B., King G.J., Batley J., Edwards D. (2017) Assembly and comparison of two closely related *Brassica napus* genomes. *Plant Biotechnol. J.* **15**, 1602–1610.
32. Schatz M.C., Maron L.G., Stein J.C., Hernandez Wences A., Gurtowski J., Biggers E., Lee H., Kramer M., Antoniou E., Ghiban E., Wright M.H., Chia J.M., Ware D., McCouch S.R., McCombie W.R. (2014) Whole genome *de novo* assemblies of three divergent strains of rice, *Oryza sativa*, document novel gene space of aus and indica. *Genome Biol.* **15**, 506.
33. Minio A., Lin J., Gaut B.S., Cantu D. (2017) How single molecule real-time sequencing and haplotype phasing have enabled reference-grade diploid genome assembly of wine grapes. *Front. Plant Sci.* **8**, 826.
34. Deamer D., Akeson M., Branton D. (2016) Three decades of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol.* **34**, 518–524.
35. Rhoads A., Au K.F. (2015) PacBio sequencing and its applications. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics.* **13**, 278–289.
36. van Dijk E.L., Jaszczyszyn Y., Naquin D., Thermes C. (2018) The third revolution in sequencing technology. *Trends Genet. TIG.* **34**, 666–681.
37. Payne A., Holmes N., Rakyán V., Loose M. (2019) BulkVis: a graphical viewer for Oxford nanopore bulk FAST5 files. *Bioinformatics.* **35**, 2193–2198.
38. De Coster W., Weissensteiner M.H., Sedlazeck F.J. (2021) Towards population-scale long-read sequencing. *Nat. Rev. Genetics.* **22**, 572–587.
39. Gouil Q., Keniry A. (2019) Latest techniques to study DNA methylation. *Essays Biochem.* **63**, 639–648.
40. Flusberg B.A., Webster D.R., Lee J.H., Travers K.J., Olivares E.C., Clark T.A., Korlach J., Turner S.W. (2010) Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nat. Meth.* **7**, 461–465.
41. Simpson J.T., Workman R.E., Zuzarte P.C., David M., Dursi L.J., Timp W. (2017) Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing. *Nat. Meth.* **14**, 407–410.
42. Rand A.C., Jain M., Eizenga J.M., Musselman-Brown A., Olsen H.E., Akeson M., Paten B. (2017) Mapping DNA methylation with high-throughput nanopore sequencing. *Nat. Meth.* **14**, 411–413.
43. Kumar S., Mohapatra T. (2021) Dynamics of DNA methylation and its functions in plant growth and development. *Front. Plant Sci.* **12**, 596236.
44. Ramos-Cruz D., Troyee A.N., Becker C. (2021) Epigenetics in plant organismic interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **61**, 102060.
45. Akhter Z., Bi Z., Ali K., Sun C., Fiaz S., Haider F.U., Bai J. (2021) In response to abiotic stress, DNA methylation confers epigenetic changes in plants. *Plants.* **10**, 1096.
46. Vaillancourt B., Buell C.R. (2019) High molecular weight DNA isolation method from diverse plant species for use with Oxford nanopore sequencing. *bioRxiv*. 783159.
47. Siadjeu C., Pucker B., Viehover P., Albach D.C., Weisshaar B. (2020) High contiguity *de novo* genome sequence assembly of trifoliolate yam (*Dioscorea dumetorum*) using long read sequencing. *Genes.* **11**, 274.
48. Krasnov G.S., Pushkova E.N., Novakovskiy R.O., Kudryavtseva L.P., Povkhova T.A., Dvorianinova E.M., Povkhova L.V., Kudryavtseva A.V., Dmitriev A.A., Melnikova N.V. (2020) High-quality genome assembly of *Fusarium oxysporum* f. sp. lini. *Front. Genet.* **11**, 959.
49. Dmitriev A.A., Pushkova E.N., Novakovskiy R.O., Beniaminov A.D., Rozhmina T.A., Zhuchenko A.A., Bolsheva N.L., Muravenko O.V., Povkhova L.V., Dvorianinova E.M., Kezimana P., Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V., Krasnov G.S., Melnikova N.V. (2020) Genome sequencing of fiber flax cultivar atlant using Oxford nanopore and illumina platforms. *Front Genet.* **11**, 590282.
50. Müller N.A., Kersten B., Leite Montalvão A.P., Mähler N., Bernhardsson C., Bräutigam K., Carracedo Lorenzo Z., Hoenicka H., Kumar V., Mader M.,

- Pakull B., Robinson K.M., Sabatti M., Vettori C., Ingvarsson P.K., Cronk Q., Street N.R., Fladung M. (2020) A single gene underlies the dynamic evolution of poplar sex determination. *Nat. Plants*. **6**, 630–637.
51. Schalamun M., Nagar R., Kainer D., Beavan E., Eccles D., Rathjen J.P., Lanfear R., Schwessinger B. (2019) Harnessing the MinION: an example of how to establish long-read sequencing in a laboratory using challenging plant tissue from *Eucalyptus pauciflora*. *Mol. Ecol. Resources*. **19**, 77–89.
 52. Zhang M., Zhang Y., Scheuring C.F., Wu C.C., Dong J.J., Zhang H.B. (2012) Preparation of megabase-sized DNA from a variety of organisms using the nuclei method for advanced genomics research. *Nat. Protocols*. **7**, 467–478.
 53. Li Z., Parris S., Saski C.A. (2020) A simple plant high-molecular-weight DNA extraction method suitable for single-molecule technologies. *Plant Meth.* **16**, 38.
 54. Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L., Imakaev M., Ragozy T., Telling A., Amit I., Lajoie B.R., Sabo P.J., Dorschner M.O., Sandstrom R., Bernstein B., Bender M.A., Groudine M., Gnirke A., Stamatoyannopoulos J., Mirny L.A., Lander E.S., Dekker J. (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*. **326**, 289–293.
 55. Yuan Y., Chung C.Y., Chan T.F. (2020) Advances in optical mapping for genomic research. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **18**, 2051–2062.
 56. Ma Z.S., Li L., Ye C., Peng M., Zhang Y.P. (2019) Hybrid assembly of ultra-long nanopore reads augmented with 10×-Genomics contigs: demonstrated with a human genome. *Genomics*. **111**, 1896–1901.
 57. Schmidt M.H., Vogel A., Denton A.K., Istace B., Wormit A., van de Geest H., Bolger M.E., Alseikh S., Mass J., Pfaff C., Schurr U., Chetelat R., Maumus F., Aury J.M., Koren S., Fernie A.R., Zamir D., Bolger A.M., Usadel B. (2017) *De novo* assembly of a new *Solanum pennellii* accession using nanopore sequencing. *Plant Cell*. **29**, 2336–2348.
 58. Michael T.P., Jupe F., Bemm F., Motley S.T., Sandoval J.P., Lanz C., Loudet O., Weigel D., Ecker J.R. (2018) High contiguity *Arabidopsis thaliana* genome assembly with a single nanopore flow cell. *Nat. Commun.* **9**, 541.
 59. Zimin A.V., Puiu D., Luo M.C., Zhu T., Koren S., Marcais G., Yorke J.A., Dvorak J., Salzberg S.L. (2017) Hybrid assembly of the large and highly repetitive genome of *Aegilops tauschii*, a progenitor of bread wheat, with the MaSuRCA mega-reads algorithm. *Genome Res.* **27**, 787–792.
 60. Zimin A.V., Stevens K.A., Crepeau M.W., Puiu D., Wegrzyn J.L., Yorke J.A., Langley C.H., Neale D.B., Salzberg S.L. (2017) An improved assembly of the loblolly pine mega-genome using long-read single-molecule sequencing. *GigaScience*. **6**, 1–4.
 61. Mondal T.K., Rawal H.C., Gaikwad K., Sharma T.R., Singh N.K. (2017) First *de novo* draft genome sequence of *Oryza coarctata*, the only halophytic species in the genus *Oryza*. *F1000Research*. **6**, 1750.
 62. Zhang H., Jain C., Aluru S. (2020) A comprehensive evaluation of long read error correction methods. *BMC genomics*. **21**, 889.
 63. Koren S., Walenz B.P., Berlin K., Miller J.R., Bergman N.H., Phillippy A.M. (2017) Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Res.* **27**, 722–736.
 64. Kolmogorov M., Yuan J., Lin Y., Pevzner P.A. (2019) Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat. Biotechnol.* **37**, 540–546.
 65. Shafin K., Pesout T., Lorig-Roach R., Haukness M., Olsen H.E., Bosworth C., Armstrong J., Tigyi K., Maurer N., Koren S., Sedlazeck F.J., Marschall T., Mayes S., Costa V., Zook J.M., Liu K.J., Kilburn D., Sorensen M., Munson K.M., Vollger M.R., Monlong J., Garrison E., Eichler E.E., Salama S., Haussler D., Green R.E., Akeson M., Phillippy A., Miga K.H., Carnevali P., Jain M., Paten B. (2020) Nanopore sequencing and the Shasta toolkit enable efficient *de novo* assembly of eleven human genomes. *Nat. Biotechnol.* **38**, 1044–1053.
 66. Ruan J., Li H. (2020) Fast and accurate long-read assembly with wtdbg2. *Nat. Meth.* **17**, 155–158.
 67. Nowoshilow S., Schloissnig S., Fei J.F., Dahl A., Pang A.W.C., Pippel M., Winkler S., Hastie A.R., Young G., Roscito J.G., Falcon F., Knapp D., Powell S., Cruz A., Cao H., Habermann B., Hiller M., Tanaka E.M., Myers E.W. (2018) The axolotl genome and the evolution of key tissue formation regulators. *Nature*. **554**, 50–55.
 68. Chin C.S., Peluso P., Sedlazeck F.J., Nattestad M., Concepcion G.T., Clum A., Dunn C., O'Malley R., Figueroa-Balderas R., Morales-Cruz A., Cramer G.R., Delledonne M., Luo C., Ecker J.R., Cantu D., Rank D.R., Schatz M.C. (2016) Phased diploid genome assembly with single-molecule real-time sequencing. *Nat. Meth.* **13**, 1050–1054.
 69. Li H. (2016) Minimap and miniasm: fast mapping and *de novo* assembly for noisy long sequences. *Bioinformatics*. **32**, 2103–2110.
 70. Vaser R., Šikić M. (2021) Time- and memory-efficient genome assembly with Raven. *Nat. Comput. Sci.* **1**, 332–336.
 71. Jayakumar V., Sakakibara Y. (2019) Comprehensive evaluation of non-hybrid genome assembly tools for third-generation PacBio long-read sequence data. *Brief. Bioinform.* **20**, 866–876.
 72. Murigneux V., Rai S.K., Furtado A., Bruxner T.J.C., Tian W., Harliwong I., Wei H., Yang B., Ye Q., Anderson E., Mao Q., Drmanac R., Wang O., Peters B.A., Xu M., Wu P., Topp B., Coin L.J.M., Henry R.J. (2020) Comparison of long-read methods for sequencing and assembly of a plant genome. *GigaScience*. **9**, giaa146.
 73. Dvorianinova E.M., Pushkova E.N., Novakovskiy R.O., Povkhova L.V., Bolsheva N.L., Kudryavtseva L.P., Rozhmina T.A., Melnikova N.V., Dmitriev A.A. (2021) Nanopore and Illumina genome sequencing of *Fusarium oxysporum* f. sp. lini strains of different virulence. *Front. Genet.* **12**, 662928.

74. Jung H., Jeon M.S., Hodgett M., Waterhouse P., Eyun S.I. (2020) Comparative evaluation of genome assemblers from long-read sequencing for plants and crops. *J. Agricult. Food Chem.* **68**, 7670–7677.
75. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. (2013) QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* **29**, 1072–1075.
76. Seppey M., Manni M., Zdobnov E.M. (2019) BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness. *Meth. Mol. Biol.* **1962**, 227–245.
77. Vaser R., Sovic I., Nagarajan N., Sikic M. (2017) Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. *Genome Res.* **27**, 737–746.
78. Walker B.J., Abeel T., Shea T., Priest M., Abouelliel A., Sakthikumar S., Cuomo C.A., Zeng Q., Wortman J., Young S.K., Earl A.M. (2014) Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One.* **9**, e112963.
79. Loman N.J., Quick J., Simpson J.T. (2015) A complete bacterial genome assembled *de novo* using only nanopore sequencing data. *Nat. Meth.* **12**, 733–735.
80. Melnikova N.V., Pushkova E.N., Dvorianinova E.M., Benjaminov A.D., Novakovskiy R.O., Povkhova L.V., Bolsheva N.L., Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V., Krasnov G.S., Dmitriev A.A. (2021) Genome assembly and sex-determining region of male and female *Populus × sibirica*. *Front. Plant Sci.* **12**, 625416.
81. Zhang X., Wu R., Wang Y., Yu J., Tang H. (2020) Unzipping haplotypes in diploid and polyploid genomes. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **18**, 66–72.
82. Roach M.J., Schmidt S.A., Borneman A.R. (2018) Purge Haplotigs: allelic contig reassignment for third-gen diploid genome assemblies. *BMC Bioinformatics.* **19**, 460.
83. Vekemans X., Castric V., Hipperson H., Muller N.A., Westerdahl H., Cronk Q. (2021) Whole-genome sequencing and genome regions of special interest: lessons from major histocompatibility complex, sex determination, and plant self-incompatibility. *Mol. Ecol.* **30**, 6072–6086.
84. Geraldine A., Hefer C.A., Capron A., Kolosova N., Martinez-Nunez F., Soolanayakanahally R.Y., Stanton B., Guy R.D., Mansfield S.D., Douglas C.J., Cronk Q.C. (2015) Recent Y chromosome divergence despite ancient origin of dioecy in poplars (*Populus*). *Mol. Ecol.* **24**, 3243–3256.
85. McKown A.D., Klapste J., Guy R.D., Soolanayakanahally R.Y., La Mantia J., Porth I., Skyba O., Unda F., Douglas C.J., El-Kassaby Y.A., Hamelin R.C., Mansfield S.D., Cronk Q.C.B. (2017) Sexual homomorphism in dioecious trees: extensive tests fail to detect sexual dimorphism in *Populus* (dagger). *Sci. Rep.* **7**, 1831.
86. Xue L., Wu H., Chen Y., Li X., Hou J., Lu J., Wei S., Dai X., Olson M.S., Liu J., Wang M., Charlesworth D., Yin T. (2020) Evidences for a role of two Y-specific genes in sex determination in *Populus deltoides*. *Nat. Commun.* **11**, 5893.
87. Zhou R., Macaya-Sanz D., Schmutz J., Jenkins J.W., Tuskan G.A., DiFazio S.P. (2020) Sequencing and analysis of the sex determination region of *Populus trichocarpa*. *Genes.* **11**, 843.
88. Yang W., Wang D., Li Y., Zhang Z., Tong S., Li M., Zhang X., Zhang L., Ren L., Ma X., Zhou R., Sanderson B.J., Keefeover-Ring K., Yin T., Smart L.B., Liu J., DiFazio S.P., Olson M., Ma T. (2021) A general model to explain repeated turnovers of sex determination in the Salicaceae. *Mol. Biol. Evol.* **38**, 968–980.
89. Nishiyama T., Sakayama H., de Vries J., Buschmann H., Saint-Marcoux D., Ullrich K.K., Haas F.B., Vanderstraeten L., Becker D., Lang D., Vosolsobe S., Rombaux S., Wilhelmsson P.K.I., Janitza P., Kern R., Heyl A., Rumpfer F., Villalobos L., Clay J.M., Skokan R., Toyoda A., Suzuki Y., Kagoshima H., Schijlen E., Tajeshwar N., Catarino B., Hetherington A.J., Saltykova A., Bonnot C., Breuninger H., Symeonidi A., Radhakrishnan G.V., Van Nieuwerburgh F., Deforce D., Chang C., Karol K.G., Hedrich R., Ulvskov P., Glockner G., Delwiche C.F., Petrusek J., Van de Peer Y., Friml J., Beilby M., Dolan L., Kohara Y., Sugano S., Fujiyama A., Delaux P.M., Quint M., Theissen G., Hagemann M., Harholt J., Dunand C., Zachgo S., Langdale J., Maumus F., Van Der Straeten D., Gould S.B., Rensing S.A. (2018) The *Chara* genome: secondary complexity and implications for plant terrestrialization. *Cell.* **174**, 448–464.
90. Hori K., Maruyama F., Fujisawa T., Togashi T., Yamamoto N., Seo M., Sato S., Yamada T., Mori H., Tajima N., Moriyama T., Ikeuchi M., Watanabe M., Wada H., Kobayashi K., Saito M., Masuda T., Sasaki-Sekimoto Y., Mashiguchi K., Awai K., Shimojima M., Masuda S., Iwai M., Nobusawa T., Narise T., Kondo S., Saito H., Sato R., Murakawa M., Ihara Y., Oshima-Yamada Y., Ohtaka K., Satoh M., Sonobe K., Ishii M., Ohtani R., Kanamori-Sato M., Honoki R., Miyazaki D., Mochizuki H., Umetsu J., Higashi K., Shibata D., Kamiya Y., Sato N., Nakamura Y., Tabata S., Ida S., Kurokawa K., Ohta H. (2014) *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nat. Commun.* **5**, 3978.
91. Banks J.A., Nishiyama T., Hasebe M., Bowman J.L., Gribskov M., dePamphilis C., Albert V.A., Aono N., Aoyama T., Ambrose B.A., Ashton N.W., Axtell M.J., Barker E., Barker M.S., Bennetzen J.L., Bonawitz N.D., Chapple C., Cheng C., Correa L.G., Dacre M., DeBarry J., Dreyer I., Elias M., Engstrom E.M., Estelle M., Feng L., Finet C., Floyd S.K., Frommer W.B., Fujita T., Gramzow L., Gutensohn M., Harholt J., Hattori M., Heyl A., Hirai T., Hiwatahi Y., Ishikawa M., Iwata M., Karol K.G., Koehler B., Kolukisaoglu U., Kubo M., Kurata T., Lalonde S., Li K., Li Y., Litt A., Lyons E., Manning G., Maruyama T., Michael T.P., Mikami K., Miyazaki S., Morinaga S., Murata T., Mueller-Roeber B., Nelson D.R., Obara M., Oguri Y., Olmstead R.G., Onodera N., Petersen B.L., Pils B., Prigge M., Rensing S.A., Riano-Pachon D.M., Roberts A.W., Sato Y., Scheller H.V., Schulz B., Schulz C., Shakirov E.V., Shibagaki N., Shinohara N., Shippen D.E., Sorensen I., Sotooka R., Sugimoto N., Sugita M., Sumikawa N., Tanurdzic M., Theissen G., Ulvskov P., Wakazuki S., Weng J.K., Willats W.W., Wipf D., Wolf P.G., Yang L., Zimmer A.D., Zhu Q., Mitros T., Hellsten U., Loque D., Otiilar R., Salamov A., Schmutz J., Shapiro H., Lindquist E., Lucas S., Rokhsar D., Grigoriev I.V. (2011) The *Selaginella* ge-

- nome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science*. **332**, 960–963.
92. Lang D., Ullrich K.K., Murat F., Fuchs J., Jenkins J., Haas F.B., Piednoel M., Gundlach H., Van Bel M., Meyberg R., Vives C., Morata J., Symeonidi A., Hiss M., Muchero W., Kamisugi Y., Saleh O., Blanc G., Decker E.L., van Gessel N., Grimwood J., Hayes R.D., Graham S.W., Gunter L.E., McDaniel S.F., Hoernstein S.N.W., Larsson A., Li F.W., Perroud P.F., Phillips J., Ranjan P., Rokshar D.S., Rothfels C.J., Schneider L., Shu S., Stevenson D.W., Thummmler F., Tillich M., Villarreal Aguilar J.C., Widiez T., Wong G.K., Wymore A., Zhang Y., Zimmer A.D., Quatrano R.S., Mayer K.F.X., Goodstein D., Casacuberta J.M., Vandepoele K., Reski R., Cuming A.C., Tuskan G.A., Maumus F., Salse J., Schmutz J., Rensing S.A. (2018) The *Physcomitrella patens* chromosome-scale assembly reveals moss genome structure and evolution. *Plant J.: Cell Mol. Biol.* **93**, 515–533.
 93. Li F.W., Brouwer P., Carretero-Paulet L., Cheng S., de Vries J., Delaux P.M., Eily A., Koppers N., Kuo L.Y., Li Z., Simenc M., Small I., Wafula E., Angarita S., Barker M.S., Brautigam A., dePamphilis C., Gould S., Hosmani P.S., Huang Y.M., Huettel B., Kato Y., Liu X., Maere S., McDowell R., Mueller L.A., Nierop K.G.J., Rensing S.A., Robison T., Rothfels C.J., Sigel E.M., Song Y., Timilsena P.R., Van de Peer Y., Wang H., Wilhelmsson P.K.I., Wolf P.G., Xu X., Der J.P., Schluempmann H., Wong G.K., Pryer K.M. (2018) Fern genomes elucidate land plant evolution and cyanobacterial symbioses. *Nat. Plants*. **4**, 460–472.
 94. Wang S., Li L., Li H., Sahu S.K., Wang H., Xu Y., Xian W., Song B., Liang H., Cheng S., Chang Y., Song Y., Cebi Z., Wittek S., Reder T., Peterson M., Yang H., Wang J., Melkonian B., Van de Peer Y., Xu X., Wong G.K., Melkonian M., Liu H., Liu X. (2020) Genomes of early-diverging streptophyte algae shed light on plant terrestrialization. *Nat. Plants*. **6**, 95–106.
 95. Li F.W., Nishiyama T., Waller M., Frangedakis E., Keller J., Li Z., Fernandez-Pozo N., Barker M.S., Bennett T., Blazquez M.A., Cheng S., Cuming A.C., de Vries J., de Vries S., Delaux P.M., Diop I.S., Harrison C.J., Hauser D., Hernandez-Garcia J., Kirbis A., Meeks J.C., Monte I., Mutte S.K., Neubauer A., Quandt D., Robison T., Shimamura M., Rensing S.A., Villarreal J.C., Weijers D., Wicke S., Wong G.K., Sakakibara K., Szovenyi P. (2020) Anthoceros genomes illuminate the origin of land plants and the unique biology of hornworts. *Nat. Plants*. **6**, 259–272.
 96. Zhang J., Fu X.X., Li R.Q., Zhao X., Liu Y., Li M.H., Zwaenepoel A., Ma H., Goffinet B., Guan Y.L., Xue J.Y., Liao Y.Y., Wang Q.F., Wang Q.H., Wang J.Y., Zhang G.Q., Wang Z.W., Jia Y., Wang M.Z., Dong S.S., Yang J.F., Jiao Y.N., Guo Y.L., Kong H.Z., Lu A.M., Yang H.M., Zhang S.Z., Van de Peer Y., Liu Z.J., Chen Z.D. (2020) The hornwort genome and early land plant evolution. *Nat. Plants*. **6**, 107–118.
 97. Liu H., Wang X., Wang G., Cui P., Wu S., Ai C., Hu N., Li A., He B., Shao X., Wu Z., Feng H., Chang Y., Mu D., Hou J., Dai X., Yin T., Ruan J., Cao F. (2021) The nearly complete genome of *Ginkgo biloba* illuminates gymnosperm evolution. *Nat. Plants*. **7**, 748–756.
 98. Yang Y., Sun P., Lv L., Wang D., Ru D., Li Y., Ma T., Zhang L., Shen X., Meng F., Jiao B., Shan L., Liu M., Wang Q., Qin Z., Xi Z., Wang X., Davis C.C., Liu J. (2020) Prickly waterlily and rigid hornwort genomes shed light on early angiosperm evolution. *Nat. Plants*. **6**, 215–222.
 99. Zhang L., Chen F., Zhang X., Li Z., Zhao Y., Lohaus R., Chang X., Dong W., Ho S.Y.W., Liu X., Song A., Chen J., Guo W., Wang Z., Zhuang Y., Wang H., Chen X., Hu J., Liu Y., Qin Y., Wang K., Dong S., Liu Y., Zhang S., Yu X., Wu Q., Wang L., Yan X., Jiao Y., Kong H., Zhou X., Yu C., Chen Y., Li F., Wang J., Chen W., Chen X., Jia Q., Zhang C., Jiang Y., Zhang W., Liu G., Fu J., Chen F., Ma H., Van de Peer Y., Tang H. (2020) The water lily genome and the early evolution of flowering plants. *Nature*. **577**, 79–84.
 100. Szovenyi P., Gunadi A., Li F.W. (2021) Charting the genomic landscape of seed-free plants. *Nat. Plants*. **7**, 554–565.
 101. De La Torre A.R., Piot A., Liu B., Wilhite B., Weiss M., Porth I. (2020) Functional and morphological evolution in gymnosperms: a portrait of implicated gene families. *Evol. Appl.* **13**, 210–227.
 102. Zhao T., Zwaenepoel A., Xue J.Y., Kao S.M., Li Z., Schranz M.E., Van de Peer Y. (2021) Whole-genome microsynteny-based phylogeny of angiosperms. *Nat. Commun.* **12**, 3498.
 103. He Z., Ji R., Havlickova L., Wang L., Li Y., Lee H.T., Song J., Koh C., Yang J., Zhang M., Parkin I.A.P., Wang X., Edwards D., King G.J., Zou J., Liu K., Snowdon R.J., Banga S.S., Machackova I., Bancroft I. (2021) Genome structural evolution in *Brassica* crops. *Nat. Plants*. **7**, 757–765.
 104. Perumal S., Koh C.S., Jin L., Buchwaldt M., Higgins E.E., Zheng C., Sankoff D., Robinson S.J., Kagale S., Navabi Z.K., Tang L., Horner K.N., He Z., Bancroft I., Chalhoub B., Sharpe A.G., Parkin I.A.P. (2020) A high-contiguity *Brassica nigra* genome localizes active centromeres and defines the ancestral *Brassica* genome. *Nat. Plants*. **6**, 929–941.
 105. Lewin H.A., Robinson G.E., Kress W.J., Baker W.J., Coddington J., Crandall K.A., Durbin R., Edwards S.V., Forest F., Gilbert M.T.P., Goldstein M.M., Grigoriev I.V., Hackett K.J., Haussler D., Jarvis E.D., Johnson W.E., Patrinos A., Richards S., Castilla-Rubio J.C., van Sluys M.A., Soltis P.S., Xu X., Yang H., Zhang G. (2018) Earth BioGenome Project: sequencing life for the future of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **115**, 4325–4333.
 106. Exposito-Alonso M., Drost H.G., Burbano H.A., Weigel D. (2020) The Earth BioGenome project: opportunities and challenges for plant genomics and conservation. *Plant J.: Cell Mol. Biol.* **102**, 222–229.
 107. Tettelin H., Masignani V., Cieslewicz M.J., Donati C., Medini D., Ward N.L., Angiuoli S.V., Crabtree J., Jones A.L., Durkin A.S., Deboy R.T., Davidsen T.M., Mora M., Scarselli M., Margarit y Ros I., Peterson J.D., Hauser C.R., Sundaram J.P., Nelson W.C., Madupu R., Brinkac L.M., Dodson R.J., Rosovitz M.J., Sullivan S.A., Daugherty S.C., Haft D.H., Selengut J., Gwinn M.L., Zhou L., Zafar N., Khouri H., Radune D., Dimitrov G., Watkins K., O'Connor K.J., Smith S., Utterback T.R., White O., Rubens C.E.,

- Grandi G., Madoff L.C., Kasper D.L., Telford J.L., Wessels M.R., Rappuoli R., Fraser C.M. (2005) Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 13950–13955.
108. Golicz A.A., Bayer P.E., Bhalla P.L., Batley J., Edwards D. (2020) Pangenomics comes of age: from bacteria to plant and animal applications. *Trends Genet. TIG*. **36**, 132–145.
109. Ho S.S., Urban A.E., Mills R.E. (2020) Structural variation in the sequencing era. *Nat. Rev. Genet.* **21**, 171–189.
110. Li Y.H., Zhou G., Ma J., Jiang W., Jin L.G., Zhang Z., Guo Y., Zhang J., Sui Y., Zheng L., Zhang S.S., Zuo Q., Shi X.H., Li Y.F., Zhang W.K., Hu Y., Kong G., Hong H.L., Tan B., Song J., Liu Z.X., Wang Y., Ruan H., Yeung C.K., Liu J., Wang H., Zhang L.J., Guan R.X., Wang K.J., Li W.B., Chen S.Y., Chang R.Z., Jiang Z., Jackson S.A., Li R., Qiu L.J. (2014) *De novo* assembly of soybean wild relatives for pan-genome analysis of diversity and agronomic traits. *Nat. Biotechnol.* **32**, 1045–1052.
111. Anderson J.E., Kantar M.B., Kono T.Y., Fu F., Stec A.O., Song Q., Cregan P.B., Specht J.E., Diers B.W., Cannon S.B., McHale L.K., Stupar R.M. (2014) A roadmap for functional structural variants in the soybean genome. *GS*. **4**, 1307–1318.
112. Tao Y., Zhao X., Mace E., Henry R., Jordan D. (2019) Exploring and exploiting pan-genomics for crop improvement. *Mol. Plant*. **12**, 156–169.
113. Swinnen G., Goossens A., Pauwels L. (2016) Lessons from domestication: targeting *cis*-regulatory elements for crop improvement. *Trends Plant Sci.* **21**, 506–515.
114. Gao L., Gonda I., Sun H., Ma Q., Bao K., Tieman D.M., Burzynski-Chang E.A., Fish T.L., Stromberg K.A., Sacks G.L., Thannhauser T.W., Foolad M.R., Diez M.J., Blanca J., Canizares J., Xu Y., van der Knaap E., Huang S., Klee H.J., Giovannoni J.J., Fei Z. (2019) The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor. *Nat. Genet.* **51**, 1044–1051.
115. Rancati G., Moffat J., Typas A., Pavelka N. (2018) Emerging and evolving concepts in gene essentiality. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 34–49.
116. Bayer P.E., Golicz A.A., Scheben A., Batley J., Edwards D. (2020) Plant pan-genomes are the new reference. *Nat. Plants*. **6**, 914–920.
117. Zhou Y., Chebotarov D., Kudrna D., Llaca V., Lee S., Rajasekar S., Mohammed N., Al-Bader N., Sobel-Sorenson C., Parakkal P., Arbelaez L.J., Franco N., Alexandrov N., Hamilton N.R.S., Leung H., Mauleon R., Lorieux M., Zuccolo A., McNally K., Zhang J., Wing R.A. (2020) A platinum standard pan-genome resource that represents the population structure of Asian rice. *Sci. Data*. **7**, 113.
118. Wang W., Mauleon R., Hu Z., Chebotarov D., Tai S., Wu Z., Li M., Zheng T., Fuentes R.R., Zhang F., Mansueto L., Copetti D., Sanciangco M., Palis K.C., Xu J., Sun C., Fu B., Zhang H., Gao Y., Zhao X., Shen F., Cui X., Yu H., Li Z., Chen M., Detras J., Zhou Y., Zhang X., Zhao Y., Kudrna D., Wang C., Li R., Jia B., Lu J., He X., Dong Z., Xu J., Li Y., Wang M., Shi J., Li J., Zhang D., Lee S., Hu W., Poliakov A., Dubchak I., Ulat V.J., Borja F.N., Mendoza J.R., Ali J., Li J., Gao Q., Niu Y., Yue Z., Naredo M.E.B., Talag J., Wang X., Li J., Fang X., Yin Y., Glaszmann J.C., Zhang J., Li J., Hamilton R.S., Wing R.A., Ruan J., Zhang G., Wei C., Alexandrov N., McNally K.L., Li Z., Leung H. (2018) Genomic variation in 3,010 diverse accessions of Asian cultivated rice. *Nature*. **557**, 43–49.
119. Zhao Q., Feng Q., Lu H., Li Y., Wang A., Tian Q., Zhan Q., Lu Y., Zhang L., Huang T., Wang Y., Fan D., Zhao Y., Wang Z., Zhou C., Chen J., Zhu C., Li W., Weng Q., Xu Q., Wang Z.X., Wei X., Han B., Huang X. (2018) Pan-genome analysis highlights the extent of genomic variation in cultivated and wild rice. *Nat. Genet.* **50**, 278–284.
120. Walkowiak S., Gao L., Monat C., Haberer G., Kassa M.T., Brinton J., Ramirez-Gonzalez R.H., Kolodziej M.C., Delorean E., Thambugala D., Klymiuk V., Byrns B., Gundlach H., Bandi V., Siri J.N., Nilsen K., Aquino C., Himmelbach A., Copetti D., Ban T., Venturini L., Bevan M., Clavijo B., Koo D.H., Ens J., Wiebe K., N'Diaye A., Fritz A.K., Gutwin C., Fiebig A., Fosker C., Fu B.X., Accinelli G.G., Gardner K.A., Fradgley N., Gutierrez-Gonzalez J., Halstead-Nussloch G., Hatakeyama M., Koh C.S., Deek J., Costamagna A.C., Fobert P., Heavens D., Kanamori H., Kawaura K., Kobayashi F., Krasileva K., Kuo T., McKenzie N., Murata K., Nabeka Y., Paape T., Padmarasu S., Percival-Alwyn L., Kagale S., Scholz U., Sese J., Juliana P., Singh R., Shimizu-Inatsugi R., Swarbreck D., Cockram J., Budak H., Tameshige T., Tanaka T., Tsuji H., Wright J., Wu J., Steuernagel B., Small I., Cloutier S., Keeble-Gagnere G., Muehlbauer G., Tibbets J., Nasuda S., Melonek J., Hucl P.J., Sharpe A.G., Clark M., Legg E., Bharti A., Langridge P., Hall A., Uauy C., Mascher M., Krattinger S.G., Handa H., Shimizu K.K., Distelfeld A., Chalmers K., Keller B., Mayer K.F.X., Poland J., Stein N., McCarty C.A., Spannagl M., Wicker T., Pozniak C.J. (2020) Multiple wheat genomes reveal global variation in modern breeding. *Nature*. **588**, 277–283.
121. Montenegro J.D., Golicz A.A., Bayer P.E., Hurgobin B., Lee H., Chan C.K., Visendi P., Lai K., Dolezel J., Batley J., Edwards D. (2017) The pangenome of hexaploid bread wheat. *Plant J.: Cell Mol. Biol.* **90**, 1007–1013.
122. Jayakodi M., Padmarasu S., Haberer G., Bonthala V.S., Gundlach H., Monat C., Lux T., Kamal N., Lang D., Himmelbach A., Ens J., Zhang X.Q., Angessa T.T., Zhou G., Tan C., Hill C., Wang P., Schreiber M., Boston L.B., Plott C., Jenkins J., Guo Y., Fiebig A., Budak H., Xu D., Zhang J., Wang C., Grimwood J., Schmutz J., Guo G., Zhang G., Mochida K., Hirayama T., Sato K., Chalmers K.J., Langridge P., Waugh R., Pozniak C.J., Scholz U., Mayer K.F.X., Spannagl M., Li C., Mascher M., Stein N. (2020) The barley pangenome reveals the hidden legacy of mutation breeding. *Nature*. **588**, 284–289.
123. Hufford M.B., Seetharam A.S., Woodhouse M.R., Chougule K.M., Ou S., Liu J., Ricci W.A., Guo T., Olson A., Qiu Y., Della Coletta R., Tittes S., Hudson A.I., Marand A.P., Wei S., Lu Z., Wang B., Tello-Ruiz M.K., Piri R.D., Wang N., Kim D.W., Zeng Y., O'Connor C.H.,

- Li X., Gilbert A.M., Baggs E., Krasileva K.V., Portwood J.L., 2nd, Cannon E.K.S., Andorf C.M., Manchanda N., Snodgrass S.J., Hufnagel D.E., Jiang Q., Pedersen S., Syring M.L., Kudrna D.A., Llaca V., Fengler K., Schmitz R.J., Ross-Ibarra J., Yu J., Gent J.I., Hirsch C.N., Ware D., Dawe R.K. (2021) *De novo* assembly, annotation, and comparative analysis of 26 diverse maize genomes. *Science*. **373**, 655–662.
124. Song J.M., Guan Z., Hu J., Guo C., Yang Z., Wang S., Liu D., Wang B., Lu S., Zhou R., Xie W.Z., Cheng Y., Zhang Y., Liu K., Yang Q.Y., Chen L.L., Guo L. (2020) Eight high-quality genomes reveal pan-genome architecture and ecotype differentiation of *Brassica napus*. *Nat. Plants*. **6**, 34–45.
125. Liu Y., Du H., Li P., Shen Y., Peng H., Liu S., Zhou G.A., Zhang H., Liu Z., Shi M., Huang X., Li Y., Zhang M., Wang Z., Zhu B., Han B., Liang C., Tian Z. (2020) Pan-genome of wild and cultivated soybeans. *Cell*. **182**, 162–176.
126. Gordon S.P., Contreras-Moreira B., Woods D.P., Des Marais D.L., Burgess D., Shu S., Stritt C., Roulin A.C., Schackwitz W., Tyler L., Martin J., Lipzen A., Dochy N., Phillips J., Barry K., Geuten K., Budak H., Juenger T.E., Amasino R., Caicedo A.L., Goodstein D., Davidson P., Mur L.A.J., Figueroa M., Freeling M., Catalan P., Vogel J.P. (2017) Extensive gene content variation in the *Brachypodium distachyon* pan-genome correlates with population structure. *Nat. Commun.* **8**, 2184.
127. Della Coletta R., Qiu Y., Ou S., Hufford M.B., Hirsch C.N. (2021) How the pan-genome is changing crop genomics and improvement. *Genome Biol.* **22**, 3.
128. Syme R.A., Tan K.C., Rybak K., Friesen T.L., McDonald B.A., Oliver R.P., Hane J.K. (2018) Pan-parastagonospora comparative genome analysis-effector prediction and genome evolution. *Genome Biol. Evol.* **10**, 2443–2457.
129. Plissonneau C., Hartmann F.E., Croll D. (2018) Pangenome analyses of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* reveal the structural basis of a highly plastic eukaryotic genome. *BMC Biol.* **16**, 5.
130. Badet T., Oggenfuss U., Abraham L., McDonald B.A., Croll D. (2020) A 19-isolate reference-quality global pangenome for the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *BMC Biol.* **18**, 12.
131. Gage J.L., Vaillancourt B., Hamilton J.P., Manrique-Carpintero N.C., Gustafson T.J., Barry K., Lipzen A., Tracy W.F., Mikel M.A., Kaeppler S.M., Buell C.R., de Leon N. (2019) Multiple maize reference genomes impact the identification of variants by genome-wide association study in a diverse inbred panel. *Plant Genome*. **12**, 1–12.
132. Понажев В.П., Рожмина Т.А., Тихомирова В.Я. (2011) *Инновационные разработки — льноводству: Селекция, семеноводство, возделывание, первичная обработка, экономика*. Тверь: Твер. гос.ун-т.
133. Jung S., Lee T., Gasic K., Campbell B.T., Yu J., Humann J., Ru S., Edge-Garza D., Hough H., Main D. (2021) The Breeding Information Management System (BIMS): an online resource for crop breeding. *Database: J. Biol. Databases Curation*. **2021**, baab054.
134. Liu J., Fernie A.R., Yan J. (2021) Crop breeding — from experience-based selection to precision design. *J. Plant Physiol.* **256**, 153313.
135. Furbank R.T., Jimenez-Berni J.A., George-Jaeggli B., Potgieter A.B., Deery D.M. (2019) Field crop phenomics: enabling breeding for radiation use efficiency and biomass in cereal crops. *New Phytologist*. **223**, 1714–1727.
136. Winter P., Kahl G. (1995) Molecular marker technologies for plant improvement. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 438–448.
137. Andersen J.R., Lubberstedt T. (2003) Functional markers in plants. *Trends Plant Sci.* **8**, 554–560.
138. Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. (2005) Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends Plant Sci.* **10**, 621–630.
139. Thudi M., Palakurthi R., Schnable J.C., Chitikineni A., Dreisigacker S., Mace E., Srivastava R.K., Satyavathi C.T., Odeny D., Tiwari V.K., Lam H.M., Hong Y.B., Singh V.K., Li G., Xu Y., Chen X., Kaila S., Nguyen H., Sivasankar S., Jackson S.A., Close T.J., Shubo W., Varshney R.K. (2021) Genomic resources in plant breeding for sustainable agriculture. *J. Plant Physiol.* **257**, 153351.
140. Salgotra R.K., Stewart C.N., Jr. (2020) Functional markers for precision plant breeding. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4792.
141. Tibbs Cortes L., Zhang Z., Yu J. (2021) Status and prospects of genome-wide association studies in plants. *Plant Genome*. **14**, e20077.
142. Desta Z.A., Ortiz R. (2014) Genomic selection: genome-wide prediction in plant improvement. *Trends Plant Sci.* **19**, 592–601.
143. Crossa J., Perez-Rodriguez P., Cuevas J., Montesinos-Lopez O., Jarquin D., de Los Campos G., Burgueno J., Gonzalez-Camacho J.M., Perez-Elizalde S., Beyene Y., Dreisigacker S., Singh R., Zhang X., Gowda M., Roorkiwal M., Rutkoski J., Varshney R.K. (2017) Genomic selection in plant breeding: methods, models, and perspectives. *Trends Plant Sci.* **22**, 961–975.
144. Розанова И.В., Хлесткина Е.К. (2020) NGS-секвенирование в селекционно-генетических исследованиях ячменя. *Вавиловский журн. генет. селекции*. **24**, 348–355.
145. Gupta P.K., Kulwal P.L., Jaiswal V. (2019) Association mapping in plants in the post-GWAS genomics era. *Adv. Genetics*. **104**, 75–154.
146. You F.M., Cloutier S. (2020) Mapping quantitative trait loci onto chromosome-scale pseudomolecules in flax. *Meth. Protocols*. **3**, 28.
147. Lai J., Li R., Xu X., Jin W., Xu M., Zhao H., Xiang Z., Song W., Ying K., Zhang M., Jiao Y., Ni P., Zhang J., Li D., Guo X., Ye K., Jian M., Wang B., Zheng H., Liang H., Zhang X., Wang S., Chen S., Li J., Fu Y., Springer N.M., Yang H., Wang J., Dai J., Schnable P.S., Wang J. (2010) Genome-wide patterns of genetic variation among elite maize inbred lines. *Nat. Genetics*. **42**, 1027–1030.
148. Darracq A., Vitte C., Nicolas S., Duarte J., Pichon J.P., Mary-Huard T., Chevalier C., Berard A., Le Paslier M.C., Rogowsky P., Charcosset A., Joets J. (2018) Sequence analysis of European maize inbred line F2 provides new insights into molecular and chromosomal characteristics of presence/absence variants. *BMC Genomics*. **19**, 119.

PLANT GENOME SEQUENCING: MODERN TECHNOLOGIES AND NOVEL OPPORTUNITIES FOR BREEDING

A. A. Dmitriev¹, E. N. Pushkova¹, and N. V. Melnikova¹, *

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

*e-mail: mnv-4529264@yandex.ru

The investigation of plant genomes is of great importance for basic research and practical breeding. In 1977, F. Sanger proposed a DNA sequencing method, which allowed the complete sequences of a number of genomes to be determined. Then high-throughput and cost-effective next-generation/second-generation sequencing methods, producing up to billions of short reads, made it possible to sequence genomes of a significant number of species and provided a breakthrough in plant genetic studies. Finally, third-generation sequencing technologies allowed the determination of single-molecule sequences up to a million nucleotides in length, which is key for high-quality genome assemblies. An important task is to obtain a pan-genome, which includes an entire set of nucleotide sequences presented in various genotypes of the same species. The sequencing of plant genomes made it possible to assess intraspecific polymorphism, identify key genes influencing the formation of significant features, and develop molecular markers of economically valuable traits and became the basis for the development of marker-assisted and genomic selection. This review provides information on the latest advances in sequencing technologies and assembly of plant genomes, as well as the opportunities that they open up for basic and applied works.

Keywords: plants, genome, pan-genome, sequencing, breeding

УДК 577.2:616_-006:578.828

ФАКТОР РЕСТРИКЦИИ ВИЧ АРОВЕС3G И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

© 2022 г. А. С. Тихонов^{а, *}, Р. Р. Минтаев^{а, b}, Д. В. Глазкова^а,
Е. В. Богословская^а, Г. А. Шипулин^а

^аЦентр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью
Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119833 Россия

^bНаучно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, 105064 Россия
*e-mail: andrey.tikhonov97@gmail.com

Поступила в редакцию 27.11.2021 г.

После доработки 11.02.2022 г.

Принята к публикации 17.02.2022 г.

Механизмы защиты организма человека от вирусных или бактериальных агентов чрезвычайно разнообразны. В одном из таких механизмов важная роль принадлежит семейству цитидиндезаминаз АРОВЕС3, которые являются факторами врожденного иммунитета и защищают организм от многочисленных вирусных агентов. Один из белков этого семейства – АРОВЕС3G – способен защищать от вируса иммунодефицита человека типа 1 в отсутствие вирусного белка Vif. В свою очередь, Vif противостоит действию АРОВЕС3G, вызывая его полиубиквитинирование и деградацию в протеасоме. В обзоре описаны возможные пути увеличения анти-ВИЧ-активности АРОВЕС3G, придания ему устойчивости к вирусному белку Vif, а также потенциальные подходы к использованию модифицированного АРОВЕС3G в генотерапии ВИЧ-инфекции.

Ключевые слова: АРОВЕС3G, АРОВЕС3G-D128K, генная терапия, ВИЧ-инфекция, Vif

DOI: 10.31857/S0026898422040115

ВВЕДЕНИЕ

Течение ВИЧ-инфекции в настоящее время успешно контролируется при помощи высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ), которая подавляет репликацию вируса и снижает вирусную нагрузку, что существенно замедляет развитие СПИДа и препятствует дальнейшему распространению вируса [1]. Однако ВААРТ не способна полностью избавить организм от ВИЧ, поскольку остаются латентно инфицированные клетки, репликация вируса в которых возобновляется при отмене терапии. Длительный прием препаратов приводит к появлению побочных эффектов и развитию лекарственной резистентности, что делает необходимым изменение схемы лечения [2].

Очевидна необходимость в поиске подходов, которые позволят сдерживать репликацию ВИЧ при отсутствии постоянной антиретровирусной терапии или даже полностью элиминируют вирус из организма. Один из таких подходов – модификация присутствующих в клетках-мишенях факторов рестрикции ВИЧ, направленная на придание им большей эффективности, таких как TRIM5a, SAMHD1, IFITM, TETHRIN, MARCH8,

АРОВЕС3G и других [3–8]. Довольно много исследований посвящено белку TRIM5α, механизмам рестрикции и способам повышения его активности в отношении ВИЧ [9–11]. Ведутся работы по созданию на его основе генно-терапевтического препарата [12]. В настоящем обзоре рассмотрен другой перспективный фактор рестрикции – белок семейства АРОВЕС3, участвующего во врожденном противовирусном иммунном ответе [13, 14]. Белки этого семейства способны дезаминировать вирусную одноцепочечную ДНК, приводя к гипермутациям вирусного генома и делая вирус нежизнеспособным [15–18].

Настоящий обзор посвящен фактору рестрикции АРОВЕС3G, так как многочисленные исследования показывают, что из всего семейства АРОВЕС3 наибольший вклад в подавление репликации ВИЧ вносит именно белок АРОВЕС3G [19–21].

МЕХАНИЗМ АНТИ-ВИЧ-АКТИВНОСТИ АРОВЕС3G

Попадая в организм человека, ВИЧ поражает в основном CD4⁺ лимфоциты, а также макрофаги, моноциты и некоторые другие популяции клеток. Жизненный цикл этого вируса состоит из не-

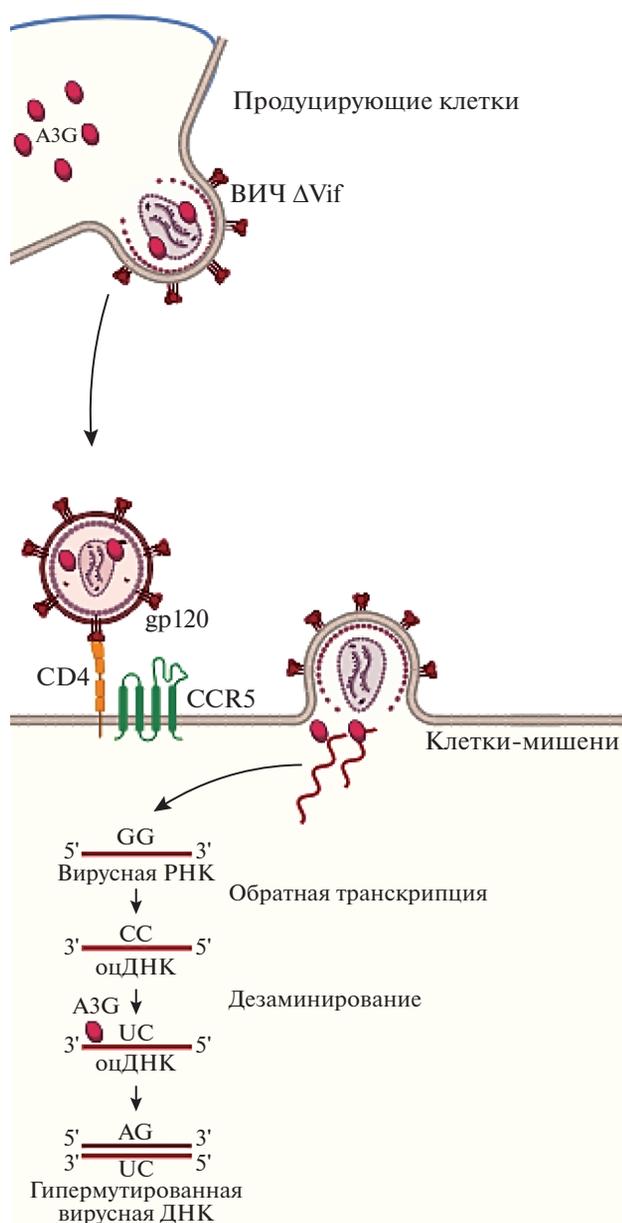


Рис. 1. Ингибирование репликации ВИЧ в отсутствие функционального белка Vif. В зараженных клетках в отсутствие вирусного фактора Vif белок АРОВЕС3G упаковывается в вирион ВИЧ. Гликопротеин gp120 связывается с рецептором CD4 и корецептором CCR5, что индуцирует слияние клеточной и вирусной мембран. После проникновения вируса в клетку ревертаза ВИЧ синтезирует вирусную ДНК на матрице РНК. В это время АРОВЕС3G дезаминирует остатки цитозина в первой цепи ДНК вируса, что в дальнейшем приводит к множественным заменам гуанина на аденин.

скольких ключевых стадий, блокирование которых может быть использовано в борьбе с ним. Для входа в клетку вирусные частицы, на поверхности которых находится белок оболочки Env (гликопро-

теин gp120), взаимодействуют с клеточным рецептором CD4 и одним из корецепторов CCR5 или CXCR4. После слияния мембран образуется предынтеграционный комплекс и начинается процесс обратной транскрипции вирусной РНК. Предынтеграционный комплекс транспортируется в ядро, где провирусная ДНК встраивается в геном клетки-хозяина. Провирусная ДНК служит матрицей для синтеза нескольких форм вирусных РНК, одни из которых транскрибируются в вирусные белки, а другие упаковываются в вирусные частицы. После упаковки полноразмерных вирусных РНК в капсид от мембраны клетки-хозяина отпочковываются новые вирионы, которые представляют собой капсиды в оболочке, сформированной из клеточной мембраны [22, 23].

Понимание механизма действия АРОВЕС3G на ВИЧ пришло после обнаружения способности этого белка полностью ингибировать репликацию ВИЧ, дефектного по белку Vif [24]. Оказалось, что присутствующий в зараженной клетке АРОВЕС3G способен упаковываться в новые вирусные частицы, связываясь с РНК ВИЧ [25, 26], либо образуя комплекс с полипротеином Gag [27, 28]. Попадая в новую клетку-мишень в составе вирусной частицы, АРОВЕС3G во время обратной транскрипции модифицирует остатки цитозина до урацила в зарождающейся первой цепи вирусной кДНК [29, 30]. Это приводит к появлению множества мутаций в геноме вируса при синтезе второй цепи ДНК, в которой происходят замены гуанина на аденин (рис. 1) [31, 32], что может вызывать образование стоп-кодонов или аминокислотных замен в белках вируса и делать его нежизнеспособным. Необходимо подчеркнуть, что в присутствии функционального белка Vif противовирусное действие АРОВЕС3G полностью подавляется.

Вирусный белок Vif защищает вирус от действия цитозиндеаминаз [33, 34]. Он вызывает убиквитинирование и деградацию АРОВЕС3G [34]. Vif связывает N-концевой домен АРОВЕС3G, после чего вовлекает белковые факторы Cul5, RBX2, EloC, EloB и CBF-β в формирование убиквитинлигазного комплекса (рис. 2). Основным компонентом этого комплекса является белок Cul5, связывающий убиквитинлигазу через белок RBX2 (RING-box protein 2) [36]. Факторы элонгации EloC, EloB и транскрипционный фактор CBF-β необходимы для стабилизации связи между Vif и Cul5 в формирующемся комплексе [36, 37].

В образовавшемся комплексе убиквитинлигаза оказывается в непосредственной близости от АРОВЕС3G, в результате чего становится возможным множественное убиквитинирование его С-концевого домена по остаткам лизина. Убиквитинированный АРОВЕС3G подвергается протеа-

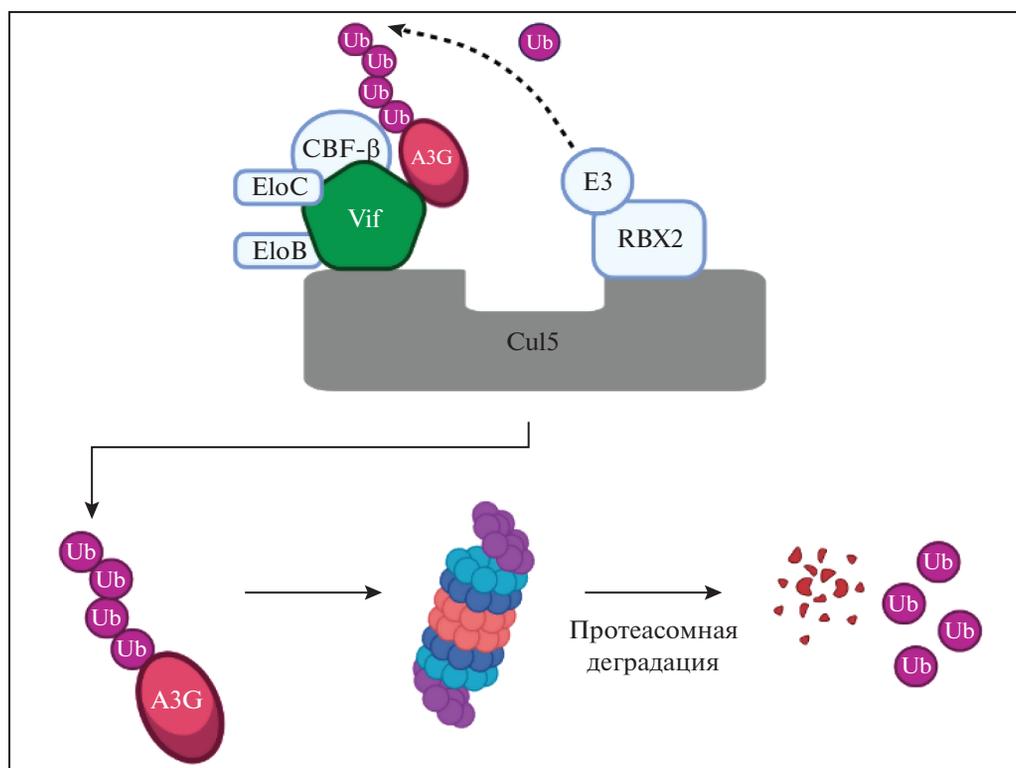


Рис. 2. Образование убиквитинлигазного комплекса и протеасомная деградация АРОВЕС3G. Вирусный белок Vif связывает АРОВЕС3G. Вокруг Vif-АРОВЕС3G формируется убиквитинлигазный комплекс, включающий факторы Cul5, RBX2, EloC, EloB, и CBF-β, индуцирующий полиубикитинирование АРОВЕС3G и его протеасомную деградацию.

сомной деградации, что приводит к уменьшению количества этого белка. Снижение концентрации АРОВЕС3G в клетке делает неэффективной его упаковку в вирусные частицы, а, следовательно, дезаминирование и последующую гипермутацию вирусных геномов. Низкая частота мутирования ВИЧ, вызываемая остаточной активностью АРОВЕС3G, приводит к увеличению его генетического разнообразия, что способствует уходу вируса от адаптивного иммунного ответа [38–41].

Таким образом, наиболее очевидным подходом к увеличению противовирусной активности АРОВЕС3G является ингибирование его связывания с белком Vif. Однако предложены и другие подходы, которые будут рассмотрены ниже.

ОНКОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ АРОВЕС3G

Прежде чем переходить к способам увеличения активности АРОВЕС3G, стоит несколько слов сказать о тех последствиях, к которым это может привести. К сожалению, повышенная активность данного белка связана с потенциальной онкогенной активностью, что показано в ряде публикаций [42–48].

Белок АРОВЕС3G в норме локализован в цитоплазме клетки и не может взаимодействовать с геномной ДНК [49]. Однако Nowarski и соавт. показали [42], что в клетках лимфомы с индуцированными двухцепочечными разрывами ДНК этот белок рекрутируется в ядро. Botvinnik и соавт. [43] установили, что АРОВЕС3G проникает в ядро и участвует в репарации ДНК, увеличивая генетическое разнообразие опухоли и повышая ее устойчивость к химио- и радиотерапии. Схожие результаты получены и на клетках множественной миеломы [44]. Ядерная локализация АРОВЕС3G показана также и в нормальных, не трансформированных клетках – активированных CD4⁺ лимфоцитах [50]. Причина изменения внутриклеточной локализации АРОВЕС3G в активированных CD4⁺ лимфоцитах ясна не до конца, но, по-видимому, он может участвовать в поддержании стабильности генома, защищая от активности ретротранспозонов [51].

Недавно обнаружили, что АРОВЕС3G может иметь онкогенную активность, не связанную с механизмами дезаминирования. Так, например, Ding и соавт. [45] установили, что частота метастазирования колоректального рака в печень связана с уровнем экспрессии гена *АРОВЕС3G*. Показано, что в основе механизма онкогенной

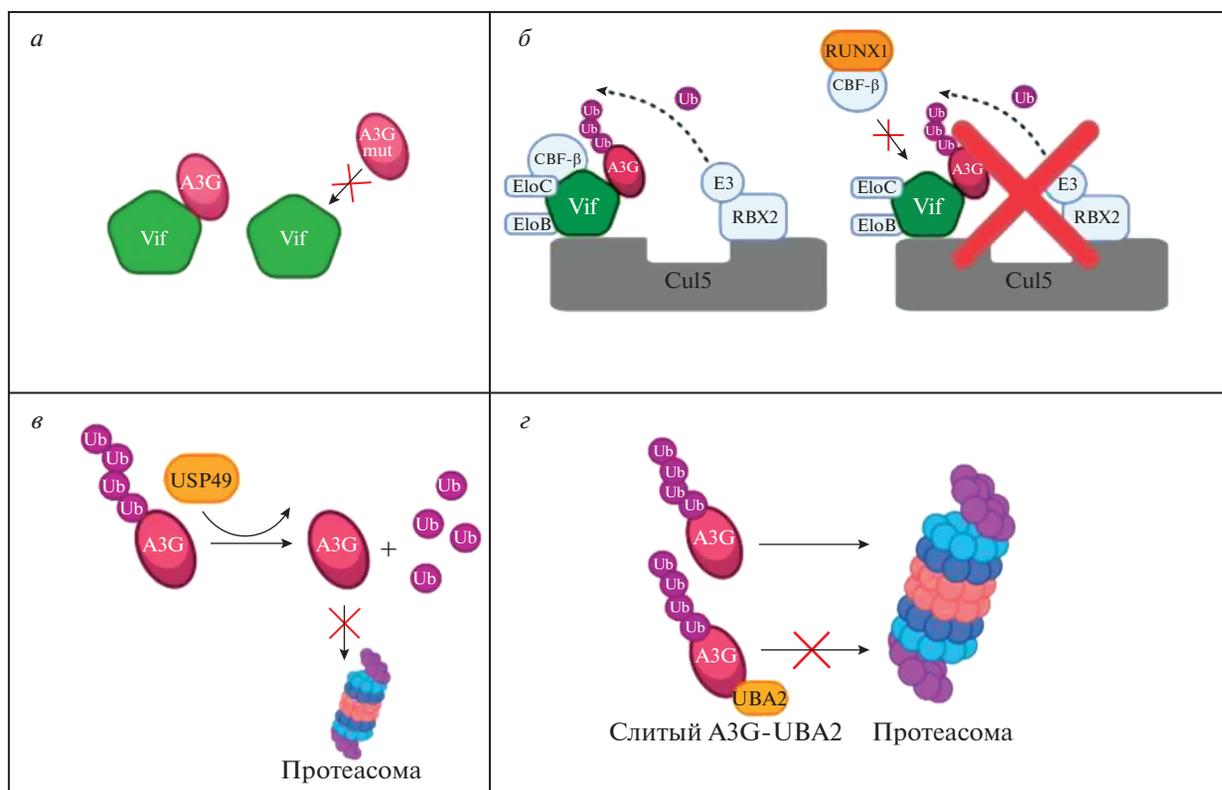


Рис. 3. Стадии деградации АРОВЕС3G под действием Vif и механизмы их блокирования. *а* – Мутантный АРОВЕС3G не связывается с Vif. *б* – RUNX1 конкурентно блокирует образование убиквитиного комплекса. *в* – Деубиквитинирование А3G под действием USP49. *г* – Полиубиквитинированный слитый белок АРОВЕС3G-UBA2 не подвергается деградации в протеасоме.

трансформации лежит ингибирующее действие АРОВЕС3G на микроРНК-29, которая подавляет экспрессию гена *MMP-2* [45]. Увеличение концентрации АРОВЕС3G приводит к повышению экспрессии *MMP-2*. В то же время, повышенную секрецию *MMP-2* считают плохим прогностическим признаком при многих видах рака, в том числе колоректального [46].

Обнаружен и другой механизм онкогенной трансформации, связанный с АРОВЕС3G. Показано, что АРОВЕС3G способен связывать 3'-нетранслируемую область мРНК белка *KLF4*, тем самым подавляя экспрессию его гена. Подавление экспрессии *KLF4* приводит к повышению экспрессии генов *SP1* и *AATF*. Они запускают процесс метаболического переключения клетки на опухолевый рост посредством ингибирования экспрессии гена *p51* и активации ряда других генов [47, 48].

Строгой связи между уровнем АРОВЕС3G и онкогенной трансформацией клетки пока не обнаружено, но проблема безопасности использования АРОВЕС3G в качестве терапевтического

средства остается крайне актуальной и требует дальнейшего изучения.

ПОДХОДЫ К УВЕЛИЧЕНИЮ АНТИ-ВИЧ-АКТИВНОСТИ АРОВЕС3G

Существующие подходы к увеличению активности АРОВЕС3G в основном направлены на блокирование одной из стадий его деградации, инициированной белком Vif: связывания АРОВЕС3G и Vif; образования убиквитиного комплекса; убиквитинирования АРОВЕС3G; протеасомной деградации АРОВЕС3G (см. рис. 3).

Нарушение связывания АРОВЕС с Vif

В настоящее время предложено несколько подходов к достижению устойчивости АРОВЕС3G к действию Vif. Один из них – внесение мутаций в сайт связывания АРОВЕС3G и Vif, что может предотвратить деградацию АРОВЕС3G и, как следствие, восстановить защиту от ВИЧ. Однако детали взаимодействия АРОВЕС3G и Vif до недавнего времени были недостаточно изучены. Известно лишь, что критически важной областью

АРОВЕС3G является петля $\beta 4-\alpha 4$, которая включает в себя аминокислотные остатки D128–D130. Недавно удалось точно установить область контакта АРОВЕС3G и Vif. В своем исследовании Letko и соавт. [57] показали, что во взаимодействии участвуют три аминокислотных остатка: D128, Y125 и D130 белка АРОВЕС3G. Каждый из этих остатков потенциально может быть мишенью для создания мутантного АРОВЕС3G, устойчивого к Vif.

Экспериментально показано, что замена остатка аспартата (К) в позиции 128 на лизин (D128K) позволяет предотвратить деградацию АРОВЕС3G в присутствии Vif. На базе линий СЕМ, РМ1, С8166, стабильно экспрессирующих трансген АРОВЕС3G D128K, созданы модельные перевиваемые клеточные линии. Заражение таких клеточных линий ВИЧ показало их полную устойчивость к вирусу [58–60]. Защита от широкого спектра вариантов Vif ВИЧ наблюдалась при введении в АРОВЕС3G мутаций Y125R, D130R [57], а также P129A [61]. Однако из четырех мутаций (Y125R, D130R, P129A, D128K) наиболее широкую и полную защиту от ВИЧ обеспечивал только вариант D128K [57].

Использованию мутантного АРОВЕС3G (D128K) в генной терапии препятствует ряд проблем, затрудняющих его доставку в клетки-мишени. Помимо собственно доставки трансгена в клетки, необходимо обеспечивать его стабильную и долговременную экспрессию в них. Это необходимое условие для продолжительного и прогнозируемого сдерживания репликации вируса. На сегодняшний день наиболее эффективно доставку трансгенов в клетки-мишени для их стабильной экспрессии осуществляют при помощи лентивирусных векторов, сконструированных на основе ВИЧ. Они способны доставлять трансген в CD4⁺ Т-лимфоциты, обеспечивать его встраивание в геном, поддерживать постоянную экспрессию и возможность передачи дочерним клеткам в процессе пролиферации [62]. Но производство лентивирусного вектора, содержащего ген АРОВЕС3G, затрудняется противовирусной активностью белка АРОВЕС3G, направленной на этот вектор. В клетках-продуцентах с векторной ДНК активно синтезируется белок АРОВЕС3G, который включается в вирусные частицы. При попадании в целевые клетки во время обратной транскрипции белок АРОВЕС3G вносит мутации в вектор, в том числе в ген, кодирующий АРОВЕС3G, что препятствует интеграции функционального гена [63]. Предложены различные варианты решения данной проблемы.

Так, Wang и соавт. предложили дополнительно экспрессировать в клетках, продуцирующих вектор, вариант Vif, активный по отно-

шению к АРОВЕС3G D128K [59]. В таком случае АРОВЕС3G D128K будет подвергаться протеасомной деградации и не сможет упаковываться в векторные частицы.

Вторым подходом, предложенным теми же авторами [59], стало использование индуцируемого доксициклином промотора для контроля экспрессии АРОВЕС3G D128K в клетках-продуцентах.

Лентивирусным вектором, полученным при совместном использовании этих подходов, трансдуцировали первичные CD4⁺ Т-клетки и макрофаги человека. Эффективность трансдукции составила 35 и 40% соответственно. Установлено, что уровень репликации ВИЧ в этих клетках снижается в 2–3 раза относительно контрольных клеток, трансдуцированных вектором, несущим только маркерный ген [59].

Альтернативный подход предложен Delviks-Frankenberry и соавт. [58]. Суть этого подхода состоит в том, что во время наработки лентивирусного вектора ген АРОВЕС3G, который упаковывается в частицы, находится в инактивированном состоянии. Это достигается путем включения в ген повторяющейся последовательности, которая нарушает рамку считывания. Однако в ходе обратной транскрипции в целевых клетках повтор не включается в образующуюся ДНК, что обусловлено особенностью функционирования ревертазы ретровирусов. В результате ген АРОВЕС3G, интегрированный в геном, не имеет повтора и является полностью функциональным [64].

Авторами создан основанный на таком подходе лентивирусный вектор, который эффективно ингибировал ВИЧ в экспериментах на перевиваемых клеточных линиях. Однако эффективность трансдукции CD4⁺ лимфоцитов и CD34⁺ стволовых клеток составила лишь 15 и 30%, соответственно, поэтому подавления репликации ВИЧ не выявили [58].

Проблемы доставки АРОВЕС3G в составе лентивирусного вектора можно решить и с помощью других приемов. Например, использовать мобильные генетические элементы [65] или распределить кодирующую последовательность АРОВЕС3G на несколько вирусных векторов с их объединением в целевых клетках при помощи интеинов [66].

Существуют и другие методы интеграции трансгенов, такие как направленная интеграция с помощью программируемых нуклеаз (Cas9, TALEN и др.). В этом случае нуклеаза вносит разрыв в целевую область хромосомы, в которую затем встраивается донорная ДНК, несущая трансген. Для доставки донорной ДНК удобно использовать AAV-векторы, которые эффективно переносят трансген в ядро клетки, где он встраивается в область разрыва за счет системы репарации клеточной ДНК. Таким

образом можно добиться длительной и стабильной экспрессии трансгенов.

Этот подход можно использовать для встраивания модифицированного гена *АРОВЕС3G* в клетки-мишени ВИЧ, причем доставка гена с помощью AAV является эффективной, так как известно, что АРОВЕС3G не влияет на продукцию AAV и трансдукцию клеток вектором, в отличие от лентивирусных векторов [67, 68].

Zhujun Ao и соавт. [61] показана принципиальная возможность использования AAV для доставки АРОВЕС3G-P129A в мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) и макрофаги человека. AAV-вектор, несущий *АРОВЕС3G P129A*, трансдуцировал РВМС и макрофаги человека с эффективностью 23 и 40% соответственно. В зараженных ВИЧ РВМС человека на третий день после трансдукции AAV наблюдалось 2–3-кратное снижение накопления вирусного антигена р24 по сравнению с нетрансдуцированными клетками.

Блокирование связывания АРОВЕС3G и Vif возможно и при помощи альтернативных стратегий. Одна из них — использование низкомолекулярных веществ, связывающих Vif и блокирующих его взаимодействие с АРОВЕС3G. Успехи в разработке таких молекул (RN-18 и его аналоги), достигнутые за последние годы, убеждают в эффективности этого подхода [53–56]. Но использование блокаторов связывания АРОВЕС3G и Vif — это лишь новое направление в химиотерапии ВИЧ-инфекции, которое не лишено таких недостатков АРТ, как пожизненный прием препаратов и их токсичность.

Повышение эффективности упаковки АРОВЕС3G в вирусную частицу

Как отмечено выше, упаковка АРОВЕС3G в вирусные частицы чрезвычайно важна для дезаминирования кДНК и способности подавлять репликацию ВИЧ. Для повышения эффективности упаковки предложено использовать пептид R14-88 — фрагмент вирусного белка VPR, который отвечает за упаковку VPR в вирионы. Пептид R14-88 объединили с АРОВЕС3G в один слитый белок R14-88–АРОВЕС3G, а также создали клеточную линию С8166–АРОВЕС3G со стабильной экспрессией белка R14-88–АРОВЕС3G. Уровень репликации ВИЧ на этой клеточной линии снижается более чем в 10 раз относительно контрольной линии клеток [69]. Кроме того, ВИЧ, полученный после репликации в клетках С8166–АРОВЕС3G, использовали для заражения РВМС человека. Вирус, полученный из культуры клеток, экспрессирующей R14-88–АРОВЕС3G, оказался нежизнеспособным.

Добавление фрагмента вирусного белка VPR теоретически могло повлиять на локализацию белка АРОВЕС3G внутри клетки (так как VPR это ядерный белок) и сделать его небезопасным с учетом возможного онкогенного потенциала. Однако показано, что внутриклеточная локализация АРОВЕС3G, слитого с фрагментом R14-88 этого белка, не изменяется, он остается в цитоплазме [69].

Слитый белок R14-88–АРОВЕС3G для достижения наибольшего противовирусного эффекта целесообразно использовать в комбинации с другими подходами, например, совместно с внесением рассмотренных выше мутаций, блокирующих связывание АРОВЕС3G с Vif. Совместное применение двух подходов позволит наиболее полно преодолеть ограничения, накладываемые Vif, и обеспечить защиту от вируса [63, 69].

Другие подходы, описанные ниже, имеют скорее теоретическое значение, они освещают механизмы, вовлеченные в деградацию АРОВЕС, поскольку их применение существенно влияет на внутриклеточную концентрацию белка АРОВЕС3G, что сопряжено с риском онкогенной трансформации.

Блокирование образования убиквитинлигазного комплекса с помощью конкурентного ингибирования

Как показано недавно, деградацию АРОВЕС3G, опосредованную белком Vif, можно предотвратить с помощью одного из клеточных белков — RUNX1 (Runt-related transcription factor 1) [70]. Установлено, что RUNX1 связывается с СВF-β и может конкурентно блокировать взаимодействие Vif с СВF-β, критически важное для образования комплекса Cul5–убиквитинлигаза (рис. 3б) [71]. При отсутствии взаимодействия между Vif и СВF-β убиквитинирование АРОВЕС3G не происходит [71, 72]. Поэтому увеличение концентрации RUNX1 может предотвращать деградацию фактора АРОВЕС3G.

Для проверки этого предположения в клетках НЕК293Т собирали вирусные частицы, содержащие функциональный Vif, в присутствии АРОВЕС3G и RUNX1 или только АРОВЕС3G. Затем определяли количество белка АРОВЕС3G в вирусосодержащем супернатанте. За 100% принимали содержание АРОВЕС3G в вирусных частицах, дефектных по белку Vif. Относительное содержание АРОВЕС3G в вирусных частицах с функциональным Vif из клеток со сверхэкспрессией RUNX1, составляло около 60% от уровня в контрольных клетках, в то время как содержание АРОВЕС3G в вирусных частицах из клеток без сверхэкспрессии RUNX1 составляло 20% от значения в контрольных клетках [71].

Однако увеличение экспрессии *RUNX1* небезопасно само по себе [73]. Белок *RUNX1* – это транскрипционный фактор, который участвует в процессе дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток. Известно, что белок *RUNX1* связан с патогенезом нескольких видов лейкозов, а также рака молочной железы [74].

Блокирование убиквитинирования АРОВЕС3G

Как известно, сигналом убиквитинирования служит остаток лизина в аминокислотной последовательности АРОВЕС3G [75]. Белок АРОВЕС3G включает 20 таких аминокислотных остатков, 13 из них расположены в N-концевом домене белка и семь в C-концевом.

Установлено, что замена остатков лизина в C-концевом домене на остатки аргинина, блокирует протеасомную деградацию, тогда как модификация лизиновых N-концевого домена к этому не приводит. Таким образом, белок с заменами в C-концевой области оказался более устойчивым к фактору вирулентности Vif. При этом АРОВЕС3G с заменами в C-концевом домене сохранял свою дезаминазную активность в отношении ВИЧ, упаковывался в вирионы и эффективно подавлял инфекцию в присутствии Vif, что показано на клеточной линии TZM-bl [76].

Снизить уровень убиквитинирования и предотвратить деградацию АРОВЕС3G вирусным белком Vif можно за счет механизма деубиквитинирования. Команда Pan и соавт. [77] выяснила, что белок USP49, клеточная деубиквитиназа, способна напрямую связываться с убиквитинированным АРОВЕС3G и деубиквитинировать остатки лизина, предотвращая тем самым деградацию белка. Установлено, что сверхэкспрессия USP49 действительно повышает устойчивость клеток к ВИЧ.

Нарушение протеасомной деградации

Недавно предложили еще один подход, позволяющий избежать деградации АРОВЕС3G в протеасоме. Этот подход основан на стабилизации АРОВЕС3G при помощи регуляторных элементов, расположенных в той же молекуле. В качестве примера такой стабилизации можно привести слитый белок АРОВЕС3G–UBA2, в котором АРОВЕС3G объединен с белковым доменом UBA2 (Ubiquitin associated domain 2) [78]. Белки, в состав которых входит домен UBA2, подвергаются убиквитинированию и взаимодействуют с протеасомой, но это не вызывает их деградации [78]. В своем исследовании Li и соавт. [78] сравнили снижение уровня белков АРОВЕС3G–UBA2 и АРОВЕС3G в клетках в присутствии Vif. Оказалось, что АРОВЕС3G дикого типа подвергается

полной деградации, в то время как уровень слитого белка АРОВЕС3G–UBA2 снижается на 60% [78].

В целом, необходимо еще раз подчеркнуть, что действия, направленные на снижение убиквитинирования или протеасомной деградации АРОВЕС3G, нарушают естественный механизм элиминирования белка и увеличивают его концентрацию в клетке, что, принимая во внимание мутагенную активность АРОВЕС3G, потенциально опасно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Белки семейства АРОВЕС рассматриваются в качестве привлекательных мишеней для генной терапии ВИЧ-инфекции. На настоящий момент доказана высокая антиретровирусная активность АРОВЕС3G, разработаны несколько принципиально разных подходов к достижению устойчивости АРОВЕС3G к деградации вирусным белком Vif при ВИЧ-инфекции. Наибольший интерес представляет совместное использование устойчивого к вирусному белку Vif мутантного варианта АРОВЕС3G D128K и пептида R14-88, улучшающего упаковку АРОВЕС3G D128K в вирусные частицы. Показано, что и тот, и другой белок не увеличивают уровень АРОВЕС3G в клетке [58, 69], что может указывать на безопасность данного подхода, однако это необходимо подтвердить, проведя дополнительные исследования мутагенной активности варианта АРОВЕС3G с мутацией D128K.

Нерешенной остается проблема эффективной доставки модифицированного гена в клетки-мишени. Однако в настоящее время активно разрабатываются различные варианты доставки генов и белков в клетки-мишени как *ex vivo*, так и *in vivo*. Поэтому в ближайшее время можно ожидать появления препаратов против ВИЧ, основанных на модификации естественных факторов рестрикции, в том числе АРОВЕС3G.

Написание обзора не потребовало специального финансирования.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. (2008) Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet*. **372**, 293–299.
2. Wang J., Holmes M.C. (2016) Engineering hematopoietic stem cells toward a functional cure of human im-

- munodeficiency virus infection. *Cytotherapy*. **18**(11), 1370–1381.
3. Arias J.F., Heyer L.N., von Bredow B., Weisgrau K.L., Moldt B., Burton D.R., Rakasz E.G., Evans D.T. (2014) Tetherin antagonism by Vpu protects HIV-infected cells from antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**(17), 6425–6430.
 4. Ayinde D., Bruel T., Cardinaud S., Porrot F., Prado J.G., Moris A., Schwartz O. (2015) SAMHD1 Limits HIV-1 antigen presentation by monocyte-derived dendritic cells. *J. Virol.* **89**(14), 6994–7006.
 5. Jimenez-Moyano E., Ruiz A., Kløverpris H.N., Rodriguez-Plata M.T., Peña R., Blondeau C., Selwood D.L., Izquierdo-Useros N., Moris A., Clotet B., Goulder P., Towers G.J., Prado J.G. (2016) Nonhuman TRIM5 variants enhance recognition of HIV-1-infected cells by CD8+ T cells. *J. Virol.* **90**(19), 8552–8562.
 6. Stopak K.S., Chiu Y.L., Kropp J., Grant R.M., Greene W.C. (2006) Distinct patterns of cytokine regulation of APOBEC3G expression and activity in primary lymphocytes, macrophages, and dendritic cells. *J. Biol. Chem.* **282**(6), 3539–3546.
 7. Lu J., Pan Q., Rong L., Liu S.L., Liang C., Liang C. (2011) The IFITM proteins inhibit HIV-1 infection. *J. Virol.* **85**(5), 2126–2137.
 8. Tada T., Zhang Y., Koyama T., Tobiume M., Tsunetsugu-Yokota Y., Yamaoka S., Fujita H., Tokunaga K. (2015) MARCH8 inhibits HIV-1 infection by reducing virion incorporation of envelope glycoproteins. *Nat. Med.* **21**(12), 1502–1507.
 9. Dufour C., Claudel A., Joubarne N., Merindol N., Maisonnnet T., Masroori N., Plourde M. B., Berthoux, L. (2018) Editing of the human *TRIM5* gene to introduce mutations with the potential to inhibit HIV-1. *PLoS One*. **13**(1), e0191709.
 10. Омельченко Д.О., Глазкова Д.В., Богословская Е.В., Урусов Ф.А., Жогина Ю.А., Цыганова Г.М., Шипулин Г.А. (2018) Защита лимфоцитов от ВИЧ с помощью лентивирусного вектора, несущего комбинацию генов *TRIM5A-HRH* и микроРНК против *CCR5*. *Молекуляр. биология*. **52**(2), 294–305.
 11. Jimenez-Guardeño J.M., Apolonia L., Betancor G., Malim M.H. (2019) Immunoproteasome activation enables human TRIM5 α restriction of HIV-1. *Nat. Microbiol.* **4**(6), 933–940.
 12. Uchida N., Hsieh M.M., Washington K.N., Tisdale J.F. (2013) Efficient transduction of human hematopoietic repopulating cells with a chimeric HIV1-based vector including SIV capsid. *Exp. Hematol.* **41**(9), 779–788.
 13. Harris R.S., Liddament M.T. (2004) Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **4**(11), 868–877.
 14. Conticello S.G. (2008) The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biol.* **9**(6), 229.
 15. Sheehy A.M., Gaddis N.C., Choi J.D., Malim M.H. (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral vif protein. *Nature*. **418**(6898), 646–650.
 16. LaRue R.S., Jonsson S.R., Silverstein K.A., Lajoie M., Bertrand D., El Mabrouk N., Hotzel I., Andresdottir V., Smith T.P., Harris R.S. (2008) The artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. *BMC Mol. Biol.* **9**, 104.
 17. Vieira V.C., Soares M.A. (2013) The role of cytidine deaminases on innate immune responses against human viral infections. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 683095
 18. Stavrou S., Ross S.R. (2015) APOBEC3 proteins in viral immunity. *J. Immunol.* **195**(10), 4565–4570.
 19. Chaipan C., Smith J.L., Hu W.S., Pathak V.K. (2013) APOBEC3G restricts HIV-1 to a greater extent than APOBEC3F and APOBEC3DE in human primary CD4+ T cells and macrophages. *J. Virol.* **87**(1), 444–453.
 20. Zennou V., Bieniasz P.D. (2006) Comparative analysis of the antiretroviral activity of APOBEC3G and APOBEC3F from primates. *Virology*. **349**(1), 31–40.
 21. Mbisa J.L., Bu W., Pathak V.K. (2010) APOBEC3F and APOBEC3G inhibit HIV-1 DNA integration by different mechanisms. *J. Virol.* **84**(10), 5250–5259.
 22. Chan D.C., Kim P.S. (1998) HIV entry and its inhibition. *Cell*. **93**(5), 681–684.
 23. Li C., Burdick R.C., Nagashima K., Hu W.S., Pathak V.K. (2021) HIV-1 cores retain their integrity until minutes before uncoating in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **118**(10), e2019467118.
 24. Harris R.S., Dudley J.P. (2015) APOBECs and virus restriction. *Virology*. **479–480**, 131–145.
 25. Khan M.A., Kao S., Miyagi E., Takeuchi H., Goila-Gaur R., Opi S., Gipson C.L., Parslow T.G., Ly H., Strebel K. (2005) Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleoprotein complexes. *J. Virol.* **79**(9), 5870–5874.
 26. Yang H., Ito F., Wolfe A.D., Li S., Mohammadzadeh N., Love R.P., Yan M., Zirkle B., Gaba A., Chelico L., Chen X.S. (2020) Understanding the structural basis of HIV-1 restriction by the full length double-domain APOBEC3G. *Nat. Commun.* **11**(1), 632.
 27. Schäfer A., Bogerd H.P., Cullen B.R. (2004) Specific packaging of APOBEC3G into HIV-1 virions is mediated by the nucleocapsid domain of the Gag polyprotein precursor. *Virology*. **328**(2), 163–168.
 28. Cen S., Guo F., Niu M., Saadatmand J., Deflassieux J., Kleiman L. (2004) The interaction between HIV-1 Gag and APOBEC3G. *J. Biol. Chem.* **279**(32), 33177–33184.
 29. Salter J.D., Polevoda B., Bennett R.P., Smith H.C. (2019) Regulation of antiviral innate immunity through APOBEC ribonucleoprotein complexes. *Subcell. Biochem.* **93**, 193–219.
 30. Morse M., Naufer M.N., Feng Y., Chelico L., Rouzina I., Williams M.C. (2019) HIV restriction factor

- APOBEC3G binds in multiple steps and conformations to search and deaminate single-stranded DNA. *Elife*. **8**, e52649.
31. Browne E.P., Allers C., Landau N.R. (2009) Restriction of HIV-1 by APOBEC3G is cytidine deaminase-dependent. *Virology*. **387**(2), 313–321.
 32. Yu Q., König R., Pillai S., Chiles K., Kearney M., Palmer S., Richman D., Coffin J.M., Landau N.R. (2004) Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**(5), 435–442.
 33. Feng Y., Baig T.T., Love R.P., Chelico L. (2014) Suppression of APOBEC3-mediated restriction of HIV-1 by vif. *Front. Microbiol.* **5**, 450.
 34. Soliman M., Srikrishna G., Balagopal A. (2017) Mechanisms of HIV-1 control. *Curr. HIV/AIDS Rep.* **14**(3), 101–109.
 35. Yu X., Yu Y., Liu B., Luo K., Kong W., Mao P., Yu X.F. (2003) Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 vif-Cul5-SCF complex. *Science*. **302**(5647), 1056–1060.
 36. Guo Y., Dong L., Qiu X., Wang Y., Zhang B., Liu H., Yu Y., Zang Y., Yang M., Huang Z. (2014) Structural basis for hijacking CBF- β and CUL5 E3 ligase complex by HIV-1 vif. *Nature*. **505**(7482), 229–233.
 37. Went M., Kinnersley B., Sud A., Johnson D.C., Weinhold N., Försti A., van Duin M., Orlando G., Mitchell J.S., Kuiper R., Walker B.A., Gregory W.M., Hoffmann P., Jackson G.H., Nöthen M.M., da Silva Filho M.I., Thomsen H., Broyl A., Davies F.E., Thorsteinsdottir U., Hansson M., Kaiser M., Sonneveld P., Goldschmidt H., Stefansson K., Hemminki K., Nilsson B., Morgan G.J., Houlston R.S. (2019) Transcriptome-wide association study of multiple myeloma identifies candidate susceptibility genes. *Hum. Genomics*. **13**(1), 37.
 38. Kim E.Y., Lorenzo-Redondo R., Little S.J., Chung Y.S., Phalora P.K., Maljkovic Berry I., Archer J., Penugonda S., Fischer W., Richman D.D., Bhattacharya T., Malim M.H., Wolinsky S.M. (2014) Human APOBEC3 induced mutation of human immunodeficiency virus type-1 contributes to adaptation and evolution in natural infection. *PLoS Pathol.* **10**(7), e1004281.
 39. Kim E.Y., Bhattacharya T., Kunstman K., Swantek P., Koning F.A., Malim M.H., Wolinsky S.M. (2010) Human APOBEC3G-mediated editing can promote HIV-1 sequence diversification and accelerate adaptation to selective pressure. *J. Virol.* **84**(19), 10402–10405.
 40. Venkatesan S., Rosenthal R., Kanu N., McGranahan N., Bartek J., Quezada S.A., Hare J., Harris R.S., Swanton C. (2018) Perspective: APOBEC mutagenesis in drug resistance and immune escape in HIV and cancer evolution. *Ann. Oncol.* **29**(3), 563–572.
 41. Ikeda T., Yue Y., Shimizu R., Nasser H. (2021) Potential utilization of APOBEC3-mediated mutagenesis for an HIV-1 functional cure. *Front. Microbiol.* **12**, 686357.
 42. Nowarski R., Wilner O.I., Cheshin O., Shahar O.D., Kenig E., Baraz L., Britan-Rosich E., Nagler A., Harris R.S., Goldberg M., Willner I., Kotler M. (2012) APOBEC3G enhances lymphoma cell radioresistance by promoting cytidine deaminase-dependent DNA repair. *Blood*. **120**(2), 366–375.
 43. Botvinnik A., Shivam P., Smith Y., Sharma G., Olshevsky U., Moshel O., Manevitch Z., Climent N., Oliva H., Britan-Rosich E., Kotler M. (2021) APOBEC3G rescues cells from the deleterious effects of DNA damage. *FEBS J.* **288**(20), 6063–6077.
 44. Talluri S., Samur M.K., Buon L., Kumar S., Potluri L.B., Shi J., Prabhala R.H., Shammas M.A., Munshi N.C. (2021) Dysregulated APOBEC3G causes DNA damage and promotes genomic instability in multiple myeloma. *Blood Cancer J.* **11**(10), 166.
 45. Ding Q., Chang C.J., Xie X., Xia W., Yang J.Y., Wang S.C., Wang Y., Xia J., Chen L., Cai C., Li H., Yen C.J., Kuo H.P., Lee D.F., Lang J., Huo L., Cheng X., Chen Y.J., Li C.W., Jeng L.B., Hsu J.L., Li L.Y., Tan A., Curley S.A., Ellis L.M., Dubois R.N., Hung M.C. (2011) APOBEC3G promotes liver metastasis in an orthotopic mouse model of colorectal cancer and predicts human hepatic metastasis. *J. Clin. Invest.* **121**(11), 4526–4536.
 46. Desimmi B.A., Delviks-Frankenberry K.A., Burdick R.C., Qi D., Izumi T., Pathak V.K. (2014) Multiple APOBEC3 restriction factors for HIV-1 and one vif to rule them all. *J. Mol. Biol.* **426**(6), 1220–1245.
 47. Garg A., Kaul D., Chauhan N. (2015) APOBEC3G governs to ensure cellular oncogenic transformation. *Blood Cells Mol. Dis.* **55**(3), 248–254.
 48. Sharma S., Garg A., Dhanda R.S., Kaul D. (2016) APOBEC3G governs the generation of truncated AATF protein to ensure oncogenic transformation. *Cell Biol. Int.* **40**(12), 1366–1371.
 49. Lackey L., Law E.K., Brown W.L., Harris R.S. (2013) Subcellular localization of the APOBEC3 proteins during mitosis and implications for genomic DNA deamination. *Cell Cycle*. **12**, 762–772.
 50. Oliva H., Pacheco R., Martinez-Navio J.M., Rodríguez-García M., Naranjo-Gómez M., Climent N., Prado C., Gil C., Plana M., García F., Miró J.M., Franco R., Borrás F.E., Navaratnam N., Gatell J.M., Gallart T. (2016) Increased expression with differential subcellular location of cytidine deaminase APOBEC3G in human CD4(+) T-cell activation and dendritic cell maturation. *Immunol. Cell Biol.* **94**(7), 689–700.
 51. Arias J.F., Koyama T., Kinomoto M., Tokunaga K. (2012) Retroelements versus APOBEC3 family members: no great escape from the magnificent seven. *Front. Microbiol.* **3**, 275.
 52. Chiang A.C., Massagué J. (2008) Molecular basis of metastasis. *N. Engl. J. Med.* **359**(26), 2814–2823.
 53. Nathans R., Cao H., Sharova N., Ali A., Sharkey M., Stranska R., Stevenson M., Rana T.M. (2008) Small-molecule inhibition of HIV-1 Vif. *Nat. Biotechnol.* **26**(10), 1187–1192.
 54. Mohammed I., Kummetha I.R., Singh G., Sharova N., Lichinchi G., Dang J., Stevenson M., Rana T.M.

- (2016) 1,2,3-Triazoles as amide bioisosteres: discovery of a new class of potent HIV-1 Vif antagonists. *J. Med. Chem.* **59**(16), 7677–7682.
55. Zhou M., Luo R.H., Hou X.Y., Wang R.R., Yan G.Y., Chen H., Zhang R.H., Shi J.Y., Zheng Y.T., Li R., Wei Y.Q. (2017) Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of N-(2-methoxyphenyl)-6-((4-nitrophenyl)sulfonyl)benzamide derivatives as potent HIV-1 Vif antagonists. *Eur. J. Med. Chem.* **129**, 310–324.
56. Sharkey M., Sharova N., Mohammed I., Huff S.E., Kummetha I.R., Singh G., Rana T.M., Stevenson M. (2019) HIV-1 escape from small-molecule antagonism of Vif. *mBio*. **10**(1), e00144-19.
57. Letko M., Booiman T., Kootstra N., Simon V., Ooms M. (2015) Identification of the HIV-1 vif and human APOBEC3G protein interface. *Cell Rep.* **13**(9), 1789–1799.
58. Delviks-Frankenberry K.A., Ackerman D., Timberlake N.D., Hamscher M., Nikolaitchik O.A., Hu W.S., Torbett B.E., Pathak V.K. (2019) Development of lentiviral vectors for HIV-1 gene therapy with vif-resistant APOBEC3G. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* **18**, 1023–1038.
59. Wang X., Ao Z., Jayappa K.D., Shi B., Kobinger G., Yao X. (2014) R88-APOBEC3Gm inhibits the replication of both drug-resistant strains of HIV-1 and viruses produced from latently infected cells. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* **3**(3), e151.
60. Voit R.A., McMahon M.A., Sawyer S.L., Porteus M.H. (2013) Generation of an HIV resistant T-cell line by targeted “stacking” of restriction factors. *Mol. Ther.* **21**(4), 786–795.
61. Ao Z., Wang X., Bello A., Jayappa K.D., Yu Z., Fowke K., He X., Chen X., Li J., Kobinger G., Yao X. (2011) Characterization of anti-HIV activity mediated by R88-APOBEC3G mutant fusion proteins in CD4⁺ T cells, peripheral blood mononuclear cells, and macrophages. *Hum. Gene Ther.* **22**(10), 1225–1237.
62. Зайкова Е.К., Левчук К.А., Поздняков Д.Ю., Дакс А.А., Зарицкий А.Ю., Петухов А.В. (2020) Эффективная трансдукция Т-лимфоцитов лентивирусными частицами в онкоиммунологических исследованиях. *Клиническая онкогематология.* **13**(3), 295–306.
63. Delviks-Frankenberry K.A., Desimie B.A., Pathak V.K. (2020) Structural insights into APOBEC3-mediated lentiviral restriction. *Viruses.* **12**(6), 587.
64. Hu W.S., Pathak V.K. (2000) Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacol. Rev.* **52**(4), 493–511.
65. Sandoval-Villegas N., Nurieva W., Amberger M., Ivics Z. (2021) Contemporary transposon tools: a review and guide through mechanisms and applications of sleeping beauty, piggyBac and Tol2 for genome engineering. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(10), 5084.
66. Jillette N., Du M., Zhu J.J., Cardoz P., Cheng A.W. (2019) Split selectable markers. *Nat. Commun.* **10**(1), 4968.
67. Chen H., Lilley C.E., Yu Q., Lee D.V., Chou J., Narvaiza I., Landau N.R., Weitzman M.D. (2006) APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. *Curr. Biol.* **16**(5), 480–485.
68. Narvaiza I., Linfesty D.C., Greener B.N., Hakata Y., Pintel D.J., Logue E., Landau N.R., Weitzman M.D. (2009) Deaminase-independent inhibition of parvoviruses by the APOBEC3A cytidine deaminase. *PLoS Pathog.* **5**(5), e1000439.
69. Ao Z., Yu Z., Wang L., Zheng Y., Yao X. (2008) Vpr14-88-APOBEC3G fusion protein is efficiently incorporated into vif-positive HIV-1 particles and inhibits viral infection. *PLoS One.* **3**(4), e1995.
70. Miyagi E., Welbourn S., Sukegawa S., Fabryova H., Kao S., Strebel K. (2020) Inhibition of vif-mediated degradation of APOBEC3G through competitive binding of core-binding factor beta. *J. Virol.* **94**(7), e01708-19.
71. Wang H., Liu B., Liu X., Li Z., Yu X.F., Zhang W. (2014) Identification of HIV-1 vif regions required for CBF- β interaction and APOBEC3 suppression. *PLoS One.* **9**(5), e95738.
72. Miyagi E., Kao S., Yedavalli V., Strebel K. (2014) CBF β enhances *de novo* protein biosynthesis of its binding partners HIV-1 Vif and RUNX1 and potentiates the Vif-induced degradation of APOBEC3G. *J. Virol.* **88**(9), 4839–4852.
73. Blyth K., Cameron E.R., Neil J.C. (2005) The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **5**(5), 376–387.
74. Asou N. (2003) The role of a Runt domain transcription factor AML1/RUNX1 in leukemogenesis and its clinical implications. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **45**(2), 129–150.
75. Iwatani Y., Chan D.S., Liu L., Yoshii H., Shibata J., Yamamoto N., Levin J.G., Gronenborn A.M., Sugiura W. (2009) HIV-1 vif-mediated ubiquitination/degradation of APOBEC3G involves four critical lysine residues in its C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**(46), 19539–19544.
76. Turner T., Shao Q., Wang W., Wang Y., Wang C., Kinlock B., Liu B. (2016) Differential contributions of ubiquitin-modified APOBEC3G lysine residues to HIV-1 vif-induced degradation. *J. Mol. Biol.* **428**(17), 3529–3539.
77. Pan T., Song Z., Wu L., Liu G., Ma X., Peng Z., Zhou M., Liang L., Liu B., Liu J., Zhang J., Zhang X., Huang R., Zhao J., Li Y., Ling X., Luo Y., Tang X., Cai W., Deng K., Li L., Zhang H. (2019) USP49 potentially stabilizes APOBEC3G protein by removing ubiquitin and inhibits HIV-1 replication. *Elife.* **8**, e48318.
78. Li L., Liang D., Li J.Y., Zhao R.Y. (2008) APOBEC3G-UBA2 fusion as a potential strategy for stable expression of APOBEC3G and inhibition of HIV-1 replication. *Retrovirology.* **5**, 72. 1.

APOBEC3G AS A HIV RESTRICTION FACTOR AND PROSPECTS OF ITS USE IN GENE THERAPY OF HIV INFECTION

A. S. Tikhonov^{1, *}, R. R. Mintaev^{1, 2}, D. V. Glazkova¹, E. V. Bogoslovskaya¹, and G. A. Shipulin¹

¹ *Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119833 Russia*

² *Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064 Russia*

**e-mail: andrey.tikhonov97@gmail.com*

The mechanisms of protection of the human body from viral or bacterial agents are extremely diverse. One of these mechanisms is provided by the APOBEC3 family of cytidine deaminases – the factors of innate immunity, which protect the body from numerous viral infectious agents. A member of the APOBEC3 protein family, the APOBEC3G can provide protection against human immunodeficiency virus type 1 in the absence of Vif protein. In turn, Vif opposes the action of APOBEC3G, causing its polyubiquitination and proteasome degradation. This review describes possible ways of increasing the anti-HIV activity of APOBEC3G, providing resistance to the Vif protein, as well as potential approaches to the use of modified APOBEC3G in gene therapy of HIV infection.

Key words: APOBEC3G, APOBEC3G-D128K, gene therapy, HIV-1, Vif

УДК 577.21

БЕЛОК CG9890 ДРОЗОФИЛЫ УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКДИЗОНЗАВИСИМОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

© 2022 г. Ю. В. Николенко^а, Н. А. Фурсова^а, М. Ю. Мазина^а,
Н. Е. Воробьева^а, А. Н. Краснов^а, *

^аИнститут биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*e-mail: krasnov@genebiology.ru

Поступила в редакцию 17.11.2021 г.

После доработки 14.12.2021 г.

Принята к публикации 14.12.2021 г.

Ранее нами было показано, что белок CG9890 с доменами цинковых пальцев взаимодействует с ENY2-содержащими комплексами дрозофилы и локализуется преимущественно на промоторах активных генов. Белок CG9890 участвует в регуляции экспрессии части генов, на промоторах которых он находится, причем в число этих генов входят гены экдизонового каскада. В представленной работе изучена роль белка CG9890 в регуляции экдизонзависимой индуцибельной транскрипции. Идентифицированы 12 экдизонзависимых генов, на промоторах которых локализован белок CG9890. Изучена их активация после добавления к клеткам 20-гидроксиэкдизона как в норме, так и после РНК-интерференции CG9890. Экспрессия экдизонзависимых генов существенно повышается в ответ на обработку клеток экдизоном, в отличие от контрольных генов. Причем в линии клеток, подвергнутых РНК-интерференции CG9890, транскрипция 8 из 12 генов была значительно выше, чем в контрольных клетках. Таким образом, белок CG9890 участвует в регуляции транскрипции экдизонзависимых генов, причем в большинстве случаев выступает в роли репрессора.

Ключевые слова: CG9890, цинковые пальцы, 20-гидроксиэкдизон, активация транскрипции

DOI: 10.31857/S0026898422040085

ВВЕДЕНИЕ

Ранее мы выделили и охарактеризовали белок ENY2, который оказался компонентом множества белковых комплексов, вовлеченных в регуляцию транскрипции и репликации. ENY2 входит в состав транскрипционных комплексов SAGA, AMEX, ТНО и связывает различные этапы экспрессии генов – организацию транскрипционных доменов и модификацию хроматина, активацию и элонгацию транскрипции, экспорт мРНК и регуляцию пространственного расположения генов в ядре [1–6]. Кроме того, ENY2 входит также в состав репликационного комплекса ORC, ответственного за позиционирование точек начала репликации [7–10]. Показано, что белок Su(Hw), содержащий домены цинковых пальцев, взаимодействует с ENY2-содержащими комплексами дрозофилы и необходим для их привлечения на сайты связывания Su(Hw), что необходимо для создания активной структуры хроматина и позиционирования точек начала репликации [1, 2, 5].

В ходе предыдущей работы мы обнаружили взаимодействие ENY2 с еще одним ранее не охарактеризованным белком – CG9890, который содержит домен цинковых пальцев, как и Su(Hw) [11]. Установлено, что белок CG9890 локализован

в ядре клетки. Биохимическими методами показано взаимодействие белка CG9890 с комплексами SAGA, ORC, dSWI/SNF, TFIID и ТНОС [11]. CG9890 связывается с транскрипционными комплексами, вовлеченными в инициацию и элонгацию транскрипции, но не взаимодействует с комплексом AMEX, участвующим в экспорте мРНК из ядра в цитоплазму, что указывает на работу CG9890 в первых стадиях транскрипционного цикла.

Идентифицированы сайты связывания CG9890 в геноме и показано, что они локализованы преимущественно на промоторах генов. Определена полногеномная корреляция сайтов связывания CG9890 и комплексов SAGA, ORC и dSWI/SNF. Сайты связывания белка CG9890 характеризуются более низкой плотностью нуклеосом (представленностью гистона H3), чем в среднем по геному и на промоторах, что указывает на активное состояние этих регуляторных элементов [12]. С использованием метода ОТ-кПЦР проанализировано изменение уровня мРНК 21 CG9890-ассоциированного гена в клетках после РНК-интерференции CG9890 по сравнению с контрольными образцами. Обнаружено, что пять из 10 генов, экспрессия которых изменилась статистически значимо после РНК-интерференции белка CG9890, это гены экдизонового каскада [12].

Учитывая полученные ранее данные, предположили, что белок CG9890 может участвовать в регуляции не только базальной, но и активируемой транскрипции экдизонзависимых генов. Для изучения этого вопроса проведен биоинформатический анализ и идентифицированы все экдизонзависимые гены, промоторы которых содержат белок CG9890. Далее проанализировали активацию этих экдизонзависимых генов после обработки клеток S2 Шнейдер дрософилы 20-гидроксиэкдизоном как в норме, так и после РНК-интерференции CG9890.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток линии S2 Шнейдер. РНК-интерференция. Индукция экспрессии экдизонзависимых генов. Клетки культивировали

при 25°C в среде Schneider's insect medium ("Sigma", США), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота ("HyClone", США). дцРНК синтезировали с использованием TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit ("ThermoScientific", США). Нокдаун белков проводили с помощью РНК-интерференции согласно протоколу [13]. Для нокдауна белка CG9890 синтезировали дцРНК длиной 500 п.н., соответствующую начальному участку его кодирующей последовательности. В качестве контроля использовали дцРНК, соответствующую 500-нуклеотидному фрагменту плазмиды pBluescript II SK(-) ("Stratagene", США). дцРНК синтезировали с использованием следующих праймеров:

CG9890, CGACTCACTATAGGGAGAACGTAACAAATGGAGCACG и CGACTCACTATAGG-GAGAAGGTGCGGTTCGGTTAG;

pBluescript IISK(-), GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTACATGATCCCCCATG и GAAT-TAATACGACTCACTATAGGGAGATTTTCGCCCCGAAGAACG.

В каждый эксперимент по РНК-интерференции дцРНК брали из расчета 30 мкг на 1 млн клеток. По прошествии 5 дней инкубации в среде с дцРНК клетки из каждой чашки рассаживали на две чашки, на следующие сутки (6-е с начала инкубации) в одной из них индуцировали экдизоновый каскад. Клетки из второй чашки служили отрицательным контролем. Все эксперименты по индукции экспрессии экдизонзависимых генов в норме и на фоне РНК-интерференции CG9890

проводили в трех повторах. Для активации экдизонового каскада в клеточную среду добавляли 20-гидроксиэкдизон ("Sigma", h5142) до концентрации 0.3 мкМ и инкубировали в течение 3 ч. Уровень экспрессии *CG9890*, экдизонзависимых и контрольных генов, использованных в качестве контроля, измеряли методом обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени. Использовали следующие праймеры:

CG9890, GCCGATGTGGAGGATATAGC и GGATGTCACACAGCAGGTTAG;

Eip75B-RA, CCTCGTCCATCTCCTCCAG и CACCAGCACCAGCAACAA;

Eip75B-RC, GACGGAGGAGTTGGGAGAA и TACCAGCACAACAGCAAGC;

DHR3, CGGTTGCGATTAACACGGTCC и CTGCAAGGGATTCTTTTGAAGATC;

HR4, GTGCGTCTGCACAATGTTGG и GGAACAGTCCATCAGCTCCTCG;

Eip78C, GCATCTACTACAGCAGCAACA и ATTTGTGGCGTTTGTGGAGTA;

Tret1-1, CATCAACCGCTGAGCAACG и TCCTCTGGCAGAATTGTGTCC;

CR43626, TTCGGTGTGTGGACAGCAAG и GGTTTCGATGTCGTACCAACTTCT;

Actin 5C, GGCACCACACSTTCTACAATGAGC, GAGGCGTACAGCGAGAGCACAG;

Tubulin 56D, CGAGAACACGGACGAGACCTACTG и GGAATCGGAGGCAGGTGGTTACG;

ras2, GAGGGATTCTGCTCGTCTTCG и GTCGCACTTGTTACCCACCATC;

CG5455, TTGGAGGTGGTGGAGAAGAA и CAGCGGTGGTGATTTCATCC;

CG8745, TCCAGTGTGCTCGCACGTT и ACATGCACGTAGTCGGGCTT;

CG15279, GGCATAGGATCGAATATAGCCATG и CAGCTCGGCGATTCCCAGTA;

E23, AGCAGCAGCAGCAACAACAG и GCAACTGTTTCTGTTTAGCTGG;

Fatp3, CAGTGGTGGCTCTCCTGCTC и ATCGTCCATCACGAAGCATGT;

Eip74EF, GTCGGAGGCTACGGATTTCAGA и ACCAGGTGCCATAGTTGATACCG.

Идентификация сайтов связывания белка CG9890 в геноме дрософилы. Исходные данные с геномного се-

квенатора Illumina HiSeq2000 выравнивали на геном дрософилы dmel_r6.40 с помощью програм-

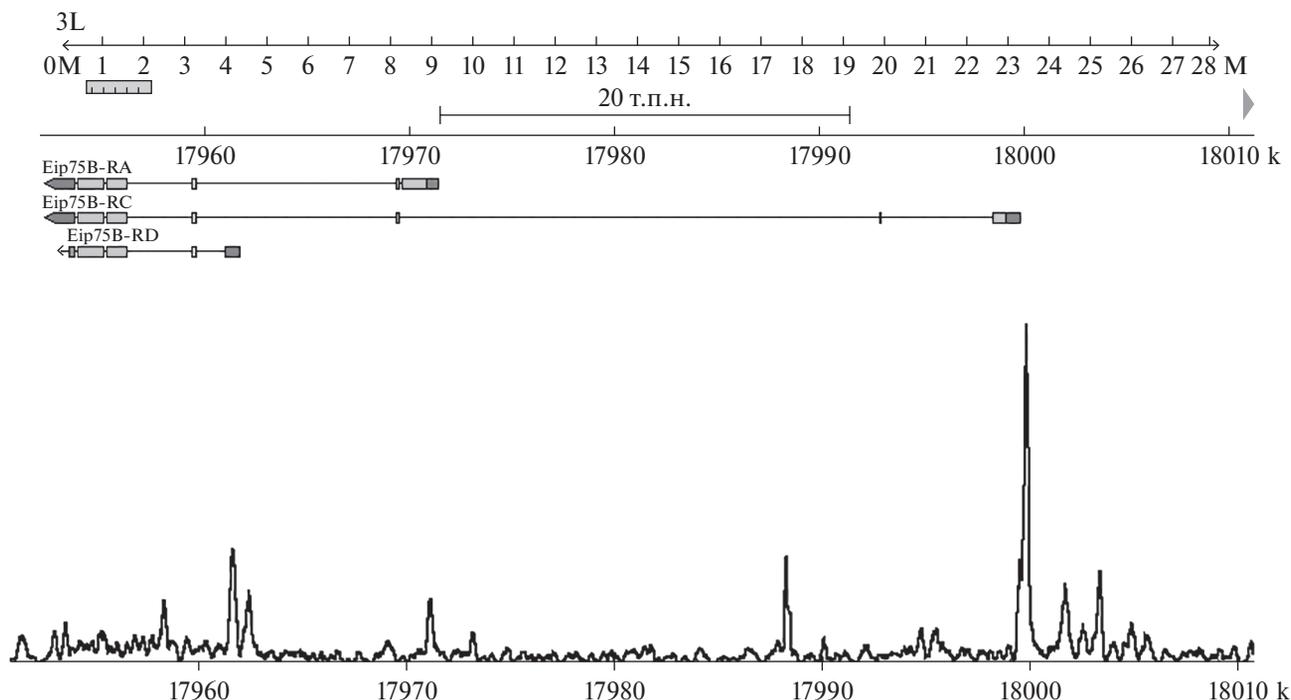


Рис. 1. ChIP-Seq-профиль белка CG9890 в области экдизонзависимого гена *Eip75B*. На верхней панели представлена структура транскриптов из геномного браузера, на нижней панели – сам ChIP-Seq -профиль.

мы Hisat2 в режиме end-to-end. Программа Hisat2 предназначена для обработки данных РНК-Seq, но ее также удобно использовать и для данных ChIP-Seq с ключом *no-spliced-alignment*. Также устанавливали ключ *-a*, который позволяет искать множественные выравнивания, с целью их исключения из анализа. В дальнейшую работу брали только уникально картированные риды, обрабатывая флаг “NH:i” в результатах вывода программы Hisat2. Также брали только те риды, уровень мисматчей в которых был менее 5%, обрабатывая флаг “XM:i” в результатах вывода программы Hisat2. Фильтрацию осуществляли с помощью собственной программы. Сайты связывания белка CG9890 определяли с помощью программы MACS2 с использованием параметров по умолчанию (*q-value* < 0.05).

Анализ сайтов связывания белка CG9890 в промоторных областях генов. Промоторные области определяли из аннотации транскриптов генома дрозофилы *dmel_r6.40*. Промоторной областью считали интервал ± 500 п.н. от старта транскрипции. Считали, что сайт связывания находится в промоторной области гена, если пик сайта связывания попадает в заданный интервал. Анализ проводили с помощью программы *bedtools*. Кроме того, сайты связывания белка CG9890 в области экдизоновых генов дополнительно контролировали путем совмещения структуры транскриптов из геномного браузера и профиля ChIP-Seq

(рис. 1). Исследование зависимости транскрипции генов от обогащения белка CG9890 на их промоторах проводили в программе Microsoft Excel, включая расчет коэффициента корреляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Белок CG9890 привлекается на промоторы экдизонзависимых генов

С целью идентификации сайтов связывания белка CG9890 на промоторах экдизонзависимых генов с помощью биоинформатических методов проанализировали ChIP-Seq-профиль этого белка [12]. Проанализированы все 17 идентифицированных нами ранее генов, транскрипция которых значительно возрастает (в 3 раза и более) после добавления 20-гидроксиэкдизона к клеткам S2 дрозофилы [14]. Оказалось, что белок CG9890 присутствует на промоторах 12 из 17 генов, что сильно превышает случайное совпадение (среднегеномный уровень колокализации белка CG9890 с промоторами генов составляет, как мы показываем далее, примерно 15%, поэтому уровень случайного совпадения соответствует двум–трем генам из 17). В качестве примера на рис. 1 представлен профиль CG9890 в области экдизонзависимого гена *Eip75B*.

Для большинства экдизонзависимых генов характерен альтернативный сплайсинг, причем разные транскрипты могут как активироваться экдизоном, так и нет. Примером такого гена является

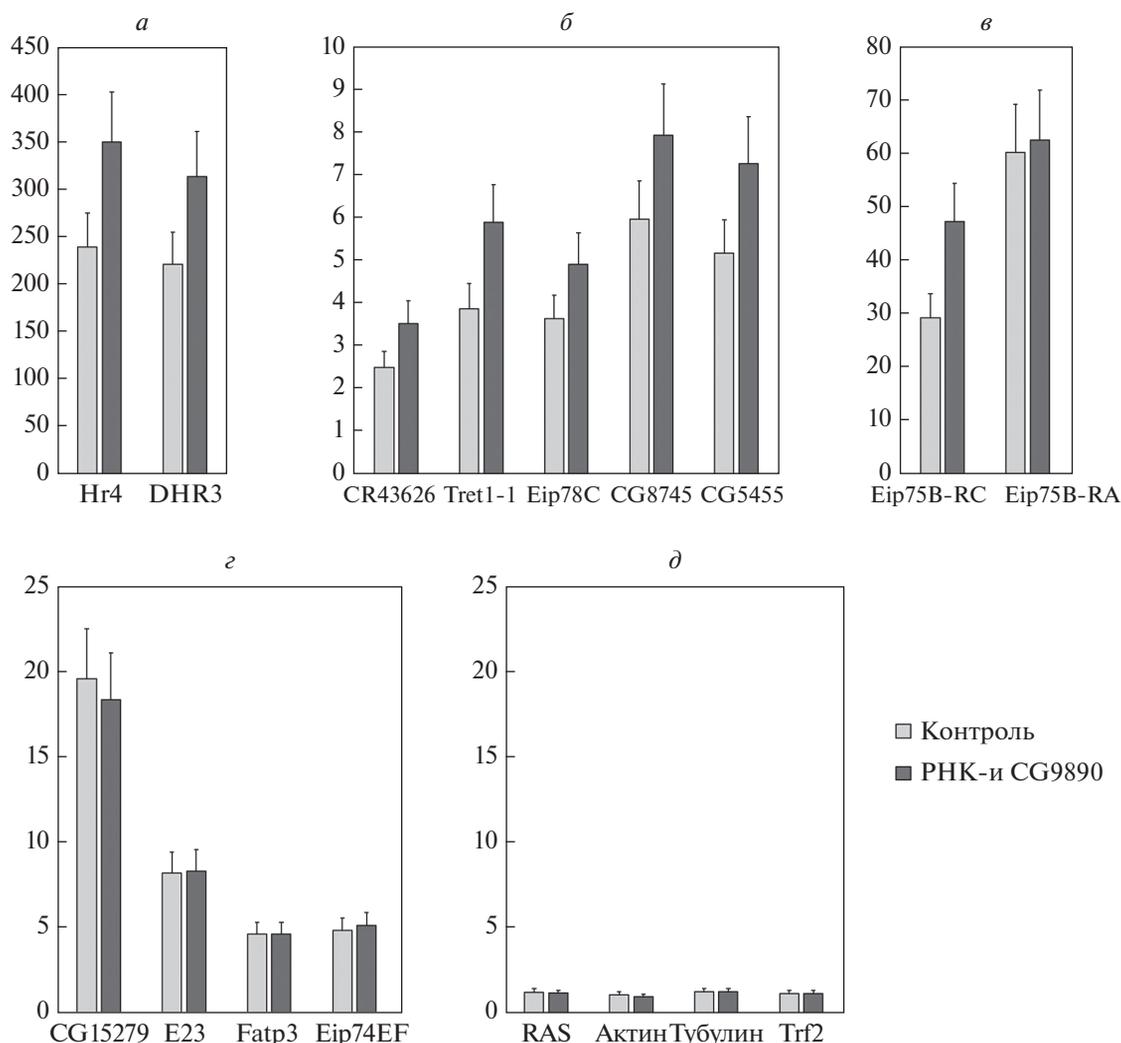


Рис. 2. Активация транскрипции экдизонзависимых (а–е) и контрольных генов (д) в ответ на добавление 20-гидроксиэктизона к S2 клеткам дрозофилы через 3 ч после индукции. Названия генов указаны под диаграммами. На вертикальной оси указана степень активации транскрипции. Светлые столбцы соответствуют активации транскрипции в нормальных клетках, темные столбцы – активации транскрипции при РНК-интерференции гена *CG9890*. Измерения проводили в трех повторах. Линии погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего.

Eip75B. На рис. 1 видно, что белок *CG9890* присутствует на промоторе экдизонзависимого транскрипта *Eip75B-RC*, тогда как на промоторе другого экдизонзависимого транскрипта *Eip75B-RA* (рис. 1) данного белка нет. Транскрипт *Eip75B-RD* экдизоном не активируется.

CG9890 принимает участие в активации экдизонзависимых генов

Далее провели анализ активации выбранных на предыдущем этапе экдизонзависимых генов в обработанных 20-гидроксиэктизоном клетках – нормальных и после РНК-интерференции *CG9890*. Проанализировали два разных экдизонзависимых транскрипта гена *Eip75B* – содержащего *CG9890*

на промоторе и без этого белка. Результаты анализа представлены на рис. 2.

Экспрессия экдизонзависимых генов существенно повышается в ответ на обработку клеток экдизоном в отличие от контрольных генов. Еще большая степень активации 8 из 12 генов наблюдается в клетках после РНК-интерференции белка *CG9890* по сравнению с контрольной линией клеток (рис. 2а–в). Транскрипция контрольных генов при РНК-интерференции *CG9890* не изменяется (рис. 2д). Интересно, что уровень транскрипта *Eip75B-RC*, синтезируемого с промотора, с которым связывается *CG9890*, повышается при РНК-интерференции *CG9890*, тогда как уровень транскрипта *Eip75B-RA*, синтезируемого с промотора, не занятого белком *CG9890*, не отличается от уровня в контрольных клетках (рис. 2в).

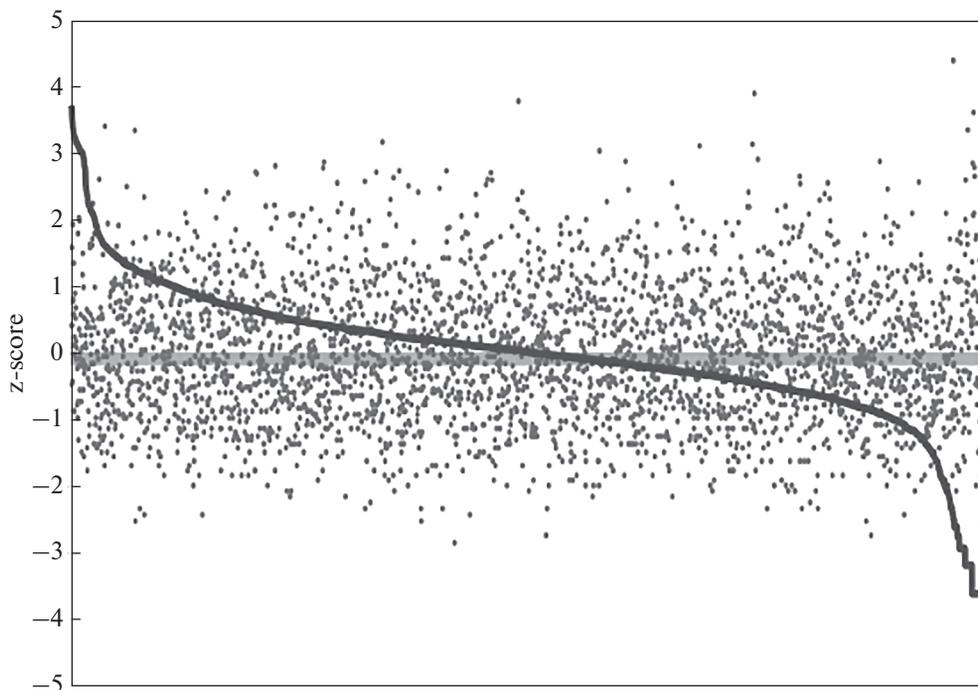


Рис. 3. Обогащение белка CG9890 на промоторах генов и уровень их экспрессии. По горизонтальной оси представлены 2803 гена, отсортированные по убыванию экспрессии слева направо. Сплошной линией показана экспрессия соответствующих генов, точки указывают представленность CG9890 на промоторах этих генов в терминах z-score (стандартные отклонения относительно среднего).

На активацию четырех экдизонзависимых генов РНК-интерференция CG9890 не влияет (рис. 2з). На основе полученных данных можно сделать вывод, что белок CG9890 выступает как репрессор экдизонзависимой активации транскрипции.

Характеристика группы CG9890-ассоциированных генов

Ранее мы изучали роль CG9890 в регуляции базальной транскрипции (без активации экдизоном) и обнаружили, что транскрипция части генов возрастает, а части снижается в результате РНК-интерференции CG9890. Белок CG9890 входит в семейство белков с доменами цинковых пальцев, значительная часть которых является факторами транскрипции [15]. Показана зависимость между присутствием многих из белков этого семейства на промоторах и уровнем экспрессии соответствующих генов [16, 17]. Мы решили проверить существование подобной зависимости для белка CG9890. Мы проанализировали ChIP-Seq-профиль белка CG9890 и обнаружили его сайты связывания на промоторах 3160 индивидуальных транскриптов — продуктов 2803 генов, что составляет 15.8% от общего числа аннотированных генов дрозофилы. Так как ChIP-Seq CG9890 выполнен в клетках линии S2, мы проанализировали транскрипцию соответствующих генов также в

этой линии и исследовали зависимость транскрипции генов от обогащения белка CG9890 на их промоторах. Результаты представлены на рис. 3. Видно отсутствие корреляции между уровнем представленности белка CG9890 на промоторах данных генов и уровнем их экспрессии в клетках S2 (коэффициент корреляции Спирмена 0.03).

Иными словами, белок CG9890 локализован на промоторах генов как с сильной, так и со слабой экспрессией. Такая локализация на промоторах генов с различной экспрессией характерна также для классических репрессорных факторов — NELF [18, 19] и белков Polycomb-группы [20]. Этот результат позволяет нам предположить, что белок CG9890 не является классическим транскрипционным фактором-активатором, а функционирует по сходным с белками-репрессорами механизмам. Противоположное влияние белка CG9890 на экспрессию различных генов может быть опосредовано вторичными эффектами его нокдауна в клетке. Ранее мы показали, что белок CG9890 локализуется на промоторах многих генов регуляторных факторов. Изменение экспрессии этих белков влияет на экспрессию подконтрольных им генов. В частности, при РНК-интерференции изучаемого белка на 40% падает количество мРНК белка Su(z)2 [12], субъединицы комплекса PRC1, который участвует в репрессии большого числа генов дрозофилы. Это, в свою

очередь, может привести к активации каких-то PRC-зависимых генов и изменению экспрессии их генов-мишеней.

Ранее мы обнаружили взаимодействие белка CG9890 с мультифункциональным консервативным белком ENY2 и с белковыми комплексами SAGA, ORC, dSWI/SNF, TFIID и TPOC [11]. Сайты связывания CG9890 в геноме дрозофилы локализованы преимущественно на промоторах генов. Белок CG9890 участвует в регуляции экспрессии части генов, на промоторах которых он находится [12]. Нами изучена роль белка CG9890 в регуляции экдизонзависимой индуцибельной транскрипции. С этой целью идентифицированы 12 экдизонзависимых генов, на промоторах которых локализован белок CG9890. Изучена их активация, вызванная добавлением 20-гидроксиэкдизона, как в нормальных клетках, так и после РНК-интерференции CG9890. Экспрессия экдизонзависимых генов существенно повышается в ответ на обработку клеток экдизоном, в отличие от контрольных генов. Причем в клетках после РНК-интерференции CG9890 транскрипция 8 из 12 генов была значительно выше, чем в контрольной линии. Таким образом, белок CG9890 участвует в регуляции транскрипции экдизонзависимых генов, выступая в большинстве случаев, в роли репрессора.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00269). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБГ РАН.

В данной работе не использовали людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vorobyeva N.E., Mazina M.U., Golovnin A.K., Kopytova D.V., Gurskiy D.Y., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Georgiev P.G., Krasnov A.N. (2013) Insulator protein Su(Hw) recruits SAGA and Brahma complexes and constitutes part of origin recognition complex-binding sites in the *Drosophila* genome. *Nucl. Acids Res.* **41**, 5717–5730.
- Мазина М.Ю., Воробьева Н.Е., Краснов А.Н. (2013) Способность Su(Hw) создавать платформу для формирования ориджинов репликации не зависит от типа окружающего хроматина. *Цитология.* **55**, 218–224.
- Vorobyeva N.E., Nikolenko J.V., Krasnov A.N., Kuzmina J.L., Panov V.V., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. (2011) SAYP interacts with DHR3 nuclear receptor and participates in ecdysone-dependent transcription regulation. *Cell Cycle.* **10**, 1821–1827.
- Kopytova D.V., Krasnov A.N., Orlova A.V., Gurskiy D.Y., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. (2010) ENY2: couple, triple...more? *Cell Cycle.* **9**, 479–481.
- Kurshakova M., Maksimenko O., Golovnin A., Pulina M., Georgieva S., Georgiev P., Krasnov A. (2007) Evolutionarily conserved E(y)2/Sus1 protein is essential for the barrier activity of Su(Hw)-dependent insulators in *Drosophila*. *Mol. Cell.* **27**, 332–338.
- Krasnov A.N., Kurshakova M.M., Ramensky V.E., Mardanov P.V., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G. (2005) A retrocopy of a gene can functionally displace the source gene in evolution. *Nucl. Acids Res.* **33**, 6654–6661.
- Kopytova D., Popova V., Kurshakova M., Shidlovskii Y., Nabirochkina E., Brechalov A., Georgiev G., Georgieva S. (2016) ORC interacts with THSC/TREX-2 and its subunits promote Nxf1 association with mRNP and mRNA export in *Drosophila*. *Nucl. Acids Res.* **44**, 4920–4933.
- Eaton M.L., Prinz J.A., MacAlpine H.K., Tretyakov G., Kharchenko P.V., MacAlpine D.M. (2011) Chromatin signatures of the *Drosophila* replication program. *Genome Res.* **21**, 164–174.
- Masai H., Matsumoto S., You Z., Yoshizawa-Sugata N., Oda M. (2010) Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 89–130.
- MacAlpine H.K., Gordan R., Powell S.K., Hartmink A.J., MacAlpine D.M. (2010) *Drosophila* ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading. *Genome Res.* **20**, 201–211.
- Фурсова Н.А., Николенко Ю.В., Сошникова Н.В., Мазина М.Ю., Воробьева Н.Е., Краснов А.Н. (2018) Белок CG9890 с доменами цинковых пальцев — новый компонент ENY2-содержащих комплексов дрозофилы. *Acta Naturae.* **10**(4), 110–114.
- Фурсова Н.А., Мазина М.Ю., Николенко Ю.В., Воробьева Н.Е., Краснов А.Н. (2020) Белок CG9890 дрозофилы, содержащий домены цинковых пальцев, колокализуется с комплексами модификации и ремоделирования хроматина на промоторах генов и участвует в регуляции транскрипции. *Acta Naturae.* **12**(4), 114–119.
- Clemens J.C., Worby C.A., Simonson-Leff N., Muda M., Maehama T., Hemmings B.A., Dixon J.E. (2000) Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 6499–6503.
- Mazina M.Y., Nikolenko J.V., Fursova N.A., Nedil'ko P.N., Krasnov A.N., Vorobyeva N.E. (2015) Early-late genes of the ecdysone cascade as models for transcriptional studies. *Cell Cycle.* **14**, 3593–3601.
- Разин С.В., Борунова В.В., Максименко О.Г., Кантидзе О.Л. (2012) Семейство белков, содержащих мотив цинковые пальцы CYS2HIS2-типа: классификация, функции, важнейшие представители. *Биохимия.* **77**, 277–288.
- Cheng C., Alexander R., Min R., Leng J., Yip K.Y., Rozowsky J., Yan K.K., Dong X., Djebali S., Ruan Y., Davis C.A., Carninci P., Lassman T., Gingeras T.R., Guigo R., Birney E., Weng Z., Snyder M., Gerstein M. (2012) Understanding transcriptional regulation by in-

- tegrative analysis of transcription factor binding data. *Genome Res.* **22**, 1658–1667.
17. Jiang N., Emberly E., Cuvier O., Hart C.M. (2009) Genome-wide mapping of boundary element-associated factor (BEAF) binding sites in *Drosophila melanogaster* links BEAF to transcription. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 3556–3568.
 18. Gilchrist D.A., Nechaev S., Lee C., Ghosh S.K., Collins J.B., Li L., Gilmour D.S., Adelman K. (2008) NELF-mediated stalling of Pol II can enhance gene expression by blocking promoter-proximal nucleosome assembly. *Genes Dev.* **22**, 1921–1933.
 19. Mazina M.Y., Kovalenko E.V., Vorobyeva N.E. (2021) The negative elongation factor NELF promotes induced transcriptional response of *Drosophila* ecdysone-dependent genes. *Sci. Rep.* **11**, 172.
 20. Brookes E., de Santiago I., Hebenstreit D., Morris K.J., Carroll T., Xie S.Q., Stock J.K., Heidemann M., Eick D., Nozaki N., Kimura H., Ragoussis J., Teichmann S.A., Pombo A. (2012) Polycomb associates genome-wide with a specific RNA polymerase II variant, and regulates metabolic genes in ESCs. *Cell Stem Cell.* **10**, 157–170.

THE DROSOPHILA CG9890 PROTEIN IS INVOLVED IN THE REGULATION OF ECDYSONE-DEPENDENT TRANSCRIPTION

Yu. V. Nikolenko¹, N. A. Fursova¹, M. Yu. Mazina¹, N. E. Vorobyeva¹, and A. N. Krasnov^{1, *}

¹ *Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

**e-mail: krasnov@genebiology.ru*

Earlier in our works, it was shown that the CG9890 protein, which has zinc finger domains, interacts with ENY2-containing complexes and is localized mainly on the promoters of active genes. The CG9890 protein is involved in the regulation of the expression of some of the genes on the promoters of which it is located, and among these genes there are genes for the ecdysone cascade. In this work, the role of the CG9890 protein in the regulation of ecdysone-dependent inducible transcription was studied. For this, 12 ecdysone-dependent genes were identified, on the promoters of which the CG9890 protein is localized. Their activation was studied after the addition of 20-hydroxyecdysone to cells, both in normal conditions and after RNA interference of CG9890. The expression of ecdysone-dependent genes is significantly increased in response to the treatment of cells with ecdysone, in contrast to the control genes. Moreover, in the cell line after RNA interference CG9890, the transcription of 8 out of 12 genes was significantly higher than in the control line. Thus, the CG9890 protein is involved in the regulation of transcription of ecdysone-dependent genes, and, in most cases, acts as a repressor.

Keywords: CG9890, *Drosophila*, zinc fingers, transcription activation, 20-hydroxyecdysone

УДК 577.12.05;576.52

СВЯЗАННАЯ С GTP ФОРМА Rab3D СПОСОБСТВУЕТ РОСТУ ЛИПИДНЫХ КАПЕЛЬ В АДИПОЦИТАХ^{1, 2}

© 2022 г. T. Wang^{a, b}, M. J. Jin^{a, b}, L. K. Li^{a, b, *}^aMOE Key Laboratory of Bioinformatics and Tsinghua-Peking Center for Life Sciences, Beijing, 100084 China^bAdvanced Innovation Center for Structural Biology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100190 China

*e-mail: liangkui826@mail.tsinghua.edu.cn

Поступила в редакцию 11.10.2021 г.

После доработки 27.12.2021 г.

Принята к публикации 27.12.2021 г.

GTPазы Rab – главные регуляторы мембранного трафика. Профилирование протеома выявило десятки белков Rab, ассоциированных с липидными каплями (LD), но установлены функции лишь некоторых из них. Белок Cidec, которым обогащены участки контактов LD–LD, опосредует слияние и рост LD. Нами изучена роль Rab3D в хранении липидов в адипоцитах. Подтверждено, что уровень транскриптов Rab3D в адипоцитах выше, чем у других членов семейства Rab3; различия были наиболее выраженными в белой жировой ткани. Более того, нами показано, что Rab3D способствует дозозависимому росту LD в преадипоцитах 3T3-L1 независимо от опосредованного Cidec слияния LD. Наконец, подтверждено, что GTP-связанная форма Rab3D способствует росту LD; в ходе дифференцировки адипоцитов эта форма транслоцируется в LD из других везикул. Напротив, Rab3D-GDP остается в цитоплазме и не влияет на размеры LD. Получены данные, доказывающие участие Rab3D в контролируемом образовании крупных LD в адипоцитах. Можно заключить, что Rab3D – это новый регулятор LD, свойства которого отличаются от свойств идентифицированных ранее белков Rab18 и Rab8a, ассоциированных с LD.

Ключевые слова: липидные капли, адипоциты, Rab3D**DOI:** 10.31857/S0026898422040140

ВВЕДЕНИЕ

Липидные капли (LD) – высокодинамичные субклеточные органеллы, обнаруженные у разных организмов – от дрожжей до млекопитающих [1]. LD состоят из нейтрального липидного ядра, окруженного монослоем фосфолипидов и ассоциированных белков [2, 3]. LD претерпевают динамические изменения, включающие биогенез, слияние/рост и деградацию [4–6]. Биогенез LD инициируется *de novo* в эндоплазматическом ретикулуме (ER) [7, 8]. Рост индивидуальных LD достигается несколькими путями. Во-первых, LD приобретают нейтральные липиды из ER. Во-вторых, LD могут синтезироваться *in situ* поверхностными белками LD, такими как DGAT2 [9]. Наконец, рост LD может определяться их слиянием, опосредуемым CIDE. Сайты контактов LD–LD обогащены индуцируемым клеточной смертью эффекторным белком, подобным фактору 45 фрагментации ДНК (CIDE), который

участвует в слиянии и росте LD посредством переноса липидов от мелких LD к более крупным [10–12]. Белки CIDE включают Cidea, Cideb и Cidec [13–17]: Cidea экспрессируется преимущественно в бурой жировой ткани (BAT) [18, 19], Cideb – в печени [20–22], а Cidec почти исключительно в белой жировой ткани (WAT) [23–25]. Катаболизм LD включает гидролиз и/или аутофагию. Гидролиз LD опосредуется клеточными липазами, которые катализируют расщепление триацилглицерина и его метаболитов. Аутофагия LD это процесс деградации, в котором LD поглощаются аутофагосомой, которая затем сливается с лизосомой с образованием аутолизосомы [3, 26, 27].

Малые GTPазы Rab играют важные роли в транспорте везикул и динамике мембран [28–31]. Активность белков Rab регулируется специфичными активирующими GTPазы белками (GAP), факторами обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF), нижележащими эффекторами. GDP-связанный Rab трансформируется в GTP-форму под действием мембраноспецифичного GEF, тогда как GTP-связанная форма Rab превращается в Rab-GDP под действием GAP [32, 33]. Большинство белков Rab активны в GTP форме и взаимо-

¹ Статья представлена авторами на английском языке.² Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898422040140 для авторизованных пользователей.

действуют с широким кругом эффекторов [34]. Особенности функционирования белков Rab (циклическое чередование включенных “on” и выключенных “off” состояний) ведет лишь к временному взаимодействию с эффекторами, которое сложно фиксировать.

К настоящему времени идентифицированы многие ассоциированные с LD Rab GTPазы [35–37]. Однако лишь некоторые из них верифицированы функционально. Среди них наиболее хорошо охарактеризован ассоциированный с LD белок Rab18, который способствует росту LD за счет привязки ER к LD [38–41]. Rab8a служит активатором опосредуемого Cidec слияния LD в адипоцитах [42]. Мутанты Rab32 с потерей функции снижают запасы липидов, нарушая аутофагию у *Drosophila* [43]. Истощение Rab40с уменьшает размеры LD, тогда как сверхэкспрессия Rab40с индуцирует кластеризацию LD [44]. Rab7 незаменим для деградации LD в гепатоцитах путем липофагии [45]. Получены также косвенные свидетельства того, что Rab1 и 5 взаимодействуют с LD [46–48]. Подсемейство Rab3 включает четыре гомологичных белка – Rab3A, Rab3B, Rab3C и Rab3D [49]. Rab3A, Rab3B и Rab3C экспрессируются преимущественно в головном мозге и нейроэндокринных клетках и локализуются исключительно в синаптических везикулах [50]. Тем не менее, Rab3D сначала идентифицировали в адипоцитах и показали постепенное повышение его экспрессии по мере дифференцировки адипоцитов [51, 52]. Белок Rab3D обильно представлен в нескольких других не нейронных тканях, включая поджелудочную и околоушную железу [52–56].

В настоящей работе определены уровни экспрессии четырех представителей семейства Rab3 в адипозных тканях, проанализировано действие Rab3D на рост LD. Кроме того, нами проведен анализ субклеточной локализации Rab3D в пре- и зрелых адипоцитах 3T3-L1. Полученные нами данные указывают на важную роль Rab3D в развитии адипоцитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные, культуры клеток и временная трансфекция. Мышей, использованных в работе, содержали в контролируемых условиях (температура 22°C, 12-часовой цикл день/ночь) со свободным доступом к воде и стандартному сбалансированному корму для грызунов. опыты проводили в виварии Университета Tsinghua (Пекин, КНР). Проведение опытов одобрено Комитетом по обращению с животными университета Tsinghua.

Преадипоциты 3T3-L1 (ATCC, Manassas, США) культивировали в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с 10% фетальной сыво-

ротки крупного рогатого скота (FBS) и антибиотиками (100 Ед./мл пенициллина и 100 Ед./мл стрептомицина) при 37°C в камерах с 5% CO₂. Линия клеток Hela со стабильной экспрессией Cidec получена в подарок от Feng-Jung Chen (Fudan University, КНР).

Зрелые адипоциты 3T3-L1 получали из преадипоцитов ранних генераций согласно протоколу ATCC. Через 48 ч после достижения 100%-ной плотности среду заменяли индукционной средой (к исходной среде добавляли 1 мкг/мл инсулина, 1 мкМ розиглитазона, 1 мкМ дексаметазона и 0.5 мкМ метилизобутирилксантина) и инкубировали в течение 48 ч, а затем заменяли поддерживающей средой (содержащей только 1 мкг/мл инсулина) и продолжали индуцировать в течение 6–8 дней, с заменой среды каждые 2 дня.

Транзientную трансфекцию клеток HeLa плазмидами проводили, используя Lipofectamine 3000 (“Invitrogen”, США) согласно инструкции производителя. Электропорацию преадипоцитов 3T3-L1 и зрелых адипоцитов выполняли, используя систему Amaxa Nucleofector II (“Lonza”, Швейцария), согласно инструкции производителя. Образование LD в преадипоцитах 3T3-L1 и клетках Hela индуцировали, добавляя к среде 200 мкМ олеиновой кислоты (ОА) (в комплексе с 1%-ным бычьим сывороточным альбумином, свободным от жирных кислот (BSA), в дважды дистиллированной H₂O) и выдерживали в течение 18 ч вместе с красителем LD Bodipy-C12.

Экстракция РНК и количественная ПЦР в реальном времени (qRT-PCR). qRT-PCR проводили, как описано ранее [57]. Сначала из клеток одной чашки диаметром 6 см с использованием реагента TRIzol выделяли суммарную РНК (1.0 мл) (“Invitrogen”). Затем проводили синтез первой цепи кДНК с 1 мкг суммарной РНК с использованием набора Superscript Reversal Kit (“Invitrogen”) по протоколу производителя. qRT-PCR проводили с SYBR Green Master Mix (“Applied Biosystems”, США) на приборе ABI 7500 fluorescent quantitative PCR. Использовали следующие условия ПЦР: 95°C, 30 с (1 цикл); затем 95°C, 5 с и 60°C, 30 с (40 циклов), в конце проводили анализ кривой плавления. В качестве внутреннего контроля выбраны праймеры на β-актин. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали методом 2^{-ΔΔCT}. Нуклеотидные последовательности праймеров показаны в табл. 1.

Конструирование плазмид. кДНК, кодирующую Rab3D мыши, клонировали в векторе экспрессии для клеток млекопитающих pEGFP-C1 (“Clontech”, США). Мутанты Rab3D с заблокированными сайтами связывания GTP и GDP (Q81L или N135I) синтезировали путем сайт-направленного мутагенеза pEGFP-Rab3D, как описано ранее [58]. Полноразмерную кДНК, кодирующую

Таблица 1. Праймеры для qRT-PCR, использованные в работе

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')
β -Actin	ACACTGTGCCCATCTACGAG CAGCACTGTGTTGGCATAGAG
Rab3a	CTCCAGCCTTTGTCAGCACCGT CAACTGACAACCTGTGGACGGGAT
Rab3b	CCTCCTTCCTTTTCCGCTATG TCACACGCTTCTCATGGCG
Rab3c	CTGTTCCGTTATGCCGACGAT CCCCTCGATAGTAGGCTGTG
Rab3d	ATGGCATCCGCTAGTGAGC TCGGTAGACCGTCTTGACCTT

перилипин (Plin1), субклонировали в вектор pm-Cherry-N1 (“Clontech”), как описано ранее [59]. Все полученные конструкции верифицированы с помощью секвенирования ДНК (см. рис. S1, S2 Приложения, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2022/4/supp_Wang_rus.pdf).

Флуоресцентный имиджинг. Клетки культивировали на покровных стеклах, промывали 3 раза PBS, фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 20 мин. Проводили еще один раунд из трех промывок, а затем клетки окрашивали Bodipy493/503 (разведение 1 : 200) в течение 30 мин и Hoechst 33258 (1 : 10000) в течение 10 мин. Изображения получали на конфокальном микроскопе сверхвысокого разрешения Nikon A1 при ×100 увеличении с иммерсионным маслом. Диаметры LD измеряли, используя программу ImageJ и анализировали с помощью программы Graphpad Prism 5.0.

Анализ иммуноблотов. Вестерн-блоттинг проводили, как описано ранее [57]. Экспериментальные образцы лизировали в буфере RIPA и денатурировали при 95°C в течение 10 мин. Затем образцы белков разделяли с помощью электрофореза в 10%-ном SDS-ПААГ и переносили на PVDF-мембрану. Мембрану блокировали в свежеприготовленном растворе PBST, содержащем 5% обезжиренного сухого молока (Yili), в течение 1 ч и инкубировали с антителом к GFP (1 : 1000) (“Santa Cruz Biotechnology”, sc-8334, США) при 4°C. После этого мембрану отмывали PBST (3 раза по 5 мин) и инкубировали с мечеными пероксидазой хрена вторичными антителами при комнатной температуре в течение 1 ч. Наконец, после еще трех отмывок полосы визуализировали с помощью Western Lightning Plus-ECL (“Perkin-Elmer”, США). В качестве контроля использовали IgG к β-актину мыши (“Sigma-Aldrich”, A5441, США). Антитела морской свинки к перилипину 1

(20R-pp004) получали от “Fitzgerald Industries” (США).

Статистика. Результаты по меньшей мере трех независимых опытов анализировали и представляли графически с использованием Graphpad Prism 5.0. Результаты опытов представляли как среднее значение ± стандартное отклонение. Для сравнения значимости различий между группами использовали *t*-тест, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Rab3D активно экспрессируется в WAT

Для определения паттернов экспрессии четырех членов подсемейства Rab3 в разных жировых тканях экстрагировали РНК из четырех типов тканей мыши, а именно из белого жира гонад (gWAT), подкожного белого жира (sWAT), белого жира брыжейки (mWAT) и бурого жира (BAT). Методом qRT-PCR во всех четырех жировых тканях выявлен наиболее высокий уровень экспрессии мРНК Rab3d, затем следует Rab3a, тогда как транскрипты Rab3b и Rab3c в белом жире слабо экспрессируются (рис. 1). Кроме того, транскрипты Rad3d экспрессируются на одинаковом уровне во всех трех типах WAT и немного менее активно в BAT, но различия были незначимыми (*P* > 0.05). Таким образом, представитель подсемейства Rab – Rab3d, в наибольшей степени ассоциирован с WAT. Поэтому дальнейшая работа была сфокусирована преимущественно на изучении функции белка Rab3d (рис. 1).

Rab3D способствует росту LD в преадипоцитах 3T3-L1

Для мониторинга динамики роста LD под действием ОА (индуктор накопления LD), преадипоциты 3T3-L1 в шестилуночном планшете транзитивно трансфицировали pEGFP-C1-Rab3D или плазмидой pEGFP-C1 без вставки (1 мкг/лунку).

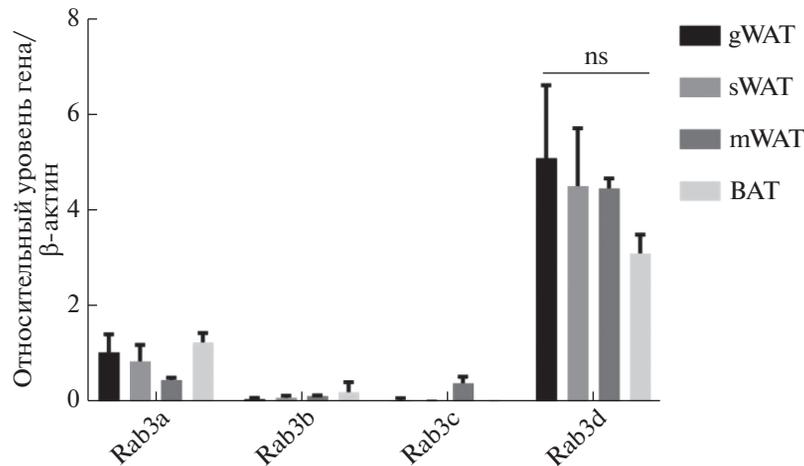


Рис. 1. Паттерны экспрессии разных генов *Rab3* в жировых тканях мыши. qRT-PCR-анализ транскриптов *Rab3a–Rab3d* в разных тканях. В качестве референсного образца использовали транскрипт *Rab3a* из образца gWAT, а уровень мРНК β -актина в качестве внутреннего контроля. Представлены значения среднего \pm стандартное отклонение, вычисленные из результатов трех независимых экспериментов. ns – статистически незначимо.

Показано, что белок Rab3D локализован преимущественно вокруг LD (рис. 2а). Кроме того, мы систематически определяли размеры самых крупных LD в клетках дикого типа или в клетках, сверхэкспрессирующих Rab3D, после обработки ОА. В контрольных клетках большинство LD имели диаметр около 1 мкм, тогда как средний диаметр LD в группе Rab3D был почти в 2 раза больше, чем в контроле ($P < 0.05$) (рис. 2б). С увеличением концентрации трансфицируемой ДНК Rab3d происходит дальнейшее увеличение соответствующих LD (рис. 2в, г). Это свидетельствует о дозозависимой стимуляции роста LD в преадипоцитах 3T3-L1 под действием Rab3D.

LD-стимулирующая активность Rab3D не зависит от опосредованного Cidec слияния LD

Поскольку Rab3D более активно экспрессируется в WAT, чем в BAT, и способен стимулировать рост LD, мы предположили, что он может участвовать в опосредуемом Cidec слиянии и росте LD. Чтобы исключить влияние других компонентов, мы ввели Rab3D в клетки Hela дикого типа или в стабильные линии клеток, сверхэкспрессирующих Cidec. Для индукции образования LD клетки Hela каждой группы стимулировали также обработкой ОА. В отличие от преадипоцитов 3T3-L1, в клетках Hela Rab3D локализовался преимущественно в участках контактов с LD, а добавление белка Cidec не влияло на его локализацию (рис. 3а, в). Согласно количественным данным, Rab3D не регулирует размер LD в клетках Hela дикого типа (рис. 3б). В клетках Hela со стабильной экспрессией Cidec этот белок стимулировал образование более крупных LD, средний диаметр которых был почти в 4 раза больше, чем в клетках дикого типа,

что свидетельствует о функционировании процессов слияния и роста LD в этой стабильной клеточной линии Hela. Добавление Rab3D, к сожалению, не влияет на размер LD (рис. 3г). Кроме того, опыты по коиммунопреципитации подтвердили, что взаимодействие между Rab3D и Cidec (данные не приведены). Эти данные свидетельствуют о том, что Rab3D стимулирует образование крупных LD не с помощью опосредуемого Cidec слияния LD, а с использованием других неизвестных процессов.

GTP-связанный Rab3D действует как активатор роста LD в преадипоцитах 3T3-L1

Исходя из свойств белков Rab (циклическое чередование “активного” GTP-связанного и “неактивного” GDP-связанного состояния), мы использовали сайт-направленный мутагенез для Rab3D в GDP- или GTP-связанной форме. Ранее было показано, что замена глутамина (Q) в положении 81 на лейцин (L) приводит к конформации Rab3D-GTP, тогда как замещение аспарагина (N) в положении 135 изолейцином (I) приводит к стабилизации мутанта Rab3D-GDP. Поэтому мы сконструировали специфические мутанты Rab3D и экспрессировали их в виде белков, слитых с зеленым флуоресцентным белком (EGFP). Показано, что Rab3D-GDP локализован в цитоплазме, тогда как Rab3D-GTP находится преимущественно в других везикулах, но не в структурах LD (рис. 4а). Это подтверждено путем котрансфекции с перилипином 1 (*plin1*) – специфическим маркером поверхности LD. Rab3D-GTP, коэкспрессируемый с *plin1-cherry*, не колокализуется с *plin1* (рис. 4б). В целом это указывает на различия в субклеточной локализации разных форм Rab3D;

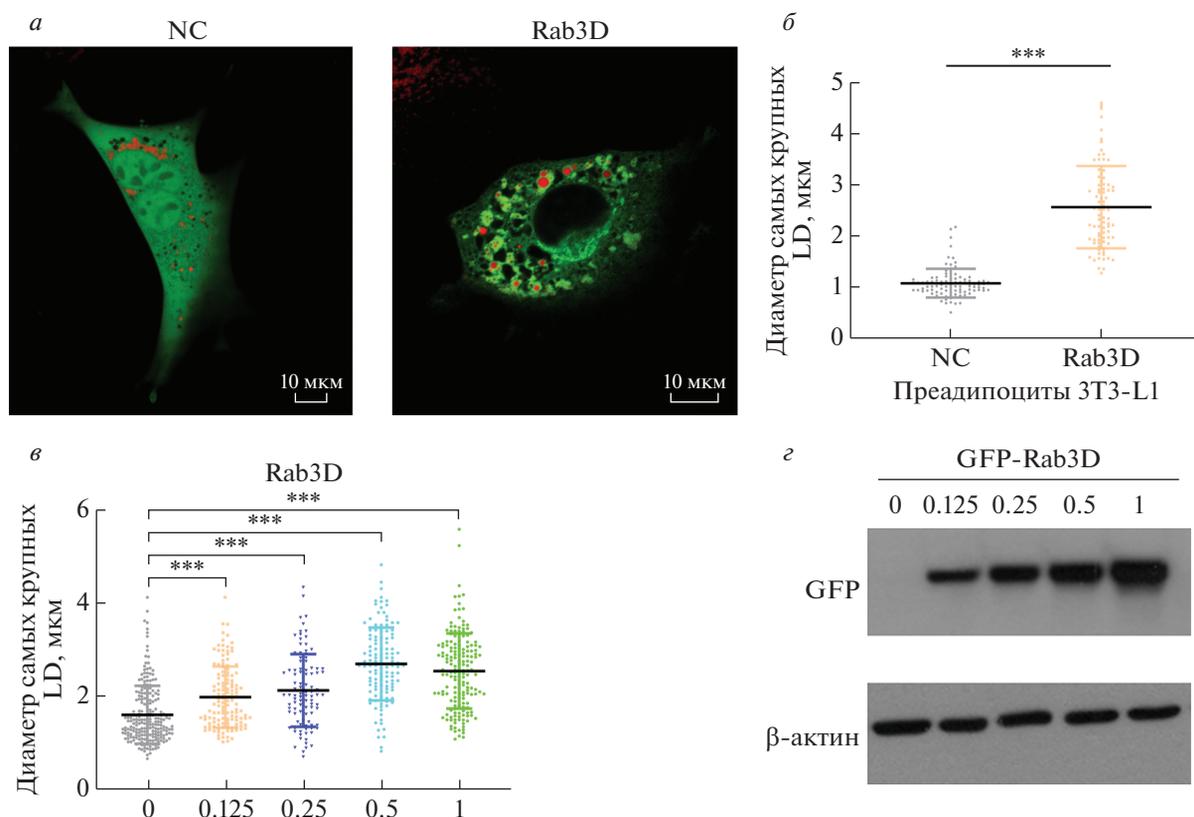


Рис. 2. Сверхэкспрессия Rab3D в преадипоцитах 3T3-L1 и субклеточная локализация Rab3D в преадипоцитах 3T3-L1 (а). Диаметры самых крупных LD в каждой клетке (среднее \pm SD; ≥ 80 в каждой группе; *** $P < 0.001$) (б). Диаметры самых крупных LD в преадипоцитах 3T3-L1, сверхэкспрессирующих различные концентрации Rab3D (среднее \pm SD; $n \geq 100$ в каждой группе) (в). Вестерн-блот, показывающий уровни белка. В качестве контроля нагрузки использовали β -актин (г). NC – контрольные клетки.

неожиданно оказалось, что в преадипоцитах 3T3-L1 активная форма Rab3D-GTP локализуется не в LD, а в других мембранных структурах. Далее мы определили размеры LD в преадипоцитах 3T3-L1, сверхэкспрессирующих специфические мутанты Rab3D. Как видно из рис. 4в, в клетках с GTP-связанным мутантом Rab3D LD имеют такой же диаметр, как в клетках с Rab3D дикого типа ($P > 0.05$), тогда как размеры LD в группе Rab3D-GDP были значительно меньше, чем в первых двух группах ($P < 0.001$). Эти данные показывают, что именно форма Rab3D-GTP действует как активатор роста LD в преадипоцитах 3T3-L1.

В зрелых адипоцитах 3T3-L1 GTP-связанная форма Rab3D частично транслоцируется в LD

Поскольку в ходе дифференцировки адипоцитов уровень белка Rab3D постепенно повышается, мы проанализировали субклеточную локализацию мутантов Rab3D в зрелых адипоцитах 3T3-L1. Оказалось, что Rab3D-GDP более равномерно распределен в цитоплазме, чем в контрольной группе. Интересно, что Rab3D-GTP сильно концен-

трируется вокруг некоторого числа LD, образуя в зрелых адипоцитах относительно равномерную кольцевую структуру. Более того, в зрелых адипоцитах 3T3-L1, котрансфицированных Rab3D-GTP и белком plin1 выявлена определенная степень колокализации Rab3D-GTP с мембранной системой LD, в которой локализуется plin1 (рис. 5). Одним словом, это показывает, что GTP-связанная форма Rab3D частично локализуется в LD, тогда как Rab3D-GDP остается в цитоплазме зрелых адипоцитов 3T3-L1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы определяли уровни экспрессии мРНК четырех белков семейства Rab3 в жировых тканях. Кроме того, с помощью сайт-направленного мутагенеза мы сконструировали Rab3D в разных состояниях и проанализировали их субклеточную локализацию в адипоцитах 3T3-L1 до и после дифференцировки и изучили их регуляцию при росте адипоцитов.

Во-первых, мы подтвердили, что из четырех членов семейства Rab3 самый высокий уровень

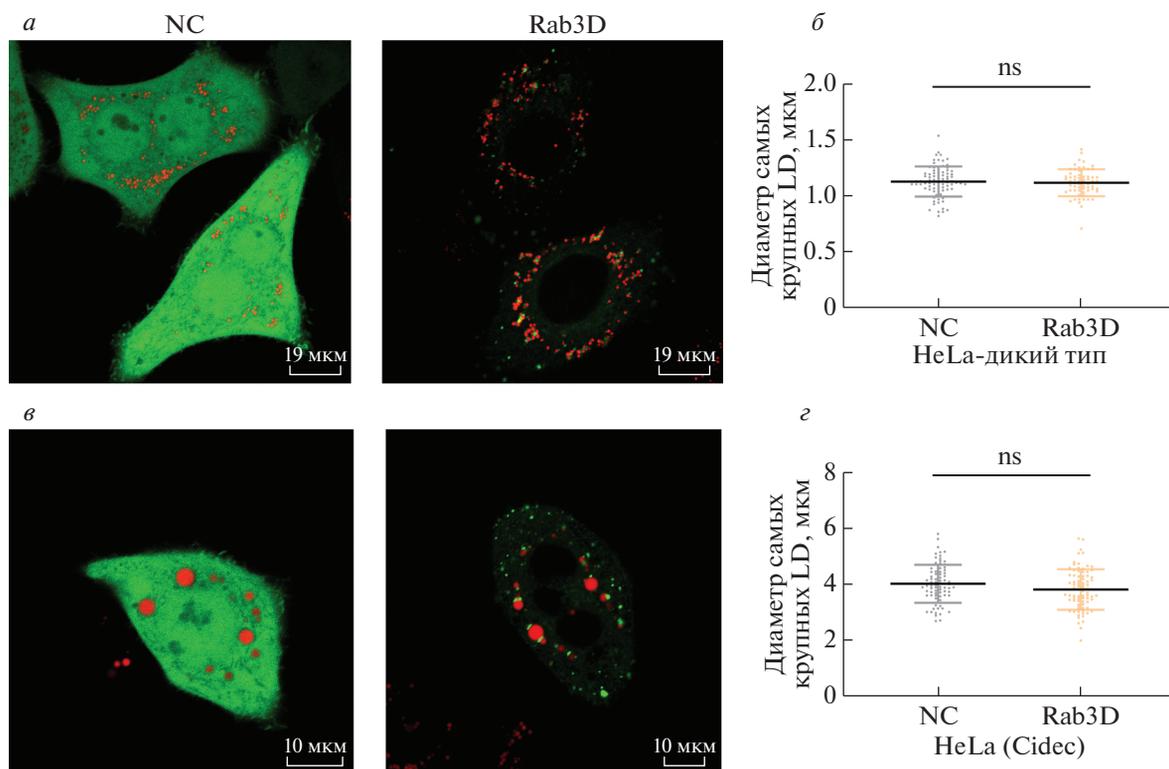


Рис. 3. Сверхэкспрессия Rab3D в клетках HeLa и субклеточная локализация Rab3D в клетках HeLa дикого типа или в клетках HeLa со стабильной сверхэкспрессией Cidec (*a, в*). Диаметры наиболее крупных LD в клетках (*б, г*). Приведено среднее значение ± стандартное отклонение; $n \geq 60$ для каждой группы; ns – незначимое различие. NC – контрольные клетки.

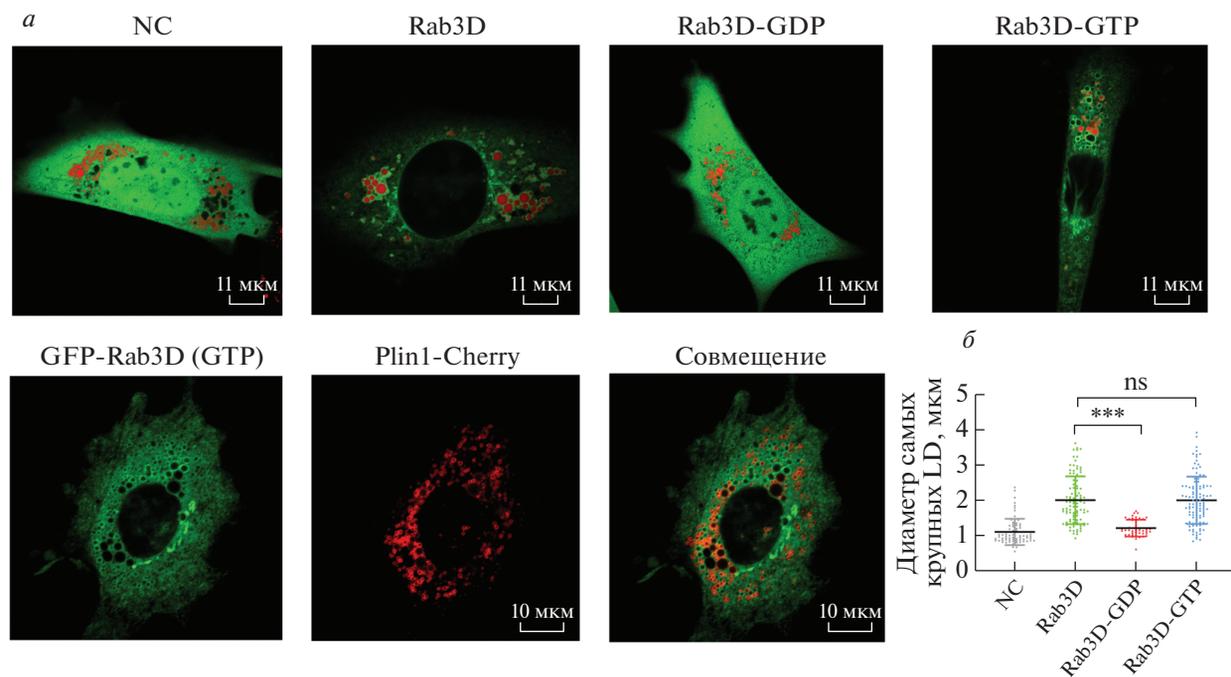


Рис. 4. Субклеточная локализация мутантов Rab3D в преадипоцитах 3Т3-Л1. *a, б* – Преадипоциты 3Т3-Л1 трансфицированные различными формами GFP-Rab3D (зеленые сигналы) или котрансфицированные plin1 (красные сигналы). LD окрашивали BodipyC12 (красный). Все опыты повторяли 3 раза. *в* – Измерение диаметров самых крупных LD в клетках (среднее ± SD; $n \geq 50$ в каждой группе; $P < 0.001$ ***; ns, отсутствие значимых различий). NC – контрольные клетки.

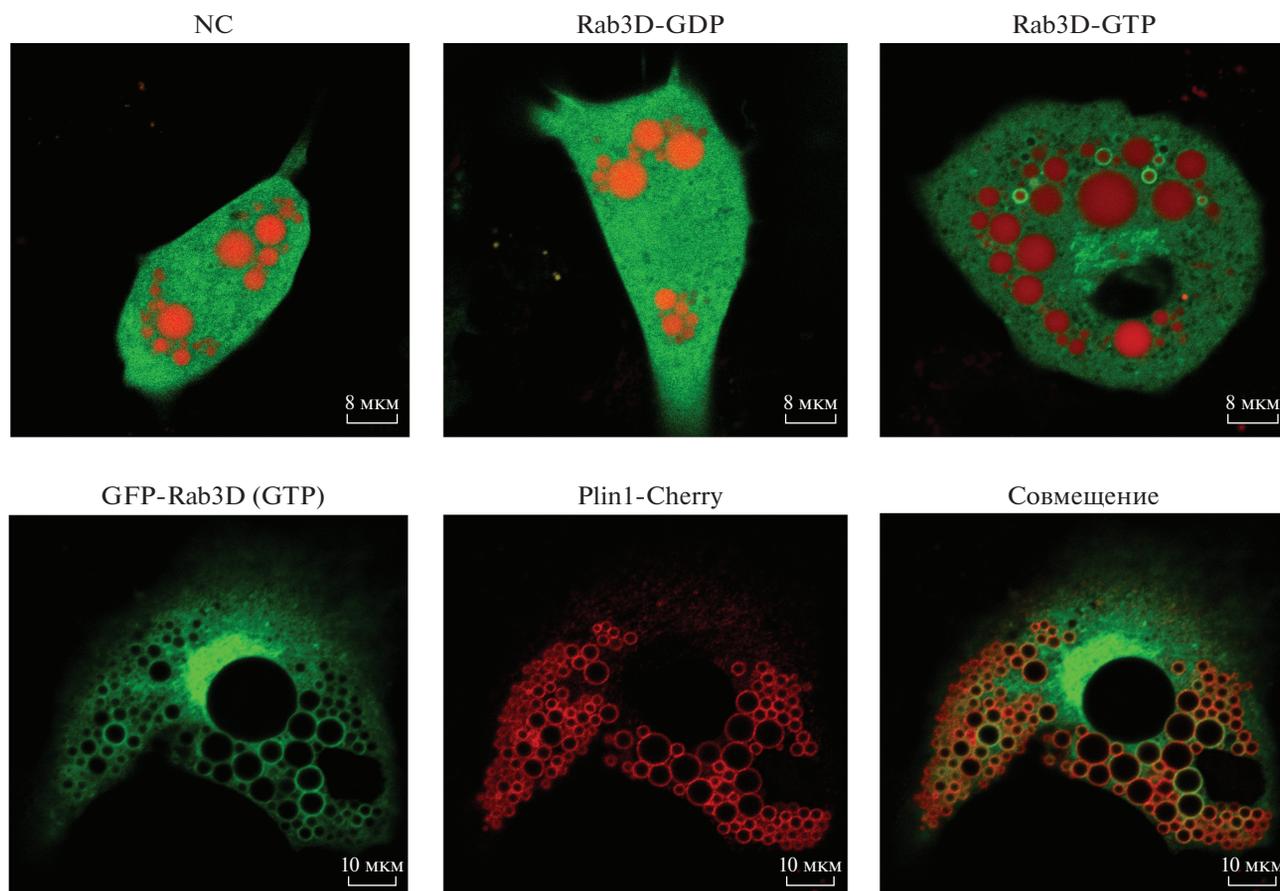


Рис. 5. Субклеточная локализация мутантов Rab3D в дифференцированных клетках 3t3-11. зрелые клетки 3t3-11 трансфицировали только мутантами *gfp-rab3d* (зеленые сигналы) или котрансфицировали с *plin1* (красные сигналы). *ld* окрашивали *boдipус* 12 (красный). все опыты повторяли 3 раза. NC – контрольные клетки.

экспрессии на уровне мРНК имеет Rab3D. Ранее в адипоцитах идентифицировали Rab3D, экспрессия которого постепенно увеличивалась в ходе дифференцировки адипоцитов. Однако функциональные исследования до настоящего времени не проводили. Более высокий уровень Rab3D в WAT подразумевает, что эта форма является критически важным регулятором метаболизма липидов. WAT сохраняет избыток энергии в форме триглицеридов в крупных “однокамерных” LD, тогда как запасенная в BAT энергия рассеивается в виде тепла; BAT обычно содержит “многокамерные” LD и обогащена митохондриями, кровеносными сосудами и нервами [60]. Более того, подтверждено, что Rab3D может стимулировать увеличение LD. И в WAT, и в BAT существуют три пути роста LD, которые наиболее сильно различаются процессами слияния LD, опосредуемыми белками CIDE. Так *Cidea*, один из трех членов семейства CIDE, экспрессируется преимущественно в BAT, тогда как *Cidec* – почти исключительно в WAT [11, 61]. Поэтому мы предположили, что Rab3D может играть роль в опосредуемом *Cidec* слиянии LD. Од-

нако введение Rab3D в клетки Hela, стабильно экспрессирующие *Cidec*, не влияло на размеры LD. Кроме того, не выявлено прямого взаимодействия между Rab3D и *Cidec*. Это показывает, что другие неизвестные компоненты, специфичные для адипоцитов, но не *Cidec*, могут участвовать в этом процессе. Для идентификации белков-мишеней Rab3D, участвующих в контроле увеличения размеров LD, необходимы дальнейшие исследования. Аномальную локализацию Rab3D и утрату его функционирования в контроле роста LD в клетках Hela дикого типа можно объяснить отсутствием специфических эффекторов и вспомогательных молекул, таких как в клетках 3T3-L1.

Кроме того, мы проверили субклеточную локализацию Rab3D. Показано, что в преадипоцитах 3T3-L1 Rab3D-GTP локализуется на поверхности других везикул, а не LD. В дифференцированных адипоцитах, однако, GTP-форма частично находится в LD, формируя равномерную кольцевую структуру. Такая локализация, по-видимому, важна для функционирования Rab3D, так как

GDP-форма Rab3D в ходе дифференцировки остается в цитоплазме. Одним из объяснений может быть то, что в этих двух моделях Rab3D-GTP способен участвовать в разных процессах. Кроме того, GTP-связанная форма Rab3D транслоцируется в LD из других везикул, и эта ассоциация зависит от других, еще не известных компонентов, образующихся в ходе дифференцировки адипоцитов. Последняя гипотеза более приемлема, поскольку Rab3D-GTP может повышать образование крупных LD в преадипоцитах 3T3-L1. Это согласуется с представлениями о том, что GTP-связанные Rab активно стимулируют мембранный трафик, тогда как GTPазы в GDP-связанной форме редко играют позитивную регуляторную роль. Изначально идентифицированный в адипоцитах белок Rab3D экспрессируется и в других секреторных гранулах и действует как позитивный модулятор экзоцитоза [53, 56, 62–64]. Несмотря на то, что в протеомных исследованиях обнаружены десятки белков Rab, ассоциированных с LD, только несколько из них, как сообщалось, активно участвуют в образовании LD, включая Rab 1, 5, 7, 8a, 18, 32 и 40c. В число этих белков входит Rab32 – уникальный представитель этого семейства, не локализованный в LD. Rab32 действует на лизосомы и аутофагосомы, влияя на аутофагию, а следовательно, и на запасание липидов. Таким образом, для выяснения того, являются ли везикулы, в которых локализован Rab3D, лизосомами или какими-то другими органеллами, и каким образом Rab3D транслоцируются из этих везикул в LD, необходимы дальнейшие исследования.

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Т.В. и Л.К.Л. предложили идею и разработали схему эксперимента, Т.В. и М.Д.Д. провели эксперименты, Т.В. проанализировал и интерпретировал данные, а также написал статью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rosen E.D., Spiegelman B.M. (2014) What we talk about when we talk about fat. *Cell*. **156**(1–2), 20–44.
- Fujimoto T., Parton R.G. (2011) Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**(3). a004838
- Olzmann J.A., Carvalho P. (2019) Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**(3), 137–155.
- Martin S., Parton R.G. (2006) Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**(5), 373–378.
- Farese R.V., Jr., Walther T.C. (2009) Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell*. **139**(5), 855–860.
- Thiam A.R., Farese R.V., Jr., Walther T.C. (2013) The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**(12), 775–786.
- Wilfling F., Haas J.T., Walther T.C., Farese R.V., Jr. (2014) Lipid droplet biogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **29**, 39–45.
- Long A.P., Mannes Schmidt A.K., VerBrugge B., Dortch M.R., Minkin S.C., Prater K.E., Biggerstaff J.P., Dunlap J.R., Dalhaimer P. (2012) Lipid droplet de novo formation and fission are linked to the cell cycle in fission yeast. *Traffic*. **13**(5), 705–714.
- Krahmer N., Guo Y., Farese R.V., Jr., Walther T.C. (2009) SnapShot: lipid droplets. *Cell*. **139**(5), 1024–U1192.
- Gong J., Sun Z., Wu L., Xu W., Schieber N., Xu D., Shui G., Yang H., Parton R.G., Li P. (2011) Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites. *J. Cell Biol.* **195**(6), 953–963.
- Wu L.Z., Zhou L.K., Chen C., Gong J.Y., Xu L., Ye J., Li D., Li P. (2014) Cidea controls lipid droplet fusion and lipid storage in brown and white adipose tissue. *Sci. China-Life Sci.* **57**(1), 107–116.
- Murphy S., Martin S., Parton R.G. (2010) Quantitative analysis of lipid droplet fusion: inefficient steady state fusion but rapid stimulation by chemical fusogens. *PLoS One*. **5**(12), e15030.
- Gong J., Sun Z., Li P. (2009) CIDE proteins and metabolic disorders. *Curr. Opin. Lipidology*. **20**(2), 121–126.
- Inohara N., Koseki T., Chen S., Wu X.Y., Nunez G. (1998) CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J.* **17**(9), 2526–2533.
- Puri V., Konda S., Ranjit S., Aouadi M., Chawla A., Chouinard M., Chakladar A., Czech M.P. (2007) Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. *J. Biol. Chem.* **282**(47), 34213–34218.
- Puri V., Ranjit S., Konda S., Nicoloso S.M.C., Straubhaar J., Chawla A., Chouinard M., Lin C., Burkart A., Corvera S., Perugini R.A., Czech M.P. (2008) Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**(22), 7833–7838.
- Jambunathan S., Yin J., Khan W., Tamori Y., Puri V. (2011) FSP27 promotes lipid droplet clustering and then fusion to regulate triglyceride accumulation. *PLoS One*. **6**(12), e28614.
- Lin S.C., Li P. (2004) CIDE-A, a novel link between brown adipose tissue and obesity. *Trends Mol. Med.* **10**(9), 434–439.
- Wu C., Zhang Y., Sun Z., Li P. (2008) Molecular evolution of Cide family proteins: novel domain formation in early vertebrates and the subsequent divergence. *BMC Evol. Biol.* **8**, 159.
- Li J.Z., Lei Y., Wang Y., Zhang Y., Ye J., Xia X., Pan X., Li P. (2010) Control of cholesterol biosynthesis, uptake

- and storage in hepatocytes by Cideb. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Biol. Lipids*. **1801**(5), 577–586.
21. Li J.Z., Ye J., Xue B., Qi J., Zhang J., Zhou Z., Li Q., Wen Z., Li P. (2007) Cideb regulates diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid oxidation. *Diabetes*. **56**(10), 2523–2532.
 22. Singaravelu R., Lyn R.K., Srinivasan P., Delcorde J., Steenbergen R.H., Tyrrell D.L., Pezacki J.P. (2013) Human serum activates CIDEb-mediated lipid droplet enlargement in hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **441**(2), 447–452.
 23. Danesch U., Hoeck W., Ringold G.M. (1992) Cloning and transcriptional regulation of a novel adipocyte-specific gene, *Fsp27* – CAAT-enhancer-binding protein (c/EBP) and c/EBP-like proteins interact with sequences required for differentiation-dependent expression. *J. Biol. Chem.* **267**(10), 7185–7193.
 24. Li D., Zhang Y., Xu L., Zhou L., Wang Y., Xue B., Wen Z., Li P., Sang J. (2010). Regulation of gene expression by FSP27 in white and brown adipose tissue. *BMC Genomics*. **11**, 446.
 25. Nishino N., Tamori Y., Tateya S., Kawaguchi T., Shibakusa T., Mizunoya W., Inoue K., Kitazawa R., Kitazawa S., Matsuki Y., Hiramatsu R., Masubuchi S., Omachi A., Kimura K., Saito M., Amo T., Ohta S., Yamaguchi T., Osumi T., Cheng J., Fujimoto T., Nakao H., Nakao K., Aiba A., Okamura H., Fushiki T., Kasuga M. (2008) FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J. Clin. Invest.* **118**(8), 2808–2821.
 26. Walther T.C., Farese R.V., Jr. (2012) Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 687–714.
 27. Ducharme N.A., Bickel P.E. (2008) Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. *Endocrinology*. **149**(3), 942–949.
 28. Pereira-Leal J.B., Seabra M.C. (2001) Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* **313**(4), 889–901.
 29. Seabra M.C., Mules E.H., Hume A.N. (2002) Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol. Med.* **8**(1), 23–30.
 30. Vonmollard G.F., Stahl B., Li C., Sudhof T.C., Jahn R. (1994) Rab proteins in regulated exocytosis. *Trends Biochem. Sci.* **19**(4), 164–168.
 31. Mizuno-Yamasaki E., Rivera-Molina F., Novick P. (2012) GTPase networks in membrane traffic. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 637–659.
 32. Pfeffer S., Aivazian D. (2004) Targeting RAB GTPases to distinct membrane compartments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**(11), 886–896.
 33. Seabra M.C., Wasmeier C. (2004) Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**(4), 451–457.
 34. Gillingham A.K., Sinka R., Torres I.L., Lilley K.S., Munro S. (2014) Toward a comprehensive map of the effectors of rab GTPases. *Dev. Cell*. **31**(3), 358–373.
 35. Bersuker K., Peterson C.W.H., To M., Sahl S.J., Savikhin V., Grossman E.A., Nomura D.K., Olzmann J.A. (2018) A proximity labeling strategy provides insights into the composition and dynamics of lipid droplet proteomes. *Dev. Cell*. **44**(1), 97–112. e117.
 36. Kraemer N., Hilger M., Kory N., Wilfling F., Stoehr G., Mann M., Farese R.V., Jr., Walther T.C. (2013) Protein correlation profiles identify lipid droplet proteins with high confidence. *Mol. Cell Proteomics*. **12**(5), 1115–1126.
 37. Turro S., Ingelmo-Torres M., Estanyol J.M., Tebar F., Fernandez M.A., Albor C.V., Gaus K., Grewal T., Enrich C., Pol A. (2006) Identification and characterization of associated with lipid droplet protein 1: a novel membrane-associated protein that resides on hepatic lipid droplets. *Traffic*. **7**(9), 1254–1269.
 38. Xu D., Li Y., Wu L., Li Y., Zhao D., Yu J., Huang T., Ferguson C., Parton R.G., Yang H., Li P. (2018) Rab18 promotes lipid droplet (LD) growth by tethering the ER to LDs through SNARE and NRZ interactions. *J. Cell Biol.* **217**(3), 975–995.
 39. Martin S., Driessen K., Nixon S.J., Zerial M., Parton R.G. (2005) Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. *J. Biol. Chem.* **280**(51), 42325–42335.
 40. Ozeki S., Cheng J., Tauchi-Sato K., Hatano N., Taniguchi H., Fujimoto T. (2005) Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J. Cell Sci.* **118**(Pt 12), 2601–2611.
 41. Pulido M.R., Diaz-Ruiz A., Jimenez-Gomez Y., Garcia-Navarro S., Gracia-Navarro F., Tinahones F., Lopez-Miranda J., Fruhbeck G., Vazquez-Martinez R., Malagon M.M. (2011) Rab18 dynamics in adipocytes in relation to lipogenesis, lipolysis and obesity. *PLoS One*. **6**(7), e22931.
 42. Wu L., Xu D., Zhou L., Xie B., Yu L., Yang H., Huang L., Ye J., Deng H., Yuan Y.A., Chen S., Li P. (2014) Rab8a-AS160-MSS4 regulatory circuit controls lipid droplet fusion and growth. *Dev. Cell*. **30**(4), 378–393.
 43. Wang C., Liu Z., Huang X. (2012) Rab32 is important for autophagy and lipid storage in *Drosophila*. *PLoS One*. **7**(2), e32086.
 44. Tan R., Wang W., Wang S., Wang Z., Sun L., He W., Fan R., Zhou Y., Xu X., Hong W., Wang T. (2013) Small GTPase Rab40c associates with lipid droplets and modulates the biogenesis of lipid droplets. *PLoS One*. **8**(4), e63213.
 45. Schroeder B., Schulze R.J., Weller S.G., Sletten A.C., Casey C.A., McNiven M.A. (2015) The small GTPase Rab7 as a central regulator of hepatocellular lipophagy. *Hepatology*. **61**(6), 1896–1907.
 46. Li C., Yu S.S. (2016) Rab proteins as regulators of lipid droplet formation and lipolysis. *Cell Biol. Int.* **40**(10), 1026–1032.
 47. Liu P., Bartz R., Zehmer J.K., Ying Y.S., Zhu M., Serro G., Anderson R.G. (2007). Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta*. **1773**(6), 784–793.
 48. Nevo-Yassaf I., Yaffe Y., Asher M., Ravid O., Eizenberg S., Henis Y.I., Nahmias Y., Hirschberg K., Sklan E.H. (2012) Role for TBC1D20 and Rab1 in hepatitis C virus replication via interaction with lipid droplet-bound nonstructural protein 5A. *J. Virol.* **86**(12), 6491–6502.

49. Yamaguchi K., Tanaka M., Mizoguchi A., Hirata Y., Ishizaki H., Kaneko K., Miyoshi J., Takai Y. (2002) A GDP/GTP exchange protein for the Rab3 small G protein family up-regulates a postdocking step of synaptic exocytosis in central synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**(22), 14536–14541.
50. Schluter O.M., Schmitz F., Jahn R., Rosenmund C., Sudhof T.C. (2004) A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function. *J. Neurosci.* **24**(29), 6629–6637.
51. Schluter O.M., Khvotchev M., Jahn R., Sudhof T.C. (2002) Localization versus function of Rab3 proteins – Evidence for a common regulatory role in controlling fusion. *J. Biol. Chem.* **277**(43), 40919–40929.
52. Valentijn J.A., Sengupta D., Gumkowski F.D., Tang L.H., Konieczko E.M., Jamieson J.D. (1996) Rab3D localizes to secretory granules in rat pancreatic acinar cells. *Eur. J. Cell Biol.* **70**(1), 33–41.
53. Valentijn J.A., van Weeren L., Ultee A., Koster A.J. (2007) Novel localization of Rab3D in rat intestinal goblet cells and Brunner's gland acinar cells suggests a role in early Golgi trafficking. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **293**(1), G165–177.
54. Chen X., Edwards J.A., Logsdon C.D., Ernst S.A., Williams J.A. (2002) Dominant negative Rab3D inhibits amylase release from mouse pancreatic acini. *J. Biol. Chem.* **277**(20), 18002–18009.
55. Chen X., Ernst S.A., Williams J.A. (2003) Dominant negative Rab3D mutants reduce GTP-bound endogenous Rab3D in pancreatic acini. *J. Biol. Chem.* **278**(50), 50053–50060.
56. Riedel D., Antonin W., Fernandez-Chacon R., Alvarez de Toledo G., Jo T., Geppert M., Valentijn J.A., Valentijn K., Jamieson J.D., Sudhof T.C., Jahn R. (2002) Rab3D is not required for exocytic exocytosis but for maintenance of normally sized secretory granules. *Mol. Cell Biol.* **22**(18), 6487–6497.
57. Wang T., Meng J., Li L., Zhang G. (2016) Characterization of CgHIFalpha-like, a novel bHLH-PAS transcription factor family member, and its role under hypoxia stress in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PLoS One.* **11**(11), e0166057.
58. Iezzi M., Escher G., Meda P., Charollais A., Baldini G., Darchen F., Wollheim C.B., Regazzi R. (1999) Subcellular distribution and function of Rab3A, B, C, and D isoforms in insulin-secreting cells. *Mol. Endocrinol.* **13**(2), 202–212.
59. Sun Z., Gong J., Wu H., Xu W., Wu L., Xu D., Gao J., Wu J.W., Yang H., Yang M., Li P. (2013) Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes. *Nat. Commun.* **4**, 1594.
60. Saely C.H., Geiger K., Drexel H. (2012) Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology.* **58**(1), 15–23.
61. Xu X., Park J.-G., So J.-S., Lee A.-H. (2015) Transcriptional activation of Fsp27 by the liver-enriched transcription factor CREBH promotes lipid droplet growth and hepatic steatosis. *Hepatology* (Baltimore, Md). **61**(3), 857–869.
62. Zhu S., Chim S.M., Cheng T., Ang E., Ng B., Lim B., Chen K., Qiu H., Tickner J., Xu H., Pavlos N., Xu J. (2016) Calmodulin interacts with Rab3D and modulates osteoclastic bone resorption. *Sci. Rep.* **6**, 37963.
63. Pavlos N.J., Xu J., Riedel D., Yeoh J.S., Teitelbaum S.L., Papadimitriou J.M., Jahn R., Ross F.P., Zheng M.H. (2005) Rab3D regulates a novel vesicular trafficking pathway that is required for osteoclastic bone resorption. *Mol. Cell Biol.* **25**(12), 5253–5269.
64. van Weeren L., de Graaff A.M., Jamieson J.D., Batenburg J.J., Valentijn J.A. (2004) Rab3D and actin reveal distinct lamellar body subpopulations in alveolar epithelial type II cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Bio.* **30**(3), 288–295.

THE GTP-BOUND FORM OF Rab3D PROMOTES LIPID DROPLET GROWTH IN ADIPOCYTE

T. Wang^{1, 2}, M. J. Jin^{1, 2}, and L. K. Li^{1, 2, *}

¹ MOE Key Laboratory of Bioinformatics and Tsinghua-Peking Center for Life Sciences, Beijing, 100084 China

² Advanced Innovation Center for Structural Biology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100190 China

*e-mail: liangkui826@mail.tsinghua.edu.cn

Rab GTPases are major regulators of membrane trafficking. Proteome profiling reveals dozens of Rab proteins associated with lipid droplets, but few of them have been functionally validated. Cidec protein mediates LD fusion and growth. It is highly enriched at LD–LD contact sites. Here we investigate the role of Rab3D in lipid storage in adipocyte. We verified that the adipose levels of Rab3D transcript were higher than that of other Rab3 family members; the differences were most pronounced in white adipose tissue. Moreover, we show that Rab3D promotes LD growth in 3T3-L1 preadipocytes in a dose dependent manner, independently of the process of Cidec-mediated LD fusion. Finally, we confirmed that the GTP-bound form of Rab3D is its LD promoting form; it translocates from other vesicles to LDs during adipocyte differentiation. By contrast, the Rab3D–GDP form is retained in the cytoplasm and had no effect on LD sizes. Presented results provide evidence for the role of Rab3D in controlling formation of large LDs in adipocytes. We conclude that Rab3D is a novel LD regulator with characteristics differing from these of previously identified LD associated Rab proteins, such as Rab18 and Rab8a.

Keywords: lipid droplet, adipocyte, Rab3D

УДК 57.032

HECTD2 СУПРЕССИРУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА, НАПРАВЛЯЯ LPCAT1 НА УБИКВИТИНИРОВАНИЕ И ДЕГРАДАЦИЮ^{1, 2}

© 2022 г. L. Ma^a, D. H. Li^a, Z. Xu^a, *^aDepartment of General Surgery, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao University, Qingdao, 266000 China

*e-mail: xuzhixuzhi1981@163.com

Поступила в редакцию 09.11.2021 г.

После доработки 29.12.2021 г.

Принята к публикации 29.12.2021 г.

Колоректальный рак (КРР) представляет собой злокачественное новообразование, характеризующееся плохой общей выживаемостью и высокой частотой рецидивов, в то время как биомаркеры КРР еще плохо изучены. Нами обнаружено, что лизофосфатидилхолинацилтрансфераза-1 (LPCAT1) высоко экспрессирована при КРР, а сверхэкспрессия LPCAT1 значительно облегчала пролиферацию клеток КРР, в то время как дефицит LPCAT1 приводил к обратному эффекту. Кроме того, содержащий HECT-домен белок-2 (HECT domain-containing 2 protein; HECTD2) идентифицирован как посттрансляционный медиатор LPCAT1, так как при иммунопреципитации анти-LPCAT1-антителами находился в комплексе с высокоубиквитинированным LPCAT1. Кроме того, повышенная экспрессия *LPCAT1* восстанавливала пролиферацию клеток КРР, нарушенную сверхэкспрессией *HECTD2*. На основании полученных данных ось HECTD2/LPCAT1 можно считать потенциальным прогностическим биомаркером КРР.

Ключевые слова: колоректальный рак, LPCAT1, HECTD2, убиквитинирование, пролиферация клеток

DOI: 10.31857/S0026898422040073

Колоректальный рак (КРР) – распространенное злокачественное заболевание, которое занимает второе место по смертности от онкологических заболеваний во всем мире: в 2020 году от него скончалось около 935 000 человек [1]. Считается, что хирургическая резекция, лучевая терапия и химиотерапия могут быть использованы для лечения КРР, однако прогноз остается неблагоприятным из-за высокой частоты рецидивов [2]. В связи с этим необходимо выяснить механизмы, участвующие в прогрессировании КРР, и биомаркеры, предсказывающие рецидив заболевания.

Лизофосфатидилхолинацилтрансфераза-1 (LPCAT1) относится к важным ферментам, которые участвуют в процессе метаболизма липидов [3], обладает ацетилтрансферазной активностью и находится в аппарате Гольджи, эндоплазматическом ретикулуме и других органеллах клетки [4]. На основании накопленных данных по структуре, функциям и механизмам регуляции LPCAT1 доказана функциональная роль LPCAT1 в синтезе альвеолярного сурфактанта [5], дегенерации сет-

чатки [6] и заболеваниях нервной системой [7]. Недавно обнаружено, что уровень LPCAT1 повышен при различных видах злокачественных опухолей, таких как рак эндометрия [8], рак простаты [9] и аденокарцинома легких [10]. Кроме того, F. Mansilla и соавт. [11] пришли к выводу, что LPCAT1 может способствовать накоплению метаболитов холина, изменяя липидный профиль КРР. Однако другие механизмы, опосредованные LPCAT1 при КРР, и функциональная роль LPCAT1 в прогрессировании КРР пока не выяснены.

Убиквитинирование – распространенная посттрансляционная модификация [12]. В ходе этого процесса ряд ферментов, включая активирующие убиквитин, конъюгирующие убиквитин, лигирующие и деградирующие, выступают в качестве важнейших участников, которые сортируют внутриклеточные белки, выбирают и специфически модифицируют убиквитином белки-мишени [13, 14]. Показано, что убиквитинирование играет решающую роль в регуляции локализации, метаболизма и деградации белков [15]. Кроме того, доказано, что убиквитинирование участвует в регуляции практически всех видов жизнедеятельности, таких как клеточный цикл [16], пролиферация [17], апоптоз и аутофагия [18], дифференциация [19], метастазирование [20], воспаление и имму-

¹ Текст представлен авторами на английском языке.

² Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898422040073 для авторизованных пользователей.

Сокращения: КРР – колоректальный рак.

нитет [21]. Функционально значимый, грандиозный механизм убиквитинирования уже исследован достаточно детально при различных видах злокачественных опухолей, таких как рак молочной железы [20], немелкоклеточный рак легкого [17] и внутрипеченочная холангиокарцинома [22]. Кроме того, E3-убиквитинлигаза, содержащий HECT-домен белок-2 (HECTD2), участвует в прогрессировании различных заболеваний, таких как бактериальное воспаление легких [23], экспериментальное повреждение легких [24] и рак простаты [25]. Однако вклад HECTD2-опосредованного убиквитинирования в развитие КРР еще предстоит изучить.

Учитывая решающую роль LPCAT1 в росте и метастазировании злокачественных опухолей, мы оценили уровни LPCAT1 и исследовали биологическую функцию этого белка при КРР. Кроме того, выясняли, может ли HECTD2 опосредовать убиквитинирование LPCAT1. В результате проведенного исследования выявлено функциональное влияние оси HECTD2/LPCAT1 на прогрессирование КРР, что позволяет считать ее потенциальной мишенью для разработки терапевтической стратегии КРР.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биоинформационный анализ. Экспрессия LPCAT1 в тканях КРР и нормальных тканях толстой кишки была извлечена из базы данных ENCORI [26] и базы данных Human Protein Atlas [27].

Коллекция тканей и культура клеток. Четыре фиксированных в формалине и парафинированных ткани КРР и соответствующие нормальные ткани были получены из Муниципальной больницы Циндао, Университет Циндао (Qingdao Municipal Hospital, Qingdao University, Китай).

От каждого пациента было получено информированное согласие. Экспериментальная стратегия проводилась в соответствии с Хельсинкской декларацией и была одобрена этическим комитетом Муниципальной больницы Циндао, Циндаоского университета.

Клеточные линии КРР: LOVO и AGS – были приобретены в Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, США). Клетки культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; “Invitrogen”, США) в увлажненной атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

Иммуноблотинг. Суммарный белок выделяли из клеток или тканей КРР с помощью буфера для лизиса RIPA, белки разделяли электрофорезом в SDS-ПААГ и переносили на PVDF-мембрану. Мембрану блокировали 5%-ным обезжиренным молоком в течение 1 ч при комнатной температуре и инкубировали с моноклональными кроличьими антителами против LPCAT1 (1/2000;

ab214034, “Abcam”, Великобритания), HECTD2 (1/3000; ab173572, “Abcam”) и GAPDH (1/1000; ab181602, “Abcam”) в течение ночи при 4°C. После этого мембраны обрабатывали вторичными антителами – конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) козьими антителами против кроличьего IgG (1/1000; ab97051, “Abcam”). Полосы визуализировали с использованием хемилюминесцентного субстрата – Chemistar™ High-sig ECL Western Blotting Substrate (“Tanon Science & Technology Co., Ltd.”, Китай).

Трансфекция клеток. Конструкты pcDNA-LPCAT1 (pLPCAT1), pcDNA-HECTD2 (pHECTD2), sh-LPCAT1-1 и sh-LPCAT1-2 и соответствующие пустые плазмиды и векторы, экспрессирующие скремблированную shРНК (NC), были разработаны компанией “Genechem” (Китай) (табл. S1 Приложения, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2022/4/supp_Ma_rus.pdf). С помощью реагента для трансфекции Lipofectamine 2000 (11668-019; “Invitrogen”, США) плазмиды и лентивирусы, несущие shРНК, трансфицировали в клетки КРР в соответствии с инструкциями производителя.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для выделения суммарной РНК из клеток или тканей КРР использовали реагент Trizol (“Absin”, Китай), а для обратной транскрипции и амплификации кДНК – набор PrimeScript RT Reagent Kit (DRR037A; “Takara”, Япония) и SYBR Master Mix (“Takara”) соответственно. Относительная экспрессия HECTD2 и LPCAT1 была нормализована на GAPDH и рассчитана методом 2^{-ΔΔCt}. Последовательности праймеров представлены в табл. S2 Приложения.

Анализ образования колоний. Клетки КРР вносили в 6-луночный планшет (2 × 10³ клеток/лунка) на 12 суток. После фиксации с помощью параформальдегида клетки окрашивали 0.5%-ным раствором кристаллического фиолетового. Клонированные клетки подсчитывали и визуализировали под световым микроскопом.

Подсчет клеток. Для подсчета клеток использовали набор Cell Counting kit-8 (ССК-8; #C0038, “Beoyotime”, Китай). В лунки 96-луночного планшета вносили по 4 × 10³ клеток КРР в 100 мкл клеточной суспензии и инкубировали с реагентом ССК-8 (10 мкл/лунка; “Beoyotime”) в течение 24, 48, 72 и 96 ч. Через 1 ч инкубации при 37°C измеряли оптическую плотность при 450 нм (OD₄₅₀) на микропланшетном ридере.

Окрашивание 5-этинил-2'-дезоксинуридин (EdU). При оценке жизнеспособности клеток КРР анализировали включение в них EdU, используя EdU kit (“Roche”, Швейцария) в соответствии с инструкциями производителя. EdU-позитивные клетки визуализировали с помощью флуорес-

центного микроскопа Zeiss (“Carl Zeiss”, Германия) на пяти случайных полях и подсчитывали с помощью программного обеспечения Image-Pro Plus 6.0 (“Media Cybernetics”, США).

Анализ коиммунопреципитации (Co-IP). Для выделения суммарного белка из клеток KPP использовали буфер для лизиса Co-IP (“Beyotime”, США) Dynabeads Protein G (1004D, “Life Technologies”, США) инкубировали в течение 2 ч с кроличьими моноклональными антителами против HA-tag (#3724; “Cell Signaling Technology”, США) или поликлональными против DDDK-tag (связывают Flag) (ab1162; “Abcam”). Затем белковый лизат инкубировали с комплексом антитело–магнитные бусины при 4°C в течение ночи. Бусины промывали элюирующим буфером, а иммунопреципитат и входящие в него белки анализировали методом иммуноблоттинга.

Масс-спектрометрия. После процедуры Co-IP очищенный HECTD2 и его иммунопреципитаты анализировали методом жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) на системах Expert TM nanoLC (“Thermo Fisher Scientific”, США) и AB Sciex TripleTOF® 5600+ (“Sciex”, США) по протоколам производителей.

Анализ убиквитинирования. Клетки KPP трансфицировали плазмидами, несущими гены, кодирующие HA-HECTD2, Flag-LPCAT1, His-ub (убиквитин с гистидиновой меткой) или His-ub-K63R (His-меченый убиквитин с заменой Lys63 на Arg), и инкубировали с протеасомным ингибитором MG132 (10 мкМ; “Sigma”, США) в течение 6 ч. Flag-LPCAT1 осаждали анти-Flag-антителами и проводили иммуноблоттинг, в котором использовали антитела против убиквитина (#3936, “Cell Signaling Technology”).

Анализ полураспада. Для оценки стабильности белка LPCAT1 клетки KPP трансфицировали рHECTD2 и обрабатывали циклогексимидом (“Sigma”) в концентрации 40 мМ в течение 0, 2, 4 и 6 ч. Белки лизатов, полученных в результате лизиса клеток, разделяли электрофорезом в SDS-ПААГ и затем анализировали иммуноблоттингом.

Статистический анализ. Данные анализировали с помощью программы GraphPad Prism 5.01 и представляли как среднее ± стандартное отклонение (SD). Для анализа различий между двумя или несколькими группами использовали *t*-тест Стьюдента и дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считали значимыми при *p*-value < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия LPCAT1 активируется при колоректальном раке

Уровни белка LPCAT1 оценили в тканях KPP и соответствующих нормальных тканях и обнару-

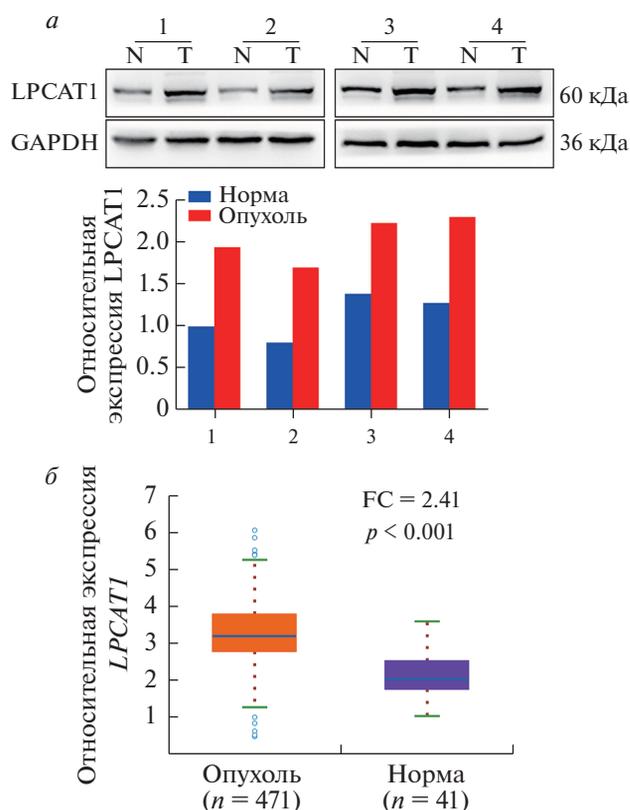


Рис. 1. Повышенная экспрессия *LPCAT1* при KPP. *а* – Экспрессия *LPCAT1* в клинических образцах опухолевых тканей KPP и соответствующих нормальных тканей, полученных от 4 пациентов (образцы 1–4). Иммуноблоттинг проведен с антителами против *LPCAT1*. *б* – Результаты анализа базы данных ENCORI по экспрессии *LPCAT1* при KPP. FC – кратность изменения; *p* – логарифмический ранговый критерий.

жили, что *LPCAT1* высоко экспрессирован в опухолевых тканях KPP (рис. 1*а*). Для проверки этого результата мы проанализировали базы данных ENCORI (<http://www.sysu.edu.cn/>) и выявили гораздо более высокие уровни мРНК *LPCAT1* в опухолевых тканях по сравнению с нормальными тканями в образцах KPP, представленными в базе The Cancer Genome Atlas (TCGA; <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>) (рис. 1*б*). В совокупности эти данные свидетельствуют о высокой экспрессии *LPCAT1* при KPP.

При повышенной экспрессии LPCAT1 ускоряется пролиферация клеток колоректального рака

Для изучения функциональной роли *LPCAT1* при KPP мы создали клетки AGS и LOVO, сверхэкспрессирующие *LPCAT1*, и исследовали эффективность трансфекции (рис. 2*а* и 2*б*). По результатам анализов колониеобразования (рис. 2*в*) и ССК-8 (рис. 2*г*) при сверхэкспрессии *LPCAT1* повышается скорость пролиферации клеток KPP,

а также значительно увеличивается число клеток, инкорпорировавших EdU (рис. 2*д*). В целом, полученные данные подтвердили канцерогенную роль LPCAT1 при КРР.

При дефиците LPCAT1 скорость пролиферации клеток колоректального рака снижена

Учитывая, что повышенный уровень LPCAT1 способствовал пролиферации клеток КРР, мы проверили биологический эффект истощения LPCAT1 на эти клетки. Для функциональных экспериментов LPCAT1-истощенные клетки КРР получили с использованием коротких интерферирующих РНК (siРНК), нацеленных на мРНК LPCAT1 (рис. 3*а* и 3*б*). По результатам колониеобразования (рис. 3*в*) и ССК-8 (рис. 3*г*) истощение по LPCAT1 приводило к снижению скорости пролиферации клеток КРР. Кроме того, EdU-анализ показал, что при дефиците LPCAT1 явно снижалось содержание EdU-позитивных клеток (рис. 3*д*). Таким образом, на основании полученных результатов можно говорить о том, что дефицит LPCAT1 индуцирует замедление пролиферации клеток КРР.

HECTD2 убиквитинирует LPCAT1 в клетках колоректального рака

После сверхэкспрессии Flag-HECTD2 в клетках LOVO, последующей иммунопреципитации анти-Flag-антителами проведен масс-спектрометрический анализ осажденных белков. Вместе с белком HECTD2 соосаждался белок LPCAT1, из чего можно строить гипотезу о их взаимодействии (рис. 4*а*). Кроме того, уровень HECTD2 в тканях КРР был ниже, чем в нормальных тканях (рис. 4*б* и 4*в*).

С целью исследовать взаимодействие между HECTD2 и LPCAT1 мы проведен анализ Co-IP и обнаружили, что HECTD2 с Flag-тегом интенсивно соосаждается с LPCAT1 в клетках КРР (рис. 4*г*). Кроме того, по данным анализа убиквитинирования сверхэкспрессия HECTD2 повышает уровень убиквитинирования LPCAT1 (рис. 4*д*). Для проверки этих результатов оценили период полужизни белка LPCAT1 и обнаружили, что он сокращается при сверхэкспрессии HECTD2, то есть HECTD2 снижает стабильность белка LPCAT1 (рис. 4*е*). В результате проведенного исследования показано, что HECTD2 функционирует как E3-убиквитинлигаза, “руководящая” убиквитинированием и деградацией белка LPCAT1 при КРР.

HECTD2 супрессирует пролиферацию клеток колоректального рака через убиквитинирование LPCAT1

С целью определить, действует ли HECTD2 как канцерогенный драйвер прогрессирования

КРР LPCAT1-зависимым образом, плазмиды со сверхэкспрессией HECTD2 и LPCAT1 совместно трансфицировали в клетки КРР (рис. 5*а*). Обнаружено, что сверхэкспрессия HECTD2 приводила к значительному снижению пролиферативной активности клеток КРР, которая восстанавливалась при сверхэкспрессии LPCAT1 (рис. 5*б* и 5*в*). Кроме того, сверхэкспрессия LPCAT1 играла критическую роль в восстановлении числа EdU-позитивных клеток, потеря которых была вызвана сверхэкспрессией HECTD2 (рис. 5*г*). В совокупности эти результаты показали, что HECTD2 подавляет прогрессирование КРР посредством убиквитинирования LPCAT1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами показано, что LPCAT1 действует как канцерогенный фактор при КРР, в то время как HECTD2 идентифицирован как белок, способствующий убиквитинированию и деградации белка LPCAT1. Таким образом, определена функциональная роль оси HECTD2/LPCAT1 в прогрессировании КРР.

Ранее сообщалось об онкогенной роли LPCAT1 при различных видах злокачественных образований, таких как рак желудка [28], плоскоклеточный рак полости рта [29] и рак предстательной железы [30]. В частности, F. Liu и др. [31] продемонстрировали, что LPCAT1 необходим для пролиферации клеток при многих онкологических заболеваниях, а повышенная экспрессия LPCAT1 тесно связана с плохим прогнозом. P. Lebok и др. [32] выявили, что сверхэкспрессия LPCAT1 способствует росту опухоли при раке молочной железы и ассоциируется с плохим прогнозом. Кроме того, Y. Du и соавт. [33] пришли к выводу, что позитивная регуляция LPCAT1 индуцирует пролиферацию и инвазию клеток при светлоклеточной почечно-клеточной карциноме. Соответственно нами показано, что экспрессия LPCAT1 повышена в тканях КРР. Трансфекция клеток КРР плазмидами, обеспечивающими сверхэкспрессию LPCAT1 или подавляющими ее под действием siРНК к LPCAT1, приводила соответственно к ускоренной пролиферации клеток или наоборот ее замедлению при истощении по LPCAT1.

Уже показано, что убиквитинирование играет важную роль в регуляцию прогрессии злокачественных новообразований, в том числе при КРР. Так, J. Hu и соавт. [34] сообщали, что TRIM39 стимулирует активность Rab7 через супрессию его убиквитинирования, тем самым сдерживая аутофагический поток и метастазирование опухоли при КРР, а B. Li и др. [35] показали, что USP10 повышает уровень деубиквитинирования NLRP7, способствуя росту опухоли и коррелируемой злокачественной опухолью поляризации макрофагов при КРР. В проведенном нами ис-

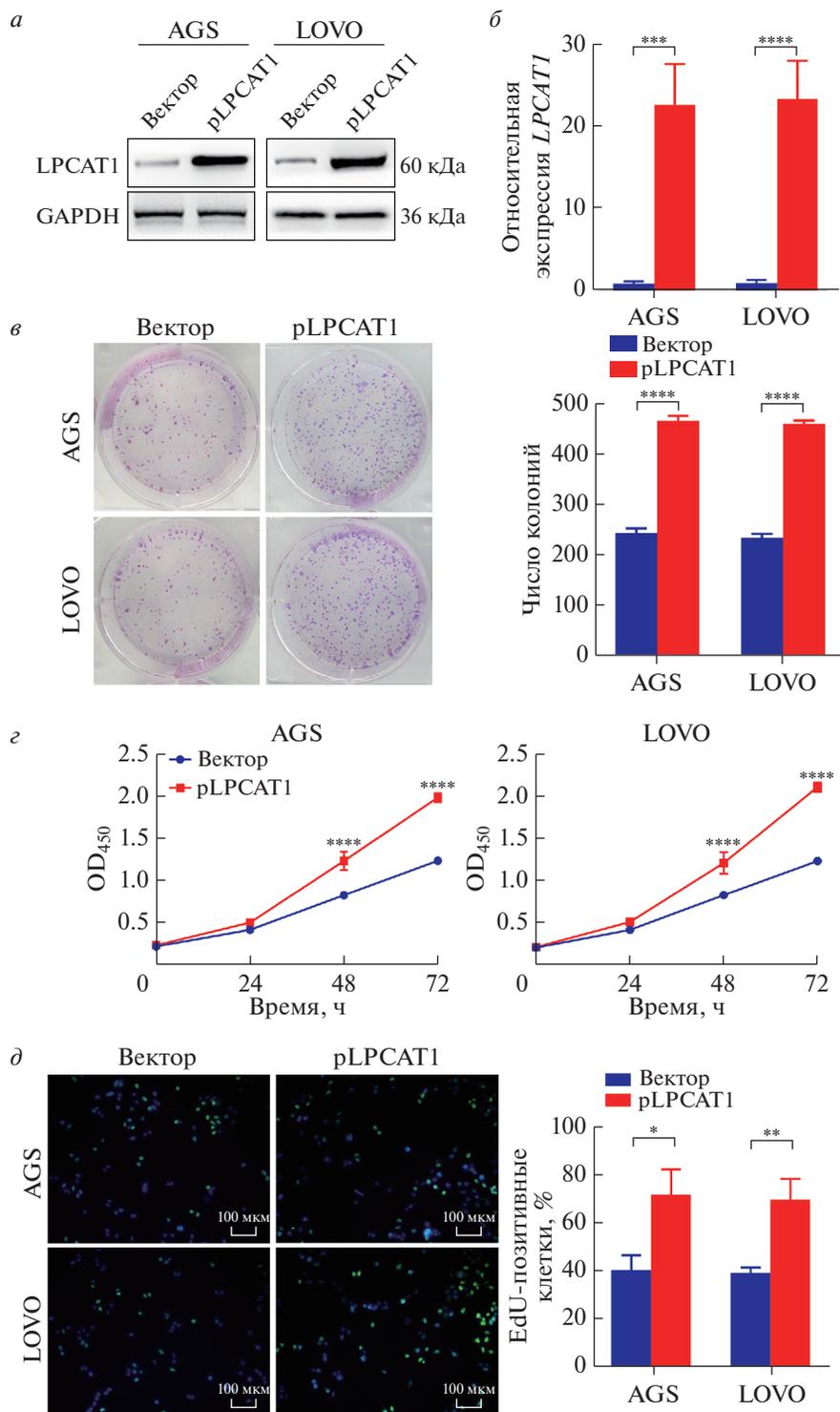


Рис. 2. Повышенный уровень LPCAT1 способствует пролиферации клеток КРР. Клетки КРР трансфицировали плазмидами, содержащими ген *LPCAT1*, и анализировали эффективность экспрессии целевого гена методом иммуноблоттинга (а) и количественной ОТ-ПЦР (б). Для оценки скорости пролиферации клеток КРР использовали тесты колониобразования (в), ССК-8 (г) и EdU (д). Все эксперименты выполнены в трех повторах, данные представлены как среднее \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ и **** $p < 0.0001$.

следовании *HECTD2* интенсивно соосаждался с *LPCAT1* в экспериментах по коиммунопреципитации и идентифицирован как возможный парт-

нер *LPCAT1* на основании данных масс-спектрометрии. Более того, сверхэкспрессия *HECTD2* приводила к повышению уровня убиквитиниро-

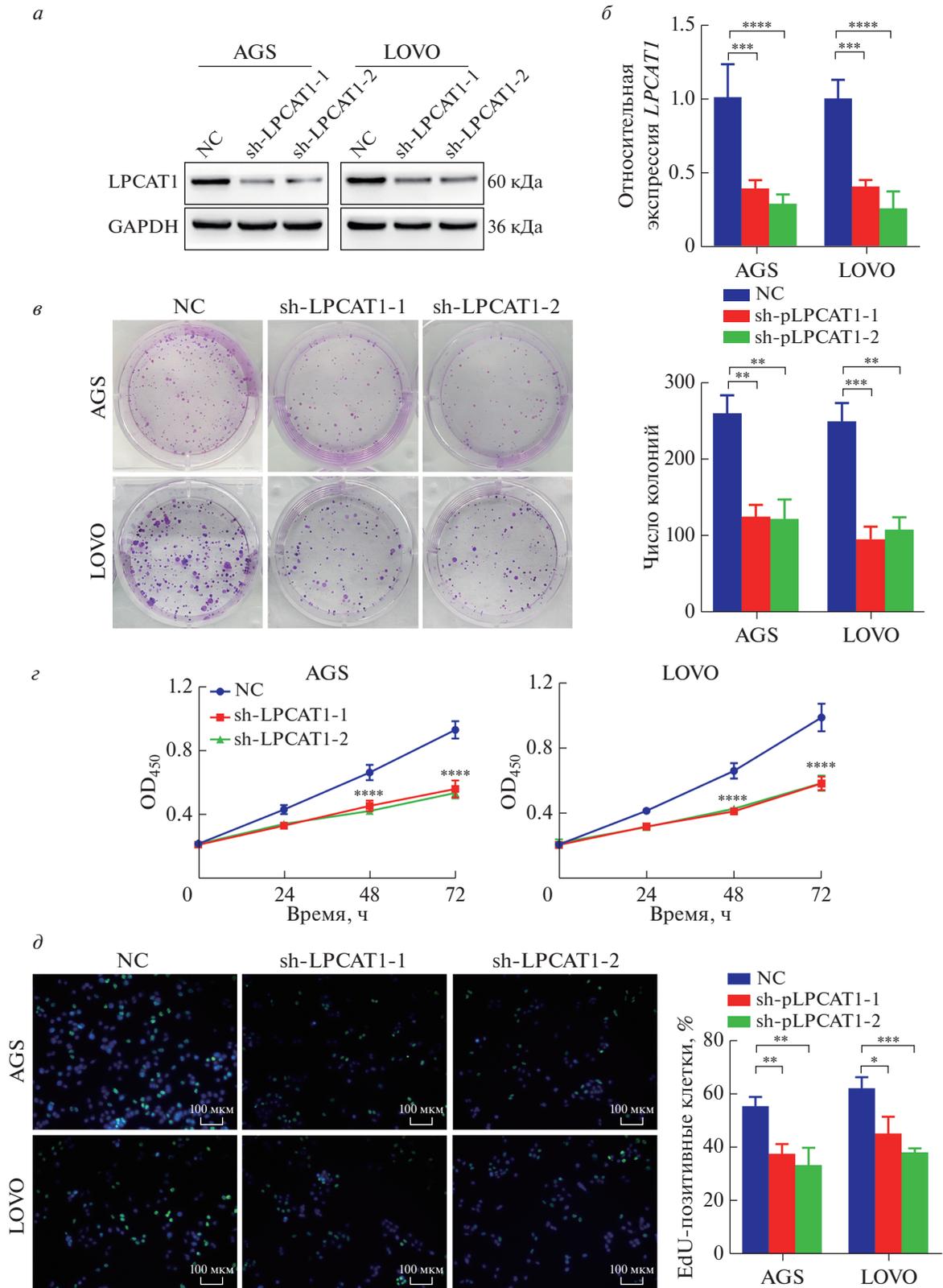


Рис. 3. При дефиците LPCAT1 замедляется пролиферация клеток КРР. Клетки КРР трансдуцировали лентивирусами, несущими shРНК к гену *LPCAT1* (sh-LPCAT1) или скремблированную shРНК (NC). Экспрессию *LPCAT1* оценивали методом иммуноблоттинга (а) и количественной ОТ-ПЦР (б). Скорость пролиферации клеток КРР оценивали методами колониеобразования (в), ССК-8 (г) и EdU (д). Все эксперименты выполнены в трех повторах, данные представлены как среднее ± SD. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 и *****p* < 0.0001.

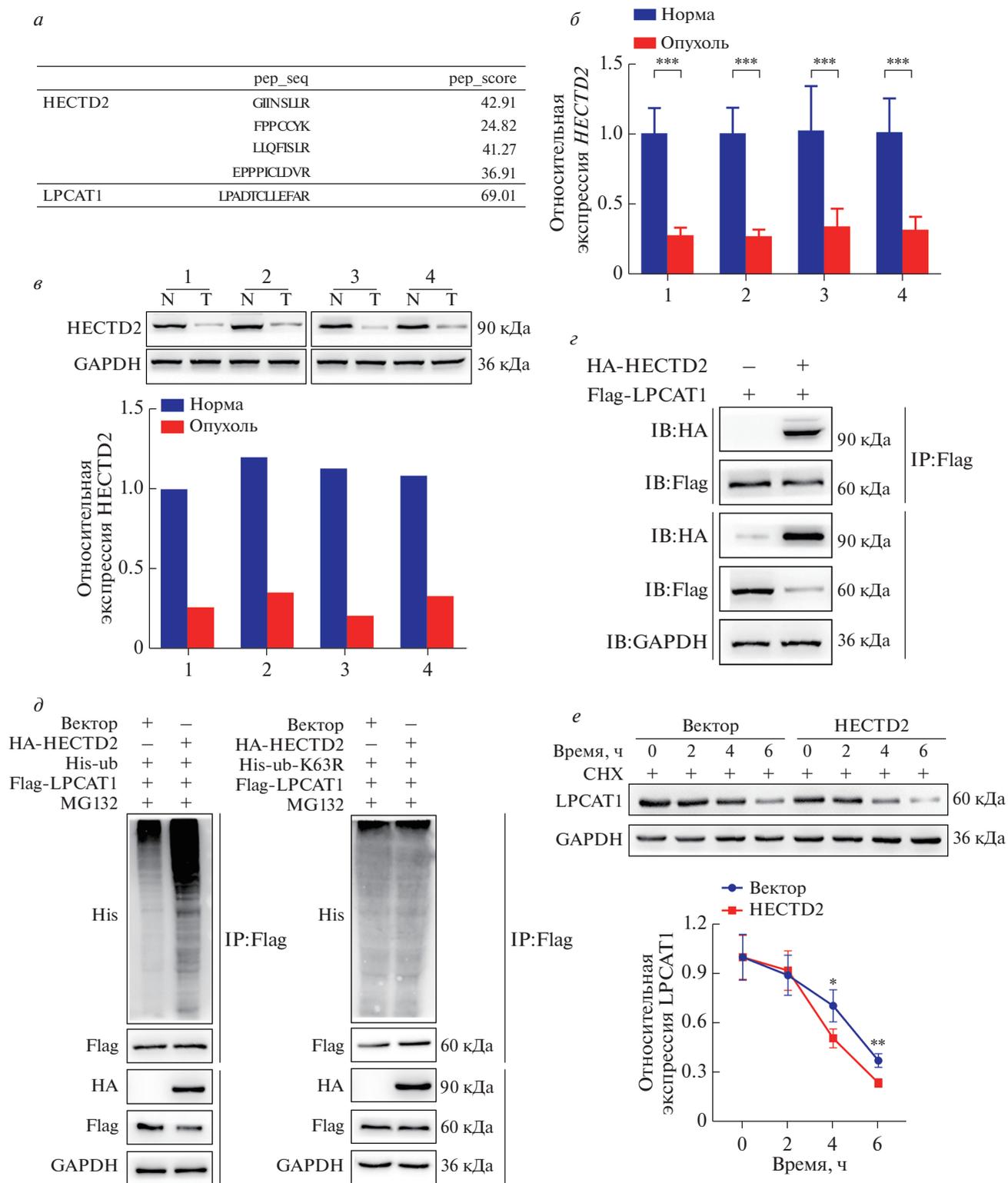


Рис. 4. В клетках KPP HECTD2 убиквитинирует LPCAT1. Для идентификации белков, взаимодействующих с LPCAT1, использована масс-спектрометрия (а). Уровень экспрессии *HECTD2* в тканях KPP (Т) и нормальных тканях (Н) оценивали методом количественной ОТ-ПЦР (б) и иммуноблотинга (в). Взаимодействие между HECTD2 и LPCAT1 оценивали с использованием Co-IP и убиквитинирования. В клетках LOVO сверхэкспрессировали Flag-LPCAT1 или HA-HECTD2, и белок Flag-LPCAT1 осаждали анти-Flag-антителами (IP:Flag), после чего проводили иммуноблотинг (IB) с анти-Flag- и анти-HA-антителами (г). Анализ на убиквитинирование проводили в клетках LOVO, трансфицированных His-ub или His-ub-K63R (д). Уровень белка LPCAT1 исследовали через 0, 2, 4 и 6 ч после обработки клеток циклогексимидом (CHX) (е). Все эксперименты проведены в трех повторах, данные представлены как среднее значение \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ и **** $p < 0.0001$.

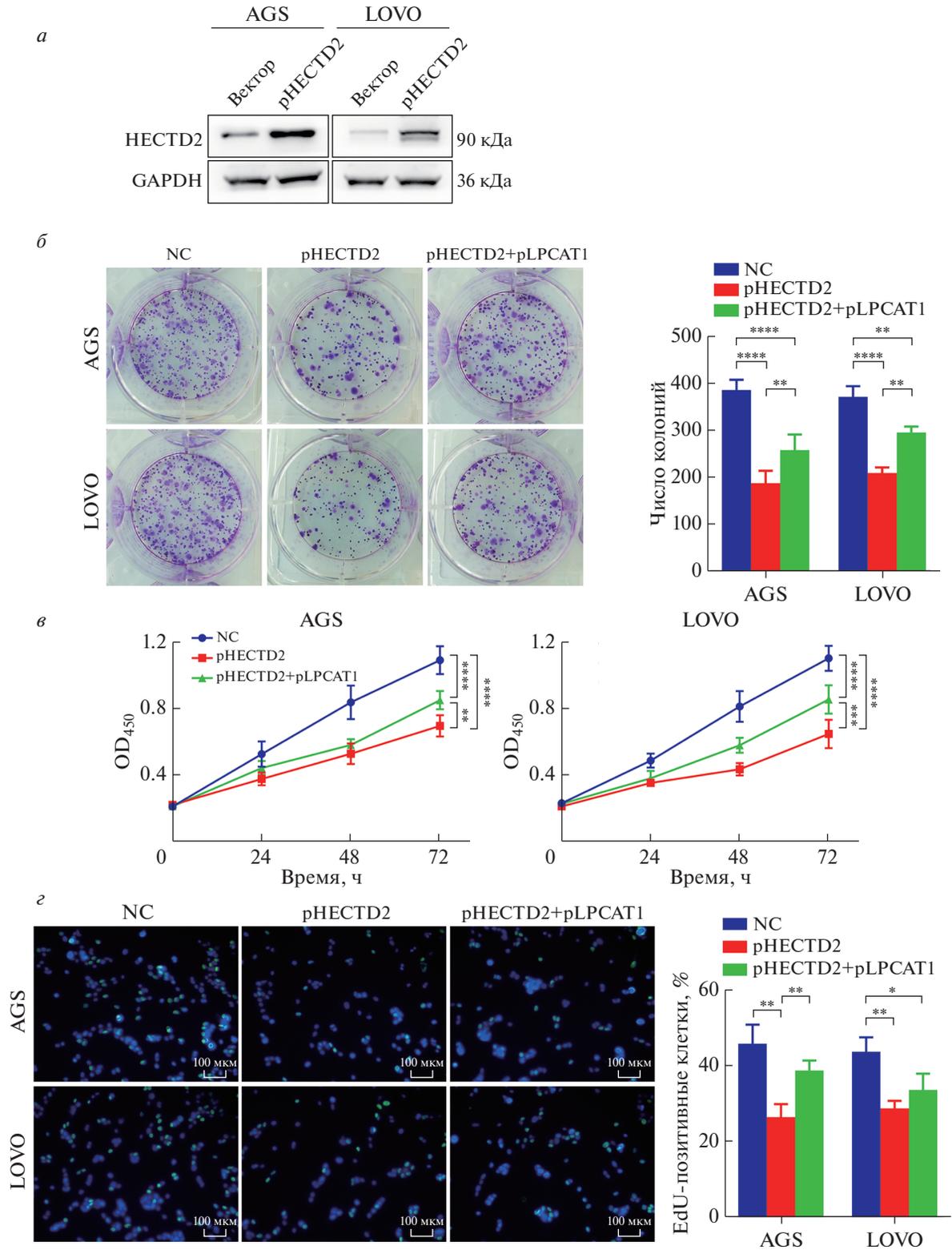


Рис. 5. HECTD2 супрессирует пролиферацию клеток КРР через убиквитинирование LPCAT1. Клетки КРР котрансфицировали плазмидами, экспрессирующими *HECTD2* (pHECTD2) и *LPCAT1* (pLPCAT1), и оценивали эффективность трансфекции методом иммуноблотинга (а). Пролиферацию клеток КРР оценивали методами колониеобразования (б), ССК-8 (в) и включения EdU (г). Все эксперименты проведены в трех повторах, данные представлены как среднее ± SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ и **** $p < 0.0001$. NC – отрицательный контроль.

вания белка LPCAT1 и индуцировала его деградацию. Ранее в моделях пневмонии показано, что HECTD2 усиливает воспаление через убиквитинирование белка PIAS1 и его деградацию [24]. Однако нами выявлено, что сверхэкспрессия HECTD2 подавляла пролиферацию клеток КРР, которая восстанавливалась при повышении уровня LPCAT1. В некоторых исследованиях сообщалось о повышенной экспрессии 19S-регулятора при КРР [36, 37]. Этот регулятор распознает убиквитинированные белки и направляет их в протеасомы для деградации. Интересно, что, несмотря на повышенное количество 19S-регулятора, экспрессия HECTD2 при КРР снижена, что позволяет опухоли поддерживать уровень LPCAT1.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что LPCAT1, по-видимому, способствует прогрессированию КРР, а HECTD2 – убиквитинированию и деградации белка LPCAT1, тем самым ограничивая пролиферацию клеток КРР. Таким образом, ось HECTD2/LPCAT1 можно рассматривать в качестве потенциального прогностического биомаркера при колоректальном раке.

Это исследование не получило какого-либо специального гранта от финансирующих агентств в государственном, коммерческом или некоммерческом секторах.

Все эксперименты проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией и были одобрены Комитетом по этике Муниципальной больницы Циндао Университета Циндао (Qingdao Municipal Hospital, Qingdao University, Китай).

Все испытуемые согласились участвовать в данном исследовании и подписали полную форму информированного согласия.

Вклад авторов: Lei Ma и Zhi Xu разработали экспериментальную стратегию. Lei Ma и Dehui Li провели эксперименты и проанализировали результаты. Рукопись подготовлена Lei Ma и отредактирована Zhi Xu. Все авторы одобрили окончательный вариант рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- (2020) Erratum: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **70**, 313.
- Feng M., Zhao Z., Yang M., Ji J., Zhu D. (2021) T-cell-based immunotherapy in colorectal cancer. *Cancer Lett.* **498**, 201–209.
- Barbosa A., Savage D., Siniouoglou S. (2015) Lipid droplet-organelle interactions: emerging roles in lipid metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* **35**, 91–97.
- Shindou H., Hishikawa D., Harayama T., Yuki K., Shimizu T. (2009) Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research. *J. Lipid Res.* **50**(Suppl.), S46–S51.
- Lin S., Ikegami M., Moon C., Naren A. Shannon J. (2015) Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) specifically interacts with phospholipid transfer protein StarD10 to facilitate surfactant phospholipid trafficking in alveolar type II cells. *J. Biol. Chem.* **290**, 18559–18574.
- Dai X., Zhang H., Han J., He Y., Zhang Y., Qi Y., Pang J.J. (2016) Effects of subretinal gene transfer at different time points in a mouse model of retinal degeneration. *PLoS One.* **11**, e0156542.
- Okubo M., Yamanaka H., Kobayashi K., Kanda H., Dai Y., Noguchi K. (2012) Up-regulation of platelet-activating factor synthases and its receptor in spinal cord contribute to development of neuropathic pain following peripheral nerve injury. *Mol. Pain.* **8**, 8.
- Zhao T., Zhang Y., Ma X., Wei L., Hou Y., Sun R., Jiang J. (2021) Elevated expression of LPCAT1 predicts a poor prognosis and is correlated with the tumour microenvironment in endometrial cancer. *Cancer Cell Int.* **21**, 269.
- Han C., Yu G., Mao Y., Song S., Li L., Zhou L., Wang Z., Liu Y., Li M., Xu B. (2020) LPCAT1 enhances castration resistant prostate cancer progression via increased mRNA synthesis and PAF production. *PLoS One.* **15**, e0240801.
- Wei C., Dong X., Lu H., Tong F., Chen L., Zhang R., Dong J., Hu Y., Wu G., Dong X. (2019) LPCAT1 promotes brain metastasis of lung adenocarcinoma by up-regulating PI3K/AKT/MYC pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **38**, 95.
- Mansilla F., da Costa K., Wang S., Kruhoffer M., Lewin T., Orntoft T., Coleman R., Birkenkamp-Demtröder K. (2009) Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) overexpression in human colorectal cancer. *J. Mol. Med. (Berl.)* **87**, 85–97.
- Deribe Y.L., Pawson T., Dikic I. (2010) Post-translational modifications in signal integration. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 666.
- Schwartz A., Ciechanover A. (2009) Targeting proteins for destruction by the ubiquitin system: implications for human pathobiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **49**, 73–96.
- Jones D., Crowe E., Stevens T.A., Candido E.P.M. (2001) Functional and phylogenetic analysis of the ubiquitylation system in *Caenorhabditis elegans*: ubiquitin-conjugating enzymes, ubiquitin-activating enzymes, and ubiquitin-like proteins. *Genome Biol.* **3**(1), RESEARCH0002. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-3-1-research0002>
- Wójcik C., DeMartino G.N. (2003) Intracellular localization of proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 579–589.
- Song Y., Wu C., Wu K., Han Q., Miao X., Ma D., Leung C. (2021) Ubiquitination regulators discovered by virtual screening for the treatment of cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 665646.

17. Xu Y., Wang C., Jiang X., Zhang Y., Su H., Jiang J., Ren H., Qiu X. (2021) KLHL38 involvement in non-small cell lung cancer progression via activation of the Akt signaling pathway. *Cell Death Dis.* **12**, 556.
18. Castro-Gonzalez S., Simpson S., Shi Y., Chen Y., Benjamin J., Serra-Moreno R. (2021) HIV Nef-mediated ubiquitination of BCL2: implications in autophagy and apoptosis. *Front. Immunol.* **12**, 682624.
19. Liu J., Li X., Zhou G., Zhang Y., Sang Y., Wang J., Li Y., Ge W., Sun Z., Zhou X. (2021) Silica nanoparticles inhibiting the differentiation of round spermatid and chromatin remodeling of haploid period via MIWI in mice. *Environ. Pollut.* **284**, 117446.
20. Gong Z., Li A., Ding J., Li Q., Zhang L., Li Y., Meng Z., Chen F., Huang J., Zhou D., Hu R., Ye J., Liu W., You H. (2021) OTUD7B deubiquitinates LSD1 to govern its binding partner specificity, homeostasis, and breast cancer metastasis. *Adv. Sci. (Weinh.)*. **8**(15), e2004504.
21. Shmuel-Galia L., Humphries F., Lei X., Ceglia S., Wilson R., Jiang Z., Ketelut-Carneiro N., Foley S., Pechhold S., Houghton J., Muneeruddin K., Shaffer S., McCormick B., Reboldi A., Ward D., Marshak-Rothstein A., Fitzgerald K. (2021) Dysbiosis exacerbates colitis by promoting ubiquitination and accumulation of the innate immune adaptor STING in myeloid cells. *Immunity*. **54**, 1137–1153.e8.
22. Lepore A., Choy P., Lee N., Carella M., Favicchio R., Briones-Orta M., Glaser S., Alpini G., D'Santos C., Tooze R., Lorger M., Syn W., Papakyriakou A., Giamas G., Bubici C., Papa S. (2021) Phosphorylation and stabilization of PIN1 by JNK promote intrahepatic cholangiocarcinoma growth. *Hepatology*. **74**(5), 2561–2579.
23. Kapur R., Semple J. (2016) Alleviation of gram-negative bacterial lung inflammation by targeting HECTD2. *Ann. Trans. Med.* **4**, 488.
24. Coon T., McKelvey A., Lear T., Rajbhandari S., Dunn S., Connelly W., Zhao J., Han S., Liu Y., Weathington N., McVerry B., Zhang Y., Chen B. (2015) The proinflammatory role of HECTD2 in innate immunity and experimental lung injury. *Sci. Trans. Med.* **7**, 295ra109.
25. Sun T., Wang X., He H., Sweeney C., Liu S., Brown M., Balk S., Lee G., Kantoff P. (2014) MiR-221 promotes the development of androgen independence in prostate cancer cells via downregulation of *HECTD2* and *RAB1A*. *Oncogene*. **33**, 2790–2800.
26. Li J.H., Liu S., Zhou H., Qu L.H., Yang J.H. (2014) starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res.* **42**, D92–D97.
27. Uhlen M., Oksvold P., Fagerberg L., Lundberg E., Jonnasson K., Forsberg M., Zwahlen M., Kampf C., Wester K., Hober S., Wernerus H., Bjorling L., Ponten F. (2010) Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat. Biotechnol.* **28**, 1248–1250.
28. Uehara T., Kikuchi H., Miyazaki S., Iino I., Setoguchi T., Hiramatsu Y., Ohta M., Kamiya K., Morita Y., Tanaka H., Baba S., Hayasaka T., Setou M., Konno H. (2016) Overexpression of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 and concomitant lipid alterations in gastric cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **23**(Suppl. 2), S206–S213.
29. Shida-Sakazume T., Endo-Sakamoto Y., Unozawa M., Fukumoto C., Shimada K., Kasamatsu A., Ogawara K., Yokoe H., Shiiba M., Tanzawa H., Uzawa K. (2015) Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 overexpression promotes oral squamous cell carcinoma progression via enhanced biosynthesis of platelet-activating factor. *PLoS One*. **10**, e0120143.
30. Grupp K., Sanader S., Sirma H., Simon R., Koop C., Prien K., Hube-Magg C., Salomon G., Graefen M., Heinzer H., Minner S., Izbicki J., Sauter G., Schlomm T., Tsourlakis M. (2013) High lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 expression independently predicts high risk for biochemical recurrence in prostate cancers. *Mol. Oncol.* **7**, 1001–1011.
31. Liu F., Wu Y., Liu J., Ni R.J., Yang A.G., Bian K., Zhang R. (2020) A miR-205–LPCAT1 axis contributes to proliferation and progression in multiple cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **527**, 474–480.
32. Lebok P., von Hassel A., Meiners J., Hube-Magg C., Simon R., Hoflmayer D., Hinsch A., Dum D., Fraune C., Gobel C., Moller K., Sauter G., Jacobsen F., Buscheck F., Prien K., Krech T., Krech R.H., von der Assen A., Wolber L., Witzel I., Schmalfeldt B., Geist S., Paluchowski P., Wilke C., Heilenkotter U., Terracciano L., Muller V., Wilczak W., Burandt E.C. (2019) Upregulation of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) is linked to poor prognosis in breast cancer. *Aging*. **11**, 7796–7804.
33. Du Y., Wang Q., Zhang X., Wang X., Qin C., Sheng Z., Yin H., Jiang C., Li J., Xu T. (2017) Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 upregulation and concomitant phospholipid alterations in clear cell renal cell carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **36**, 66.
34. Hu J., Ding X., Tian S., Chu Y., Liu Z., Li Y., Li X., Wang G., Wang L., Wang Z. (2021) TRIM39 deficiency inhibits tumor progression and autophagic flux in colorectal cancer via suppressing the activity of Rab7. *Cell Death Dis.* **12**, 391.
35. Li B., Qi Z.P., He D.L., Chen Z.H., Liu J.Y., Wong M.W., Zhang J.W., Xu E.P., Shi Q., Cai S.L., Sun D., Yao L.Q., Zhou P.H., Zhong Y.S. (2021) NLRP7 deubiquitination by USP10 promotes tumor progression and tumor-associated macrophage polarization in colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **40**, 126.
36. Erokhov P.A., Kulikov A.M., Karpova Y.D., Rodoman G.V., Sumedi I.R., Goncharov A.L., Razbirin D.V., Gorelova V.S., Sharova N.P., Astakhova T.M. (2021) Proteasomes in patient rectal cancer and different intestine locations: where does proteasome pool change? *Cancers (Basel)*. **13**, 1108.
37. Boland K., Flanagan L., McCawley N., Pabari R., Kay E.W., McNamara D.A., Murray F., Byrne A.T., Ramtoola Z., Concannon C.G., Prehn J.H. (2016) Targeting the 19S proteasomal subunit, Rpt4, for the treatment of colon cancer. *Eur. J. Pharmacol.* **780**, 53–64.

HECTD2 REPRESSES CELL PROLIFERATION IN COLORECTAL CANCER THROUGH DRIVING UBIQUITINATION AND DEGRADATION OF LPCAT1

L. Ma¹, D. H. Li¹, and Z. Xu¹, *

¹ Department of General Surgery, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao University, Qingdao, 266000 China

*e-mail: xuzhixuzhi1981@163.com

Colorectal cancer (CRC) is a malignancy featured by a poor overall survival and a high recurrence rate, whereas the biomarkers for CRC remain to be investigated. Herein, it was found that lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) was highly expressed in CRC, and *LPCAT1* overexpression significantly promoted CRC cell proliferation, while it was reversed by LPCAT1 depletion. In addition, HECT domain-containing 2 (HECTD2) protein was determined as a post-translational mediator of LPCAT1 because HECTD2 co-immunoprecipitated with high ubiquitinated LPCAT1. Furthermore, upregulated LPCAT1 rescued the impairment of CRC cell proliferation caused by HECTD2 overexpression. In conclusion, our findings supported HECTD2/LPCAT1 axis as a potential prognostic biomarker in CRC.

Keywords: colorectal cancer, HECTD2, LPCAT1, ubiquitination, cell proliferation

УДК 577.2

ДЕЛЕЦИЯ *Aldh4a1* ПРИВОДИТ К НАРУШЕНИЮ СОЗРЕВАНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ У МЫШЕЙ¹

© 2022 г. Y. Xiao^{a, 2}, Z. Z. Wen^{b, 2}, B. Wu^a, H. X. Zhu^a, A. Z. Zhang^{a, *}, J. Y. Li^{c, **}, J. G. Gao^{a, b, ***}^a*School of Life Science and Key Laboratory of the Ministry of Education for Experimental Teratology, Shandong University, Jinan, 250100 P.R. China*^b*Medical Science and Technology Innovation Center, Shandong First Medical University, Jinan, 250117 P.R. China*^c*Key Laboratory of Male Reproductive Health, Institute of Science and Technology, National Health Commission, Beijing, 100081 P.R. China*

*e-mail: aizhenzhang@126.com

**e-mail: sdscli@126.com

***e-mail: jggao@sdu.edu.cn

Поступила в редакцию 09.10.2021 г.

После доработки 09.02.2022 г.

Принята к публикации 15.02.2022 г.

ALDH4A1, член суперсемейства альдегиддегидрогеназ, является ключевым ферментом в митохондриальном пути метаболизма пролина. Недавние исследования показали, что мутации в *aldh4a1* приводят к снижению фертильности и преждевременному репродуктивному старению самцов нематод. Однако влияние ALDH4A1 на фертильность самцов мышей не изучалось. В настоящем исследовании использовали технологию CRISPR-Cas9 для создания мышиной модели с нокаутом *Aldh4a1*, чтобы впервые изучить влияние этого гена на фертильность самцов мышей. Показано, что по сравнению с самцами дикого типа самцы *Aldh4a1*^{-/-} были фертильны, имели нормальный сперматогенез, но дефект созревания сперматозоидов в эпидидимисе выражался в нарушении подвижности, морфологии и увеличении спонтанной реакции акросомы. Кроме того, с использованием трансмиссионной электронной микроскопии в митохондриях сперматозоидов обнаружены вакуоли, а также выявлены вакуоли и трещины в шейке сперматозоидов у мутантных мышей. Полученные результаты показывают, что ALDH4A1 играет жизненно важную роль в структуре жгутика сперматозоида и процессе созревания сперматозоидов у мышей.

Ключевые слова: ALDH4A1, созревание сперматозоидов, CRISPR-Cas9, митохондрии, мышиная модель

DOI: 10.31857/S0026898422040152

ВВЕДЕНИЕ

Мужское бесплодие является одной из основных проблем здравоохранения во всем мире. По данным Всемирной организации здравоохранения, 9% пар в мире сталкиваются с проблемами фертильности, и на долю мужского бесплодия приходится 50% случаев из общего числа [1]. Здоровье сперматозоидов имеет ключевое значение для мужской фертильности. Тератозооспермия, астеноспермия и олигоспермия вызывают мужское бесплодие [2]. Количество спермы у бес-

плодных мужчин значительно снижено [3], а качество неуклонно снижается с каждым годом [4]. Недавние исследования показали, что мутация и инактивация альдегиддегидрогеназы 4A1 (ALDH4A1), фермента, катализирующего второй этап катаболизма пролина [5], ухудшает качество спермы и приводит к преждевременному репродуктивному старению [6].

Гены суперсемейства альдегиддегидрогеназ играют важную роль в катаболизме эндогенных и экзогенных альдегидов [7]. Представитель семейства ALDH4A1 локализуется в митохондриях [8] и важен в митохондриальном метаболизме пролина для преобразования 1-пирролин-5-карбоксилата (P5C) в глутаминовую кислоту [5]. Потеря активности фермента вследствие мутаций *Aldh4a1* приводит к возникновению гиперлипидемии [9]. Более того, уровень флавинадениндинуклеотида (FAD)

¹ Текст представлен авторами на английском языке.

² Эти авторы внесли равный вклад.

Список сокращений: ALDH4A1 – альдегиддегидрогеназа 4A1; P5C – 1-пирролин-5-карбоксилат; АФК – активные формы кислорода; РК – ретиноевая кислота; FAD – флавинадениндинуклеотид; gRNA – (guide RNA) – направляющая РНК системы CRISPR/Cas9; WT (wild type) – дикий тип; H&E – окраска гематоксилином и эозином.

снижается, что приводит к изменению функционирования митохондрий [10]. Центральный аксон сперматозоидов окружен девятью внешними плотными волокнами и образует спиральную митохондриальную оболочку шейки и хвоста [11]. Активность митохондрий и цитоплазматический гликолиз обеспечивают движение сперматозоидов [12]. Изменения в ультраструктуре, активности или функции митохондрий могут негативно влиять на нормальное функционирование сперматозоидов и вызывать их дисфункцию [13].

Сперматогенез — это сложный процесс, происходящий в семенниках [14]. Образование зрелых сперматозоидов требует пролиферации и дифференцировки сперматогоний, мейоза для образования сперматозоидов и созревания круглых сперматозоидов [15]. После сперматогенеза сперматозоиды продолжают созревать в эпидидимисе [16, 17], который делится на три части: придаточный эпидидимис, каудальный эпидидимис и тело эпидидимиса [18–20], в которых специфичные ионы и белки изменяют созревание сперматозоидов и способствуют их подвижности [21]. Для изучения влияния ALDH4A1 на мужскую репродукцию были созданы нокаутные мыши с использованием технологии CRISPR-Cas9 [22]. Показано, что нокаут гена *Aldh4a1* не влияет на сперматогенез в семенниках, но нарушает созревание сперматозоидов в хвостовом эпидидимисе, приводит к их аномальной морфологии, снижению подвижности сперматозоидов и преждевременной акросомальной реакции. Кроме того, у самцов *Aldh4a1*^{-/-} в митохондриях сперматозоидов наблюдали вакуоли, а в шейке сперматозоидов наблюдали трещины и вакуоли. Полученные результаты указывают на важную роль ALDH4A1 в функционировании сперматозоидов у мышей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение мышей с нокаутом *Aldh4a1*. Технологию CRISPR/Cas9 использовали для нокаута гена *Aldh4a1* у мышей C57BL/6. Целевые последовательности направляющих РНК (gRNA) были следующими: gRNA1 – GTTCGGGCTGGGTGATCTGAGGG, gRNA2 – CCCGAGAGAGCGACCATTTTGG. мРНК hCas9 и gRNA получали путем транскрипции *in vitro*. Суперовулированных самок дикого типа (WT) C57BL/6 спаривали с самцами C57BL/6 для получения зигот для введения мРНК Cas9 и gRNA. Геномную ДНК выделяли из хвостов новорожденных мышат. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием прямого праймера ALDH4A1 5'-CCTTCTCGTGGAAGGAGAAAC-3' и двух обратных праймеров 5'-CTGTGTTATCAACATCTCACTTCCACT-3' и 5'-GACAATGACTAGCTCAAGGCTGAA-3' для того, чтобы амплифициро-

вать фрагменты геномной ДНК, окружающие целевые сайты gRNA. Полученные ПЦР-фрагменты секвенировали для выявления мутаций. При скрещивании мутантов F0 сначала гибридизовали с мышами WT на том же фоне C57BL/6, и отбирали гетерозиготных мутантов F1. Затем гетерозиготные F1 скрещивались для получения гомозиготных мутантов F2.

Анализ уровней экспрессии мРНК. РНК из тканей мышей WT выделяли с помощью реагента TRIzol (“Invitrogen”, США). кДНК синтезировали с помощью обратной транскриптазы Primescript (“Takara”, Япония), затем проводили полимеразную цепную реакцию в реальном времени с использованием флуоресцентного красителя SYBR Green (“TakaRa”, Япония). Использовали следующие праймеры: *Aldh4a1* прямой, 5'-TCTACTGGGTCTGTGGTGGTGG-3', *Aldh4a1* обратный, 5'-GGGGTGATGTCCAGCGTAAG-3'. В качестве референсного гена использовали *Gapdh*. Все образцы анализировали в трех повторах, и относительные уровни мРНК в каждой ткани были рассчитаны методом $-2^{\Delta\Delta t}$.

Гистологический анализ. Семенники мышей WT и *Aldh4a1*^{-/-} и их придатки фиксировали раствором Буэна в течение 12 ч при комнатной температуре, затем обезвоживали в градиенте этанола и помещали в парафин. Полученную ткань разрезали на срезы толщиной 4 мкм. После депарафинизации и регидратации срезы тканей окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) в соответствии со стандартными процедурами.

Анализ морфологии сперматозоидов. У мышей дикого типа и *Aldh4a1*^{-/-} двусторонние половые железы вырезали из хвоста придатка семенника и помещали в PBS при 37°C на 15 минут. Затем 10 мкл надосадочной жидкости наносили на предметное стекло и получали мазки методом “тяги–толкая”. Предметные стекла высушивали на воздухе в течение ночи, фиксировали в 95% этаноле в течение 30 мин при комнатной температуре и окрашивали стандартным методом H&E.

Активация акросомальной реакции. Среду TYN (Aibei Biotechnology Co., Ltd, Nanjing, China), предварительно выдержанную в течение ночи в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂, использовали при индукции акросомальной реакции сперматозоидов. Двусторонний каудальный эпидидимис мышей WT и *Aldh4a1*^{-/-} измельчали в предварительно выдержанной среде и держали в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в течение 15 мин, чтобы вызвать акросомальную реакцию сперматозоидов. После мазка спермы акросомы окрашивали аглютинином *Arachis hypogaea* (арахис) (PNA, “Sigma”, L7381), а ядра окрашивали DAPI. Окрашивание акросом наблюдали в конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM900 (ZEISS, Oberko-

chen, Германия). У каждой мыши подсчитывали не менее 200 сперматозоидов. Рассчитывали значение AR как соотношение PNA-отрицательных /API-положительных сперматозоидов.

Анализ подвижности сперматозоидов. Двусторонний хвост придатка семенника взрослых мышей помещали в PBS, затем его надламывали и инкубировали при 37°C в течение 15 мин, чтобы сперматозоиды вышли естественным путем. После этого 10 мкл надосадочной жидкости капали на стеклянную пластину для количественного анализа сперматозоидов. 200 сперматозоидов анализировали с помощью системы компьютерного анализа спермы (CASA) (Tsinghua Tongfang, Пекин, Китай) для получения кинетических параметров сперматозоидов.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Сперматозоиды из хвоста придатка яичка фиксировали в глутаральдегиде и осмиевой кислотой. После добавления 10% желатина сперматозоиды обезвоживали сахарозой и затем замораживали в жидком азоте. Готовили замороженные срезы толщиной 50 нм с помощью криоультрамикротомы (EM FC7; Leica, Wetzlar, Германия) и просматривали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

Иммуногистохимический анализ. Парафинированные срезы обезжиривали, регидратировали, блокировали 3% H₂O₂ в течение 10 мин и прогревали в растворе для демаскировки (10 мМ цитрата натрия). Затем срезы инкубировали с кроличьими моноклональными антителами против SOX9 (1 : 100, "Abclonal", Китай) при 4°C в течение ночи. Иммуногистохимическое окрашивание парафиновых срезов проводили с помощью иммуногистохимического набора (Beijing Zhongshan Golden Bridge, Пекин, Китай).

Иммунофлуоресцентный анализ. После обезжиривания и регидратации парафинированные срезы помещали в цитрат натрия для демаскировки антигена и пермеабилizировали 0.5% Тритоном X-100 в течение 10 мин. После блокирования 5% козьей сывороткой при 37°C в течение 30 мин, срезы инкубировали с первичными антителами (γ H2aX, "Abcam", ab26350, Кембридж, Великобритания) при 4°C в течение ночи и вторичными антителами при 37°C в течение часа. После окрашивания DAPI срезы просматривали на LSM900 (ZEISS, Oberkochen, Германия).

Вестерн-блоттинг. Общий белок, выделенный из семенников и придатка, смешивали с 5-кратным буфером для образцов и помещали в кипящую воду на 5 мин. Белки разделяли с помощью гель-электрофореза SDS-PAGE и переносили на PVDF мембрану. После блокирования 5%-ным обезжиренным молоком мембрану инкубировали с первичными антителами, разведенными 5%

BCA при 4°C в течение ночи (GAPDH, 1 : 20000; ALDH4A1, 1 : 1000, Novus, Littleton, Colorado, USA). Затем вторичные антитела разводили 5%-ным обезжиренным молоком и инкубировали с мембраной при комнатной температуре в течение 1 ч. Количественный анализ полос проводили с помощью программы Image J.

Статистический анализ. Все данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение (SD). Для сравнения двух групп данных использовали *t*-тест Стьюдента, и *p* < 0.05 указывало на статистически значимую разницу.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение Aldh4a1^{-/-} мышей с помощью CRISPR-Cas9

Экспрессию *Aldh4a1* в тканях самцов мышей анализировали методом RT-qPCR. Обнаружено, что *Aldh4a1* экспрессируется в репродуктивной системе самцов мышей, причем его экспрессия в придатках выше, чем в семенниках и в хвосте придатка (рис. 1a). Для изучения влияния *Aldh4a1* на репродуктивную систему самцов мышей с помощью технологии CRISPR-Cas9 получили нокаут гена. *Aldh4a1* содержит 15 экзонов, и экзоны со 2 по 14 были удалены двумя sgRNA (рис. 1б). Секвенирование ДНК подтвердило делецию 13143 п.н. в последовательности гена *Aldh4a1* (рис. 1б), генотип определяли с помощью ПЦР-анализа (рис. 1в). Вестерн-блот показал также отсутствие белка ALDH4A1 у нокаутных мышей *Aldh4a1^{-/-}* (рис. 1з). Полученные результаты показывают, что получены мыши с нокаутом *Aldh4a1*.

Нормальное развитие и фертильность самцов мышей Aldh4a1^{-/-}

Влияние ALDH4A1 на фертильность самцов изучали, наблюдая развитие репродуктивной системы у самцов мышей *Aldh4a1^{-/-}*. По сравнению с самцами мышей WT, морфология и масса тела самцов *Aldh4a1^{-/-}* значимо не отличались (рис. 2a–в). Гистологический анализ показал, что по сравнению с самцами мышей WT у двух-четырёхмесячных самцов *Aldh4a1^{-/-}* наблюдали нормальную морфологию семенников и придатков, но у 6-месячных особей *Aldh4a1^{-/-}* в большинстве семенных канальцев присутствовали сфероиды (рис. 2д). Для проверки фертильности взрослых самцов WT и *Aldh4a1^{-/-}* спаривали со взрослыми самками мышей WT при соотношении самцов и самок 1 : 2 соответственно. В ходе последующих трех месяцев наблюдений обнаружили, что количество потомков, произведенных с участием самцов *Aldh4a1^{-/-}*, было таким же, как у самцов WT (рис. 2з), что сви-

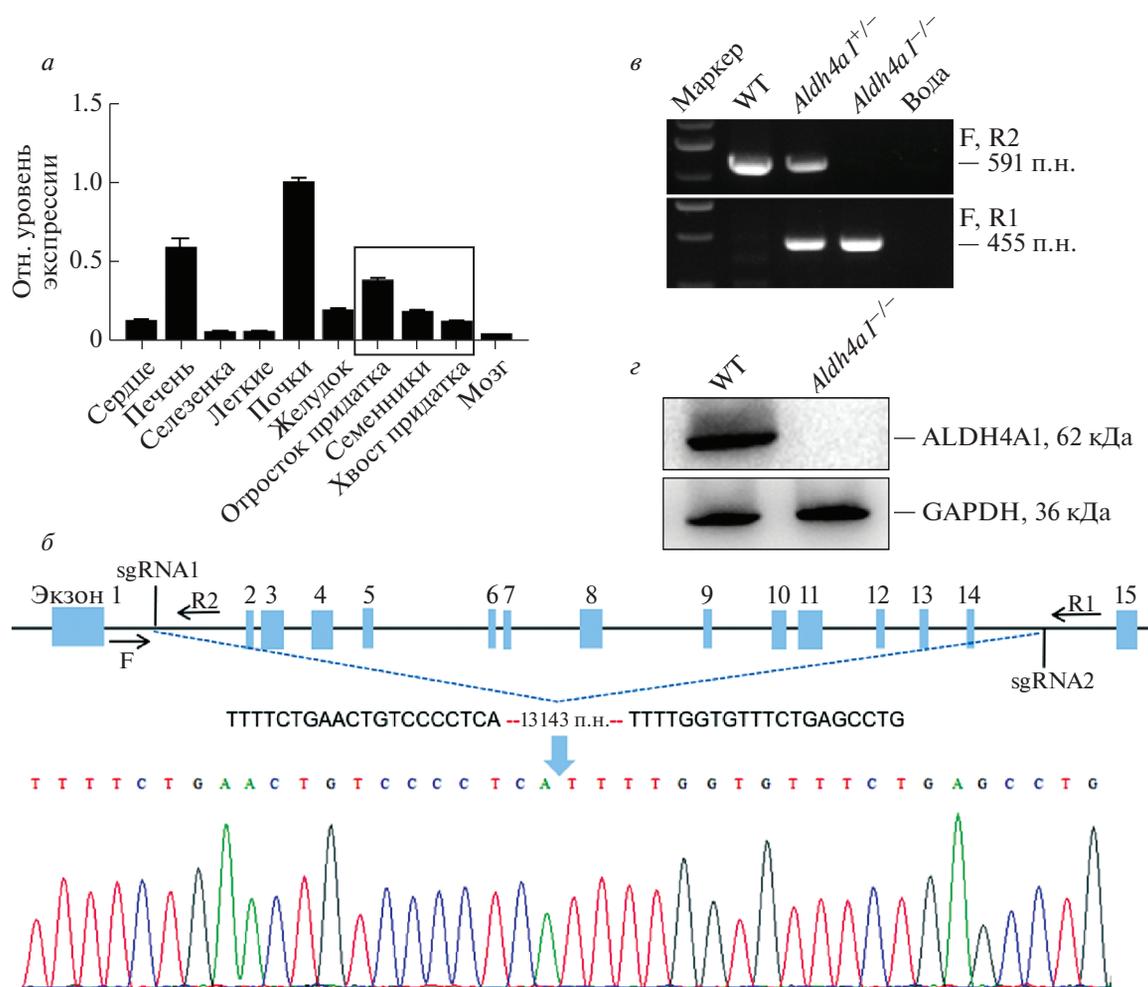


Рис. 1. CRISPR-Cas9-опосредованное получение мышей *Aldh4a1*^{-/-}. *а* – Анализ экспрессии ALDH4A1 в тканях мыши, включая сердце, печень, селезенку, легкие, почки, желудок, отростки придатков семенников, семенники, хвосты придатков семенников и мозг, с помощью RT-qPCR. *б* – Схема нокаута *Aldh4a1* с использованием системы CRISPR-Cas9. Между мишенями sgRNA1 и sgRNA2 был удален участок длиной 13143 п.н., делеция между мишенями идентифицирована с помощью ПЦР с прямыми (F) и обратными (R1, R2) праймерами. *в* – Различные фрагменты ДНК при анализе продуктов ПЦР у мышей WT и *Aldh4a1*^{-/-}. *г* – Подтверждение отсутствия экспрессии белка ALDH4A1 у мышей *Aldh4a1*^{-/-} с помощью анализа вестерн-блоттинга.

детельствует о том, что делеция *Aldh4a1* не влияет на репродуктивную способность самцов мышей.

Нарушение качества спермы у самцов мышей *Aldh4a1*^{-/-}

Далее мы проверили качество спермы самцов *Aldh4a1*^{-/-}. Для анализа морфологии и подвижности сперматозоидов они были извлечены из хвоста придатка семенника. Результаты указывают на то, что уровень деформации сперматозоидов в хвосте придатка семенника у самцов *Aldh4a1*^{-/-} значительно выше, чем у самцов WT. Проявления деформации в основном выражались в аномалии развития головки, шейки и хвоста сперматозоидов, наиболее часто наблюдали изогнутую шейку

(рис. 3*а, б*). Кроме того, определяли подвижность сперматозоидов, в измерениях использовали не менее 200 образцов от каждой мыши. В результате показано, что по сравнению со сперматозоидами самцов мышей WT, жизнеспособность и подвижность сперматозоидов у *Aldh4a1*^{-/-} резко снижены, в то время как количество иммобилизованных сперматозоидов значительно увеличено (рис. 3*в*). После этого оценили акросомальные реакции у самцов *Aldh4a1*^{-/-}. Акросомальная реакция инициируется после соединения сперматозоида и яйцеклетки. Если спонтанная акросомальная реакция происходит до того, как сперматозоид соединится с блестящей оболочкой яйцеклетки, сперматозоид теряет способность к оплодотворению. Капацитацию сперматозоидов моделировали в среде TYN

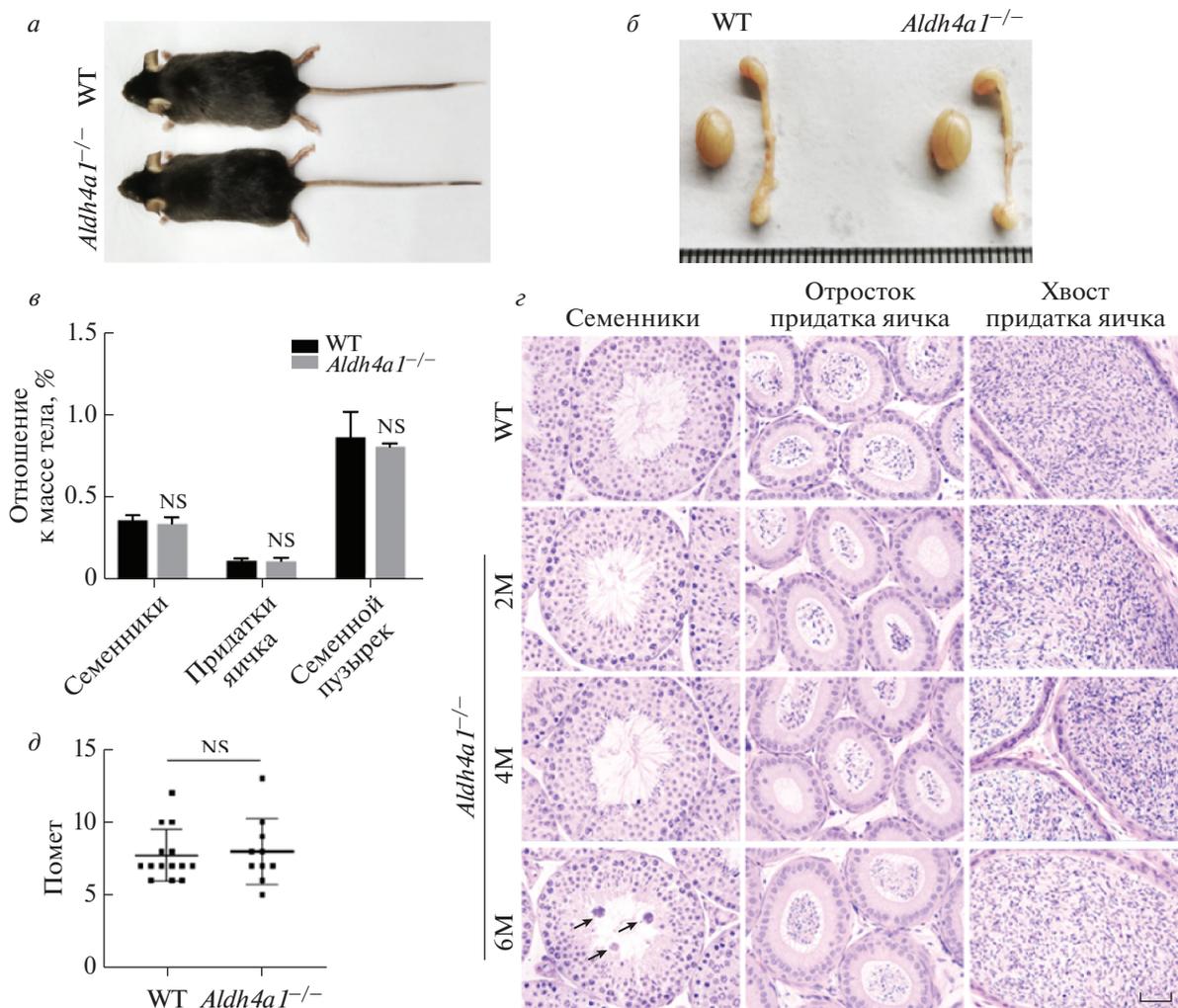


Рис. 2. Нормальная фертильность и состояние репродуктивной системы у самцов мышей *Aldh4a1*^{-/-}. *а, б* – Размеры самцов и размеры семенников и придатков мышей WT и *Aldh4a1*^{-/-}. *в* – Отношение массы семенников, придатков и семенных пузырьков к массе тела у самцов мышей *Aldh4a1*^{-/-} и WT (N = 7). *г* – Тест на фертильность самцов *Aldh4a1*^{-/-} и WT (N = 5). *д* – Парафиновые срезы семенников, придаточного эпидидимиса и каудального эпидидимиса 2-6-месячных самцов мышей WT и *Aldh4a1*^{-/-}, окрашенные Н&Е. Аномальные сфероиды в семенниках 6-месячных самцов *Aldh4a1*^{-/-} показаны стрелкой. Масштабная линейка = 100 мкм.

для последующих измерений частоты спонтанной акросомальной реакции. Показано, что независимо от капацитации спонтанная акросомальная реакция сперматозоидов самцов *Aldh4a1*^{-/-} значительно увеличена по сравнению со сперматозоидами самцов WT (рис. 3*г, д*). Полученные результаты говорят о том, что качество спермы у самцов мышей *Aldh4a1*^{-/-} ухудшено.

Аномальная структура жгутиков сперматозоидов у самцов мышей *Aldh4a1*^{-/-}

В связи с увеличенным количеством поврежденных сперматозоидов, первым делом, исследовали, является ли нормальным сперматогенез у самцов мышей *Aldh4a1*^{-/-}. Поскольку клетки Сер-

толи выстилают семенные канальца и выполняют множество функций в сперматогенезе, провели иммуногистохимический анализ этих клеток. Согласно полученным результатам, по сравнению с самцами WT, у самцов *Aldh4a1*^{-/-} не выявлено значимых различий в морфологии и количестве клеток Сертоли (рис. 4*а, в*). Мейоз является важным процессом в сперматогенезе, и наличие экспрессии γ H2aX служит одним из отличительных событий мейоза. Существует два различных типа детекции γ H2aX: в одном случае наблюдается яркое окрашивание ядра, а в другом – агрегация γ H2aX. Первый тип появляется в начале сперматогенеза, а второй – перед спермиацией. Анализ двух типов окрашивания γ H2aX не выявил их количественных различий у самцов WT и

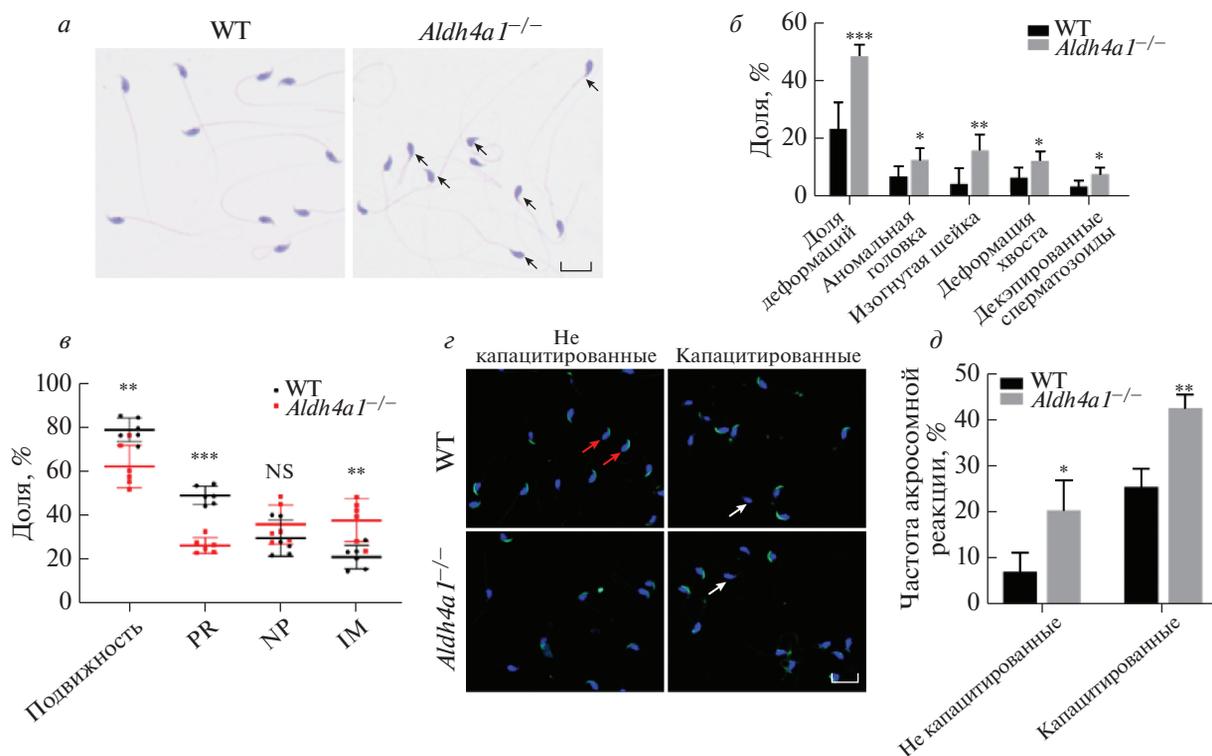


Рис. 3. Анализ качества спермы у самцов *Aldh4a1*^{-/-}. *а* – Окрашивание H&E сперматозоидов в хвосте придатка семенника самцов WT и *Aldh4a1*^{-/-}, anomальная морфология сперматозоидов указана стрелкой. Масштабная линейка = 50 мкм. *б* – Соотношение деформированных сперматозоидов в хвосте придатка семенника самцов мышей WT и *Aldh4a1*^{-/-} (N = 6). *в* – CASA-анализ сперматозоидов в хвосте придатка семенника самцов WT и *Aldh4a1*^{-/-} (N = 6). PR – прогрессивная подвижность; NP – непрогрессивная подвижность; IM – иммобилизованные сперматозоиды. *г* – Окрашивание PNA для детекции спонтанной акросомальной реакции. Сперматозоиды без акросомальной реакции оставались интактными (положительное окрашивание PNA, с зеленой флуоресценцией головки, показано красной стрелкой), а сперматозоиды с акросомальной реакцией показали дефект акросомы (отрицательное окрашивание PNA, без зеленой флуоресценции на головке, показано белой стрелкой). Масштабная линейка = 50 мкм. *д* – Частота спонтанных акросомальных реакций активированных и неактивных сперматозоидов в каудальном эпидидимисе у самцов мышей WT и *Aldh4a1*^{-/-} (N = 3).

Aldh4a1^{-/-} (рис. 4б, г). Таким образом, у самцов *Aldh4a1*^{-/-} обнаружен нормальный сперматогенный эпителий и нормальный сперматогенез.

ALDH4A1 локализуется в матриксе митохондрий и играет важную роль в их функционировании. Проанализировали субклеточную структуру сперматозоидов в хвосте придатка семенника с помощью ТЭМ. По сравнению со сперматозоидами самцов WT, структура акросомы сперматозоидов у самцов *Aldh4a1*^{-/-} была нормальной (рис. 4д), но в шейке сперматозоидов самцов *Aldh4a1*^{-/-} обнаружили трещины и вакуоли (рис. 4д). Вакуоли присутствовали также во многих митохондриях самцов *Aldh4a1*^{-/-} (рис. 4д). Кроме того, в жгутиках сперматозоидов самцов *Aldh4a1*^{-/-} наблюдали нормальное расположение аксонемы “9 + 2” (рис. 4д).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Зрелые и здоровые сперматозоиды – основа мужской фертильности. Снижение подвижности,

дегенерация и гибель сперматозоидов могут стать причиной мужского бесплодия [23, 24]. Мутация *alh-6* гомолога *Aldh4a1* у *Caenorhabditis elegans* может изменять содержание FAD и нарушать гомеостаз митохондрий, что приводит к дисфункции сперматозоидов у самцов нематод и ухудшению репродуктивной способности [6, 10]. Поэтому в представленном исследовании нами впервые использована CRISPR-Cas9 для создания мышиной модели с нокаутом гена *Aldh4a1*, чтобы изучить влияние ALDH4A1 на мужскую фертильность, сперматогенез и созревание сперматозоидов млекопитающих.

Нокаут *Aldh4a1* влияет на созревание сперматозоидов

В нашем исследовании установлено, что самцы мышей *Aldh4a1*^{-/-} имели нормальную фертильность и сперматогенез, но, по сравнению с самцами мышей WT, созревание сперматозоидов было нарушено, что проявлялось в увеличении

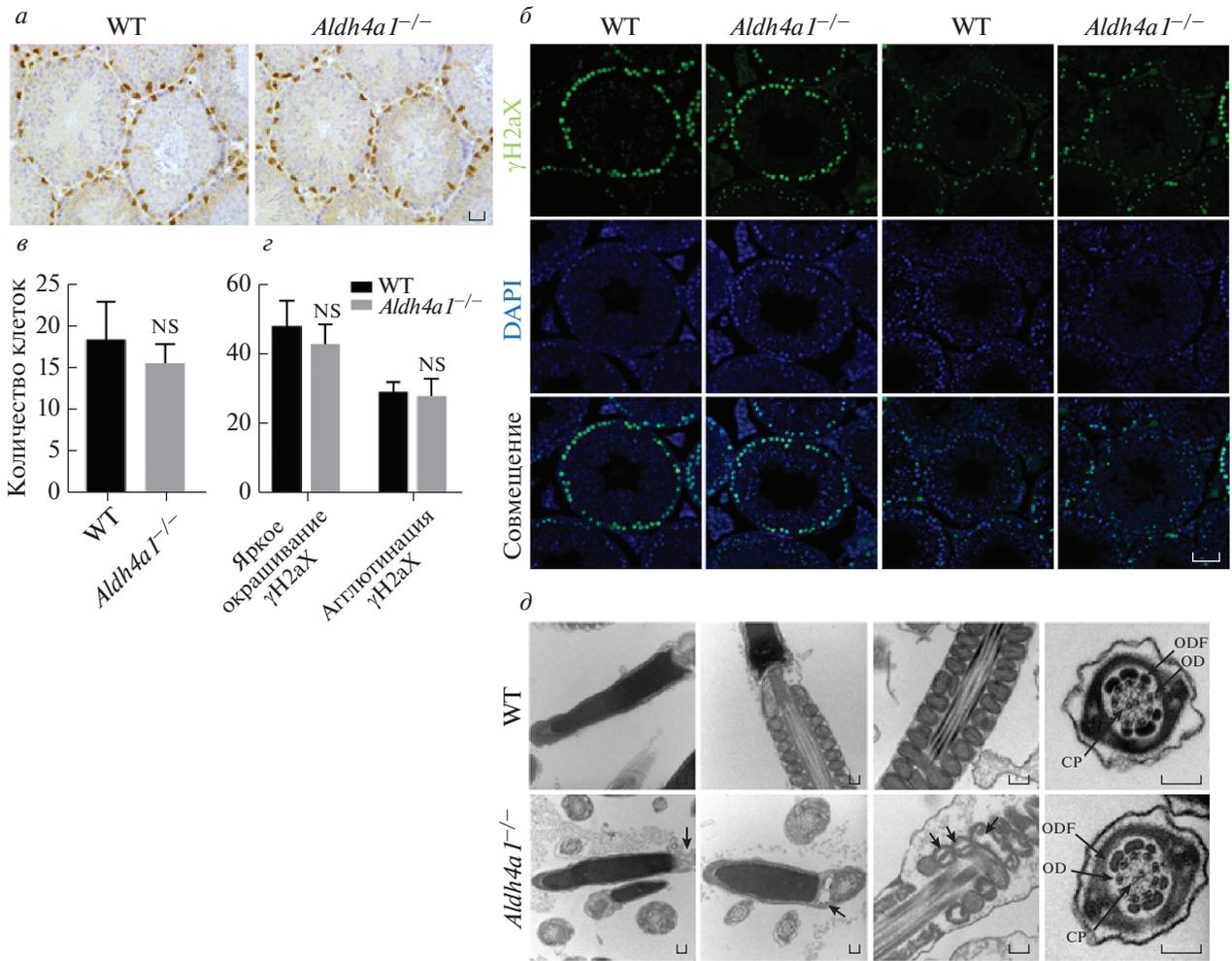


Рис. 4. У самцов *Aldh4a1*^{-/-} наблюдается нормальный сперматогенез. *a* – Иммуногистохимия SOX9 парафиновых срезов семенников самцов WT и *Aldh4a1*^{-/-}. Масштабная линейка = 100 мкм. *б* – Иммунофлуоресценция парафиновых срезов семенников самцов WT и *Aldh4a1*^{-/-}, окрашивание γ H2aX в сперматогенных канальцах разделено на яркое и агрегационное. Масштабная линейка = 50 мкм. *в* – Количество клеток Сертоли у самцов *Aldh4a1*^{-/-} и WT. В каждом случае подсчитывали двадцать сперматогенных канальцев одинакового размера с одинаковым сперматогенным эпителиальным циклом (N = 3). *г* – Количество сперматогониев у самцов *Aldh4a1*^{-/-} и WT, определенное с использованием двух типов окрашивания γ H2aX. В каждом случае подсчитывали двадцать сперматогенных канальцев одинакового размера и одинакового сперматогенного эпителиального цикла (N = 3). *д* – Ультраструктура сперматозоидов у самцов WT и *Aldh4a1*^{-/-}, определенная с помощью ТЭМ. В шейке наблюдали трещины и вакуоли, как показано стрелкой. Морфология акросомы, структура “9 + 2” хвоста и митохондриальная оболочка были нормальными. Масштабная линейка = 1 нм. ODF – наружное плотное волокно; OD – периферические дублеты микротрубочек; CP – центральные микротрубочки.

числа дефектов их развития, снижении подвижности сперматозоидов и увеличении спонтанных акросомальных реакций. Семейство альдегиддегидрогеназ (ALDH) катализирует превращение ретинола, спиртовой формы витамина А, в ретиновую кислоту (РК), которая имеет решающее значение для сперматогенеза, и ингибирование экспрессии ALDH приводит к дерегуляции сперматогенеза [25]. ALDH1 – член семейства альдегиддегидрогеназ, который высоко экспрессируется в клетках Сертоли семенников и опосредует образование РК, которая участвует в синтезе тестостерона и способствует сперматогенезу [26].

Аномальный сперматогенез не наблюдали у самцов мышей *Aldh4a1*^{-/-}, что указывает на то, что ALDH4A1 не играет важную роль в сперматогенезе. Сфероиды, обнаруженные в семенных канальцах семенников 6-месячных самцов мышей *Aldh4a1*^{-/-}, могут быть вызваны аномальным метаболизмом остаточных телец в сперматогенных канальцах стареющих мышей [27, 28]. Окрашивание H&E среза придатка яичка у самцов мышей *Aldh4a1*^{-/-} показало, что морфология эпителия придатка семенника была нормальной, что указывает на возможные изменения гомеостаза [29],

что, в свою очередь, влияет на функции сперматозоидов. Таким образом, нокаут *Aldh4a1* приводит к изменениям в устойчивом состоянии эпидимиса, что влияет на созревание сперматозоидов.

Дерегуляция митохондриального гомеостаза приводит к нарушению функции сперматозоидов

Aldh4a1 находится в митохондриях, и его мутации могут вызывать гиперпротеинемию II типа [8]. Нокаут *Aldh4a1* приводит к нарушению второго этапа катаболизма пролина, а именно превращения P5C в глутаминовую кислоту, что приводит к накоплению P5C, снижению уровня FAD, нарушению гомеостаза АФК и преждевременной репродуктивной неспособности у самцов [6]. Исследования показали, что экспрессия ALDH4A1 в семенниках самцов и ооцитах самок мышей с возрастом снижается, что предполагает, что ALDH4A1 может быть связан с репродуктивным старением. Значимо увеличенное количество изгибов шейки сперматозоидов у самцов мышей *Aldh4a1*^{-/-} обусловлено преждевременным репродуктивным старением. Нарушения в субмикроскопической структуре митохондриальной оболочки указывают на то, что нокаут *Aldh4a1* может повлиять на митохондриальный гомеостаз, приводящий к окислительному стрессу. Небольшое количество АФК играет положительную роль в капацитации сперматозоидов, акросомальной реакции и т.д. Однако высокий уровень окислительного стресса может вызывать перекисное окисление липидов сперматозоидов и повреждение ДНК, и даже окисление белков и инактивацию ферментов в сперматозоидах, что приводит к бесплодию [30–32]. Поэтому механизм влияния ALDH4A1 на мужское репродуктивное старение будет направлением наших будущих исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке National Key Research and Developmental Program of China (Grants 2018YFC1003602, 2018YFC1003601).

Все эксперименты с использованием животных одобрены Комитетом по этике Шаньдунского университета (г. Цзинань, Китай) и проведены в строгом соответствии с национальными и местными законами о защите животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fainberg J., Kashanian J. (2019) Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Res*. **8**, 2 F1000 Faculty Rev-670. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17076.1>
- Skoracka K., Eder P., Łykowska-Szuber L., Dobrowolska A., Krela-Kaźmierczak I. (2020) Diet and nutritional factors in male (in) fertility—underestimated factors. *J. Clin. Med.* **9**(5), 1400. <https://doi.org/10.3390/jcm9051400>
- Agarwal A., Baskaran S., Parekh N., Cho C.-L., Henkel R., Vij S., Arafa M., Selvam M.K.P., Shah R. (2021) Male infertility. *Lancet*. **397**(10271), 319–333. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
- Huang C., Li B., Xu K., Liu D., Hu J., Yang Y., Nie H., Fan L., Zhu W. (2017) Decline in semen quality among 30,636 young Chinese men from 2001 to 2015. *Fertil. Steril.* **107**(1), 83–88. e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.035>
- Yoshida A., Rzhetsky A., Hsu L.C., Chang C. (1998) Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur. J. Biochem.* **251**(3), 549–557. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2510549.x>
- Yen C.A., Curran S.P. (2021) Incomplete proline catabolism drives premature sperm aging. *Aging Cell*. **20**(2), e13308. <https://doi.org/10.1111/accel.13308>
- Jackson B., Brocker C., Thompson D.C., Black W., Vasiliou K., Nebert D.W., Vasiliou V. (2011) Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum. Reprod.* **5**(4), 1–21. <https://doi.org/10.1186/1479-7364-5-4-283>
- Muzio G., Maggiora M., Paiuzzi E., Oraldi M., Canuto R.A. (2012) Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free Radical. Biol. Med.* **52**(4), 735–746. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.033>
- Marchitti S.A., Brocker C., Stagos D., Vasiliou V. (2008) Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol.* **4**(6), 697–720. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.6.697>
- Yen C.-A., Ruter D.L., Turner C.D., Pang S., Curran S.P. (2020) Loss of flavin adenine dinucleotide (FAD) impairs sperm function and male reproductive advantage in *C. elegans*. *Elife*. **9**, e52899. <https://doi.org/10.7554/eLife.52899>
- Xu K., Yang L., Zhang L., Qi H. (2020) Lack of AKAP3 disrupts integrity of the subcellular structure and proteome of mouse sperm and causes male sterility. *Development*. **147**(2), dev181057. <https://doi.org/10.1242/dev.181057>
- Lehti M.S., Sironen A. (2017) Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biol. Reprod.* **97**(4), 522–536. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox096>
- Amaral A., Lourenço B., Marques M., Ramalho-Santos J. (2013) Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*. **146**(5), R163–R174. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0178>
- de Kretser D.M., Loveland K.L., Meinhardt A., Simorangkir D., Wreford N. (1998) Spermatogenesis. *Hum. Genomics* **13**(suppl. 1), 1–8. https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_1.1
- Neto F.T.L., Bach P.V., Najari B.B., Li P.S., Goldstein M. (2016) Spermatogenesis in humans and its af-

- fecting factors. *Semin. Cell Dev. Biol.* **59**, 10–26.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.04.009>
16. Rinaldi V.D., Donnard E., Gellatly K., Rasmussen M., Kucukural A., Yukselen O., Garber M., Sharma U., Rando O.J. (2020) An atlas of cell types in the mouse epididymis and vas deferens. *Elife*. **9**, e55474.
<https://doi.org/10.7554/eLife.55474>
 17. Sullivan R., Mieuisset R. (2016) The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum. Reprod. Update.* **22**(5), 574–587.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmw015>
 18. Sullivan R., Legare C., Lamontagne-Proulx J., Breton S., Soulet D. (2019) Revisiting structure/functions of the human epididymis. *Andrology*. **7**(5), 748–757.
<https://doi.org/10.1111/andr.12633>
 19. Cornwall G.A. (2009) New insights into epididymal biology and function. *Hum. Reprod. Update.* **15**(2), 213–227.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmn055>
 20. Turner T.T., Johnston D.S., Finger J.N., Jelinsky S.A. (2007) Differential gene expression among the proximal segments of the rat epididymis is lost after efferent duct ligation. *Biol. Reprod.* **77**(1), 165–171.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059493>
 21. Dacheux J.-L., Dacheux F. (2014) New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*. **147**(2), R27–R42.
<https://doi.org/10.1530/REP-13-0420>
 22. Henaou-Mejia J., Williams A., Rongvaux A., Stein J., Hughes C., Flavell R.A. (2016) Generation of genetically modified mice using the CRISPR–Cas9 genome-editing system. *Cold Spring Harbor Protoc.* **2016**(2), pdb. prot090704.
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot090704>
 23. Cedikova M., Miklikova M., Grundmanova M., Zech N., Králíčková M., Kuncova J. (2014) Sperm mitochondrial function in men with normozoospermia and asthenozoospermia. *Ceska Gynaecol.* **79**(1), 22–28.
 24. Wilton L.J., Temple-Smith P.D., Baker H.G., de Kretser D.M. (1988) Human male infertility caused by degeneration and death of sperm in the epididymis. *Fertil. Steril.* **49**(6), 1052–1058.
[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)59960-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)59960-9)
 25. Kent T., Arnold S.L., Fasnacht R., Rowsey R., Mitchell D., Hogarth C.A., Isoherranen N., Griswold M.D. (2016) ALDH enzyme expression is independent of the spermatogenic cycle, and their inhibition causes misregulation of murine spermatogenic processes. *Biol. Reprod.* **94**(1), 12, 1–13.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.131458>
 26. López-Fernández L.A., del Mazo J. (1997) The cytosolic aldehyde dehydrogenase gene (*Aldh1*) is developmentally expressed in Leydig cells. *FEBS Lett.* **407**(2), 225–229.
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00352-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00352-9)
 27. Xiao C.Y., Wang Y.Q., Li J.H., Tang G.C., Xiao S.S. (2017) Transformation, migration and outcome of residual bodies in the seminiferous tubules of the rat testis. *Andrologia*. **49**(10), e12786.
<https://doi.org/10.1111/and.12786>
 28. Paniagua R., Nistal M., Amat P., Rodriguez M.C., Martin A. (1987) Seminiferous tubule involution in elderly men. *Biol. Reprod.* **36**(4), 939–947.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod36.4.939>
 29. Hinton B.T., Palladino M.A. (1995) Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microsc. Res. Tech.* **30**(1), 67–81.
<https://doi.org/10.1002/jemt.1070300106>
 30. Barati E., Nikzad H., Karimian M. (2020) Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**(1), 93–113.
<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03253-8>
 31. Bisht S., Faiq M., Tolahunase M., Dada R. (2017) Oxidative stress and male infertility. *Nat. Rev. Urol.* **14**(8), 470–485.
<https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69>
 32. Menezo Y.J., Silvestris E., Dale B., Elder K. (2016) Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. *Reprod. BioMed. Online* **33**(6), 668–683.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.09.006>

DELETION OF *Aldh4a1* LEADS TO IMPAIRED SPERM MATURATION IN MICE

Y. Xiao¹, Z. Z. Wen², B. Wu¹, H. X. Zhu¹, A. Z. Zhang¹ *,
 J. Y. Li³, **, and J. G. Gao^{1,2}, ***

¹ School of Life Science and Key Laboratory of the Ministry of Education for Experimental Teratology, Shandong University, Jinan, 250100 P.R. China

² Medical Science and Technology Innovation Center, Shandong First Medical University, Jinan, 250117 P.R. China

³ Key Laboratory of Male Reproductive Health, Institute of Science and Technology, National Health Commission, Beijing, 100081 P.R. China

*e-mail: aizhenzhang@126.com

**e-mail: sdscli@126.com

***e-mail: jggao@sdu.edu.cn

ALDH4A1, a member of the aldehyde dehydrogenase superfamily, is a key enzyme in the mitochondrial proline metabolism pathway. Recent studies have shown that mutations in *aldh4a1* lead to reduced fertility and

reproductive premature aging of male nematodes. However, the effect of ALDH4A1 on fertility of male mice has not been studied. In this study, we used CRISPR-Cas9 technology to construct a knockout mouse model of *Aldh4a1* for the first time to explore the effect of this gene on the reproduction of male mice. The results showed that compared with WT male mice, *Aldh4a1*^{-/-} male mice were fertile, had normal spermatogenesis but defect in sperm maturation in the epididymis documented by impaired motility, increased morphological abnormalities and increased spontaneous acrosome reaction. In addition, transmission electron microscopy showed vacuoles in the sperm mitochondria, and fracture in the neck of sperms and vacuoles in these mice. These results revealed that ALDH4A1 plays a vital role in the structure of sperm flagellum and the process of sperm maturation in mice.

Keywords: ALDH4A1, sperm maturation, CRISPR-Cas9, mitochondria, mouse model

УДК 577.21

СНИЖЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОЙ ИЗОФОРМЫ OCT-1L ОКАЗЫВАЕТ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ В КЛЕТКАХ ЛИМФОМЫ БЕРКИТТА *Namalwa*

© 2022 г. Т. Н. Порцева^а, А. П. Котнова^а, Е. В. Булавкина^а, А. А. Макарова^а, С. Г. Георгиева^а, А. Г. Степченко^а, Е. В. Панкратова^{а, *}

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

*e-mail: panliz@mail.ru

Поступила в редакцию 08.12.2021 г.

После доработки 17.02.2022 г.

Принята к публикации 24.02.2022 г.

Повышенный уровень фактора транскрипции Oct-1 считается одним из ключевых маркеров неблагоприятного течения канцерогенеза. Кроме убиквитарной изоформы Oct-1A, представленной во всех клетках организма, существует и тканеспецифическая изоформа Oct-1L, которая экспрессируется в гемопоэтических клетках. Oct-1L не только повышает устойчивость клеток к разным видам стресса, но и регулирует экспрессию генов, отвечающих за дифференцировку гемопоэтических клеток и клеток иммунной системы. Уровень экспрессии тканеспецифической изоформы Oct-1L значительно увеличен в лимфобластных В-клеточных линиях *Namalwa* и *Raji* и в Т-клеточной лимфобластной линии *Jurkat* по сравнению с нормальными В- и Т-клетками. Вероятно, aberrантная сверхэкспрессия Oct-1L приводит не только к повышению стрессоустойчивости клеток, но и к дезорганизации путей их развития, способствуя злокачественной трансформации. В этой работе нами показано, что направленное подавление экспрессии тканеспецифической изоформы Oct-1L снижает скорость деления клеток *Namalwa*, вызывает значительное увеличение их гибели в условиях гипоксии, а также повышает чувствительность к химиотерапевтическим препаратам — доцетакселу и доксорубину. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности таргетной терапии, направленной на подавление отдельных изоформ Oct-1, уровень экспрессии которых повышен в опухолевой клетке, а не всех изоформ одновременно, что даст возможность избежать травмирующего эффекта полного нокдауна Oct-1. Избирательное подавление изоформ Oct-1 считается перспективной стратегией в терапии опухолей лимфоидного ряда и, по-видимому, может способствовать облегчению течения болезни и повышению выживаемости пациентов.

Ключевые слова: фактор транскрипции POU2F1 (Oct-1), альтернативные промоторы, тканеспецифические изоформы, канцерогенез, лимфоциты

DOI: 10.31857/S0026898422040097

ВВЕДЕНИЕ

Фактор транскрипции Oct-1, содержащий высококонсервативный ДНК-связывающий домен (POU-домен), — один из главных регуляторов дифференцировки иммунных клеток [1, 2]. Oct-1 модулирует экспрессию специфических генов В-клеток, а также выживаемость и пролиферацию клеток иммунной системы [3, 4]. При онкотрансформации клеток концентрация Oct-1, необходимая для поддержания клеточного гомеостаза, может возрастать в 10 раз и более, так как этот белок способствует устойчивости к генотоксическому и окислительному стрессу и гликолитическому метаболизму, обеспечивая выживаемость раковых клеток при большой стрессовой нагрузке, которая развивается при онкотрансформации [5, 6]. Эти же функции Oct-1 выполняет в нормальных клетках [5].

Oct-1 охарактеризован достаточно давно, однако интерес к нему в настоящее время существенно возрос, поскольку обнаружили тесную корреляцию между злокачественностью опухоли, ее устойчивостью к терапии и высоким уровнем экспрессии Oct-1 в опухолевых клетках. Такая корреляция установлена при раке желудка [7–9], предстательной железы [10], раке шейки матки [11] и колоректальном раке [12]. Сверхэкспрессия Oct-1 коррелирует с агрессивностью многих типов опухолей [13–15].

Помимо убиквитарной изоформы Oct-1A, представленной во всех клетках на протяжении всей жизни организма, существуют тканеспецифические изоформы, экспрессирующиеся в определенных популяциях клеток в определенный период времени. Все эти изоформы образуют семейство факторов Oct-1 (у человека обнаружены 7 RefSeq и 14 дополнительных мРНК Oct-1 (GeneBank)) [3, 4,

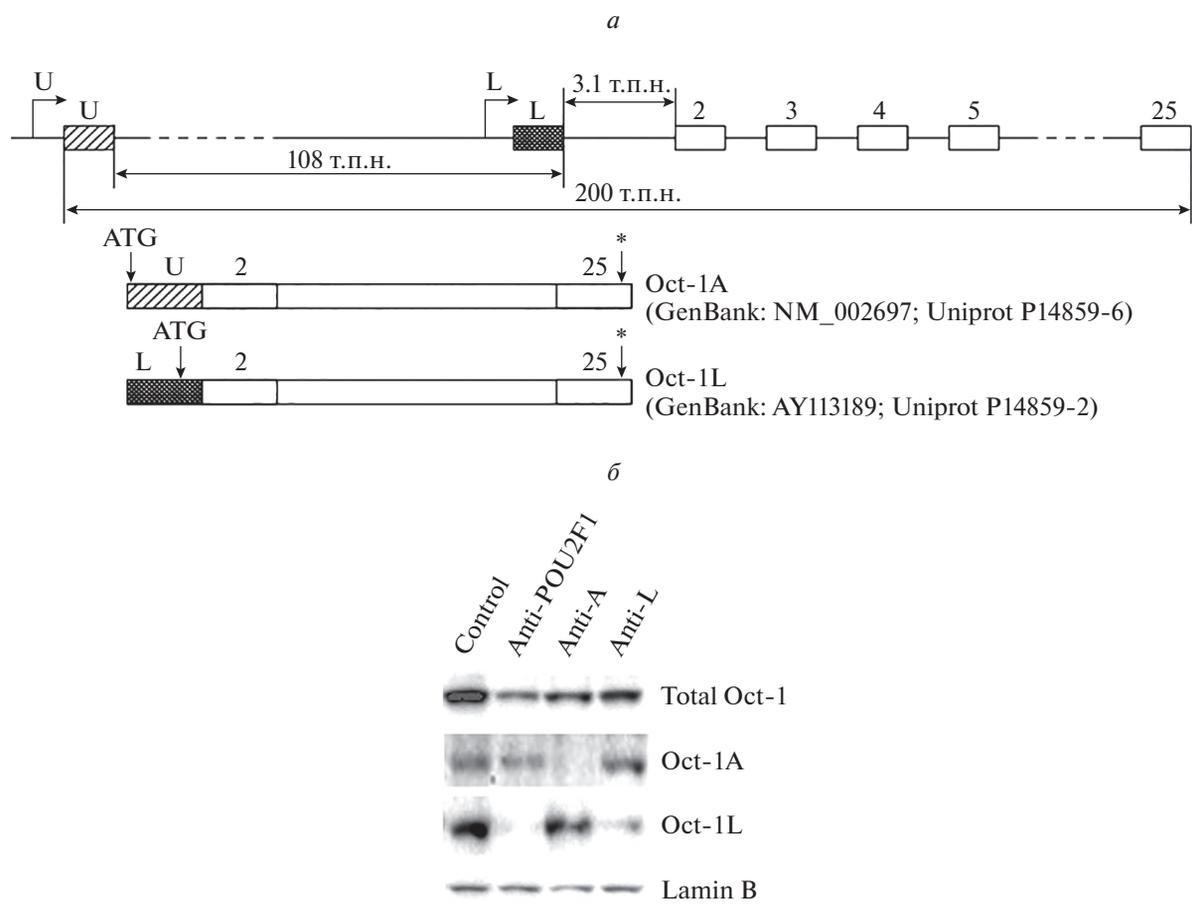


Рис. 1. Подавление экспрессии мРНК *POU2F1* (Oct-1) и его изоформ Oct-1A и Oct-1L в стабильно трансдуцированных клетках лимфомы Беркитта Namalwa под действием shРНК. *a* – Схема строения гена *POU2F1* и двух основных его изоформ, транскрибирующихся с убиквитарного промотора U и тканеспецифичного промотора L. *b* – Вестерн-блот-гибридизация с антителами к тотальному Oct-1 и его изоформам Oct-1A и Oct-1L. Здесь и далее: клеточные линии Namalwa “control” – клетки, трансдуцированные контрольной лентивирусной конструкцией, не имеющей значимой гомологии с геномом человека; Namalwa “anti-*POU2F1*” – клетки, трансдуцированные лентивирусной конструкцией, синтезирующей shРНК к тотальному Oct-1; Namalwa “anti-A” – клетки, трансдуцированные лентивирусной конструкцией, синтезирующей shРНК к изоформе Oct-1A; Namalwa “anti-L” – клетки, трансдуцированные лентивирусной конструкцией, синтезирующей shРНК к изоформе Oct-1L. Контроль нанесения образцов – гибридизация с антителами к ламину B. На дорожки нанесено по 10 мкг клеточного экстракта.

16–18]. В клетке могут экспрессироваться одновременно несколько изоформ Oct-1, и эту совокупность изоформ мы определяем как “тотальный Oct-1”. Несколько альтернативных изоформ Oct-1 найдены у мыши [1, 19, 20]. Ген *POU2F1* человека и мыши содержит альтернативные промоторы U и L [16, 20–24]. Считываемые с них транскрипты имеют разные первые экзоны и кодируют разные изоформы: Oct-1A считывается с промотора U, а Oct-1L – с промотора L. Как видно из рис. 1а, эти белки различаются своими N-концевыми последовательностями, что характерно для изоформ, которые различаются тканевой специфичностью экспрессии и регулируемыми генами-мишенями [25]. Oct-1L экспрессируется в клетках крови и в мозге. В наибольшем количестве эта изоформа представлена в В-клет-

ках [3, 16, 20]. Минорная тканеспецифическая изоформа Oct-1R специфична только для В-клеток [3]. Паттерны экспрессии различных изоформ Oct-1 изменяются во время дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников (CD34+, CD19+, CD14+ и CD3+) [3, 18]. Так Oct-1L экспрессируется на высоком уровне в CD34+. Уровень экспрессии резко падает во время дифференцировки Т-клеток, а при дифференцировке В-клеток он почти не изменяется.

Помимо повышения устойчивости к разным видам стресса, тканеспецифические изоформы Oct-1 регулируют гены, отвечающие за дифференцировку и фенотипы стволовых гемопоэтических клеток и клеток иммунной системы [3, 4]. Таким образом, увеличение концентрации тканеспецифических изоформ в онкотрансформи-

рованных клетках приводит не только к повышению стрессоустойчивости, но и к дезорганизации путей их развития. Проонкогенные функции Oct-1 описаны при лимфоме Ходжкина, лимфоме тимуса, остром миелоидном лейкозе [26, 27]. Сверхэкспрессия Oct-1 часто наблюдается при диффузной В-крупноклеточной лимфоме и считается независимым прогностическим фактором неблагоприятного исхода при этом заболевании [28].

Существование альтернативных промоторов в гене *POU2F1*, кодирующем белок Oct-1, указывает на возможность воздействия не на экспрессию тотального Oct-1, а на экспрессию тех его изоформ, уровень которых возрастает в опухолевых клетках.

Мы провели серию экспериментов по направленному ингибированию экспрессии как отдельных изоформ Oct-1, так и тотального Oct-1 с использованием малых интерферирующих РНК, специфичных как к отдельным изоформам, так и ко всем изоформам соответственно. Затем мы проанализировали эффект подавления как отдельных изоформ, так и тотального Oct-1 на пролиферацию и стрессоустойчивость клеток В-лимфобластной линии клеток Namalwa, полученной из лимфомы Беркитта. Показано, что нокдаун белка Oct-1 или отдельных его изоформ снижает скорость деления В-лимфобластных клеток, вызывает увеличение их гибели в условиях гипоксии, а также повышает чувствительность к химиотерапевтическим препаратам. Избирательное подавление экспрессии тканеспецифичной изоформы Oct-1L играет ведущую роль в снижении скорости деления клеток и повышения их гибели в условиях гипоксии. Полученные результаты свидетельствуют о возможности таргетной терапии, направленной на подавление отдельных изоформ Oct-1 в опухолевых клетках, что позволит снизить травмирующий эффект полного нокдауна Oct-1 или избежать его.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии. В работе использовали линию клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA MB-231. Клетки культивировали в полной среде ДМЕМ (“GIBCO”, “Thermo Fisher Scientific”, США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; “HyClone”, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина.

Нокдаун гена *POU2F1*. Для нокдауна гена *POU2F1* использовали технологию РНК-интерференции. На основе лентивирусного вектора рGPV.ma4 созданы конструкции для синтеза коротких РНК со шпилечной структурой (shРНК): scrambled (контрольная) и anti-*POU2F1* (shРНК для нокдауна мРНК всех изоформ Oct-1), anti-*A* (shРНК для нокдауна мРНК изоформы Oct-1A, “Евроген”, Россия), которыми трансфицировали клетки НЕК-293 и получали соответствующие лентивирусные стоки. Клетки Namalwa (10^6 клеток)

трансдуцировали полученными лентивирусными частицами. После селекции с использованием пурамицина, получили четыре линии клеток Namalwa со стабильным нокдауном тотального Oct-1, Oct-1A, Oct-1L и контрольную линию клеток Namalwa.

shРНК к мРНК Oct-1 (анти-*POU2F1*):

5'-GATCCGCCAAGACSTTCAAACAATTCAGAGATTTGTTTGAAGGTCTTGGCT-TTTTTG-3'.

shРНК к мРНК Oct-1A (anti-*A*): 5'-GATCCACG-GAGGAGCAGCGAGTCATTCAAGAGATGACTC-GCTGCTCCTCCGTTTTTTTG-3'.

shРНК к мРНК Oct-1L (anti-*L*): 5'-GATCCGTG-CAGTGAATATGTTCTAGTTCAAGAGACTAGAA-CATAGTCACTGCATTTTTTTG-3'.

shРНК control – нуклеотидная последовательность, не имеющая гомологии с РНК человека, использована в качестве отрицательного контроля:

5'-GATCCGCAAAAATTCCTCCGAACGTGTT-CAAGAGACACGTTTCGGAGAATTTTTGT-TTTTTG-3'.

Уровень экспрессии Oct-1 измеряли с использованием количественной ПЦР и иммуноблотинга.

Выделение РНК и RT-qPCR. РНК выделяли из клеточных линий с использованием Trizol. Уровни мРНК измеряли с помощью обратной транскрипции и ПЦР реального времени (RT-PCR) и нормировали по мРНК, кодирующей глюкоконидазу В (*GUS*). Обратную транскрипцию выполняли с использованием 2 мкг суммарной РНК и набора Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit для RT-qPCR (“Thermo Scientific”) в соответствии с рекомендациями производителя. кДНК синтезировали с использованием смешанных олиго(dT)₁₈ и случайных гексамерных праймеров. Использовали следующие праймеры: Oct-1A-F: 5'-TATTCAAATGGCGGACGGA-3'; Oct-1A-R: 5'-GTTTCTGACGGATTGTTTCATTC-3'; *GUS*-F: 5'-CGTGGTTGGAGAGCTCATTTGGA-3' и *GUS*-R: 5'-ATTCCCCAGCACTCTCGTCGGT-3'. RT-PCR выполняли в термоциклере LightCycler96 (“Roche”, США). Стандартная реакционная смесь (25 мкл) содержала соответствующие пары праймеров, кДНК, эквивалентную 50 нг суммарной РНК, и мастер-смесь qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”). ПЦР в реальном времени проводили в следующих условиях: 55°C в течение 2 мин, 95°C в течение 5 мин, затем 40 циклов: 95°C, 10 с и 59°C, 30 с (температура получения сигнала). В каждом случае измерения проводили как минимум в трех повторностях и рассчитывали средние значения. Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения LightCycler96 Instrument. Данные RT-PCR обрабатывали путем расчета $\Delta\Delta Ct$.

Вестерн-блотинг. Клеточные экстракты (10 мкг белка), смешанные с буфером Laemmli, содержащим дитиотреитол, инкубировали при 40°C в течение 10 мин, затем наносили на 8%-ный денату-

рирующий полиакриламидный гель и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (“GE Healthcare”, США) в растворе 25 мМ Трис, 192 мМ глицина и 20% этанола с последующим блокированием мембраны 5%-ным обезжиренным молоком в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Антитела против Oct-1, его изоформ Oct-1A и Oct-1L, ламина В использовали для иммуноокрашивания мембран. Ламин В использовали в качестве контроля нанесения. Мембраны инкубировали с первичными антителами в PBS с добавлением 0.1% Tween-20 (PBS-T) в 5%-ном обезжиренном молоке в PBS-T при 4°C в течение ночи, а затем промывали 3 раза в течение 20 мин PBS-T и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP). После четырех дополнительных стадий промывки PBS-T сигнал детектировали в соответствии со стандартным протоколом с использованием реагента ECL (“GE Healthcare”, США). Использовали поликлональные антитела кролика к изоформам Oct-1A и Oct-1L, полученные ранее в нашей лаборатории [4], поликлональные антитела кролика к Oct-1 (“Abcam”, Ab66132, Великобритания), моноклональные антитела мыши к ламину В1 (sc-377000; “SantaCruz”), вторые антимышьи антитела козы, конъюгированные с HRP (“Jackson ImmunoResearch”, США, 115-035-174) и вторые антикроличьи антитела козы, конъюгированные с HRP (“Jackson ImmunoResearch”, 111-035-144).

Результаты вестерн-блоттинга визуализировали, сигнал количественно оценивали с использованием системы визуализации ChemiDoc MP (“Bio-Rad”, США) с помощью программного обеспечения Bio-Rad Image Lab. Все измерения проводили не менее, чем в трех повторностях и рассчитывали средние значения.

Клеточный стресс. Гипоксия. Для изучения роли нокдауна Oct-1 в клеточном ответе на гипоксию или обработку химиотерапевтическими препаратами клетки Namalwa культивировали в 96-луночных планшетах (30000 клеток в лунке, пять повторностей) в полной среде ДМЕМ. Устойчивость к гипоксии определяли, используя культивирование клеток при 37°C и 0.5% O₂ (гипоксия) в течение 24 ч. Жизнеспособность клеток определяли с помощью CytoTox-Glo Cytotoxicity Assay (“Promega”, США). Рассчитывали содержание (%) мертвых клеток относительно общего числа клеток и средние значения. Устойчивость к химиотерапевтическим препаратам определяли, используя обработку доцетакселом (500 нг/мл), доксорубицином (500 нг/мл), туникамицином (2 мкг/мл) в течение 48 ч. Содержание (%) живых клеток определяли с помощью набора CellTiter 96(R) AQueous One Solution Assay (“Promega”) относительно контрольных необработанных клеток, которые культивировали в тех

же условиях, но без добавления химиотерапевтических препаратов.

Статистика. Сравнение экспериментальных групп проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Все данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (SD), рассчитанных на основании не менее трех независимых экспериментов. Различия считали статистически значимыми при *P* < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получены линии опухолевых клеток с пониженным уровнем экспрессии Oct-1 и его изоформ: убиквитарной Oct-1A и тканеспецифичной Oct-1L

Нами созданы конструкции shРНК для нокдауна отдельных изоформ, а также мРНК Oct-1. На основе лентивирусного вектора pGPV.ma4 получены четыре конструкции для синтеза shРНК. Конструкция (scram) – контрольная; конструкция (anti-POU) – shРНК для нокдауна мРНК всех изоформ Oct-1; конструкция (anti-A) – shРНК для нокдауна мРНК изоформы Oct-1A; конструкция (anti-L) – shРНК для нокдауна изоформы Oct-1L. Получены соответствующие лентивирусные стоки и проведена трансдукция клеток линий Namalwa. С помощью пуромидина проведена селекция, получены линии клеток со стабильным нокдауном тотального Oct-1 и его отдельных изоформ.

С помощью количественной ПЦР и Вестерн-блот-гибридизации показано специфическое для каждой конструкции подавление мРНК Oct-1 (тотального Oct-1, изоформы Oct-1A и Oct-1L).

Как видно из представленных результатов (рис. 1б), конструкции, трансдуцированные в клетки линии Namalwa, эффективно подавляют экспрессию как тотального белка Oct-1 (примерно в 6 раз), так и изоформ Oct-1A (в 9 раз) и Oct-1L (в 8 раз), при этом shРНК anti-Oct-1A избирательно и специфично подавляет экспрессию Oct-1A, тогда как shРНК anti-Oct-1L избирательно и специфично подавляет экспрессию Oct-1L. Поскольку в клетках Namalwa изоформа Oct-1L является основной, то при ее нокдауне количество тотального Oct-1 снижается в несколько раз сильнее, чем при нокдауне Oct-1A.

В последующих экспериментах мы оценивали влияние понижения уровня тотального Oct-1 и его изоформ Oct-1A и Oct-1L на пролиферацию клеток Namalwa, их устойчивость к гипоксии и химиотерапевтическим препаратам.

Нокдаун изоформы Oct-1L снижает скорость деления опухолевых клеток

Изменения скорости деления опухолевых клеток при нокдауне тотального белка Oct-1 и его

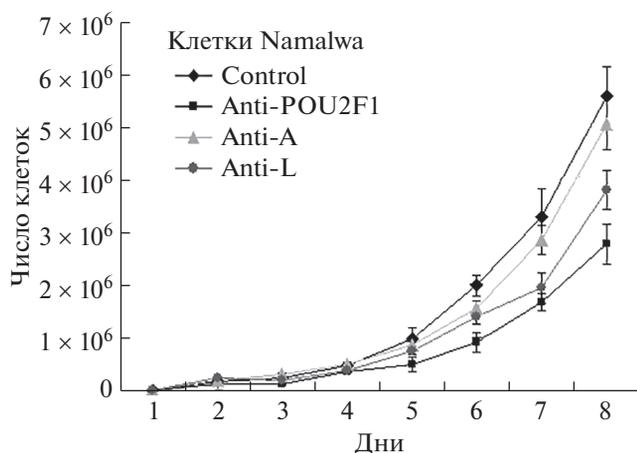


Рис. 2. Влияние подавления экспрессии Oct-1 и его отдельных изоформ на скорость деления клеток лимфомы Беркитта Namalwa. Клетки культивировали в полной среде ДМЕМ в 24-луночных планшетах в пяти повторах для каждой временной точки и каждой линии. Описание клеточных линий как на рис. 1. Каждый день забирали все клетки из лунки и подсчитывали их число. На графиках представлено среднее значение \pm SD, вычисленное по пяти независимым экспериментальным точкам.

изоформ Oct-1A и Oct-1L оценивали на линиях клеток Namalwa “anti-POU2F1”, Namalwa “anti-A”, Namalwa “anti-L” и Namalwa “control”. Нами показано, что подавление экспрессии Oct-1 в клетках Namalwa приводит к статистически значимому снижению скорости их деления. Максимальный эффект наблюдается при подавлении Oct-1 или изоформы Oct-1L, тогда как нокдаун Oct-1A почти не влияет на скорость деления клеток (рис. 2).

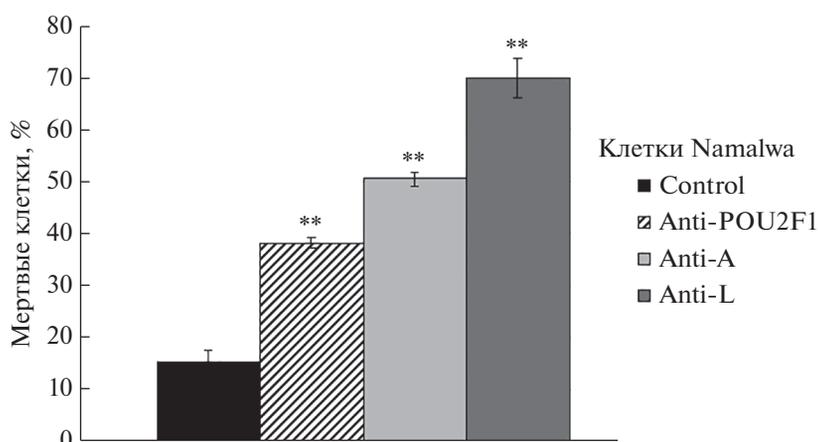


Рис. 3. Нокдаун как тотального Oct-1, так и его изоформ Oct-1A или Oct-1L понижает выживаемость клеток лимфомы Беркитта Namalwa при гипоксии. Гистограмма доли погибших клеток в условиях гипоксии (0.5% O₂ в течение 24 ч). Клеточные линии: Namalwa. Описание клеточных линий см. на рис. 1. Количество мертвых клеток определяли с помощью CytoTox-Glo Cytotoxicity Assay (“Promega”). На графиках представлено среднее значение \pm SD, вычисленное по пяти независимым экспериментам. С помощью *t*-тестов определяли существование значимых различий между средними значениями для контрольных клеток и клеток с нокдауном (***P* < 0.01).

Понижение экспрессии изоформ Oct-1 вызывает увеличение гибели клеток в условиях гипоксии

Опухолевые клетки адаптируются к гипоксии и приобретают более агрессивные терапевтически устойчивые фенотипы. После получения клеточных линий Namalwa с пониженной экспрессией тотального белка Oct-1 либо его изоформ Oct-1A или Oct-1L оценивали влияние подавления экспрессии Oct-1 на устойчивость раковых клеток к гипоксии. Клетки инкубировали в условиях “жесткой” гипоксии (0.5% O₂) в течение 24 ч, после чего определяли количество (%) погибших клеток методом CytoTox-GloAssay (“Promega”). Во всех полученных нами линиях с нокдауном Oct-1 в условиях гипоксии наблюдалось увеличение числа погибших клеток по сравнению с контрольной линией (рис. 3).

Результаты эксперимента показали, что понижение экспрессии Oct-1 в клетках лимфомы Беркитта приводит к значительному снижению устойчивости клеток к гипоксии. Особенно существенно гибели клеток способствовало подавление экспрессии изоформы Oct-1L.

Нокдаун изоформ Oct-1 увеличивает чувствительность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам

На следующем этапе мы провели *in vitro* анализ устойчивости опухолевых клеток В-клеточной лимфомы Namalwa к химиотерапевтическим препаратам при избирательном подавлении экспрессии тотального белка Oct-1 и его изоформ Oct-1A и Oct-1L.

Наши результаты показывают, что в клеточной линии лимфомы Беркитта Namalwa понижение

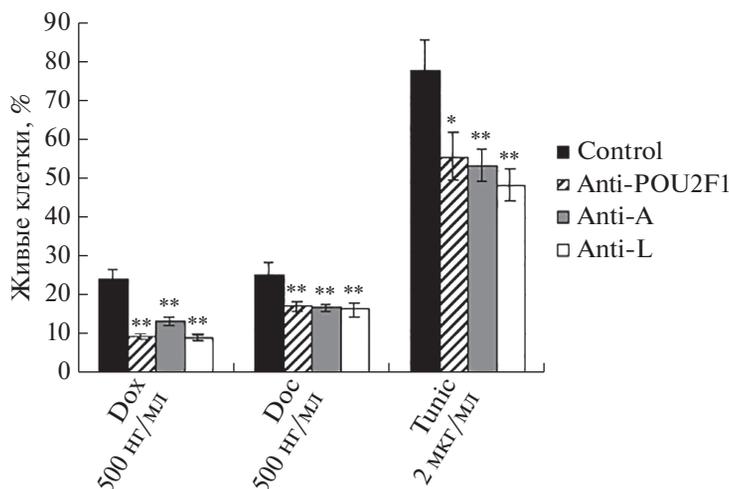


Рис. 4. Влияние подавления экспрессии Oct-1 и его отдельных изоформ на чувствительность клеток лимфомы Беркитта Namalwa к химиотерапевтическим препаратам. Клетки культивировали в полной среде ДМЕМ с указанными веществами в течение 48 ч. Количество (%) живых клеток подсчитывали с помощью набора CellTiter 96(R) AQueous One Solution Assay (“Promega”) относительно контрольных необработанных клеток, которые культивировали в тех же условиях, но без добавления токсических веществ. Dox – Доксорубин, Doc – доцетаксел, Tunic – туникамицин. На графиках представлено среднее значение \pm SD, вычисленное для пяти независимых точек. Статистическую значимость различий между средними значениями для контрольных и обработанных клеток (* $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$) оценивали с помощью *t*-тестов.

экспрессии Oct-1 или его отдельных изоформ приводит к усилению химиотерапевтического действия лекарственных веществ и цитотоксических препаратов (доцетаксел, доксорубин, туникамицин). Эти вещества воздействуют на разные системы клетки, механизмы их действия принципиально различаются, однако понижение уровня Oct-1 приводит к снижению защиты клеток Namalwa от повреждающего действия всех трех веществ (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Повышение уровня фактора транскрипции Oct-1 в различных злокачественных новообразованиях сделало этот фактор одним из ключевых маркеров неблагоприятного течения опухолевого процесса. Однако несмотря на то, что этот белок можно рассматривать как потенциальную лекарственную мишень, ни одно лекарство, нацеленное на POU2F1 (Oct-1), еще не разработано, что обусловлено чрезвычайной структурной и функциональной гибкостью Oct-1 и существованием альтернативных промоторов в его гене [4, 29]. Кроме того, Oct-1 – убиквитарный белок, который экспрессируется во всех клетках организма и необходим для нормальной жизнедеятельности клеток. Полное подавление этого фактора может привести к нежелательным последствиям для организма. На модельной системе острого миелобластного лейкоза у мышей с одновременным нокаутом *POU2F1* (*Oct-1*) показано, что потеря одного аллеля *POU2F1* (*Oct-1*), т.е. уменьшение в 2 раза количества белка Oct-1 в клетке, значительно задерживает развитие лейкоза, а делеция

обоих аллелей гена *Oct-1* полностью защищает мышей от лейкоза, но приводит к недостаточности костного мозга и гибели животных [25].

В этой работе нами разработана модельная система избирательного подавления отдельных изоформ Oct-1. Оценено влияние подавления отдельных изоформ Oct-1 на снижение злокачественного фенотипа В-клеточной лимфобластомы линии Namalwa. Показано, что понижение уровня лимфоцитспецифической изоформы Oct-1L при сохранении неизменного уровня экспрессии Oct-1A может быть значимым для снижения агрессивности этих опухолевых клеток: мы наблюдали снижение скорости деления, значительный рост гибели клеток в условиях гипоксии, а также повышение их чувствительности к химиотерапевтическим препаратам.

Использование каждой из трех конструкций для нокдауна приводит к трем разным вариантам изменения соотношения изоформ Oct-1 в клетках Namalwa. Из результатов экспериментов мы видим, что во всех трех случаях наблюдается общая тенденция изменений клеточной пролиферации, ответа на гипоксию и ответа на химиотерапевтические препараты. Однако соотношение изоформ Oct-1 специфически влияет на каждый из трех процессов (пролиферацию, ответ на гипоксию, ответ на химические вещества).

Ранее мы показали, что регуляторное взаимодействие между изоформами Oct-1 способствует нормальному гемопоэзу, а дисбаланс изоформ коррелирует с злокачественной трансформацией В-клеток [3]. Так, например, при дифференцировке гемопоэтических клеток значительно изменя-

ются уровни экспрессии отдельных изоформ, тогда как изменение количества тотального Oct-1 выражено не столь существенно [3]. Это связано с тем, что изменение состава и относительных соотношений изоформ Oct-1 приводит к изменению паттернов экспрессии генов-мишеней, регулируемых Oct-1 [3, 4], и способствует регуляции дифференцировки и клеточного ответа на стресс. Таким образом, в ответе клетки на внешние воздействия важную роль играет не только общее количество Oct-1, но и количественное соотношение изоформ Oct-1. Этот вывод подтверждается результатами нашей работы.

Oct-1 имеет важное значение для регуляции ранних стадий дифференцировки В-клеток и Т-клеток [3, 4, 30–32]. Ранее мы показали, что сверхэкспрессия тканеспецифических изоформ Oct-1 в клетках Namalwa приводит к репрессии многих генов, участвующих в дифференцировке В- и Т-лимфоцитов, а также клеток моноцитарного ряда [12, 13]. Тканеспецифические изоформы Oct-1 регулируют гены, направляющие дифференцировку клеток-предшественников по пути В-клеток, но они же предотвращают терминальную дифференцировку В-клеток [3, 4, 30]. Например, они подавляют транскрипцию гена рецептора В-клеточного антигена (BCR), активность которого важна для нормальной дифференцировки В-клеток. Они также репрессируют гены, участвующие в путях передачи сигнала, и отвечают за ответ клетки на хемокин-опосредованный сигнальный путь и рецепторные сигналы цитокин-цитокин, участвуют в репрессии сигнальных путей IFN (тип I) и IFN γ (тип II), которые важны для дифференцировки клеток иммунной системы [3, 4]. Уровень экспрессии тканеспецифической изоформы Oct-1L, но не других изоформ Oct-1, значительно повышен в В-клеточных лимфоцитах Namalwa и Raji и в Т-клеточной лимфоцитарной линии Jurkat по сравнению с нормальными В- и Т-клетками. Вероятно, aberrantная экспрессия тканеспецифических изоформ Oct-1 играет важную роль в остановке дифференцировки В- и Т-клеток на ранних стадиях, способствуя их злокачественной трансформации. Можно предположить, что, хотя Oct-1L необходим для поддержания пула В-клеток на определенном этапе дифференцировки в нормальных условиях, чрезмерное повышение уровня Oct-1L приводит к снижению чувствительности дифференцирующихся лимфоцитов к регуляторным сигналам, которые должны подавлять пролиферацию и индуцировать дифференцировку.

Наши результаты показывают, что при использовании Oct-1 в качестве терапевтической мишени следует иметь в виду, что Oct-1 присутствует в клетках человека не в виде отдельного белка, но как целое семейство функционально различных изоформ [3, 4], и для снижения злокачественного потенциала опухолевых В-лимфоцитарных клеток можно

использовать подавление экспрессии тканеспецифической изоформы Oct-1L, но не других изоформ Oct-1. О важности поставленной задачи свидетельствует сверхэкспрессия и проонкогенные свойства Oct-1 при лимфоме Ходжкина, диффузной В-крупноклеточной лимфоме, лимфоме Беркитта, лимфоме тимуса, острым миелоидном лейкозе. В частности, Oct-1 — это один из основных факторов транскрипции в патогенезе и прогнозе диффузной В-крупноклеточной лимфомы. Диффузная В-крупноклеточная лимфома является основным подтипом неходжкинской лимфомы [26], она составляет почти 50% всех неходжкинских лимфом. Меньше половины всех взрослых пациентов с неходжкинскими лимфомами излечиваются, а высокий уровень экспрессии Oct-1 коррелирует с неблагоприятным прогнозом и низкой выживаемостью пациентов [26].

Разработка способов избирательного подавления изоформ Oct-1 рассматривается как перспективная стратегия терапии опухолей лимфоидного ряда, применение которой, по-видимому, будет способствовать облегчению течения болезни и повышению выживаемости пациентов.

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

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. Сытина Е.В., Панкратова Е.В. (2003) Фактор транскрипции Oct-1 — пластичность и полифункциональность. *Молекуляр. биология*. **37**, 755–767.
2. Shakya A., Goren A., Shalek A., German C.N., Snook J., Kuchroo V.K., Yosef N., Chan R.C., Regev A., Williams M.A., Tantin D. (2015) Oct1 and OCA-B are selectively required for CD4 memory T cell function. *J. Exp. Med.* **212**, 2115–2131.
3. Pankratova E.V., Stepchenko A.G., Krylova I.D., Portseva T.N., Georgieva S.G. (2018) The regulatory interplay between Oct-1 isoforms contributes to hematopoiesis and the isoforms imbalance correlates with a malignant transformation of B cells. *Oncotarget*. **9**, 29892–29905.
4. Pankratova E.V., Stepchenko A.G., Portseva T., Mogila V.A., Georgieva S.G. (2016) Different N-terminal isoforms of Oct-1 control expression of distinct sets of genes and their high levels in Namalwa Burkitt's lymphoma cells affect a wide range of cellular processes. *Nucl. Acids Res.* **44**, 9218–9230.
5. Maddox J., Shakya A., South S., Shelton D., Andersen J.N., Chidester S., Kang J., Gligorich K.M., Jones D.A., Spangrude G.J., Welm B.E., Tantin D. (2012) Transcription factor Oct1 is a somatic and cancer stem cell determinant. *PLoS Genet.* **8**, e1003048.
6. Wang P., Jin T. (2010) Oct-1 functions as a sensor for metabolic and stress signals. *Islets*. **2**, 46–48.

7. Qian J., Kong X., Deng N., Tan P., Chen H., Wang J., Li Z., Hu Y., Zou W., Xu J., Fang J.-Y. (2015) OCT1 is a determinant of synbindin-related ERK signalling with independent prognostic significance in gastric cancer. *Gut*. **64**, 37–48.
8. Almeida R., Almeida J., Shoshkes M., Mendes N., Mesquita P., Silva E., Van Seuning I., Reis C.A., Santos-Silva F., David L. (2005) OCT-1 is over-expressed in intestinal metaplasia and intestinal gastric carcinomas and binds to, but does not transactivate, CDX2 in gastric cells. *J. Pathol.* **207**, 396–401.
9. Jeong S.H., Lee Y.J., Cho B.I., Ha W.-S., Choi S.-K., Jung E.-J., Ju Y.-T., Jeong C.-Y., Ko G.H., Yoo J., Hong S.-C. (2014) OCT-1 overexpression is associated with poor prognosis in patients with well-differentiated gastric cancer. *Tumour Biol.* **35**, 5501–5509.
10. Obinata D., Takayama K., Urano T., Murata T., Kumagai J., Fujimura T., Ikeda K., Horie-Inoue K., Homma Y., Ouchi Y., Takahashi S., Inoue S. (2012) Oct1 regulates cell growth of LNCaP cells and is a prognostic factor for prostate cancer. *Int. J. Cancer.* **130**, 1021–1028.
11. Xiao S., Liao S., Zhou Y., Jiang B., Li Y., Xue M. (2014) High expression of octamer transcription factor 1 in cervical cancer. *Oncol Lett.* **7**, 1889–1894.
12. Kuzmanov A., Johansen P., Hofbauer G. (2020) FBXO25 promotes cutaneous squamous cell carcinoma growth and metastasis through cyclin D1. *J. Invest. Dermatol.* **140**, 2496–2504.
13. Wang Y.P., Song G.H., Chen J., Xiao C., Li C., Zhong L., Sun X., Wang Z.-W., Deng G.-L., Yu F.-D., Xue Y.-M., Tang H.-M., Peng Z.-H., Wang X.-L. (2016) Elevated OCT1 participates in colon tumorigenesis and independently predicts poor prognoses of colorectal cancer patients. *Tumour Biol.* **37**, 3247–3255.
14. Hwang-Verslues W.W., Chang P.H., Jeng Y.M., Kuo W.-H., Chiang P.-H., Chang Y.-C., Hsieh T.-H., Su F.-Y., Lin L.-C., Abbondante S., Yang C.-Y., Hsu H.-M., Yu J.-C., Chang K.-J., Shew J.-Y., Lee E.Y.-H.P., Lee W.-H. (2013) Loss of corepressor PER2 under hypoxia up-regulates OCT1-mediated EMT gene expression and enhances tumor malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 12331–12336.
15. Sharpe D.J., Orr K.S., Moran M., White S.J., McQuaid S., Lappin T.R., Thompson A., James J.A. (2014) POU2F1 activity regulates HOXD10 and HOXD11 promoting a proliferative and invasive phenotype in head and neck cancer. *Oncotarget.* **5**, 8803–8815.
16. Luchina N.N., Krivega I.V., Pankratova E.V. (2003) Human Oct-1L isoform has tissue-specific expression pattern similar to Oct-2. *Immunol. Lett.* **85**, 237–241.
17. Stepchenko A.G., Portseva T.N., Glukhov I.A., Kotonova A.P., Georgieva S.G., Pankratova E.V. (2021) Primate-specific stress-induced transcription factor POU2F1Z protects human neuronal cells from stress. *Sci. Rep.* **11**, 18808.
18. Stepchenko A.G., Lyanova B.M., Krylova I.D., Ilyin Y.V., Georgieva S.G., Pankratova E.V. (2018) Differentiation of monocytic cells is accompanied by a change in the expression of the set of Oct-1 isoforms. *Dokl. Biochem. Biophys.* **483**, 306–308.
19. Stepchenko A.G. (1992) The nucleotide sequence of mouse OCT-1 cDNA. *Nucl. Acids Res.* **20**, 1419.
20. Pankratova E.V., Deyev I.E., Zhenilo S.V., Polanovsky O.L. (2001) Tissue-specific isoforms of the ubiquitous transcription factor Oct-1. *Mol. Genet. Genomics.* **266**, 239–245.
21. Панкратова Е.В., Порцева Т.Н., Макарова А.А., Льянова Б.М., Георгиева С.Г., Степченко А.Г. (2021) POU2F1(Oct-1) разнонаправленно участвует в ауторегуляции альтернативных промоторов за счет связывания с различными регуляторными участками гена POU2F1. *Молекуляр. биология.* **55**, 972–981.
22. Крылова И.Д., Порцева Т.Н., Георгиева С.Г., Степченко А.Г., Панкратова Е.В. (2013) Новая изоформа мРНК фактора транскрипции Oct-1 транскрибируется с альтернативного промотора. *Молекуляр. биология.* **47**, 634–641.
23. Степченко А.Г., Георгиева С.Г., Панкратова Е.В. (2019) Множественный характер взаимодействия транскрипционного фактора Oct-1 (POU2F1) с последовательностями PORE и MORE. *Молекуляр. биология.* **53**, 430–435.
24. Pankratova E., Sytina E., Polanovsky O. (2006) Autoregulation of Oct-1 gene expression is mediated by two octasites in alternative promoter. *Biochimie.* **88**, 1323–1329.
25. Stepchenko A.G., Pankratova E.V., Doronin S.A., Gulag P.V., Georgieva S.G. (2011) The alternative protein isoform NK2B, encoded by the vnd/NK-2 proneural gene, directly activates transcription and is expressed following the start of cells differentiation. *Nucl. Acids Res.* **39**, 5401–5411.
26. García-Cosío M., Santón A., Martín P., Camarasa N., Montalbán C., García J.F., Bellas C. (2004) Analysis of transcription factor OCT.1, OCT.2 and BOB.1 expression using tissue arrays in classical Hodgkin's lymphoma. *Mod. Pathol.* **17**, 1531–1538.
27. Jafek J.L., Shakya A., Tai P.Y., Ibarra A., Kim H., Maddox J., Chumley J., Spangrude G.J., Miles R.R., Kelley T.W., Tantin D. (2019) Transcription factor Oct1 protects against hematopoietic stress and promotes acute myeloid leukemia. *Exp. Hematol.* **76**, 38–48.e2.
28. Gouveia G.R., Ferreira S.C., Siqueira S.A.C., de Pádua Covas Lage L.A., Hallack Neto A.E., de Oliveira Costa R., Pereira J. (2020) Overexpression of OCT-1 gene is a biomarker of adverse prognosis for diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): data from a retrospective cohort of 77 Brazilian patients. *BMC Cancer.* **20**, 1041.
29. Dey A., Sen S., Uversky V.N., Maulik U. (2021) Structural facets of POU2F1 in light of the functional annotations and sequence-structure patterns. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **39**, 1093–1105.
30. Matthias P. (1998) Lymphoid-specific transcription mediated by the conserved octamer site: who is doing what? *Semin. Immunol.* **10**, 155–163.
31. Kim E.C., Edmonston C.R., Wu X., Schaffer A., Casali P. (2004) The HoxC4 homeodomain protein mediates activation of the immunoglobulin heavy chain 3' hs1,2 enhancer in human B cells. Relevance to class switch DNA recombination. *J. Biol. Chem.* **279**, 42258–42269.
32. Hwang S.S., Kim L.K., Lee G.R., Flavell R.A. (2016) Role of OCT-1 and partner proteins in T cell differentiation. *Biochim Biophys Acta.* **1859**, 825–831.

REDUCED EXPRESSION OF TISSUE-SPECIFIC ISOFORM OCT-1L PROVIDES ANTITUMOR EFFECT IN NAMALWA BURKITT'S LYMPHOMA CELLS

T. N. Portseva¹, A. P. Kotnova¹, E. V. Bulavkina¹, A. A. Makarova¹, S. G. Georgieva¹, A. G. Stepchenko¹, and E. V. Pankratova¹, *

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

*e-mail: pank@eimb.ru

An increased level of expression of the transcription factor Oct-1 is one of the key markers of an unfavorable course of carcinogenesis. In addition to the ubiquitous isoform Oct-1A, which is expressed in all cells of the body, there is a tissue-specific isoform Oct-1L, which is expressed in hematopoietic cells. In addition to increasing resistance to various types of stress, Oct-1L regulates genes responsible for the differentiation of hematopoietic cells and cells of the immune system. The expression level of the tissue-specific isoform Oct-1L is significantly increased in B-cell lymphoblastomas Namalwa and Raji and in T-cell lymphoblastoma Jurkat compared to normal B and T cells. Probably, aberrant overexpression of Oct-1L leads not only to an increase in stress resistance of cells, but also to disorganization of their developmental pathways, contributing to their malignant transformation. In this work, we showed that targeted suppression of the expression of tissue-specific isoform Oct-1L reduces the proliferation of B-lymphoblastic Burkitt's lymphoma cells Namalwa, causes a significant increase in their death under hypoxic conditions, and also increases their sensitivity to chemotherapeutic drugs – docetaxel and doxorubicin. The results obtained indicate the promise of targeted therapy aimed at suppressing individual isoforms, the level of expression of which is increased in the tumor cell, rather than suppressing total Oct-1, which will make it possible to avoid the traumatic effect of complete knockdown of Oct-1. The development of methods for the selective suppression of Oct-1 isoforms is a promising strategy in the treatment of lymphoid tumors and, apparently, will facilitate the course of the disease and patient survival.

Keywords: transcription factor POU2F1 (Oct-1), alternative promoters, tissue-specific isoforms, carcinogenesis, lymphoblasts

УДК 577.21

ЭФФЕКТИВНАЯ ВИРУСНАЯ ДОСТАВКА В НЕЙРОНАЛЬНУЮ КУЛЬТУРУ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ И ГЕННОЙ ТЕРАПИИ GNAO1-ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

© 2022 г. Е. А. Лунев^{a, b, c}, А. А. Шмидт^a, С. Г. Васильева^a, И. М. Савченко^a, В. А. Логинов^a, В. И. Марина^b, Т. В. Егорова^a, М. В. Бардина^{a, b, c, *}

^aИнститут биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

^bООО “Марлин Биотех”, Сочи, 354340 Россия

^cЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*e-mail: maryana.bardina@gmail.com

Поступила в редакцию 31.01.2022 г.

После доработки 25.02.2022 г.

Принята к публикации 28.02.2022 г.

GNAO1-энцефалопатия – орфанное генетическое заболевание, которое характеризуется ранней младенческой эпилепсией, нарушением контроля над движениями и серьезной задержкой развития. Заболевание вызывается мутациями в гене *GNAO1*, приводящими к нарушению функций кодируемого этим геном белка Gαo1. Методы лечения GNAO1-энцефалопатии отсутствуют, а симптоматическая терапия неэффективна. Фенотипическая гетерогенность заболевания указывает на необходимость персонализированного подхода к разработке терапии пациентов с конкретным патогенным вариантом *GNAO1*, что требует изучения механизма заболевания на животных и клеточных моделях. В настоящей работе разработан подход к созданию клеточных моделей GNAO1-энцефалопатии на первичной культуре нейронов здоровой мыши, а также к тестированию препаратов генной терапии *in vitro*. С этой целью нами оптимизирована доставка трансгенов в Gαo1-экспрессирующие клетки с помощью аденоассоциированных вирусов (ААВ). Оценен тропизм пяти нейротропных серотипов ААВ (1, 2, 6, 9, DJ) к Gαo1-позитивным нейронам в культуре из цельного мозга мыши. Самый высокий потенциал в качестве средства доставки репортера показал серотип DJ, который заражал до 66% целевых нейронов без выраженной цитотоксичности. ААВ-DJ также обеспечивал эффективную доставку и экспрессию генетических конструкций, кодирующих нормальную и мутантную форму Gαo1, а также коротких шпилечных РНК (shРНК) для супрессии эндогенного *Gnao1* в нейронах мыши. Полученные нами результаты позволят продвинуться в изучении механизма патогенеза клинических вариантов GNAO1-энцефалопатии, а также тестировать конструкции для генной терапии данного заболевания в клеточных моделях.

Ключевые слова: аденоассоциированные вирусы, орфанные заболевания, GNAO1-энцефалопатия, Gαo1, вирусная доставка, *in vitro* моделирование заболеваний человека, генная терапия, персонализированная медицина, первичная нейрональная культура, короткие шпилечные РНК

DOI: 10.31857/S0026898422040061

ВВЕДЕНИЕ

Использование технологий высокопроизводительного секвенирования позволило обнаружить связь между мутациями в гене *GNAO1* и орфанным неврологическим расстройством – GNAO1-энцефалопатией [1, 2]. Это генетическое заболевание проявляется в младенчестве и характеризуется эпилептической энцефалопатией (ОМIM 615473) и/или нарушением развития мозга с непроизвольными движениями (ОМIM 617493). Ген

GNAO1 экспрессируется преимущественно в головном мозге и кодирует белок Gαo1 [3, 4]. Функция белка Gαo1 слабо изучена, однако известно, что Gαo1 относится к семейству ингибиторных G-белков (Gi/o) и участвует в модуляции сигналинга в нейронах [5]. Описано 25 клинически значимых мутаций гена *GNAO1* [5], все они проявляются в гетерозиготном состоянии и возникают *de novo*.

Сокращения: ААВ – аденоассоциированные вирусы; ITR – Inverted terminal repeats (концевые инвертированные повторы); LOF – Loss-of-function (потеря функции); GOF – Gain-of-function (усиление функции); ГК – геномные копии.

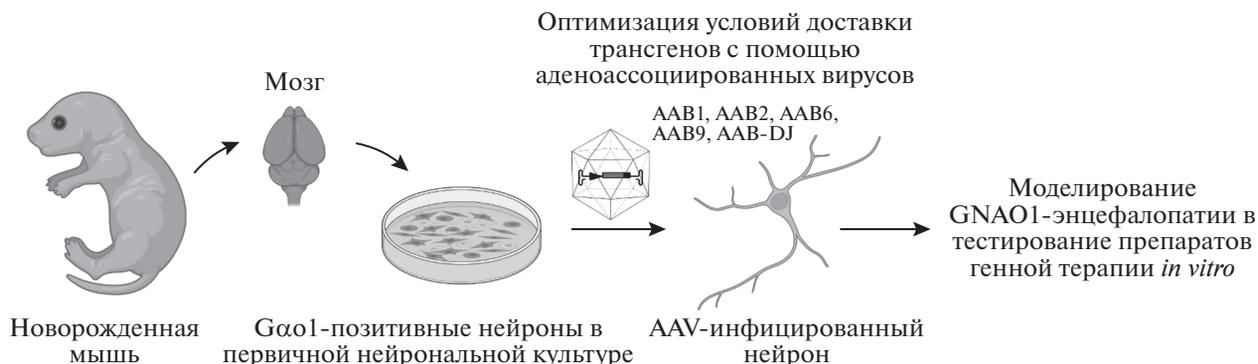


Рис. 1. Общая схема применения AAV-опосредованной доставки трансгенов в первичную культуру нейронов мыши для моделирования и тестирования препаратов генной терапии для GNAO1-энцефалопатии.

Способов лечения GNAO1-энцефалопатии не существует. Симптоматическая терапия включает антиконвульсанты и препараты для снятия гиперкинеза, однако они проявляют высокую эффективность не у всех пациентов [6, 7]. Ситуация осложняется фенотипической гетерогенностью заболевания, вызванной разным влиянием конкретных мутаций на функцию Gα1 и опосредованную им нейрональную передачу. Так, описана группа мутаций *GNAO1* (D174G, I279N, G40R), которые проявляются преимущественно младенческой эпилепсией; другая группа мутаций (E246K, R209H, R209C, R209G) приводит к нарушению двигательной активности [8–11]. Вероятно, эпилепсия развивается в результате мутаций, приводящих к дефициту белка Gα1 (так называемые LOF-мутации, от англ. *loss-of-function*), а двигательные нарушения, напротив, ассоциированы с мутациями, усиливающими функцию Gα1 (GOF-мутации, от англ. *gain-of-function*) [12]. Примечательно, что наиболее часто встречающийся вариант *GNAO1* с.607 G>A (p.G203R) приводит к развитию двойного фенотипа, т.е. у пациентов развиваются как эпилепсия, так и двигательные нарушения [13]. Фенотипическую гетерогенность необходимо принимать во внимание при подборе схемы терапии и применять персонализированный подход с учетом конкретного патогенного варианта *GNAO1* и молекулярного механизма заболевания.

Патогенез GNAO1-энцефалопатии и ее отдельных вариантов необходимо детально изучать на животных и клеточных моделях. Однако создание персонализированных животных моделей в случае таких ультраредких заболеваний, как GNAO1-энцефалопатия (около 200 случаев в мире по данным <https://gnao1.org/>), является трудозатратным, а материал для получения пациент-специфических нейронов не всегда доступен. Альтернативой клеточной модели GNAO1-энцефалопатии могут служить нейроны здоровых мышей с доставкой в них трансгенов с помощью рекомбинантных аденоассоциированных вирусов

(AAV) (рис. 1). AAV представляют собой эффективный инструмент для доставки генов в нейрональные клетки [14, 15]. Разнообразие доступных природных, рекомбинантных и синтетических серотипов позволяет трансдуцировать разные субпопуляции нейронов [15–17]. Для создания модели GNAO1-энцефалопатии с LOF-мутациями можно доставлять в нейроны мыши короткие шпилечные РНК (shРНК). Специфичные shРНК будут подавлять экспрессию эндогенного *Gnao1* по механизму РНК-интерференции, воспроизводя дефицит нормального белка Gα1. Патологию GNAO1-энцефалопатии с GOF- или доминантно-негативными мутациями (нарушающими функцию нормального белка) можно смоделировать, доставляя с помощью нейротропных AAV белоккодирующую последовательность мутантного гена.

Рекомбинантные AAV часто используются в качестве векторов при разработке генотерапевтических препаратов [18]. Высокая способность к трансдукции нейронов, низкая токсичность и иммуногенность позволяют использовать рекомбинантные AAV в генной терапии заболеваний центральной нервной системы [19]. Генная терапия потенциально применима для коррекции GNAO1-энцефалопатии. Так, пациентам с LOF-мутациями подходит заместительная генная терапия с AAV-опосредованной доставкой функциональной копии гена *GNAO1* для восполнения дефицита белка Gα1. В случае доминантно-негативных и GOF-мутаций можно применить аллель-селективное подавление экспрессии мутантного аллеля или подавление обоих аллелей в комбинации с доставкой нормального гена [20]. Кроме того, AAV могут обеспечить доставку современных инструментов для редактирования нуклеиновых кислот независимо от типа мутации [21]. Первичное тестирование AAV-векторов можно проводить на первичной культуре нейронов мыши (рис. 1).

В настоящей работе мы оптимизировали AAV-опосредованную доставку трансгенов в нейроны мыши *in vitro* для моделирования GNAO1-энце-

фалопатии и скрининга препаратов для генной терапии. На первом этапе мы получили из мозга мышей первичную культуру $G\alpha 1$ -экспрессирующих нейронов. Далее охарактеризовали AAB пяти нейротропных серотипов (1, 2, 6, 9, DJ) с репортерным геном и показали, что AAB-DJ обладает наибольшим тропизмом к $G\alpha 1$ -положительным нейронам при отсутствии выраженной цитотоксичности. Кроме того, нами показано, что AAB-DJ обеспечивает эффективную доставку трансгенного *GNAO1* дикого типа и с мутацией G203R, а также shPHK для супрессии эндогенного *Gnao1* в нейрональной культуре мыши.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. Мыши линии CD-1 получены из разведения питомника “Столбовая”, Филиала Научного центра биомедицинских технологий ФМБА. Экспериментальные протоколы одобрены этической комиссией Института биологии гена РАН.

Пациенты. От родителей пациента с вариантом *GNAO1* с.607 G>A получено письменное информированное согласие на проведение биопсии и участие в научных исследованиях.

Клонирование плазмидных конструкций. pAAV-GNAO1-wt-мус и pAAV-GNAO1-G203R-flag. Биоптат кожи пациента с GNAO1-энцефалопатией, вызванной гетерозиготным вариантом *GNAO1* с.607 G>A, предоставлен НИКИ педиатрии им. Ю.Е. Вельтишева. Фибробласты кожи пациента использовали для амплификации белоккодирующей последовательности гена *GNAO1* (CCDS10756.1) дикого типа и с мутацией с.607 G>A (G203R). Ампликоны (1065 п.н.) получали в ПЦР с парой праймеров (5'-ATGGGATGТАCTCTGAGCGCA-3' и 5'-TCAGTACAAGCCGСAGCCC-3') и клонировали в коммерческий вектор pEGFP-C1 (“Clontech”, США) вместо EGFP безлигазным методом. Для этого вектор линейаризовали в ПЦР с праймерами 5'-GGCTGCGGCTTG-TACTGATCCGGACTCAGATCTCGAGCTCAA-3' и 5'-GCGCTCAGAGTACATCCCATGGTGCGC-GACCGGTAGCG-3', сборку проводили на основе перекрывания концевых последовательностей ампликонов с использованием T4 ДНК-полимеразы (“SibEnzyme”, Россия, E339). Полученные плазмиды обозначены pGNAO1 и pGNAO1-G203R.

На следующем этапе CDS *GNAO1* и *GNAO1-G203R* встроили в вектор pAAV-eGFP вместо eGFP с добавлением на С-конец эпитопов мус и flag соответственно (pAAV-GNAO1-wt-мус и pAAV-GNAO1-G203R-flag). С этой целью GNAO1-wt-мус синтезировали на матрице pGNAO1 с использованием пары праймеров GNAO1_F (5'-GAAGTCACCATGGGATGТАCTCTGAGCGCA-GAGGAG-3') и Mус_R (5'-GATCCTCTTCT-GAGATGAGTTTTTGTTCGTACAAGCCGСAG-

CCCCGGA-3'), вектор pAAV-eGFP готовили для вставки путем амплификации с праймерами GNAO1_R (5'-GTACATCCCATGGTGACTTCTTT-TTTGCTTTAGCAGGCTCTTTC-3') и Mус_F (5'-AAACTCATCTCAGAAAGAGGATCTGТААТА-ATAACCGGGCAGGCCATGTCT-3'). Вставки GNAO1-G203R-flag синтезировали на матрице pGNAO1-G203R с праймерами GNAO1_F и Flag_R (5'-CTTGTCTGTCATCGTCTTTGTAGTC-GTACAAGCCGСAGCCCCGGA-3'), вектор готовили с праймерами GNAO1_R и Flag_F (5'-CAAAGACGATGACGACAAGТААТАААССG-GGCAGGCCATGTCT-3'). Сборку проводили методом безлигазного клонирования, как описано выше.

Конструкции с shPHK. shPHK для подавления эндогенного транскрипта *Gnao1* (NM_010308.3) подобраны с помощью интернет-портала Genetic Perturbation Platform (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/seq/search>). Из 13 предсказанных shPHK выбрали три перспективные с высоким рейтингом (intrinsic score) для таргетных последовательностей: TRCN0000036487 (5'-CGCTCACCCAA-CAAAGAAATA-3'), TRCN0000097757 (5'-CGCT-CACCCAAACAAGAAATT-3'); TRCN0000097756 (5'-CGAATAATATCCAGGTGGTAT-3'), далее shGnao1/1, shGnao1/2 и shGnao1/3 соответственно. Плазмида pLKO.1-shGnao1/1 приобретена в составе набора TRC Lentiviral Human Gnao1 shRNA (“Dharmacon”, США, RHS4533-EG2775). shGnao1/2, shGnao1/3, а также shEGFP (таргетная последовательность 5'-ТАСААСAGCCACAAC-GTCTAT-3') были клонированы в вектор pLKO.1 (Addgene plasmid #10878) [22], любезно предоставленный David Root, по протоколу сайта Addgene [23] с изменениями. Вставки клонировали с использованием пары одноцепочечных олигонуклеотидов (“Евроген”, Россия) с таргетными последовательностями. Пару олигонуклеотидов отжигали в буфере NEBuffer 2 (B7002S) для получения дуплекса с липкими концами для AgeI и EcoRI и фосфорилировали T4-полинуклеотидкиназой (“Sibenzyme”). Вектор линейаризовали и одновременно дефосфорилировали, обрабатывая рестриктазами EcoRI и AgeI (“SibEnzyme”) и щелочной фосфатазой FastAP (“ThermoFisher”, США) в буфере SE Orange (“SibEnzyme”) в течение 2 ч при 37°C, затем выделяли из 0.6%-ного агарозного геля. Лигирование проводили с помощью T4-ДНК-лигазы (“ThermoFisher Scientific”). Все полученные конструкции имели одинаковый дизайн shPHK (стебель 21 п.н. и шестинуклеотидная петля с сайтом рестрикции XhoI) и отличались только таргетными последовательностями. Контрольный вектор pLKO.1-shSCR с нетаргетирующей shPHK любезно предоставлен David Sabatini (Addgene plasmid, #1864).

После функциональной проверки экспрессионные кассеты из pLKO.1-shGnao1/1 и pLKO.1-

shSCR, содержащие U6-промотор, shPHK и терминатор, клонировали в вектор pAAV-eGFP между 5'-ITR и CMV-промотором. Для этого экспрессионную кассету и вектор pAAV-eGFP амплифицировали с помощью пар праймеров (соответственно 5'-GGAGTTCGGAACGTCTGCCCCCTTACCGAGG-3', 5'-CGTTGGCTGC-GAGTGATGACGAGCCATTTGTCTCGAGGTC-GAGAATTCAAAA-3' и 5'-CACTCGCAGCCAAC-GACGCGGGCAGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGT-3', 5'-CAGACGTTCCGGAACCTCCATATATGGGCTATGAACTAATG-3'). Клонирование проводили с использованием набора NEBuilder HiFi DNA Assembly ("NEB", США, E5520S). Полученные векторы названы pAAV-shGnao1/1-eGFP и pAAV-shSCR-eGFP.

pMusGNAO1. Плазмиду с кодирующей областью *Gnao1* мыши (CCDS22532.1) создавали по такой же технологии, как и pGNAO1. CDS *Gnao1* амплифицировали из образцов мозга мыши с праймерами 5'-CGCTACCGGTCCGACCATGGGATGTACGCTGAGCGC-3' и 5'-TCAGT-TATCTAGATCCGGTGGATTTCAGTACAAGCCG-CAGCCC-3', вектор готовили с помощью праймеров 5'-ATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATATCA-3' и 5'-GGTGGCGACCGGTAGCG-3'.

Нуклеотидную последовательность векторов подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

Проверка плазмидных конструкций в НЕК293Т. Сверхэкспрессию трансгенов и скрининг shPHK для подавления *Gnao1* проводили в культуре клеток НЕК293Т (ATCC) путем трансфекции плазмид. Клетки культивировали в среде DMEM ("Gibco", 11995) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного скота ("BioSera", Франция, FB-1001/500) и пенициллина-стрептомицина ("ПанЭко", Россия, А063). В день трансфекции клетки снимали с подложки 0.05%-ным раствором трипсина, осаждали, ресуспендировали в среде DMEM и рассевали в 24-луночный планшет в количестве 350000 клеток на лунку. Плазмидную ДНК (250 нг), содержащую 2.5 нг pAAV-GNAO1 или смесь плазмид (2.5 нг pMus-Gnao1, 2.5 нг pEGFP-C1, 100 нг pLKO.1-shPHK), добавляли к раствору линейного полиэтиленimina (ЛПЭИ) ("Polysciences", США, 23966-1) в среде DMEM в массовом соотношении 1 : 4 (ДНК : ЛПЭИ). Трансфекционную смесь инкубировали в течение 20 мин и добавляли к клеткам. Через 72 ч после трансфекции клетки собирали и методом вестерн-блоттинга определяли в них содержание белка Gαo1.

Наработка и очистка вирусов. Рекомбинантные ААВ получали с помощью системы AAV Helper-Free System ("Agilent", США) в прикрепленной культуре НЕК293Т (ATCC) по ранее описанному протоколу [24]. Вирусы разных серотипов нарабатывали с использованием плазмидных кон-

струкций, кодирующих белки Rep и Cap, – pAAV-RC1 ("Cell Biolabs", США), pAAV-RC2 ("Agilent"), pAAV-RC6 ("Cell Biolabs"), pAAV-RC9 ("Penn Vector Core") и pAAV-DJ ("Cell Biolabs"). В качестве векторной плазмиды использовали pAAV-eGFP, а также pAAV-GNAO1-wt-мус, pAAV-GNAO1-G203R-flag, pAAV-shSCR-eGFP или pAAV-shGnao1/1-eGFP. Вирусные частицы ААВ очищали с помощью универсального для всех серотипов метода, основанного на центрифугировании в градиенте плотности йодиксанола [24, 25]. Методом количественной ПЦР контролировали титр вирусных частиц на стадиях продукции, очистки и конечного концентрированного препарата [24]. Отсутствие белковых примесей подтверждали окрашиванием Кумасси в полиакриламидном геле согласно стандартному протоколу (Coomassie Brilliant blue, G250, "Helicon", Россия).

Первичная нейрональная культура. Первичную нейрональную культуру получали из цельного головного мозга новорожденных мышей линии CD-1 согласно протоколу [26] с модификациями. Извлеченный головной мозг промывали в охлажденной среде DMEM ("Gibco"), содержащей 15 мМ HEPES, и измельчали скальпелем до однородной массы. Измельченную ткань обрабатывали 0.25% раствором трипсин-EDTA ("ПанЭко") с добавлением 10 нг/мкл ДНКазы I ("PanReac Aprilichem", Испания) при 37°C в течение 20 мин. Затем добавляли ингибитор трипсина ("ПанЭко", П071) и центрифугировали суспензию при 1000 г в течение 7 мин. Супернатант удаляли и ресуспендировали ткань в 10 мл HEPES-DMEM с последующим центрифугированием и удалением супернатанта. Промывку повторяли 2 раза, после чего клетки пропускали через клеточное сито с диаметром пор 70 мкм. Затем клетки центрифугировали при 1000 г в течение 5 мин и заменяли раствор на полную среду Neurobasal-A ("Gibco"), содержащую добавку B-27 ("Gibco") и 2 мМ аланил-глутамин ("ПанЭко"). Для проведения вестерн-блоттинга клетки высевали в 12-луночные планшеты, для анализа цитотоксичности – в 96-луночные. Для анализа методом иммунофлуоресценции клетки высевали в 6-луночные культуральные планшеты на покровные стекла размером 24 × 24 мм (Menzel coverslips). Поверхность планшетов и стекло предварительно покрывали поли-D-лизином ("Sigma-Aldrich", США). Клетки высевали при расчетной плотности ~100000 клеток/см² и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Изображения клеток получали на инвертированном микроскопе с фазовым контрастом Nikon Ti-E.

Вирусная трансдукция. Первичную нейрональную культуру заражали ААВ на 7-й день культивирования. К нейронам в полной нейробазальной среде добавляли очищенный препарат вируса

из расчета 1×10^5 геномных копий (ГК) на клетку. После заражения клетки инкубировали в течение еще 7 дней до анализа образцов.

Цитотоксичность. Выживаемость клеток после трансдукции препаратами ААВ оценивали с использованием реагента PrestoBlue™ Cell Viability Reagent (“Invitrogen”, США, A13261). В качестве контроля использовали незараженные клетки. Анализ проводили в 96-луночном культуральном планшете согласно инструкции производителя. После добавления реагента клетки инкубировали при 37°C в течение 1.5 ч. Определяли поглощение при длине волны 570 нм на планшетном ридере Clariostar Plus (“BMG Labtech”, Германия). Полученные значения нормировали по поглощению при 600 нм. Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения MARS (“BMG Labtech”).

Вестерн-блоттинг. Белковый экстракт клеток НЕК293Т готовили в буфере RLB (“Promega”, США, E397A) согласно инструкциям производителя. Первичные нейроны мыши лизировали в охлажденном буфере (50 мМ Трис-НСl рН 7.4, 150 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, 5 мМ EGTA, 1% Тритона X-100, 0.1% натрия дезоксихолата и 0.1% додецилсульфата натрия) [27] и осветляли центрифугированием при 17000 g в течение 5 мин при 4°C. Концентрацию белка в образцах измеряли с помощью реагента Quick Start Bradford 1× Dye Reagent (“Bio-Rad”, США, 5000205) на планшетном ридере Clariostar Plus (“BMG Labtech”). Белковый экстракт (5–10 мкг) в буфере Лэммли подвергали электрофорезу в денатурирующих условиях в 12%-ном полиакриламидном геле. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану, используя набор Trans-Blot Turbo RTA Transfer kit (“Bio-Rad”, 170-4270), на приборе Transfer-blot Turbo (“Bio-Rad”). Качество нанесения и эффективность переноса белков оценивали, окрашивая мембрану Ponceau S. Мембрану инкубировали с антителами кролика к Gαo1 мыши и человека (“Invitrogen”, PA5-30044; 1 : 5000), GFP (“Sigma”, США, G1544-100UG; 1 : 4500), βIII-тубулину (“Abcam”, Великобритания, ab18207; 1 : 1000), антителами мыши к тус-эпителию (“ThermoFisher Scientific”, MA1-980; 1 : 2000), GAPDH (G8795, “Sigma-Aldrich”; 1 : 20000) или антителами козы к flag-эпителию (“Abcam”, ab1257; 1 : 5000). Затем мембрану инкубировали с вторичными антителами, меченными пероксидазой хрена, против иммуноглобулинов кролика (“Bio-Rad”, Cat# 170-6515, 1 : 3000), мыши (“Bio-Rad”, Cat# 170-6516; 1 : 3000) или козы (“Invitrogen”, #81-1620; 1 : 3000). Сигнал детектировали с помощью набора Clarity Western ECL substrate (“BioRad”, #170-5060) на приборе iBright 1500 (“ThermoFisher”). Анализ изображений проводили в программе Fiji [28].

Количественная ПЦР. Суммарную РНК выделяли из инфицированных нейронов с помощью набора ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (“Promega”). Концентрацию РНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop™ 8000 и обрабатывали ДНКазой I (“NEB”, M0303). Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью набора MMLV RT kit (SK021, “Евроген”) с использованием смеси случайного (“Евроген”, SB002) и олиго(dT)15 (“Евроген”, SB001) праймеров в концентрации 1 мкМ каждый. Полученную кДНК разводили в 5 раз в воде без нуклеаз (“Евроген”, RB007). Экспериментальный образец (5 мкл) добавляли к 20 мкл ПЦР мастер-микса (“Синтол”, Россия, М-428), содержащего специфические (400 нМ) праймеры и зонды (200 нМ), 2% DMSO и дополнительно 3 мМ MgCl₂. *Gnao1* мыши детектировали с использованием праймеров 5'-ТАСТАССТ-GGACAGCCTGGA-3', 5'-GGATCCAТТСТТGC-GTTCA-3' и зонда 5'-ROX-CGTCGGGGCCAGC-BHQ2-3'. *Gapdh* детектировали с использованием праймеров 5'-GGAGAAACCTGCCAAGTATGA-3', 5'-TCCTCAGTGTAGCCCAAGA-3' и зонда 5'-VIC-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGCAT-BHQ1-3'. ПЦР в реальном времени проводили на приборе CFX96 Real-Time PCR Detection System (“Bio-Rad Laboratories”). Амплификацию проводили по следующей программе: денатурация при 94°C, 3 мин; далее 40 циклов – 94°C, 15 с и 60°C, 40 с; считывание флуоресцентного сигнала проводили в каналах VIC и ROX. Количество копий транскриптов *Gnao1* определяли по стандартной кривой ДНК-стандарта (плазмида pMusGnao1 с известной концентрацией) и нормировали по уровню *Gapdh*.

Иммунофлуоресценция. Клетки фиксировали на покровных стеклах в течение 30 мин при комнатной температуре в 4%-ном параформальдегиде (“Panreac AppliChem”, 141451.1211) с 2% сахарозы D(+) (“Panreac AppliChem”, 57-50-1) в фосфатно-солевом буфере (“ПанЭко”, В-60201) с последующей пермеабиллизацией в 0.2%-ном Тритоне X-100 (“Amresco”, США, Am-O694-1.0) в течение 10 мин при комнатной температуре. Для блокирования неспецифического связывания антител клетки инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в фосфатно-солевом буфере с 3% БСА (“ПанЭко”, РМ-Т1725.50) и 0.2% Тритон X-100.

Первичную культуру нейронов окрашивали поликлональными антителами кролика к βIII-тубулину (“Abcam” ab18207 1 : 300), GFAP (“Abcam” ab7260; 1 : 300) или Gαo1 (“Invitrogen”, PA5-30044; 1 : 300). В качестве вторичных антител использовали антитела козы против иммуноглобулинов кролика, меченные красителем Alexa Fluor 633 (“Invitrogen”, A 21072; 1 : 1000). Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst 33342 (“ThermoFisher Scientific”, H3570, 1 : 1000). Стекла с окрашенными

ми клетками покрывали средой для заключения (ProLong™ Glass Antifade Mountant, “ThermoFisher Scientific”, P3698). Изображения получали на инвертированном микроскопе Leica DM16000 одновременно по двум каналам (Alexa 405, Alexa 633).

Тропизм ААВ анализировали с использованием поликлональных антител кролика к $G\alpha 1$ (“Invitrogen”, PA5-30044; 1 : 300) и антител козы против иммуноглобулинов кролика, меченных красителем Alexa Fluor 633 (“Invitrogen”, A 21072; 1 : 1000). Ядра клеток контрастировали красителем Hoechst 33342 (“ThermoFisher Scientific”, H3570, 1 : 1000). Стекла помещали на предметные стекла в среду для заключения. Изображения получали на микроскопе THUNDER Imaging Systems (“Leica”) одновременно по трем каналам (Alexa 405, Alexa 488, Alexa 633). Для каждого образца отснято по 144 поля зрения.

Анализ колокализации. Для оценки тропизма ААВ разных серотипов определяли колокализацию трансгенного GFP с эндогенным $G\alpha 1$ мыши ($mG\alpha 1$). Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения CellProfiler 4.2.1 [29]. Для каждого изображения в трех каналах выполнена коррекция освещенности “CorrectIllumination” и удаление шума путем наложения фильтра Гаусса “GaussianFilter”. На первом этапе идентифицировали объекты в каждом из каналов. Синий канал — окраска ядер, зеленый канал — флуоресценция GFP, красный канал — окраска специфическими антителами к $G\alpha 1$. Путем сравнения слоев в синем и красном каналах определяли $G\alpha 1$ -позитивные клетки. В дальнейшем определяли позитивные клетки по двум каналам, сравнивая слои с $G\alpha 1$ - и GFP-позитивными клетками. Процент колокализации оценивали как отношение клеток, позитивных по двум каналам, к общему количеству $G\alpha 1$ -позитивных клеток. Проанализировано не менее 1800 $G\alpha 1$ -позитивных клеток каждого образца.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

G\alpha 1-богатая нейрональная культура

На первом этапе исследований перед нами стояла задача получения первичной нейрональной культуры мыши, богатой $G\alpha 1$ -позитивными клетками. Согласно опубликованным данным, ген *Gnao1* экспрессируется во всех отделах головного мозга грызунов, в том числе в коре больших полушарий, мозжечке, базальных ганглиях, обонятельной луковице [3, 30–32]. Для получения всего многообразия нейрональных клеток, в которых осуществляется $G\alpha 1$ -опосредованная передача сигнала, мы выделяли нейроны из цельного мозга новорожденных мышей, адаптировав ранее описанный протокол [26]. Качество нейронов оценивали через 7 дней после выделения в куль-

туру по морфологии клеток в фазовом контрасте (рис. 2а), а также методом вестерн-блоттинга (рис. 2б) и иммунофлуоресценции (рис. 2в–д). Окрашивание антителами к маркеру β III-тубулину показало, что культура состоит преимущественно из нейронов (рис. 2б, в), а антитела к маркеру GFAP (глиальный кислый фибриллярный белок) выявили лишь незначительное присутствие астроцитов (рис. 2г). В полученной первичной нейрональной культуре нами обнаружен существенный синтез белка $G\alpha 1$ мыши ($mG\alpha 1$), который детектировали с помощью специфических антител методами вестерн-блоттинга и иммунофлуоресценции (рис. 2б, д). Таким образом, выделение нейронов из цельного мозга новорожденных мышей позволило получить культуру нейронов, богатую $G\alpha 1$ -позитивными клетками. Эту культуру использовали в дальнейших экспериментах для вирусной доставки.

Тропизм серотипов ААВ к G\alpha 1-позитивным клеткам *in vitro*

На следующем этапе мы подобрали условия эффективной доставки трансгенов в $G\alpha 1$ -позитивные нейроны мыши *in vitro*. С этой целью использовали контрольный вирусный вектор с репортерным геном eGFP под конститутивным CMV-промотором (рис. 3а). Для упаковки вектора рAAV-eGFP использовали капсиды серотипов 1, 2, 6, 9 и DJ, охарактеризованных ранее как нейротропные в исследованиях *in vitro* и *in vivo* [15, 16]. Эффективность продукции вирусных частиц в клетках, а также потери в процессе очистки, контролировали методом кПЦР (рис. 3б). Средняя продукция вирусных частиц разных серотипов в неочищенном клеточном лизате различалась до 8 раз и составила 3.8×10^{10} (ААВ1), 1.8×10^{10} (ААВ2), 3.7×10^{10} (ААВ6), 1.6×10^{11} (ААВ9) и 1.1×10^{11} (ААВ-DJ) геномных копий (ГК) на cm^2 площади культуральной поверхности. Наиболее высокой была эффективность продукции серотипов ААВ9 и DJ, а самой низкой — серотипа 2, что согласуется с опубликованными данными [33]. Средний выход вирусных частиц разных серотипов после всех стадий очистки варьировал в диапазоне 15–27%. Наибольшая эффективность очистки наблюдалась для серотипов 6 и 9 (27 и 22% соответственно, табл. 1). Наибольшими были потери вирусного материала (до 85%) при очистке ААВ1 и ААВ2. Все препараты ААВ концентрировали до титра $\sim 2 \times 10^{13}$ ГК/мл.

Первичную культуру нейронов мыши заражали вирусными частицами ААВ-eGFP серотипов 1, 2, 6, 9 и DJ при множественности инфекции 10^5 ГК на клетку. Общую эффективность заражения первичной нейрональной культуры разными серотипами ААВ оценивали по уровню экспрессии

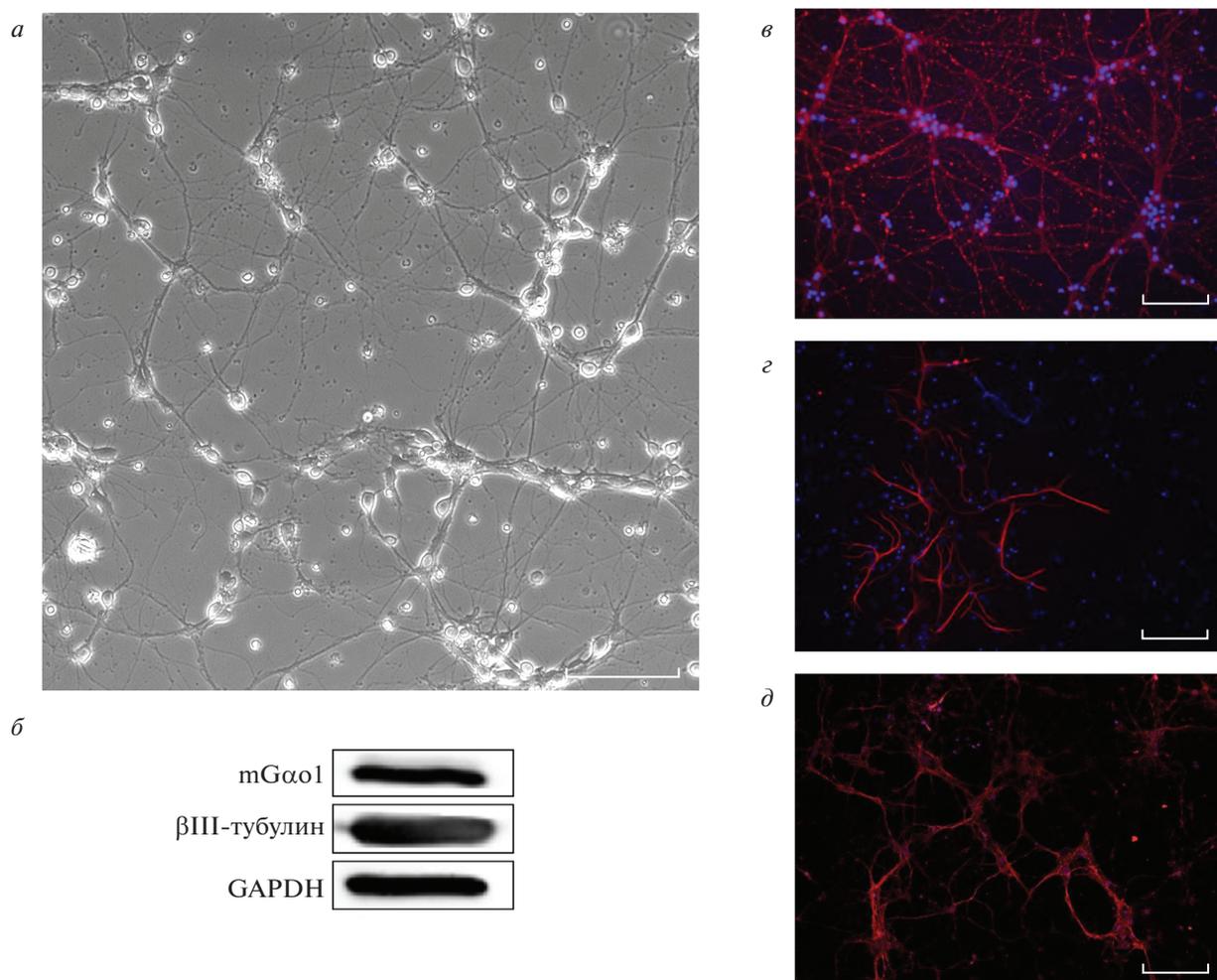


Рис. 2. Оценка качества клеток и экспрессии $G\alpha o1$ в первичной нейрональной культуре, полученной из цельного мозга мышей. *a* – Фазовый контраст; *b* – анализ экспрессии $mG\alpha o1$ и маркера нейронов βIII -тубулина методом вестерн-блоттинга; контроль нагрузки – GAPDH. Иммунофлуоресцентное окрашивание культуры нейронов мыши антителами к нейрональному маркеру βIII -тубулину (*c*), глиальному маркеру GFAP (*e*) и $mG\alpha o1$ (*d*). Окраска специфичными антителами показана красным, ядра контрастированы Hoechst 33342 (синий). На *c* и *d* показаны репрезентативные поля, на *e* показано поле с максимальным количеством GFAP-положительных клеток. Длина масштабного отрезка 100 мкм.

трансгена *eGFP* методом вестерн-блоттинга (рис. 3*в*, *г*). Установлено, что относительный уровень экспрессии *GFP* через 7 дней после трансдукции был выше в культурах, трансдуцированных серотипа-

ми 6 и DJ. Наименьшим уровень экспрессии трансгена был в культуре, трансдуцированной AAB9. Анализ выживаемости первичных нейронов не выявил значительных различий между

Таблица 1. Эффективность очистки вирусных частиц разных серотипов, кодирующих репортерный белок *eGFP*

Серотип AAB	Число независимых экспериментов, <i>n</i>	Средний выход*, %	Стандартное отклонение, %
AAB1	3	15	4
AAB2	4	15	8
AAB6	4	27	16
AAB9	6	22	2
AAB-DJ	4	19	15

* Выход вирусных частиц рассчитан как отношение общего количества ГК в очищенном препарате к общему количеству ГК в исходном клеточном лизате в каждом независимом эксперименте (*n*).

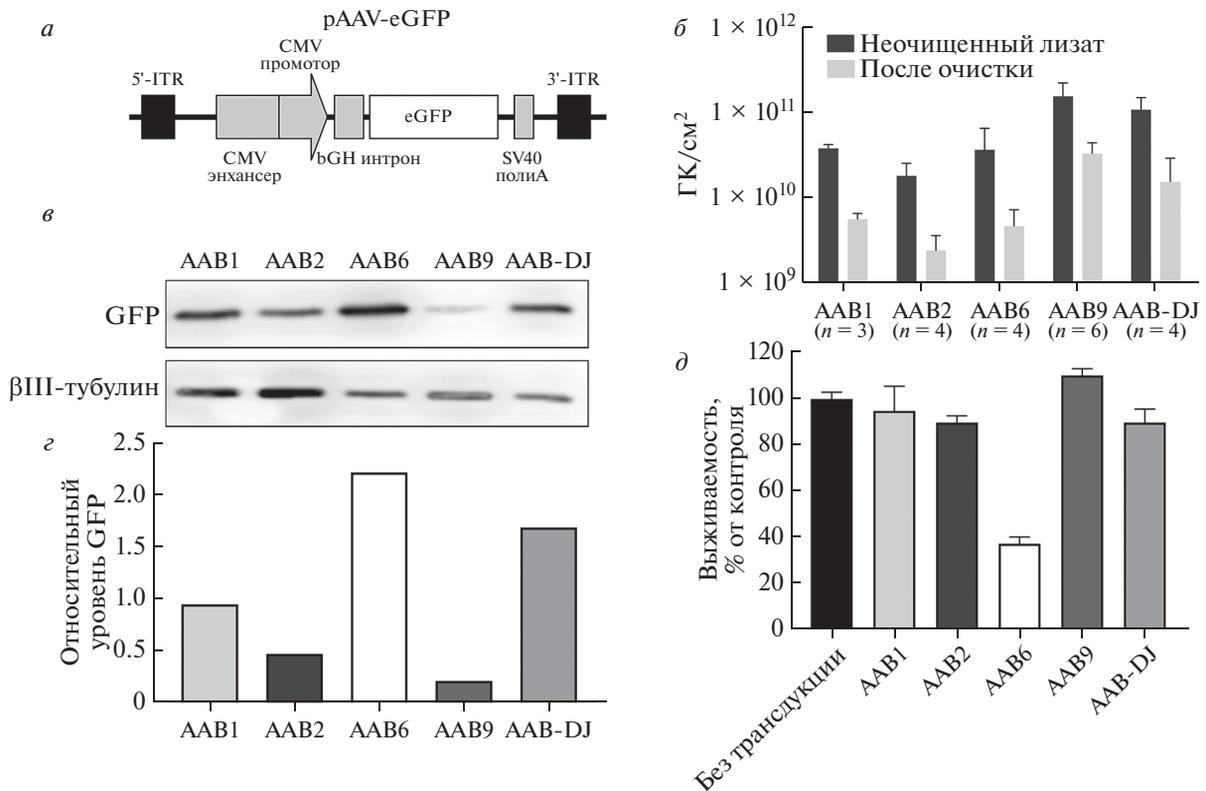


Рис. 3. Получение и тестирование препаратов вируса различных серотипов, кодирующих белок-репортер. *а* – Схема контрольного вирусного вектора, кодирующего репортерный белок eGFP. *б* – Количество вирусных частиц разных серотипов в клеточном лизате и после стадий очистки методом кПЦР. Данные представлены в виде числа геномных копий (ГК)/см² культуральной поверхности. *в* – Количество независимых экспериментов. *г* – Вестерн-блоттинг с лизатами первичной нейрональной культуры, трансдуцированной разными серотипами ААВ при множественности заражения 10⁵ ГК/клетку. Показан уровень экспрессии eGFP через 7 дней после трансдукции. *з* – Количественный подсчет результатов вестерн-блоттинга. Показан относительный уровень экспрессии GFP в нейронах, трансдуцированных разными серотипами ААВ. Уровень экспрессии GFP нормирован по уровню экспрессии βIII-тубулина. *д* – Анализ цитотоксичности разных серотипов в первичной нейрональной культуре мыши. Показан уровень жизнеспособности трансдуцированных клеток в процентах от нетрансдуцированной культуры.

культурами, трансдуцированными серотипами ААВ 1, 2, 9, DJ, и нетрансдуцированными клетками (рис. 3д). Однако обнаружено, что вирусные частицы с капсидом серотипа б проявляли существенную цитотоксичность в отношении первичной нейрональной культуры.

Чтобы выявить серотип ААВ с наибольшим тропизмом к субпопуляции Gαo1-позитивных нейронов, мы изучили колокализацию экспрессии GFP и mGαo1 (рис. 4). С этой целью определили процент Gαo1-позитивных клеток, зараженных ААВ-eGFP (рис. 4а). Все протестированные серотипы ААВ трансдуцировали Gαo1-позитивные клетки, однако с разной эффективностью. Наибольшим тропизмом к Gαo1-позитивным клеткам обладали серотипы ААВ6 и ААВ-DJ: 59 и 66% колокализации соответственно. Серотипы ААВ1, ААВ2 и ААВ9 имели более низкий тропизм – колокализация с таргетными клетками составила только 19, 25 и 8% соответственно. Пример колокализации серотипа ААВ-DJ представлен на рис. 4б.

Таким образом, по результатам скрининга пяти нейротропных серотипов ААВ оптимальным для заражения mGαo1-позитивных нейронов мыши *in vitro* оказался ААВ-DJ. Серотип DJ при множественности 10⁵ ГК на клетку обеспечивал эффективную доставку репортерного трансгена в целевые клетки и обладал низкой цитотоксичностью. Этот серотип использовали в дальнейшем для тестирования потенциальных генотерапевтических подходов и моделирования GNAO1-энцефалопатии.

Экспрессия Gαo1 человека и супрессия эндогенного Gαo1

На заключительном этапе мы проверили эффективность доставки с помощью ААВ-DJ генетических конструкций разных конфигураций, которые потенциально могут быть применены в генной терапии и моделировании GNAO1-энцефалопатии в нейронах мыши *in vitro*. Разработаны две группы экспрессионных ААВ-векторов (рис. 5а, б).

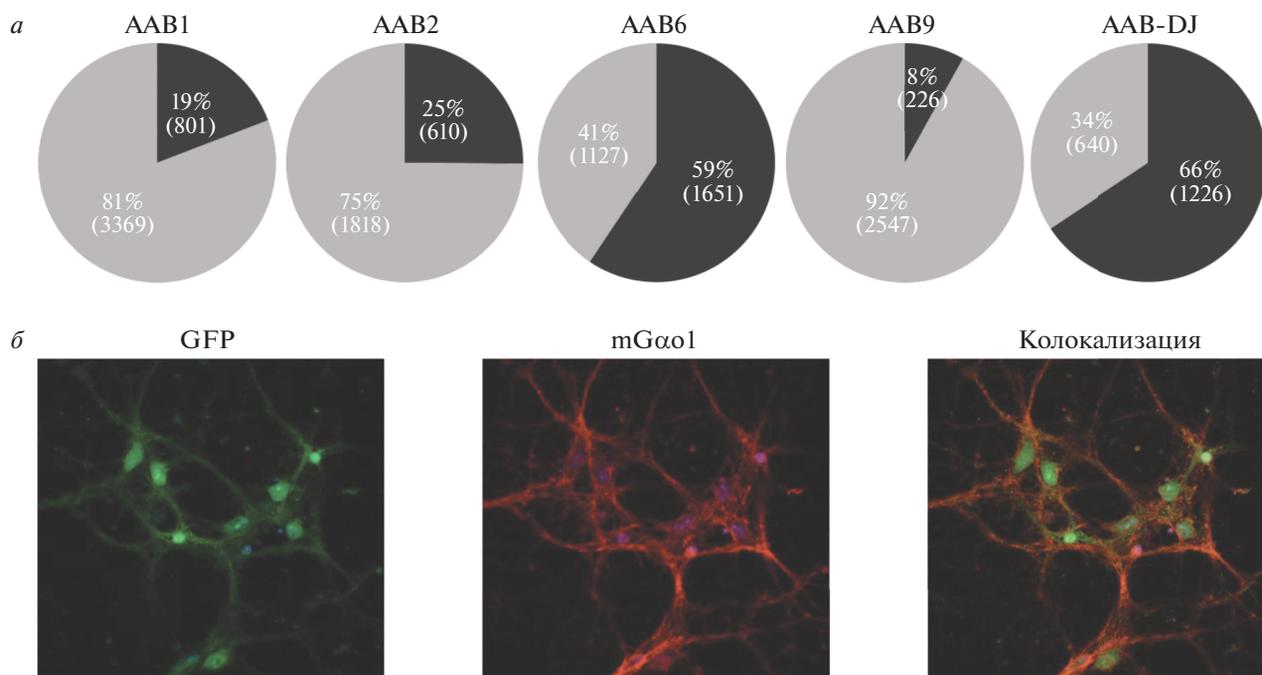


Рис. 4. Анализ тропизма рекомбинантных аденоассоциированных вирусов разных серотипов на первичной нейрональной культуре. *а* – Оценка количества трансдуцированных mGα01-позитивных нейронов мыши. Процент коллокализации (черный сегмент) оценивали как отношение mGα01-позитивных клеток, экспрессирующих eGFP, к общему количеству mGα01-позитивных клеток. Количество незараженных mGα01-позитивных нейронов показано серым. В скобках указано количество клеток, участвующих в подсчете. *б* – Пример коллокализации сигнала от клеток, трансдуцированных AAB-DJ, экспрессирующих GFP (зеленый), с сигналом от mGα01-позитивных клеток, окрашенных специфичными антителами (красный). Ядра контрастированы Hoechst 33342 (синий).

Первая группа AAB-векторов несет в качестве трангена кодирующие белок последовательности *GNAO1*. Вектор pAAV-GNAO1-wt-мус экспрессирует Gα01 человека (hGα01) дикого типа с мус-эпитопом (рис. 5а). Эту конструкцию можно использовать для тестирования заместительной генной терапии, применимой к пациентам с LOF-мутациями в гене *GNAO1* [12]. С помощью вектора pAAV-GNAO1-G203R-flag можно доставлять мутантную форму трансгенного белка hGα01-G203R для выяснения механизма патогенеза наиболее часто встречающегося варианта. Экспрессию обеих форм hGα01 (нормальной и мутантной) AAB-векторами подтвердили в контексте плазмидной трансфекции в HEK293T с помощью антител, специфичных к мус- и flag-эпитопам соответственно (рис. 5б).

Вторая группа AAB-векторов кодирует shРНК (рис. 5б). Специфичные к *Gnao1* shРНК подавляют экспрессию эндогенного mGα01 на посттранскрипционном уровне посредством РНК-интерференции [20]. Эти векторы можно использовать для моделирования GNAO1-энцефалопатии, вызванной LOF-мутациями, которые приводят к дефициту белка. Кроме того, векторы с shРНК, специфичные к *GNAO1* человека, можно использовать в генотерапевтических подходах, основанных на

супрессии генов и эффективных при GOF-мутациях и мутациях с доминантно-негативным проявлением.

Чтобы подобрать shРНК для эффективного подавления mGα01, мы протестировали три плазмидные конструкции с таргетирующими последовательностями к *Gnao1* (shGnao1/1, shGnao1/2, shGnao1/3) в HEK293T со сверхэкспрессией Gα01 мыши (рис. 5с). В качестве негативных контролей использовали shРНК с нетаргетирующей последовательностью шпильки (shSCR) и последовательностью для подавления GFP (shGFP). Конструкции shGnao1/1 и shGnao1/2 эффективно подавляли продукцию mGα01. Последовательность shGnao1/1 отобрали для создания AAB-вектора (pAAV-shGnao1/1-eGFP), учитывая способность подавлять Gα01 как мыши, так и человека.

С помощью описанных экспрессионных векторов, несущих трансгенный *GNAO1* или shРНК (рис. 5а, б), мы получили очищенные препараты AAB в капсиде DJ. Продукцию и эффективность очистки вирусных частиц оценивали, как в случае вирусов с GFP-репортером. Продукция всех вирусов серотипа DJ в лизате клеток HEK293T была сходной: 8.0×10^{10} (GNAO1-wt-myc), 9.6×10^{10} (GNAO1-G203R-Flag), 7.3×10^{10} (shSCR) и 1.0×10^{11} (shGnao1/1) ГК/см² культуральной поверхности

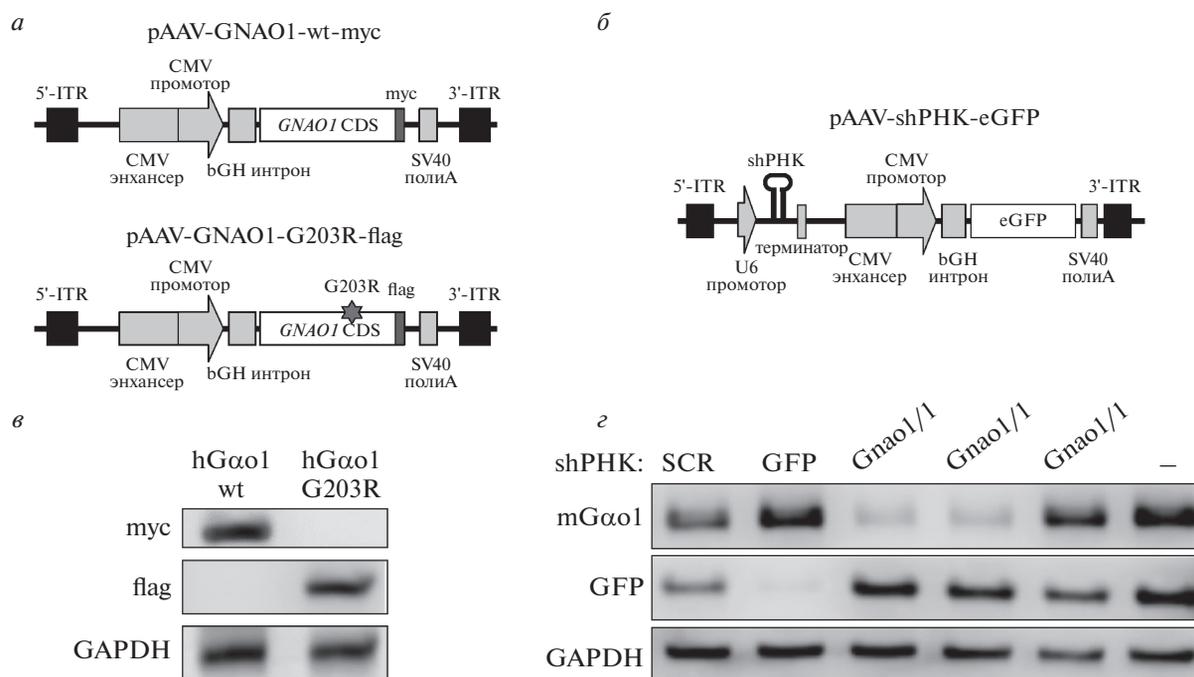


Рис. 5. Скрининг плазмидных конструкций для сверхэкспрессии трансгенного hG α o1 или подавления mG α o1 мыши. *a* – Схема вирусных векторов, кодирующих нормальную или мутантную форму белка hG α o1, меченного мус- или flag-эпитопом соответственно. *б* – Схема вирусного вектора, кодирующего shPHK и GFP в качестве репортерного гена. *в* – Результат вестерн-блоттинга, показывающий экспрессию нормальной или мутантной формы hG α o1 в культуре НЕК293Т, трансфицированной разработанными ААВ-векторами. *г* – Результат скрининга shPHK (shGnao1/1, shGnao1/2, shGnao1/3), таргетирующих транскрипт гена *Gnao1*. Конструкции pLKO.1-shPHK транзientно экспрессировали в культуре клеток НЕК293Т совместно с плазмидой pGnao1, кодирующей mG α o1 мыши. Подавление анализировали методом вестерн-блоттинга с антителами, специфичными к G α o1, GFP. Контроль нанесения – GAPDH.

(рис. 6а). Выход указанных вирусных препаратов после очистки составил 17, 14, 20 и 12% соответственно. Вирусные препараты сконцентрировали до $2-3 \times 10^{13}$ ГК/мл, отсутствие белковых примесей проверяли, анализируя вирусные частицы в полиакриламидном геле с окрашиванием Кумаси (рис. 6б).

Вирусные препараты добавляли к mG α o1-богатой первичной культуре нейронов из цельного мозга мышей при множественности инфекции 10^5 ГК на клетку. Через 7 дней после инфекции анализировали уровень экспрессии трансгенного hG α o1 человека и эндогенного mG α o1 мыши. Как показано на рис. 6в, ААВ-DJ обеспечивает хорошо детектируемый уровень экспрессии трансгенов *GNAO1*-wt-myc и *GNAO1*-G203R-flag в нейронах на уровне белка. Используя ААВ-DJ для доставки shPHK, нам удалось добиться снижения экспрессии эндогенного *Gnao1* в первичной нейрональной культуре на 85% на уровне РНК и вдвое на уровне белка mG α o1 (рис. 6г, д соответственно).

Таким образом, нами показано, что серотип ААВ-DJ подходит для эффективной доставки в первичные нейроны мыши трансгенов, обеспечивающих сверхэкспрессию G α o1 человека, и shPHK

для подавления эндогенного *Gnao1*. Подобные условия доставки могут быть использованы как для моделирования GNAO1-энцефалопатии, так и для тестирования подходов генной терапии в нейронах мыши *in vitro*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вирусная доставка генетических конструкций в клетки-мишени широко применяется в фундаментальных исследованиях [34], а также при разработке генотерапевтических препаратов [35]. Популярным вирусным вектором для доставки трансгенов в центральную нервную систему являются рекомбинантные ААВ [18].

В настоящей работе мы оптимизировали ААВ-опосредованную доставку трансгенов в нейрональной культуре, полученной из цельного мозга мышей, с целью проведения исследований по GNAO1-энцефалопатии (рис. 1). Нами проверены пять нейротропных серотипов (1, 2, 6, 9 и DJ) при множественности инфекции 10^5 вирусных геномов на клетку. ААВ6 и ААВ-DJ обеспечили самый высокий уровень экспрессии доставленного GFP-репортера (рис. 3в, г), а также самый высокий тропизм к G α o1-позитивным нейронам (59 и

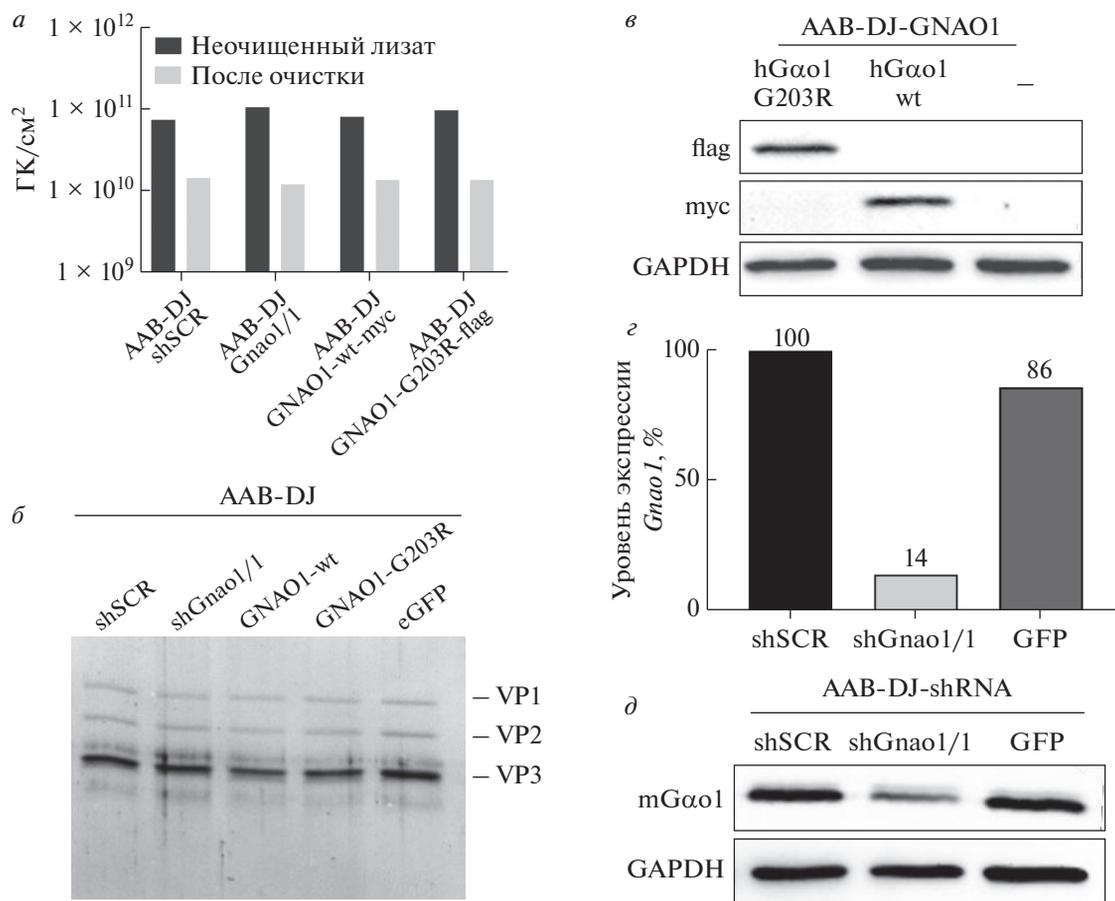


Рис. 6. Получение и тестирование вирусных препаратов для сверхэкспрессии трансгенного $hG\alpha o1$ или подавления эндогенного $Gnao1$ в первичной культуре нейронов из мозга мышей. *a* – Оценка количества целевых ААВ в клеточном лизате и после стадий очистки методом кПЦР. *b* – Анализ чистоты вирусных препаратов в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Окрашивание Кумасси: отмечены три белка вирусного капсида (VP1, VP2, VP3). *c* – Вестерн-блот-анализ экспрессии нормальной или мутантной формы $hG\alpha o1$ в первичных нейронах, трансдуцированных вирусами ААВ-DJ-GNAO1-wt-myc и ААВ-DJ-GNAO1-G203R-flag. *d* – Анализ подавления экспрессии эндогенного $Gnao1$ на уровне транскрипта методом кПЦР после заражения ААВ-DJ-shРНК первичной нейрональной культуры. Показан уровень экспрессии (%) от уровня в культуре, трансдуцированной нетаргетирующей контрольной шпилькой (shSCR). *e* – Вестерн-блот-анализ подавления экспрессии $mG\alpha o1$ в трансдуцированной первичной нейрональной культуре мыши.

66% соответственно) (рис. 4). Установлено, что серотип ААВ6, в отличие от ААВ-DJ, проявляет существенную цитотоксичность в первичной нейрональной культуре мыши (рис. 3д).

Ранее были опубликованы результаты исследования, в котором сравнивали цитотоксичность и тропизм серотипов ААВ1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 в первичной кортикальной культуре крысы [36]. С помощью иммунофлуоресцентного анализа показано, что серотипы ААВ2 и ААВ9 обеспечивают минимальную экспрессию GFP в трансдуцированной культуре, в то время как в клетках, трансдуцированных серотипами ААВ1 и ААВ6, наблюдается самая высокая интенсивность сигнала GFP. Эти данные согласуются с нашими результатами, полученными методом вестерн-блотинга (рис. 3e).

Сообщается также о цитотоксичности ААВ6, хотя и менее выраженной, чем в наших экспериментах (рис. 3д). Мы предполагаем, что это связано с большей гетерогенностью нейрональной культуры, полученной из цельного мозга, чем кортикальной культуры. Роуо и соавт. [37] также отметили повышенную токсичность ААВ6 в гиппокампальной культуре крысы в сравнении с серотипами 1, 2, 5, 7, 8 и 9. Изучив роль аминокислотной последовательности капсида ААВ6, установили, что внесение замены K531E в участок капсида, критичный для связывания гепарина, приводит к уменьшению цитотоксичности без снижения эффективности трансдукции нейронов [37]. Серотип ААВ-DJ обладает генно-инженерным капсидом, полученным сочетанием восьми природных серотипов [38].

В разных работах показана повышенная способность серотипа DJ трансдуцировать *in vitro* клеточные культуры, в том числе нейрональные [15]. Таким образом, исходя из опубликованных данных и результатов нашего исследования, мы делаем вывод о том, что AAB-DJ является оптимальным серотипом для доставки трансгенов в $G\alpha 1$ -богатую первичную нейрональную культуру, полученную из цельного мозга мышей.

С целью моделирования GNAO1-энцефалопатии, а также тестирования генотерапевтических конструкций, нами созданы AAB-векторы для экспрессии hG $\alpha 1$ человека и подавления эндогенного *Gnao1* с помощью shРНК (рис. 5а, б). Показано, что серотип DJ обеспечивает эффективную доставку этих генетических конструкций в культуру mG $\alpha 1$ -экспрессирующих нейронов (рис. 6в–д).

Нейроны мышцы с AAB-опосредованной экспрессией hG $\alpha 1$ -G203R могут служить клеточной моделью GNAO1-энцефалопатии с вариантом с.607 G>A (рис. 6в). Эта мутация наиболее часто встречается у пациентов с GNAO1-энцефалопатией [5]. По данным родительских организаций под наблюдением врачей в России находятся четыре таких пациента. При этом данные о влиянии мутации G203R на функциональную активность G $\alpha 1$ остаются противоречивыми [1, 12, 39]. Нейроны со сниженным с помощью shРНК уровнем эндогенного mG $\alpha 1$ воспроизводят дефицит функционального белка у пациентов с LOF-мутациями (рис. 6г, д). На таких клеточных моделях можно изучать молекулярный механизм патологии GNAO1-энцефалопатии. В частности, можно исследовать общую функциональную активность AAB-трансдуцированных нейронов (методом визуализации Ca²⁺), возможные нарушения аденилатциклазного каскада, а также электрофизиологические характеристики, такие как сопряжение активности G $\alpha 1$ -содержащих рецепторов с работой потенциалзависимых Ca²⁺-каналов и активируемых G-белком GIRK-каналов. Подобные исследования помогут восполнить пробел в понимании молекулярных механизмов патологии [12], а также скорректировать схему терапии и разработать персонализированные подходы к терапии пациентов с GNAO1-энцефалопатией.

Полученные нами генетические конструкции могут стать основой для создания генотерапевтических препаратов. Так, конструкция rAAV-GNAO1-wt-мус потенциально может использоваться в заместительной терапии пациентов с LOF-мутациями и дефицитом нормального G $\alpha 1$ в тканях мозга (рис. 5а). AAB-вектор с shGnao1/1 обладает таргетной последовательностью (TRCN0000036487), универсальной для супрессии G $\alpha 1$ как мыши, так и человека (рис. 5б). Следовательно, вектор rAAV-shGnao1/1 можно адаптировать для су-

прессии генного продукта с GOF-мутацией или доминантно-негативным проявлением. Аналогичная генотерапевтическая стратегия описана для других неврологических заболеваний [40–43]. В одном из вариантов этой стратегии (так называемая “Silence-and-replace” [20, 44]) shРНК подавляет экспрессию как мутантного, так и нормального аллеля, при этом параллельно доставляется функциональная копия гена в том же или в другом AAB-векторе. Проверку экспрессии генотерапевтических конструкций для GNAO1-энцефалопатии можно проводить на первичных нейронах, используя AAB-DJ в качестве инструмента для доставки.

Серотип AAB-DJ может использоваться также в качестве средства доставки в новых подходах к генной терапии GNAO1-энцефалопатии, таких как CRISPR-Cas9, CRISPR-Cas13 и молекулярные редакторы оснований ДНК [21].

Таким образом, созданные в нашей работе генетические конструкции и оптимизированные протоколы с применением AAB помогут продвигаться в понимании механизмов патогенеза GNAO1-энцефалопатии и могут лечь в основу генотерапевтических препаратов.

Мы благодарим за помощь в клонировании ряда плазмидных конструкций Усачёва Е.В. (Лаборатория трансляционной биомедицины НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), Лосеву Е.М. и Лучкину Е.А. (ООО “Марлин Биотех”) за помощь в клонировании и первичную проверку плазмидных векторов, Веляева О.А. (ООО “Марлин Биотех”) за продукцию и очистку плазмидных векторов, Хаматову А.Ю. (ООО “Марлин Биотех”) за определение титра вирусных препаратов методом кПЦР.

Работа проведена с использованием оборудования ИБР им. Н.К. Кольцова РАН. Мы благодарим за предоставленное оборудование Центр высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины (Институт биологии гена), развиваемый при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

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. Экспериментальные протоколы одобрены этической комиссией Института биологии гена РАН (Москва, Россия). От родителей пациента с вариантом *GNAO1* с.607 G>A получено письменное информированное согласие на проведение биопсии и участие в научных исследованиях.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nakamura K., Kodera H., Akita T., Shiina M., Kato M., Hoshino H., Terashima H., Osaka H., Nakamura S., Tohyama J., Kumada T., Furukawa T., Iwata S., Shi-hara T., Kubota M., Miyatake S., Koshimizu E., Nishi-yama K., Nakashima M., Tsurusaki Y., Miyake N., Ha-yasaka K., Ogata K., Fukuda A., Matsumoto N., Saitu H. (2013) *De novo* mutations in GNAO1, encoding a G α subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 496–505.
2. EuroEPINOMICS-RES Consortium, Epilepsy Phenome/Genome Project, and Epi4K Consortium (2014) *De novo* mutations in synaptic transmission genes including *DNM1* cause epileptic encephalopathies. *Am. J. Hum. Genet.* **95**, 360–370.
3. Worley P.F., Baraban J.M., Van Dop C. (1986) Go, a guanine nucleotide-binding protein: immunohistochemical localization in rat brain resembles distribution of second messenger systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 4561–4565.
4. Jiang M., Bajpayee N.S. (2009) Molecular mechanisms of go signaling. *Neurosignals.* **17**, 23–41.
5. Feng H., Khalil S., Neubig R.R., Sidiropoulos C. (2018) A mechanistic review on GNAO1-associated movement disorder. *Neurobiol. Dis.* **116**, 131–141.
6. Ananth A.L., Robichaux-Viehoever A., Kim Y.M., Hanson-Kahn A., Cox R., Enns G.M., Strober J., Willing M., Schlagger B.L., Wu Y.W., Bernstein J.A. (2016) Clinical course of six children with GNAO1 mutations causing a severe and distinctive movement disorder. *Pediatr. Neurol.* **59**, 81–84.
7. Danti F.R., Serena Galosi S., Romani M., Montomoli M., Carss K.J., Raymond F.L., Parrini E., Bianchini C., McShane T., Dale R.C., Mohammad S.S., Shah U., Mahant N., Ng J., McTague A., Samanta R., Vadlamani G., Valente E.M., Leuzzi V., Kurian M.A., Guerrini R. (2017) GNAO1 encephalopathy: broadening the phenotype and evaluating treatment and outcome. *Neurol. Genet.* **3**, 143.
8. Menke L.A., Engelen M., Alders M., Odekerken V.J.J., Baas F., Cobben J.M. (2016) Recurrent GNAO1 mutations associated with developmental delay and a movement disorder. *J. Child. Neurol.* **31**, 1598–1601.
9. Saitu H., Fukai R., Ben-Zeev B., Sakai Y., Mimaki M., Okamoto N., Suzuki Y., Monden Y., Saito H., Tziperman B., Torio M., Akamine S., Takahashi N., Osaka H., Yamagata T., Nakamura K., Tsurusaki Y., Nakashima M., Miyake N., Shiina M., Ogata K., Matsumoto N. (2015) Phenotypic spectrum of GNAO1 variants: epileptic encephalopathy to involuntary movements with severe developmental delay. *Eur. J. Hum. Genet.* **24**, 129–134.
10. Roddy D.W., Farrell C., Doolin K., Roman E., Tozzi L., Frodl T., O’Keane V., O’Hanlon E. (2019) The hippocampus in depression: more than the sum of its parts? Advanced hippocampal substructure segmentation in depression. *Biol. Psychiatry.* **85**, 487–497.
11. Kim S.Y., Shim Y., Ko Y.J., Park S., Jang S.S., Lim B.C., Ki Joong Kim K.J., Chae J. (2020) Spectrum of movement disorders in GNAO1 encephalopathy: in-depth phenotyping and case-by-case analysis. *Orphanet. J. Rare. Dis.* **15**, 1–6.
12. Feng H., Sjögren B., Karaj B., Shaw V., Gezer A., Neubig R.R. (2017) Movement disorder in GNAO1 encephalopathy associated with gain-of-function mutations. *Neurology.* **89**, 762–770.
13. Arya R., Spaeth C., Gilbert D.L., Leach J.L., Holland K.D. (2017) GNAO1-associated epileptic encephalopathy and movement disorders: c.607G>A variant represents a probable mutation hotspot with a distinct phenotype. *Epileptic. Disord.* **19**, 67–75.
14. Bedbrook C.N., Deverman B.E., Gradinaru V. (2018) Viral strategies for targeting the central and peripheral nervous systems. *Annu. Rev. Neurosci.* **41**, 323–348.
15. Haery L., Deverman B.E., Matho K.S., Cetin A., Woodard K., Cepko C., Guerin K.I., Rego M.A., Erasing I., Bachle S.M., Joanne Kamens J., Fan M. (2019) Adeno-associated virus technologies and methods for targeted neuronal manipulation. *Front. Neuroanat.* **13**. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.0093>
16. Hammond S.L., Leek A.N., Richman E.H., Tjalkens R.B. (2017) Cellular selectivity of AAV serotypes for gene delivery in neurons and astrocytes by neonatal intracerebroventricular injection. *PLoS One.* **12**, e0188830.
17. Kondratov O., Kondratova L., Mandel R.J., Coleman K., Savage M.A., Gray-Edwards H.L., Ness T.J., Rodriguez-Lebron E., Bell R.D., Rabinowitz J., Gamlin P.D., Zolotukhin S. (2021) A comprehensive study of a 29-capsid AAV library in a non-human primate central nervous system. *Mol. Ther.* **29**, 2806–2820.
18. Wang D., Tai P.W.L., Gao G. (2019) Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **18**, 358–378.
19. Hocquemiller M., Giersch L., Audrain M., Parker S., Cartier N. (2016) Adeno-associated virus-based gene therapy for CNS diseases. *Hum. Gene. Ther.* **27**, 478–496.
20. Borel F., Kay M.A., Mueller C. (2014) Recombinant AAV as a platform for translating the therapeutic potential of RNA interference. *Mol. Ther.* **22**, 692–701.
21. Wang D., Zhang F., Gao G. (2020) CRISPR-based therapeutic genome editing: strategies and in vivo delivery by AAV vectors. *Cell.* **181**, 136–150.
22. Moffat J., Grueneberg D.A., Yang X., Kim S.Y., Kleopfer A.M., Hinkle G., Piqani B., Eisenhaure T.M., Luo B., Grenier J.K., Carpenter A.E., Foo S.Y., Stewart S.A., Stockwell B.R., Hacohen N., Hahn W.C., Lander E.S., Sabatini D.M., Root D.E. (2006) A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell.* **124**, 1283–1298.
23. Addgene: Protocol pLKO.1–TRC Cloning Vector. <https://www.addgene.org/protocols/plko/> (accessed January 31, 2022)
24. Starikova A.V., Skopenkova V.V., Polikarpova A.V., Reshetov D.A., Vassilieva S.G., Velyaev O.A., Shmidt A.A., Savchenko I.M., Soldatov V.O., Egorova T.V., Bardina M.V. (2022) Therapeutic potential of highly functional codon-optimized microutrophin for muscle-specific expression. *Sci. Rep.* **12**, 1–13.

25. Buclez P.O., Dias Florencio G., Relizani K., Beley C., Garcia L., Benchaouir R. (2016) Rapid, scalable, and low-cost purification of recombinant adeno-associated virus produced by baculovirus expression vector system. *Mol. Ther. Methods. Clin. Dev.* **3**, 16035.
26. Nikitin E.S., Bal N.V., Malyshev A., Ierusalimsky V.N., Spivak Y., Balaban P.M., Volgushev M. (2017) Encoding of high frequencies improves with maturation of action potential generation in cultured neocortical neurons. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 28.
27. Geissler M., Gottschling C., Aguado A., Rauch U., Wetzel C.H., Hatt H., Faissner A. (2013) Primary hippocampal neurons, which lack four crucial extracellular matrix molecules, display abnormalities of synaptic structure and function and severe deficits in perineuronal net formation. *J. Neurosci.* **33**, 7742.
28. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods.* **9**, 676–682.
29. Carpenter A.E., Jones T.R., Lamprecht M.R., Clarke C., Kang I.H., Friman O., Guertin D.A., Chang J.H., Lindquist R.A., Moffat J., Golland P., Sabatini D.M. (2006) CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* **7**, 1–11.
30. Masuho I., Mototani Y., Sahara Y., Asami J., Nakamura S., Kozasa T., Inoue T. (2008) Dynamic expression patterns of G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1 (GRIN1) and its colocalization with G α implicate significant roles of G α -GRIN1 signaling in nervous system. *Dev. Dyn.* **237**, 2415.
31. Choi J.M., Kim S.S., Choi C.H., Cha H.L., Oh H.H., Ghil S., Lee Y.D., Birnbaumer L. (2016) Development of the main olfactory system and main olfactory epithelium-dependent male mating behavior are altered in Go-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**, 10974–10979.
32. GNAO1 protein expression summary – The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000087258-GNAO1> (accessed January 25, 2022)
33. Vandenberghe L.H., Xiao R., Lock M., Lin J., Korn M., Wilson J.M. (2010) Efficient serotype-dependent release of functional vector into the culture medium during adeno-associated virus manufacturing. *Hum. Gene Ther.* **21**, 1251–1257.
34. Nectow A.R., Nestler E.J. (2020) Viral tools for neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* **21**, 669–681.
35. Bulcha J.T., Wang Y., Ma H., Tai P.W.L., Gao G. (2021) Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct. Target Ther.* **6**, 1–24.
36. Howard D.B., Powers K., Wang Y., Harvey B.K. (2008) Tropism and toxicity of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 6, 7, 8, and 9 in rat neurons and glia *in vitro*. *Virology.* **372**, 24–34.
37. Royo N.C., Vandenberghe L.H., Ma J.Y., Hauspurg A., Yu L.Y., Maronski M., Johnston J., Dichter M.A., Wilson J.M., Watson D.J. (2008) Specific AAV serotypes stably transduce primary hippocampal and cortical cultures with high efficiency and low toxicity. *Brain Res.* **1190**, 15.
38. Grimm D., Lee J.S., Wang L., Desai T., Akache B., Storm T.A., Kay M.A. (2008) *In vitro* and *in vivo* gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. *J. Virol.* **82**, 5887.
39. Muntean B.S., Masuho I., Dao M., Sutton L.P., Zucca S., Iwamoto H., Patil D.N., Wang D., Birnbaumer L., Blakely R.D., Grill B., Martemyanov K.A. (2021) G α is a major determinant of cAMP signaling in the pathophysiology of movement disorders. *Cell Rep.* **34**, 108718.
40. Aimiwu O.V., Fowler A.M., Sah M., Teoh J.J., Kamber A., Pyne N.K., Petri S., Chana Rosenthal-Weiss C., Mu Yang M., Scott Q., Harper S.Q., Wayne N., Frankel W.N. (2020) RNAi-based gene therapy rescues developmental and epileptic encephalopathy in a genetic mouse model. *Mol. Ther.* **28**, 1706–1716.
41. Choudhury S.R., Harris A.F., Cabral D.J., Keeler A.M., Sapp E., Ferreira J.S., Gray-Edwards H.L., Johnson J.A., Johnson A.K., Su Q., Stoica L., DiFiglia M., Aronin N., Martin D.R., Gao G., Sena-Esteves M. (2016) Widespread central nervous system gene transfer and silencing after systemic delivery of novel AAV-AS vector. *Mol. Ther.* **24**, 726–735.
42. Martier R., Liefhebber J.M., Garcia-Osta A., Miniarikova J., Cuadrado-Tejedor M., Espelousin M., Ursua S., Petry H., van Deventer S., Evers M.M., Konstantinova P. (2019) Targeting RNA-mediated toxicity in C9orf72 ALS and/or FTD by RNAi-based gene therapy. *Mol. Ther. Nucl. Acid.* **16**, 26–37.
43. Nobre R.J., Lobo D.D., Henriques C., Duarte S.P., Lopes S.M., Silva A.C., Lopes M.M., Mariet F., Schwarz L.K., Baatje M.S., Ferreira V., Vallès A., Almeida L., Evers M.M., Toonen L.J.A. (2021) MiRNA-mediated knockdown of ATXN3 alleviates molecular disease hallmarks in a mouse model for spinocerebellar ataxia type 3. *Nucl. Acid Ther.* <https://doi.org/10.1089/nat.2021.0020>
44. Strings-Ufombah V., Malerba A., Kao S.C., Harbaran S., Roth F., Cappellari O., Lu-Nguyen N., Takahashi K., Mukadam S., Kilfoil G., Claudia Kloth C., Roelvink P., Dickson G., Trollet C., Suhy D. (2021) BB-301: a silence and replace AAV-based vector for the treatment of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* **24**, 67–78.

EFFECTIVE VIRAL DELIVERY OF GENETIC CONSTRUCTS INTO NEURONS FOR *in vitro* MODELING GNAO1-ENCEPHALOPATHY AND GENE THERAPY TESTING

E. A. Lunev^{1, 2, 3}, A. A. Shmidt¹, S. G. Vassilieva¹, I. M. Savchenko¹, V. A. Loginov¹, V. I. Marina², T. V. Egorova¹, and M. V. Bardina^{1, 2, 3, *}

¹ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

² Marlin Biotech LLC, Sochi, 354340 Russia

³ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: maryana.bardina@gmail.com

GNAO1 encephalopathy is an orphan genetic disease associated with early infantile epilepsy, impaired motor control, and severe developmental delay. The disorder is caused by mutations in the *GNAO1* gene, leading to dysfunction of the encoded protein G α 1. There is no cure for this disease, and symptomatic therapy is ineffective. Phenotypic heterogeneity highlights the need for a personalized approach for treating patients with a specific clinical variant of GNAO1 and requires the study of the disease mechanism in animal and cell models. Towards this aim, we developed an approach for modeling GNAO1 encephalopathy and testing gene therapy drugs in primary neurons derived from healthy mice. We optimized the delivery of transgenes to G α 1-expressing neurons using recombinant adeno-associated viruses (rAAV). We assessed the tropism of five neurotropic AAV serotypes (1, 2, 6, 9, DJ) for G α 1-positive neurons from the whole mouse brain. The DJ serotype showed the highest potential as a reporter delivery vehicle, infecting up to 66% of G α 1-expressing cells without overt cytotoxicity. We demonstrated that AAV-DJ also provides efficient delivery and expression of genetic constructs encoding normal and mutant G α 1, as well as short hairpin RNA (shRNA) to suppress endogenous Gnao1 in murine neurons. Our results will further simplify the study of the pathological mechanism for clinical variants of GNAO1, as well as optimize the testing of gene therapy approaches for GNAO1 encephalopathy in cell models.

Keywords: adeno-associated viruses, GNAO1 encephalopathy, G α 1, viral delivery, *in vitro* modeling of human diseases, gene therapy, personalized medicine, primary neuronal culture, short hairpin RNA

УДК 577.23:575.826

ИНАКТИВАЦИЯ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ОКСИДАЗЫ *bd-I* ПРИВОДИТ К СВЕРХЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *E. coli* К АНТИБИОТИКАМ КЛАССОВ ХИНОЛОНОВ И БЕТА-ЛАКТАМОВ

© 2022 г. Т. А. Серегина^а, *, К. В. Лобанов^а, Р. С. Шакулов^а, А. С. Миронов^а^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: tatyana.s82@gmail.com

Поступила в редакцию 16.02.2022 г.

После доработки 02.03.2022 г.

Принята к публикации 02.03.2022 г.

Терминальная оксидаза *bd-I* *Escherichia coli*, кодируемая генами *cydAB*, катализирует восстановление кислорода до воды с использованием гидрохинона в качестве донора электронов. Помимо *cydAB*, для сборки активной *bd-I*-оксидазы необходимо функционирование еще двух генов — *cydDC*, контролирующих синтез гетеродимерного АТФ-связывающего транспортера. Показано, что инактивация фермента *bd-I* *E. coli* путем делеции генов *cydB* или *cydD* приводит к возникновению сверхчувствительности бактерий к хинолоновым и бета-лактамным антибиотикам. Чувствительность этих мутантов к антибиотикам частично супрессируется при внесении в их геном конститутивно экспрессируемого гена *katG*, кодирующего каталазу, под контролем промотора P_{tet} . К аналогичному эффекту приводит повышение уровня генерации внутриклеточного сероводорода в результате экспрессии гена *mstA*, поставленного под контроль промотора P_{tet} (кодирует фермент 3-меркаптопируват-сульфидтрансферазу). Полученные данные свидетельствуют о важной роли терминальной оксидазы *bd-I* в защите бактерий от окислительного стресса и бактерицидного действия антибиотиков.

Ключевые слова: *E. coli*, терминальная оксидаза *bd-I*, гены *cydB* и *cydD*, делеции, сверхчувствительность к антибиотикам, окислительный стресс, каталаза KatG, сероводород

DOI: 10.31857/S0026898422040103

ВВЕДЕНИЕ

Геном *E. coli* содержит кластеры генов, кодирующих три цитохромоксидазы: *bo'* (оперон *cyoABCD*), *bd-I* и *II* (оперон *cydAB*) и *bd-II* (оперон *appCD*) [1]. Эти три фермента функционируют на последнем этапе дыхательной цепи, контролируя сопряжение окисления дыхательных субстратов с четырехэлектронным восстановлением кислорода до воды. Экспрессия оперона *cyoABCD*, кодирующего цитохромоксидазу *bo'*, максимальна при высоком внутриклеточном содержании кислорода, тогда как экспрессия *bd-I* и *bd-II* находится на низком уровне [2]. Напротив, в условиях низких внутриклеточных концентраций кислорода, наблюдаемых, в частности, на стационарной стадии роста бактерий, активность *bd-I* и *bd-II* резко повышается, а экспрессия *bo'* существенно снижается [3]. Наряду с опероном *cydAB*, для сборки активной *bd-I*-оксидазы необходимо функционирование еще двух генов — *cydDC*, контролирующих синтез гетеродимерного АТФ-связывающего транспортера [4, 5].

Помимо генерации протон-движущей силы, цитохромоксидаза *bd-I* выполняет в клетке и другие жизненно важные функции. Так, активная

bd-I повышает толерантность *E. coli* к оксиду азота [6, 7], окислительному стрессу [8, 9] и вовлечена в механизм детоксификации клеток *E. coli* от пероксида водорода [10, 11]. Уровень экспрессии и содержание цитохромоксидазы *bd-I* в мембране увеличиваются не только при низкой концентрации O_2 [12–14], но и в условиях защелачивания среды [15], при высокой температуре [16, 17], при добавлении в среду ядов, в частности цианида [18, 19], в присутствии разбавителей протонофоров [15, 20, 21] и при высоком гидростатическом давлении [22, 23]. Мутанты *E. coli*, дефектные по *bd-I*, обнаруживают чувствительность к H_2O_2 [17], цинку [18, 24], продуцируют внеклеточный фактор, ингибирующий рост бактерий [25, 26], а также теряют способность выходить из стационарной фазы роста и возобновлять аэробный рост при 37°C [27, 28]. В то же время, какие-либо данные об участии цитохромоксидазы *bd-I* в защите бактерий от действия антибиотиков отсутствуют.

Главной задачей настоящей работы было выяснение роли цитохромоксидазы *bd-I* в обеспечении устойчивости бактерий к действию антибиотиков. С этой целью мы инактивировали цито-

Таблица 1. Генотип и происхождение штаммов *E. coli*, использованных в работе

Штамм	Генотип	Происхождение
MG1655	F ⁻ дикий тип	[29]
AM3105	Как MG1655, но $\Delta cydB$	[30]
AM3086	Как MG1655, но $\Delta cydD$	[30]
AM3096	Как MG1655, но P _{tet} - <i>katG</i>	[30]
AM3009	Как MG1655, но P _{tet} - <i>mstA</i>	[31]
AM3111	Как AM3086, но P _{tet} - <i>katG</i>	Данная работа
AM3113	Как AM3105, но P _{tet} - <i>katG</i>	»
AM3114	Как AM3086, но P _{tet} - <i>mstA</i>	»
AM3115	Как AM3105, но P _{tet} - <i>mstA</i>	»
AM3120	Как MG1655, но pSoxS':: <i>lux</i>	»
AM3122	Как AM3105, но pSoxS':: <i>lux</i>	»
AM3123	Как AM3086, но pSoxS':: <i>lux</i>	»

хромоксидазу *bd-I* путем делеции генов *cydB* или *cydD* в хромосоме *E. coli* и показали, что полученные мутантные бактерии сверхчувствительны к действию хинолоновых и бета-лактамных антибиотиков. Таким образом, данные, показывающие, что повышенная чувствительность мутантов $\Delta cydB$ и $\Delta cydD$ к антибиотикам супрессируется при конститутивной экспрессии гена *katG* или высокому уровню генерации сероводорода, позволяют заключить, что цитохромоксидаза *bd-I* вовлечена в защиту бактерий от действия бактерицидных антибиотиков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы. Используемые в работе бактериальные штаммы *E. coli* и их генотип представлены в табл. 1. Делеционные мутанты получали, выращивая фаг P1 на штаммах из коллекции Keio [32], содержащих инсерции *cusB::kan* и *cydD::kan*, и их последующей трансдукции в геном штамма *E. coli* MG1655. Из полученных штаммов удаляли канамициновую кассету с помощью хелперной плазмиды pCP20 [33] с образованием делеций $\Delta cydB$ и $\Delta cydD$. Наличие делеций подтверждали с помощью ПЦР. Получение штаммов, содержащих гены *katG* и *mstA* под контролем конститутивного промотора P_{tet}, описано в работе [31]. Для количественной оценки уровня генерации супероксид-аниона использовали гибридную плазмиду pSoxS'::*lux*, в которой промоторно-операторная область перед геном *soxS* транскрипционно слита с кассетой генов *luxC-DABE P. luminescens* [34, 35].

Среды и условия культивирования. В качестве полноценной питательной среды для выращивания бактерий использовали среду LB без глюкозы [36]. В жидкой среде бактерии культивировали на

качалке (200 об./мин). При необходимости в среде добавляли: налидиксовую кислоту (2 мкг/мл), норфлоксацин (0.05 мкг/мл), моксифлоксацин (0.05 мкг/мл), карбенициллин (3 мкг/мл), ампициллин (3 мкг/мл).

Построение кривых роста бактерий. Кривые роста строили с использованием автоматического прибора Bioscreen. Ночные культуры бактерий, выращенные при 37°C в среде LB, разводили в 100 раз, помещали в лунки платформы Bioscreen и растили при 37°C и максимальном встряхивании. Величины OD₆₀₀ записывали автоматически через определенные промежутки времени. Каждый опыт проводили в трех повторностях, средние значения использовали для построения кривых роста бактерий.

Определение чувствительности бактерий к антибиотикам. Ночные культуры бактерий разводили в 100 раз и выращивали при аэрации и 37°C до титра 10⁷, обрабатывали указанными концентрациями антибиотиков и продолжали выращивать в течение 90 мин, затем делали разведения и высевали пробы на чашки с LB-средой, которые помещали в термостат (37°C, 24 ч). Выживаемость определяли, подсчитывая число колоний в трех независимых опытах и вычисляя средние значения. Кроме того, способность к образованию колоний оценивали методом микроразведений. Ночные культуры бактерий разводили в 100 раз и подращивали на термостатированной качалке при 37°C до OD₆₀₀ = 0.5–0.6. Все суспензии выравнивали по оптической плотности. Готовили серию десятикратных разведений полученных культур в 96-луночном планшете в объеме 100 мкл. Полученные разведения высевали на чашки с богатой средой, содержащей различные концентрации исследуемых антибиотиков. Чашки инкубировали в течение ночи в

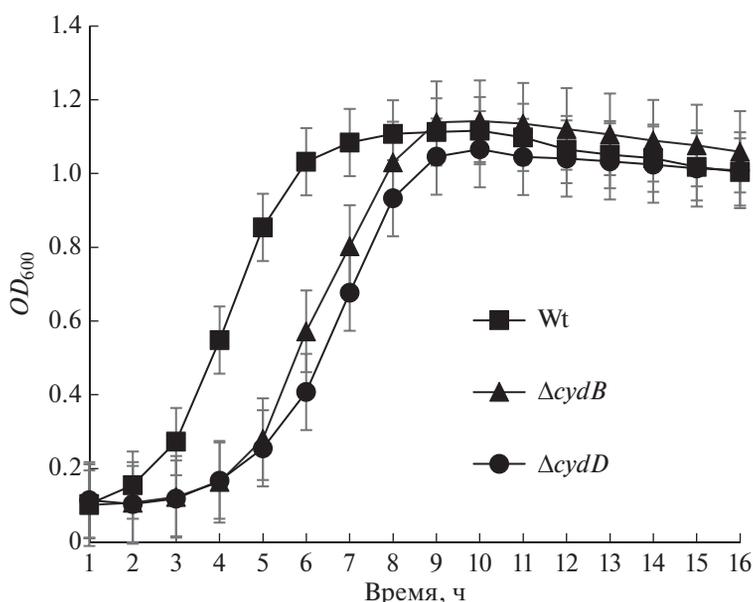


Рис. 1. Мутанты *cydB* и *cydD* характеризуются увеличением продолжительности лаг-фазы роста. Показаны кривые роста штаммов MG1655 (дикий тип) и мутантов *cydB* и *cydD*. Ночные культуры бактерий, выращенные при 37°C в среде LB, разводили в 100 раз, помещали в лунки платформы прибора Bioscreen C и растили при 37°C и максимальном встряхивании. Величины OD_{600} записывали автоматически через определенные промежутки времени. Каждый опыт проводили в трех повторностях, для построения кривых роста бактерий использовали средние значения.

термостате при 37°C и фотографировали с помощью аналитической системы GelCamera M-26XV.

Определение уровня генерации активных форм кислорода в присутствии антибиотиков. Ночные культуры бактерий, содержащие плазмиду $pSoxS'::lux$, разводили до титра 10^7 клеток/мл в свежей среде LB и выращивали с аэрацией при 30°C до ранней экспоненциальной стадии. Пробы объемом 200 мкл переносили в специальные кюветы, одна из проб, в которую добавляли 4 мл дистиллированной воды, служила контролем, а во вторую добавляли антибиотики с заданной концентрацией. Пробы помещали перед фотоумножителем люминометра LMAO1 ("Beckmann", США) для измерения интенсивности биолюминесценции. Интенсивность биолюминесценции определяли согласно [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Инактивация цитохромоксидазы bd-I приводит к сверхчувствительности к антибиотикам

Согласно многочисленным исследованиям, генетическое повреждение цитохромоксидазы *bd-I* снижает устойчивость бактерий к окислительному и другим видам физиологического стресса [6–11]. Для проверки возможного участия этого ферментного комплекса в защите бактерий от бактерицидных антибиотиков проведена инактивация *bd-I* путем трансдукционного переноса инсерций *cydB::kan* и *cydD::kan* из штаммов коллекции

Keio [32] в хромосому штамма MG1655 с последующим выщеплением канамициновой кассеты и образованием соответствующих делеций $\Delta cydB$ и $\Delta cydD$. Ген *cydB* кодирует субъединицу II цитохромоксидазы *bd-I*, которая: в комплексе с субъединицей I образует активный фермент, способный связывать металлсодержащие кофакторы: гем b558, гем b595 и гем d [38]. Ген *cydD* кодирует транспортер типа ABC, содержащий сайт связывания АТФ, и участвует в сборке активного комплекса *bd-I* [39].

Построение кривых роста мутантных клеток (рис. 1) показало, что у обоих мутантов $\Delta cydB$ и $\Delta cydD$ продолжительность лаг-фазы значительно увеличивается по сравнению с родительским штаммом MG1655, однако по достижении экспоненциальной стадии скорости роста мутантов и бактерий дикого типа, выравниваются.

На следующем этапе работы определяли чувствительность полученных мутантов к антибиотикам, принадлежащим к классу хинолонов — налидиксовой кислоте, норфлоксацину и моксифлоксацину, а также к бета-лактамам — ампициллину и карбенициллину (рис. 2 и 3). Как показано на рис. 2 и 3, оба мутанта ($\Delta cydB$ и $\Delta cydD$) обнаруживают значительно более высокий уровень чувствительности ко всем трем хинолонам, а также к бета-лактамам по сравнению с родительским штаммом MG1655.

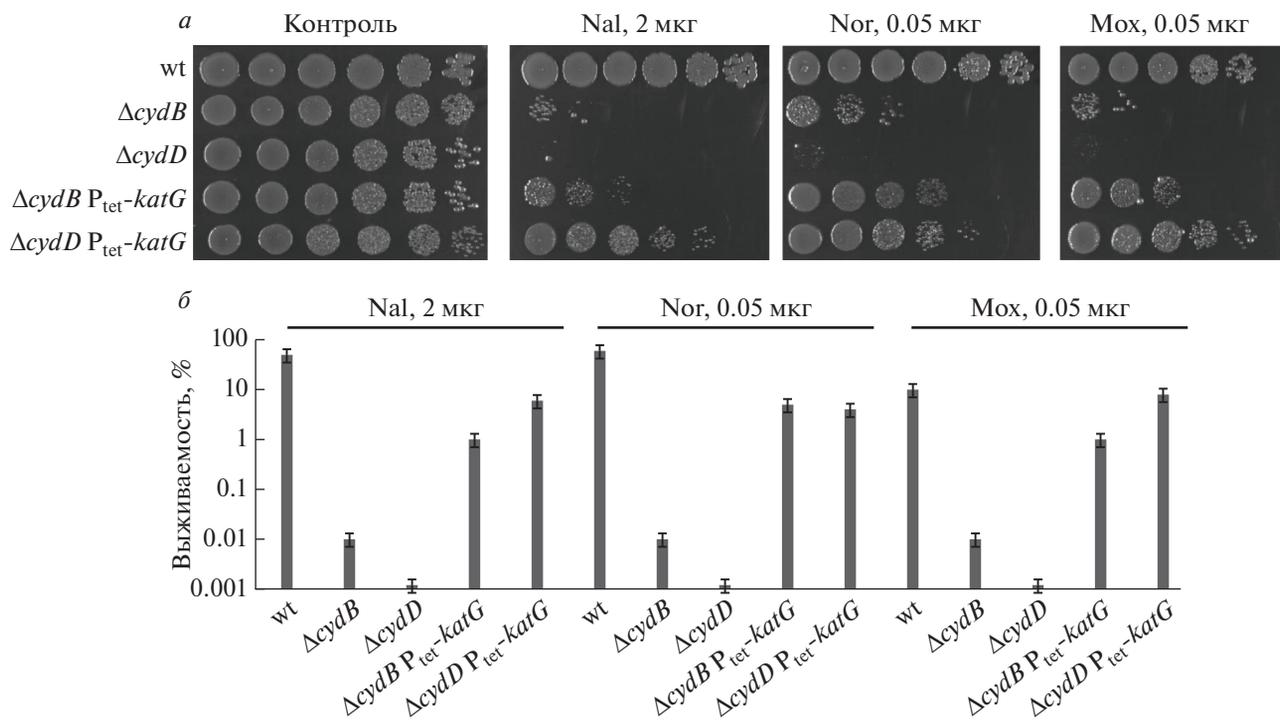


Рис. 2. Конститутивная экспрессия гена *katG* супрессирует сверхчувствительность мутантов *cydB* и *cydD* к действию хинолоновых антибиотиков: налидиксовой кислоте (Nal), норфлоксацину (Nor) и моксифлоксацину (Mox). *а* – Эффективность образования колоний в присутствии антибиотиков определяли путем нанесения бактериальных суспензий из серии 10-кратных разведений на чашки с LB-средой, содержащей антибиотики в указанных концентрациях; *б* – ночные культуры бактерий разводили в 100 раз и выращивали при аэрации и 37°C до титра 10⁷, обрабатывали антибиотиками в указанных концентрациях и продолжали выращивать в течение 90 мин. Затем делали разведения и высеивали пробы на чашки с LB-средой, которые помещали в термостат (37°C, 24 ч). Здесь и на рис. 3 – выживаемость определяли, подсчитывая число колоний в трех независимых опытах для вычисления средних значений.

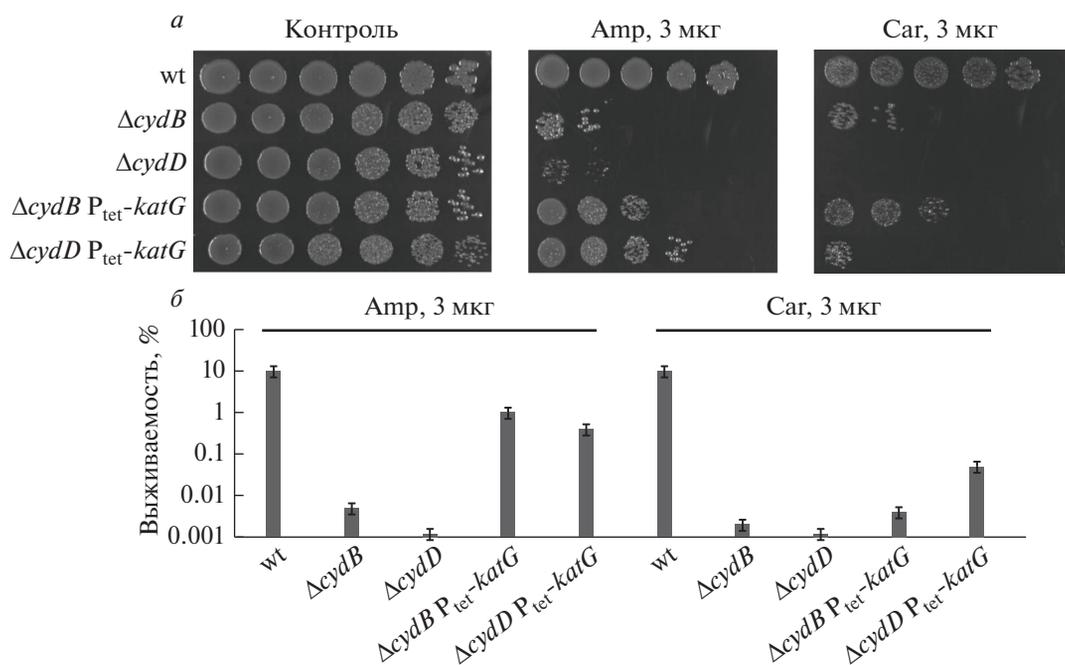


Рис. 3. Конститутивная экспрессия гена *katG* супрессирует сверхчувствительность мутантов *cydB* и *cydD* к действию бета-лактамов антибиотиков: ампициллину (Amp) и карбенициллину (Car). *а* – Эффективность образования колоний в присутствии антибиотиков определяли путем нанесения бактериальных суспензий из серии 10-кратных разведений на чашки с LB-средой, содержащей антибиотики в указанных концентрациях. *б* – Ночные культуры бактерий разводили в 100 раз и выращивали при аэрации и 37°C до титра 10⁷, обрабатывали антибиотиками в указанных концентрациях и продолжали выращивать в течение 90 мин. Затем делали разведения и высеивали пробы на чашки с LB-средой, которые помещали в термостат (37°C, 24 ч). Выживаемость определяли как на рис. 2.

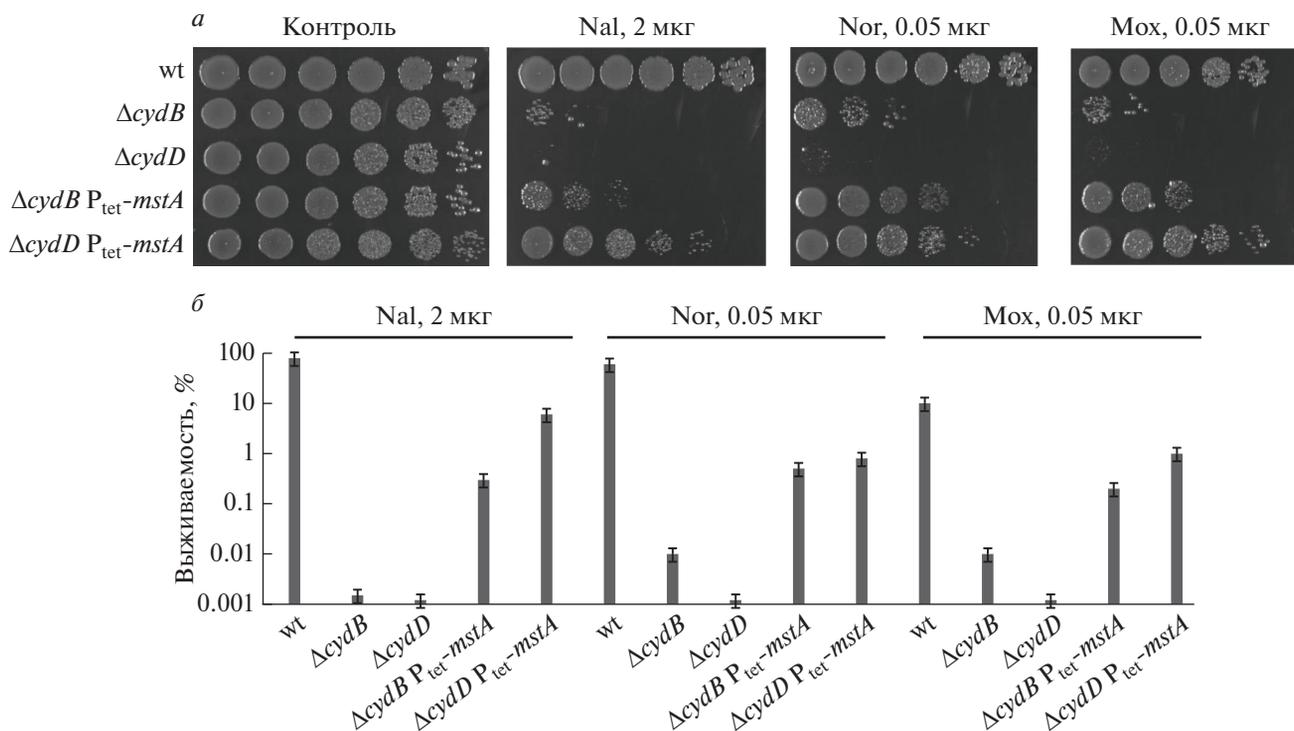


Рис. 4. Конститутивная экспрессия гена *mstA* супрессирует сверхчувствительность мутантов *cydB* и *cydD* к действию хинолоновых антибиотиков: налидиксовой кислоте (Nal), норфлоксацину (Nor) и моксифлоксацину (Мох). *а* – Эффективность образования колоний в присутствии антибиотиков определяли путем нанесения бактериальных суспензий из серии 10-кратных разведений на чашки с LB- средой, содержащей антибиотики в указанных концентрациях. *б* – Ночные культуры бактерий разводили в 100 раз и выращивали при аэрации и 37°C до титра 10⁷, обрабатывали антибиотиками в указанных концентрациях и продолжали выращивать в течение 90 мин, затем делали разведения и высевали пробы на чашки с LB-средой, которые помещали в термостат (37°C, 24 ч). Выживаемость определяли, как на рис. 2.

*Сверхчувствительность мутантов $\Delta cydB$ и $\Delta cydD$ частично супрессируется конститутивным синтезом каталазы *KatG* и высоким уровнем генерации сероводорода*

Хинолоны ингибируют ДНК-гиразу грамотрицательных бактерий, один из ключевых ферментов, участвующих в репликации бактериальной хромосомы, на стадии формирования эфирной связи тирозилфосфата, в результате чего в основной цепи ДНК образуется разрыв. Этот этап бактериостатичен и обратим. Бактерицидное (летальное) необратимое действие хинолонов связано с последующим процессом накопления одно- и двухцепочечных разрывов в ДНК [40], оно определяется сложным взаимодействием хинолона и гидроксил-радикала ОН' [41–43]. Гидроксил-радикал играет ключевую роль и в летальном эффекте антибиотиков других групп (β -лактамов, аминогликозидных и др.) [44–49]. При росте необработанных хинолонами бактерий в аэробных условиях активные формы кислорода (АФК) образуются как побочный продукт активности ферментов дыхательной системы. Однако системы защиты от пероксида водорода (каталазы *KatG* и *KatE*, алкилгидропероксидредуктаза *AhpC*) и супероксид-аниона

(супероксиддисмутазы *MnSodA*, *FeSodB*, *CuSodC*) обеспечивают очень низкий базальный уровень АФК, не способный повредить ДНК, тем более что клетка содержит специальные ферменты, репарирующие окисленные азотистые основания в ДНК.

Обнаруженная нами сверхчувствительность мутантов $\Delta cydB$ и $\Delta cydD$ к антибиотикам указывает на критическую роль цитохромоксидазы *bd-I* в защите клетки от предполагаемого повышенного уровня генерации АФК при обработке бактерий антибиотиками. Для проверки этого предположения мы решили усилить экспрессию гена *katG*, кодирующего каталазу, – один из основных ферментов, обеспечивающих защиту клеток от действия АФК. С этой целью ген *katG* поместили под контроль сильного промотора P_{tet} , и полученную конструкцию перенесли в геном мутантов $\Delta cydB$ и $\Delta cydD$. Как следует из рис. 2 и 3, конститутивная экспрессия *katG* приводит к существенной супрессии бактерицидного действия антибиотиков на мутантов $\Delta cydB$ и $\Delta cydD$. Обращает на себя внимание тот факт, что сверхэкспрессия каталазы более эффективно супрессирует чувствительность к антибиотикам на фоне делеции $\Delta cydD$, чем при повреждении гена *cydB*.

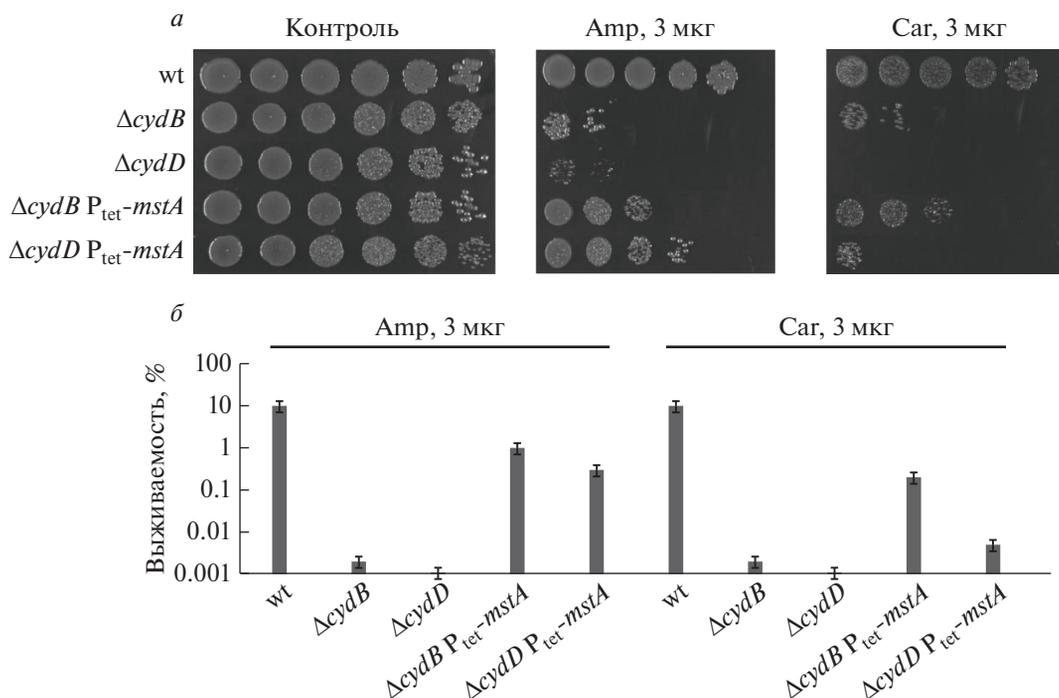


Рис. 5. Конститутивная экспрессия гена *mstA* супрессирует сверхчувствительность мутантов *cydB* и *cydD* к действию бета-лактамовых антибиотиков: ампициллина (Amp) и карбенициллина (Car). *a* – Эффективность образования колоний в присутствии антибиотиков определяли путем нанесения бактериальных суспензий из серии 10-кратных разведений на чашки с LB-средой, содержащей антибиотики в указанных концентрациях. *b* – Ночные культуры бактерий разводили в 100 раз и выращивали при аэрации и 37°C до титра 10^7 , обрабатывали антибиотиками в указанных концентрациях и продолжали выращивать в течение 90 мин, затем делали разведения и высевали пробы на чашки с LB-средой, которые помещали в термостат (37°C, 24 ч). Выживаемость определяли, как на рис. 2.

Аналогичный уровень супрессии наблюдается при внесении в хромосому гена *mstA* под контролем сильного промотора P_{tet}, что обеспечивает высокий уровень генерации внутриклеточного сероводорода (рис. 4 и 5). Ранее мы показали, что ген *mstA*, кодирующий 3-меркаптопируват-сульфидтрансферазу, играет ключевую роль в генерации эндогенного сероводорода и в условиях конститутивного синтеза обеспечивает защиту бактерий от окислительного стресса и антибиотиков [29, 31]. Главным механизмом защитного действия сероводорода является его способность титровать молекулы свободного железа в реакции Фентона, приводящей к генерации токсичного гидроксил-радикала [31]. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что важной составляющей бактерицидного действия используемых антибиотиков является генерация АФК.

Мутанты ΔcydB и ΔcydD характеризуются более высоким базальным уровнем генерации АФК

Уровень генерации АФК определяли с использованием плазмиды SoxS⁺::lux – специфического индуцируемого lux-биосенсора, позволяющего детектировать супероксид-анион [34]. Этой плаз-

мидой трансформировали клетки мутантов Δ*cydB* и Δ*cydD* и измеряли интенсивность биолюминесценции полученных штаммов в зависимости от времени инкубации (рис. 6). Как следует из данных, представленных на рис. 6, мутанты Δ*cydB* и Δ*cydD* характеризуются резким нарастанием интенсивности биолюминесценции по сравнению с бактериями дикого типа. Из этого следует, что повреждение цитохромоксидазы *bd-I* действительно сопровождается более высоким базальным уровнем генерации супероксидного аниона.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Бактериальная клетка содержит ферменты, осуществляющие защиту от АФК: каталазы (KatG и KatE) и алкилгидропероксидредуктаза AhpC разлагают пероксид водорода до сверхнизких концентраций, а супероксиддисмутаза SodA, SodB и SodC восстанавливают супероксид-анионы до кислорода и пероксида водорода, который в дальнейшем разлагается каталазами. Показано, что основной вклад в летальное действие пероксида водорода вносят присутствующие в клетке свободные ионы Fe²⁺ [50, 51]. В этом случае пероксид водорода

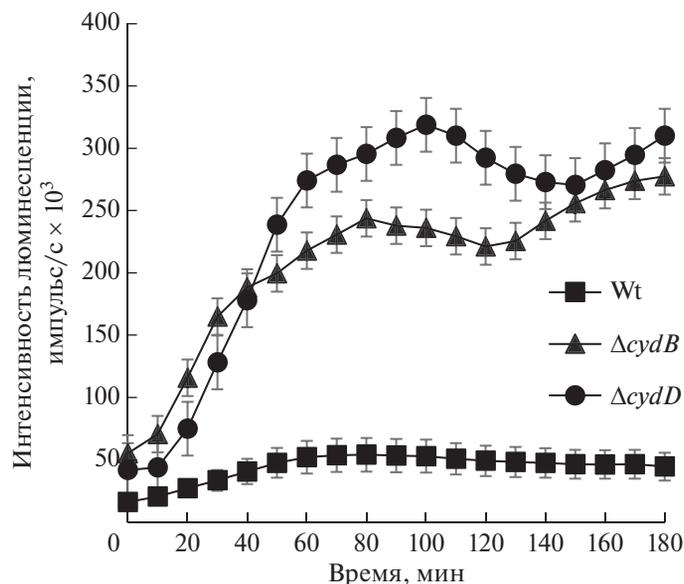


Рис. 6. Мутанты *cydB* и *cydD* обнаруживают повышенный уровень генерации супероксидного аниона по сравнению с бактериями дикого типа. Показана интенсивность люминесценции, обеспечиваемой плазмидой pSoxS':lux, в клетках мутантов *cydB* и *cydD*, и штамма MG1655 дикого типа.

в реакции с ионом железа (реакция Фентона) превращается в гидроксил-радикал OH[•]:



Радикал OH[•] характеризуется высокой стабильностью и способностью вызывать разрывы в цепи ДНК. Полученные нами данные позволяют заключить, что цитохромоксидаза *bd-I*, наряду с описанными выше ферментами, играет важную роль в защите клеток бактерий от окислительного стресса и бактерицидного действия антибиотиков. Кроме того, наши данные подтверждают концепцию о важном вкладе АФК в летальное действие бактерицидных антибиотиков на бактериальные клетки [41–48, 52]. Результаты нашей работы показывают, что цитохромоксидазу *bd-I* можно рассматривать как перспективную мишень для создания ингибиторов, обладающих антибактериальной активностью.

Авторы выражают благодарность Е.А. Нудлеру за ценные комментарии при обсуждении результатов настоящей работы.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Контракт в системе электронный бюджет № 075-10-2021-113, ID проекта: RF-193021X0001).

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

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Anraku Y., Gennis R.B. (1987) The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 262–266.
- Kranz R.G., Gennis R.B. (1983) Immunological characterization of the cytochrome *o* terminal oxidase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **258**, 10614–10621.
- Rice C.W., Hempfling W.P. (1978) Oxygen-limited continuous culture and respiratory energy conservation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **134**, 115–124.
- Georgiou C.D., Fang H., Gennis R.B. (1987) Identification of the *cydC* locus required for the expression of the functional form of the cytochrome *d* terminal oxidase complex in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 2107–2112.
- Poole R.K., Hatch L., Cleeter M.W.J., Gibson F., Cox G.B., Wu G. (1993) Cytochrome *bd* biosynthesis in *Escherichia coli*: the sequences of the *cydC* and *cydD* genes suggest that they encode the components of an ABC membrane transporter. *Mol. Microbiol.* **10**, 421–430.
- Borisov V.B., Forte E., Konstantinov A.A., Poole R.K., Sarti P., Giuffre A. (2004) Interaction of the bacterial terminal oxidase cytochrome *bd* with nitric oxide. *FEBS Lett.* **576**, 201–204.
- Mason M.G., Shepherd M., Nicholls P., Dobbin P.S., Dodsworth K.S., Poole R.K., Cooper C.E. (2009) Cytochrome *bd* confers nitric oxide resistance to *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 94–96.
- Lindqvist A., Membrillo-Hernandez J., Poole R.K., Cook G.M. (2000) Roles of respiratory oxidases in protecting *Escherichia coli* K12 from oxidative stress. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **78**, 23–31.
- Giuffre A., Borisov V.B., Arese M., Sarti P., Forte E. (2014) Cytochrome *bd* oxidase and bacterial tolerance

- to oxidative and nitrosative stress. *Biochim. Biophys. Acta.* **1837**, 1178–1187.
10. Борисов В.Б., Давлетшин А.И., Константинов А.А. (2010) Peroxidase activity of cytochrome *bd* from *Escherichia coli*. *Биохимия.* **75**, 520–530.
 11. Korshunov S., Imlay J.A. (2010) Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **75**, 1389–1401.
 12. Rice C.W., Hempfling W.P. (1978) Oxygen-limited continuous culture and respiratory energy conservation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **134**, 115–124.
 13. Cotter P.A., Chepuri V., Gennis R.B., Gunsalus R.P. (1990) Cytochrome *o* (*cyoABCDE*) and *d* (*cydAB*) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the *fnr* gene product. *J. Bacteriol.* **172**, 6333–6338.
 14. Fu H.-A., Iuchi S., Lin E.C.C. (1991) The requirement of ArcA and Fnr for peak expression of the *cyd* operon in *Escherichia coli* under microaerobic conditions. *Mol. Gen. Genet.* **226**, 209–213.
 15. Avetisyan A.V., Bogachev A.V., Murtasina R.A., Skulachev V.P. (1992) Involvement of a *d*-type oxidase in the Na⁺-motive respiratory chain of *Escherichia coli* growing under low ΔμH⁺ conditions. *FEBS Lett.* **306**, 199–202.
 16. Delaney J.M., Fayet O., Lipinska B., Yamamoto T., Georgopoulos C. (1992) *arc*-Dependent thermal regulation and extragenic suppression of the *Escherichia coli* cytochrome *d* operon. *J. Bacteriol.* **174**, 6554–6562.
 17. Delaney J.M., Wall D., Georgopoulos C. (1993) Molecular characterization of the *Escherichia coli* *htrD* gene: cloning, sequence, regulation, and involvement with cytochrome *d* oxidase. *J. Bacteriol.* **175**, 166–175.
 18. Ashcroft J.R., Haddock B.A. (1975) Synthesis of alternative membrane-bound redox carriers during aerobic growth of *Escherichia coli* in the presence of potassium cyanide. *Biochem. J.* **148**, 349–352.
 19. Brekasis D., Paget M.S. (2003) A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J.* **22**, 4856–4865.
 20. Bogachev A.V., Murtazina R.A., Skulachev V.P. (1993) Cytochrome *d* induction in *Escherichia coli* growing under unfavorable conditions. *FEBS Lett.* **336**, 75–78.
 21. Bogachev A.V., Murtazine R.A., Shestopalov A.I., Skulachev V.P. (1995) Induction of the *Escherichia coli* cytochrome *d* by low ΔμH⁺ and by sodium ions. *Eur. J. Biochem.* **232**, 304–308.
 22. Tamegai H., Kato C., Horikoshi K. (1998) Pressure-regulated respiratory system in barotolerant bacterium, *Shewanella* sp. strain DSS12. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* **1**, 213–220.
 23. Tamegai H., Kawano H., Ishii A., Chikuma S., Nakasone K., Kato C. (2005) Pressure-regulated biosynthesis of cytochrome *bd* in piezo- and psychrophilic deep-sea bacterium *Shewanella violacea* DSS12. *Extremophiles.* **9**, 247–253.
 24. Poole R.K., Williams H.D., Downie J.A., Gibson F. (1989) Mutations affecting the cytochrome *d*-containing oxidase complex of *Escherichia coli* K12: identification and mapping of a fourth locus, *cydD*. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 865–1874.
 25. Macinga D.R., Rather P.N. (1996) *aarD*, a *Providencia stuartii* homologue of *cydD*: role in 2'-*N*-acetyltransferase expression, cell morphology and growth in the presence of an extracellular factor. *Mol. Microbiol.* **19**, 511–520.
 26. Cook G.M., Loder C., Soballe B., Stafford G.P., Membrillo-Hernandez J., Poole R.K. (1998) A factor produced by *Escherichia coli* K-12 inhibits the growth of *E. coli* mutants defective in the cytochrome *bd* quinol oxidase complex: enterochelin rediscovered. *Microbiol.* **144**, 3297–3308.
 27. Siegele D.A., Kolter R. (1993) Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant defective in resuming growth after starvation. *Genes Dev.* **7**, 629–640.
 28. Siegele D.A., Imlay K.R., Imlay J.A. (1996) The stationary-phase-exit defect of *cydC* (*surB*) mutants is due to the lack of a functional terminal cytochrome oxidase. *J. Bacteriol.* **178**, 6091–6096.
 29. Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. (2011) H₂S: A universal defense against antibiotics in bacteria. *Science.* **334**, 986–990.
 30. Mironov A., Seregina T., Shatalin K., Nagornyykh M., Shakulov R., Nudler E. (2020) CydDC functions as a cytoplasmic cystine reductase to sensitize *Escherichia coli* to oxidative stress and aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 23565–23570.
 31. Mironov A., Seregina T., Nagornyykh M., Luhachack L., Korolkova L., Errais Lopes L., Kotova V., Zavilgelsky G., Shakulov R., Shatalin R., Nudler E. (2017) A mechanism of H₂S-mediated protection against oxidative stress in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, 6022–6027.
 32. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008.
 33. Datsenko K.A., Wanner B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 6640–6645.
 34. Котова В.Ю., Миронов А.С., Завильгельский Г.Б. (2014) Вклад активных форм кислорода в бактерицидное действие хинолонов – ингибиторов ДНК-гиразы. *Молекуляр. биология.* **48**(6), 990–998.
 35. Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. (2009) Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса. *Биотехнология.* №6, 16–25.
 36. Miller J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press.
 37. Zavilgelsky G.B., Kotova V.Y., Manukhov I.V. (2007) Action of 1,1-dimethylhydrazine on bacterial cells is determined by hydrogen peroxide. *Mutat. Res.* **634**, 172–176.
 38. Kita K., Konishi K., Anraku Y. (1984) Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. II. Purification and properties of cytochrome b558-d complex from cells grown with limited oxygen and evidence of branched electroncarrying systems. *J. Biol. Chem.* **259**, 3375–3381.
 39. Cruz-Ramos H., Cook G.M., Wu G., Cleeter M.W., Poole R.K. (2004). Membrane topology and mutational

- analysis of *Escherichia coli* CydDC, an ABC-type cysteine exporter required for cytochrome assembly. *Microbiology*. **150**, 3415–3427.
40. Luan G., Hong Y., Drlica K., Zhao X. (2018) Suppression of reactive oxygen species accumulation accounts for paradoxical bacterial survival at high quinolone concentration. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e01622-17.
 41. Malik M., Zhao X., Drlica K. (2006) Lethal fragmentation of bacterial chromosomes mediated by DNA gyrase and quinolones. *Mol. Microbiol.* **61**, 810–825.
 42. Dwyer D.J., Kohanski M.A., Hayele B., Collins J.J. (2007) Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* **3**, 91–106.
 43. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayele B., Lawrence C.A., Collins J.J. (2007) A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. **130**, 797–810.
 44. Wang X., Zhao X., Malik M., Drlica K. (2010) Contribution of reactive oxygen species to pathways of quinolone-mediated bacterial cell death. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 520–524.
 45. Dwyer D.J., Kohanski M.A., Collins J.J. (2009) Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 482–489.
 46. Wang X., Zhao X. (2009) Contribution of oxidative damage to antimicrobial lethality. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1395–1402.
 47. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J. (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 423–435.
 48. Belenky P., Collins J.J. (2011) Antioxidant strategies to tolerate antibiotics. *Science*. **334**, 915–916.
 49. Foti J.J., Devadoss B., Winkler J.A., Collins J.J., Walker G.C. (2012) Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science*. **336**, 315–319.
 50. Imlay J.A., Chin S.M., Linn S. (1988) Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science*. **240**, 640–642.
 51. Park S., You X., Imlay J.A. (2005) Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx7 mutants of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 9317–9322.
 52. Zhao X., Drlica K. (2014) Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress. *Curr. Opin. Microbiol.* **21**, 1–6.

INACTIVATION OF TERMINAL OXIDASE *bd-I* LEADS TO SUPERSENSITIVITY OF *E. coli* TO ANTIBIOTICS OF QUINOLONE AND BETA-LACTAM CLASSES

T. A. Seregina¹, *, K. V. Lobanov¹, R. S. Shakulov¹, and A. S. Mironov¹

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

*e-mail: tatyana.s82@gmail.com

In *E. coli* cells terminal oxidase *bd-I* encoding by *cydAB* genes catalyzes the reduction of O₂ to water by using hydroquinone as electron donor. In addition to the *cydAB* operon, the two other genes, *cydC* and *cydD* encoding heterodimeric ATP-binding cassette-type transporter are essential for the assembly of cytochrome *bd-I*. It was shown that inactivation of cytochrome *bd-I* by introduction of *cydB* or *cydD* deletions into *E. coli* chromosome leads to supersensitivity of bacteria to antibiotics of quinolone and beta-lactam classes. The sensitivity of these mutants to antibiotics is partially suppressed by introduction into their genome constitutive expressing *katG* gene under the control of P_{tet} promoter. To the same effect leads increased level of hydrogen sulfide as a result of introduction of *mstA* gene encoding 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase under the control of P_{tet} promoter. The data obtained demonstrate the important role of cytochrome *bd-I* in defence of bacteria from oxidative stress and bactericidal antibiotics.

Ключевые слова: *E. coli*, terminal oxidase *bd-I*, *cydB* и *cydD* deletions, supersensitivity to antibiotics, oxidative stress, catalase KatG, hydrogen sulfide

УДК 577.214.6

Rpn4p БЕЗ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА ОБЕСПЕЧИВАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ *Saccharomyces cerevisiae* К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ И ЦИКЛОГЕКСИМИДУ

© 2022 г. Д. С. Карпов^{а, *}, Д. С. Спаская^а, В. В. Тютяева^а, В. Л. Карпов^б^аЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия^бИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: aleom@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.02.2022 г.

После доработки 09.03.2022 г.

Принята к публикации 09.03.2022 г.

Убиквитин-протеасомная система участвует в контроле всех основных молекулярных процессов в норме и реакции клеток на стрессовые воздействия. Rpn4p служит ключевым транскрипционным регулятором протеасомы у дрожжей класса *Saccharomycetes* и участвует также в ответе клеток на различные стрессовые воздействия. Помимо протеасомных генов, Rpn4 влияет на экспрессию нескольких сотен других, включая гены, вовлеченные в репарацию ДНК и ответ на окислительный стресс. В то же время молекулярные механизмы, используемые Rpn4 в контроле генов-мишеней и функционировании как регулятора ответа клеток на стрессовые условия, остаются во многом неясными. Цель работы состояла в определении доменов Rpn4, необходимых для обеспечения устойчивости клеток к стрессовым воздействиям. Показано, что N-концевая и центральная части белка, содержат участки, необходимые для устойчивости ко всем видам стресса. Предполагаемый сигнал ядерной локализации не влияет на функционирование Rpn4. Неожиданно белок с делецией обоих мотивов “цинковых пальцев”, образующих ДНК-связывающий домен, обеспечивал устойчивость дрожжей к окислительному стрессу и циклогексимиду. Более того, нами показано, что Rpn4 может привлекаться к промоторным областям регулируемых им генов даже в том случае, если они не содержат его сайтов связывания. На основании полученных данных можно предполагать, что Rpn4 участвует в регуляции генов и ответе клеток на стресс за счет белок-белковых взаимодействий.

Ключевые слова: Rpn4p, делеционный анализ, ДНК-связывающий домен, окислительный стресс**DOI:** 10.31857/S002689842204005X

Убиквитин-протеасомная система (УПС) включает в себя семейство ферментов, распознающих белковые субстраты и модифицирующих их ковалентно цепями небольшого белка убиквитина (масса около 8.5 кДа), и мультисубъединичный АТР-зависимый протеиназный комплекс – протеасому, куда доставляются полиубиквитинированные субстраты и где происходит отщепление от них полиубиквитиновых цепей, разворачивание белков и их расщепление до пептидов [1]. Основные функ-

ции УПС заключаются в контроле активности регуляторных белков и расщеплении белков, структура которых нарушена вследствие ошибок в экспрессии генетической информации или под действием стрессовых условий [2]. УПС участвует в протекании всех основных клеточных процессов и необходима в клеточном ответе на различные виды стресса. Нарушение функционирования УПС влечет развитие тяжелых нейродегенеративных заболеваний, дистрофию мышц, нарушение иммунно-

Сокращения: УПС – убиквитин-протеасомная система; 3-АТ (3-amino-1,2,4-triazol) – 3-амино-1,2,4-триазол; CAD (C-terminal acidic domain) – С-концевой “кислый домен”; CZnF (C-terminal zinc finger domain) – С-концевой домен “цинкового пальца”; DamID (Dam identification) – метод картирования участков генома, взаимодействующих с белками, с использованием ДНК-метилазы *Escherichia coli*; MACE (*MAGI*-associated control element) – регуляторный элемент, ассоциированный с геном *MAGI*; NAD (N-terminal acidic domain) – N-концевой “кислый домен”; NLS (nuclear localization signal) – сигнал ядерной локализации; NTAD (N-terminal transactivation domain) – N-концевой трансактиваторный домен; NZnF (N-terminal zinc finger domain) – N-концевой домен “цинкового пальца”; PACE (proteasome associated control element) – регуляторный элемент, ассоциированный с протеасомными генами; RACE (*RPN8*-associated control element) – регуляторный элемент, ассоциированный с геном *RPN8*; Rpn (regulatory particle non-ATPase) – не-АТФазная субъединица регуляторного комплекса протеасомы; Rpt (regulatory particle triple-A protein) – АТФазная субъединица регуляторного комплекса протеасомы; а.о. – аминокислотный остаток.

го ответа и т.д. [2]. Активность УПС контролируется на различных уровнях, включая экспрессию генов. Так, активность протеасом у всех эукариот регулируется по механизму отрицательной обратной связи с участием Rpn4-подобных факторов транскрипции у низших эукариот (дрожжей) [3, 4] или факторов транскрипции высококонсервативного семейства Cap-N-Collar у высших эукариот [5]. Следует отметить, что экспрессия протеасомных генов регулируется координированно и большая часть промоторных областей этих генов содержит сайты связывания соответствующих факторов [6]. У дрожжей класса *Saccharomycetes* Rpn4-подобные факторы транскрипции взаимодействуют с довольно консервативными элементами, называемыми PACE (Proteasome-Associated Control Element) за счет С-концевого ДНК-связывающего домена, содержащего два “цинковых пальца” [3, 4, 7]. В N-концевой и центральной части Rpn4p нами и другими авторами картированы трансактиваторные домены [8–10]. Ранее М. Nelson и соавт. [11] предположили, что фрагмент полипептидной цепи 381–398 этого белка представляет собой сигнал ядерной локализации Rpn4p и экспериментально показали локализацию Rpn4p в ядре.

Помимо протеасомных генов Rpn4p участвует в регуляции экспрессии нескольких сотен других дрожжевых генов [12], по-видимому, используя при этом как PACE, так и PACE-подобные элементы, обозначенные как MACE (*MAG1*-associated control element) и RACE (*RPN8*-associated control element) [13], а также укороченную GC-богатую часть сайта связывания – так называемый PACE-core [14]. В частности, нами показана Rpn4-зависимая регуляция экспрессии генов нескольких путей репарации ДНК [15, 16], а также генов, вовлеченных в ответ клеток на окислительный стресс [17]. Нами и другими авторами показано, что Rpn4 участвует в клеточном ответе на различные виды стресса, включая ДНК-повреждающие агенты, тяжелые металлы, аналоги аминокислот, циклогексимид, окислительные агенты [10, 16–18]. Несмотря на успехи в изучении структуры и функций Rpn4p, до сих пор не выяснены молекулярные механизмы, которые этот фактор задействует для выполнения роли регулятора транскрипции, а также регулятора клеточного ответа на стрессовые воздействия.

Цель представленной работы заключалась в идентификации доменов Rpn4p, необходимых для обеспечения устойчивости клетки к действию солей тяжелых металлов, окислительному стрессу и циклогексимиду.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы и условия их выращивания. В работе использовали штаммы *Saccharomyces cerevisiae*

334t *rpn4*-Δ (MATα, *pep4*-3, *prb1*-1122, *ura3*-52, *leu2*-3,112, *reg1*-501, *gal1*, *rpn4*::*G418*) с делецией гена *RPN4* [8], штамм дикого типа BY4742 (MATα, *his3D1*, *leu2D0*, *lys2D0*, *ura3D0*) (“Euroscarf”, Германия) и производные от него мутантные штаммы *rpn4*-Δ (BY4742 YDL020c::kanMX4) (“Euroscarf”) и YPL (BY4742 *pre1*-8 nat+) [15], а также штамм PJ69-4A (MATα, *trp1*-901, *leu2*-3,112, *ura3*-52, *his3*-200, *gal4*-Δ, *gal80*-Δ, *LYS2*::*GAL1*-*HIS3*, *GAL2*-*ADE2*, *met2*::*GAL7*-*lacZ*) [19]. Дрожжевые культуры растили при 30°C на среде YPD (2% глюкозы, 2% пептона, 1% дрожжевого экстракта) и трансформировали, используя литий-ацетатный метод [20]. Штаммы, трансформированные экспрессионными плазмидами, выращивали в минимальной среде, содержащей YNB (6.7 г/л), смесь 20 аминокислот, глюкозу (2%), а также козаминовые кислоты (0.5%) без добавления урацила. В случае двугибридной системы дрожжевые трансформанты растили на селективной среде без триптофана, лейцина, гистидина и аденина. Использовали компоненты питательных сред производства “Sigma” (США). Плазмиды, использованные в работе, описаны в табл. 1.

Получение плазмид pPRPN4ΔNLS и pPRPN4ΔNZnF. Варианты гена *RPN4*, содержащие делецию предполагаемого сигнала ядерной локализации и N-концевого “цинкового пальца”, получали путем двухстадийного сайт-направленного мутагенеза с помощью высокоточной ДНК-полимеразы KAPA HiFi (“Roche Molecular Systems, Inc.”, США), используя пары праймеров *RPN4*-NcoI-F/*RPN4*-ΔNLS-R и *RPN4*-ΔNLS-F/*Rpn4*-XhoI-R и *RPN4*-NcoI-F/*RPN4*-ΔNZnF-R и *RPN4*-ΔNZnF-F/*Rpn4*-XhoI-R (табл. 2) соответственно. Полученные ПЦР-фрагменты очищали с использованием набора GeneJET PCR Purification Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) и клонировали в вектор pPDX2 по сайтам эндонуклеаз BamHI и XhoI. Отсутствие посторонних мутаций и наличие целевых делеций в последовательностях клонированных фрагментов проверяли секвенированием.

Двугибридная дрожжевая система. Гены *RPN2*, *NAS2* и *RPN4* амплифицировали с геномной ДНК дрожжей с помощью высокоточной ДНК-полимеразы KAPA HiFi (“Roche Molecular Systems, Inc.”), используя пары праймеров *RPN2*-EcoRI-F/*RPN2*-XhoI-R, *NAS2*-NcoI-F/*XhoI*-R и *RPN4*-NcoI-F/*RPN4*-XhoI-R. Полученные ПЦР-фрагменты очищали с помощью набора GeneJET PCR Purification Kit (“Thermo Fisher Scientific”). ПЦР-фрагмент гена *RPN2* обрабатывали эндонуклеазой EcoRI и XhoI и клонировали в векторы pGBT9 и pGAD424, гидролизованные по сайтам эндонуклеаз EcoRI и SalI. Сайты XhoI и SalI после гидролиза соответствующими эндонуклеазами образуют комплементарные липкие концы. Отсутствие посторонних мутаций в последовательностях кло-

Таблица 1. Плазмиды, использованные в работе

Название плазмиды	Описание плазмиды	Источник
pRS426	Высококопийный (2 μ) шаттл-вектор для клонирования	[21]
YCpLac33	Низкокопийный (CEN) шаттл-вектор для клонирования	[22]
Ycp-Ub-dam	Вектор YCpLac33, кодирующий Dam-метиразу <i>Escherichia coli</i> с присоединенным убиквитинзависимым дегроном Rpn4p	[23]
YCp-GDR	Вектор YCpLac33, кодирующий Rpn4p, к которому с N-конца присоединена Dam-метиლაза; экспрессия химерного гена контролируется промотором <i>GAL1</i>	[23]
YCp-GDR-C/A	Вектор YCpLac33, кодирующий мутантный Rpn4p с заменой кодонов цистеина на кодоны аланина в позициях 450, 477, 480, к которому с N-конца присоединена Dam-метиლაза	[23]
YCp-GDR- Δ NCZnF	Вектор YCpLac33, кодирующий мутантный Rpn4p с делецией ДНК-связывающего домена, к которому с N-конца присоединена Dam-метиლაза	Данная работа
pPDX2-GAL	Высококопийный дрожжевой экспрессионный шаттл-вектор	[24]
pPRPN4	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий полноразмерный белок Rpn4p под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 Δ 56	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией 56 N-концевых а.о., под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 Δ 109	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией 109 N-концевых а.о., под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 Δ 151	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией 151 N-концевых а.о., под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 Δ 180	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией 180 N-концевых а.о., под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 Δ 210	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией 210 N-концевых а.о., под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 Δ NAD	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией N-кислого домена под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 Δ CAD	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией C-кислого домена под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 Δ NCAD	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией обоих кислых доменов, включая участок между ними, под контролем <i>GAL1</i> промотора	[8]
pPRPN4 Δ NLS	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией предполагаемого сигнала ядерной локализации под контролем <i>GAL1</i> промотора	Данная работа
pPRPN4 Δ NZnF	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией предполагаемого N-цинкового пальца под контролем <i>GAL1</i> промотора	Данная работа
pPRPN4 Δ NCZnF	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с делецией обоих цинковых пальцев под контролем <i>GAL1</i> промотора	[25]
pPRPN4(4K-R)	Вектор pPDX2-GAL, кодирующий Rpn4p с заменой четырех остатков лизина на остатки аргинина в главном N-концевом трансактиваторном домене	[8]

Таблица 1. Окончание

Название плазмиды	Описание плазмиды	Источник
pGBT9	Дрожжевой вектор двугибридной системы, кодирующий ДНК-связывающий домен фактора транскрипции Gal4p	“Takara Bio”, Saint-Germain-en-Laye, Франция
pGAD424	Дрожжевой вектор двугибридной системы, кодирующий трансактиваторный домен фактора транскрипции Gal4p	“Takara Bio”, Saint-Germain-en-Laye, Франция
pGBT-Su(Hw)	Вектор pGBT9 с геном белка Su(Hw) <i>Drosophila melanogaster</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим ДНК-связывающий домен Gal4p	[26]
pGAD-mod	Вектор pGAD424 с геном белка Mod(mdg4)-67.2 <i>D. melanogaster</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим трансактиваторный домен Gal4p	[26]
pGBT10	Вектор, производный от pGBT9 и содержащий сайт NcoI	Данная работа
pGAD425	Вектор, производный от pGAD424 и содержащий сайт NcoI	Данная работа
pGBT-Rpn2	Вектор pGBT9 с геном <i>RPN2</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим ДНК-связывающий домен Gal4p	Данная работа
pGAD-Rpn2	Вектор pGAD424 с геном <i>RPN2</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим трансактиваторный домен Gal4p	Данная работа
pGBT-Nas2	Вектор pGBT10 с геном <i>NAS2</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим ДНК-связывающий домен Gal4p	Данная работа
pGAD-Nas2	Вектор pGAD425 с геном <i>NAS2</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим трансактиваторный домен Gal4p	Данная работа
pGBT-Rpn4	Вектор pGBT10 с геном <i>RPN4</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим ДНК-связывающий домен Gal4p	Данная работа
pGAD-Rpn4	Вектор pGAD425 с геном <i>RPN4</i> , клонированным в одной рамке считывания с участком, кодирующим трансактиваторный домен Gal4p	Данная работа

нированных фрагментов проверяли секвенированием. Полученные плазмиды назвали pGBT-Rpn2 и pGAD-Rpn2 (табл. 1).

Перед клонированием генов *NAS2* и *RPN4* в векторы двугибридной системы ввели сайт NcoI. Векторы pGAD424 и pGBT9 обрабатывали эндонуклеазой EcoRI и лигировали с двухцепочечным олигонуклеотидом, имеющим липкие концы, комплементарные EcoRI, и образованным путем отжига олигонуклеотидов – pGAD-GBT-iMCS-F/pGAD-GBT-iMCS-R. Наличие вставки олигонуклеотида проверяли путем рестрикционного анализа по сайтам NcoI и PvuI с последующим секвенированием. Полученные плазмиды назвали pGAD425 и pGAD10. ПЦР-фрагменты генов *NAS2* и *RPN4* очищали набором GeneJET PCR Purification Kit (“Thermo Fisher Scientific”), обрабатывали эндонуклеазами NcoI и XhoI и клонировали в модифицированные векторы дву-

гибридной системы, обработанные эндонуклеазами NcoI и SalI. Отсутствие посторонних мутаций в последовательностях клонированных фрагментов проверяли секвенированием. Полученные плазмиды назвали pGBT-Rpn4, pGBT-Nas2, pGAD-Rpn4 и pGAD-Nas2 (табл. 1).

Штамм PJ69-4а котрансформировали парой плазмид, производных векторов pGBT9 и pGAD424, с помощью стандартного литий-ацетатного метода [20]. Колонии выращивали на селективной среде без триптофана и лейцина. Затем колонии рассеивали штрихом на чашках Петри с агаризованной селективной средой без триптофана, лейцина, гистидина и аденина в присутствии 5 мМ 3-амино-1,2,4-триазола (3-АТ) в качестве ингибитора фоновой активации экспрессии гена *HIS3*. Чашки инкубировали при 30°C в течение 2–3 суток.

Определение устойчивости дрожжей к стрессовым условиям путем выращивания серийных разведений дрожжевой культуры на чашках Петри. Дрожжевые культуры растили до стационарной фазы в течение ночи при 30°C. Культуры разводили до конечной оптической плотности $OD_{600} = 1$, готовили пятикратные разведения и высевали на твердую селективную среду с добавлением стрессовых агентов в виде капель объемом 5 мкл. В контроле штаммы растили на среде без добавления стрессовых агентов. Устойчивость к стрессу исследуемых дрожжевых штаммов определяли качественно по скорости формирования колоний при 30°C.

Определение активности Dam-метилазы (DamID). Плазмиду YCr-GDR- Δ NCZnF, кодирующую химерный белок Dam-Rpn4 Δ NCZnF с делецией ДНК-связывающего домена, получали путем клонирования ПЦР-фрагмента гена *RPN4*, полученного с праймерами RPN4-NcoI-F и RPN4- Δ NCZnF-R, в плазмиду YCr-GDR по сайтам NcoI и XhoI. Отсутствие посторонних мутаций в последовательностях клонированных фрагментов проверяли секвенированием.

Клетки штамма *rpn4- Δ* , продуцирующие Dam-метилазу, соединенную с убиквитинзависимым деградом Rpn4 (U-dam), гибридный белок Dam-Rpn4 или гибридные белки Dam-Rpn4-C/A и Dam-Rpn4 Δ NCZnF с нарушенной ДНК-связывающей активностью Rpn4, растили при 30°C до оптической плотности 1–1.5 при длине волны 600 нм. Из полученной культуры выделяли геномную ДНК с использованием смеси фенол-хлороформ [27]. Далее 1 мкг геномной ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции MboI (“Thermo Fisher Scientific”) в концентрации 1 ед./мкл не менее 18 ч при 37°C. Обработанную ДНК амплифицировали методом ПЦР в реальном времени с праймерами, фланкирующими исследуемый GATC-сайт. Референтной последовательностью служил фрагмент гена *RPT6*, не содержащий сайтов GATC. Использованные в работе праймеры указаны в табл. 2. Каждую реакцию проводили в трех технических повторях на приборе LightCycler 480-II (“Roche Diagnostics”, США) в присутствии флуоресцентного красителя Eva Green (“Синтол”, Россия). Метилирующую активность (*R*) определяли по соотношению сигналов от обработанной и необработанной ферментом пробы. Относительную метилирующую активность (R_{rel}) определяли как соотношение метилирующих активностей Dam-Rpn4, или Dam-Rpn4-C/A, или Dam-Rpn4 Δ NCZnF к U-dam. Разброс данных рассчитывали по ранее описанной методике [23].

ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ). Относительные уровни мРНК интересующих генов определяли с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени, как описано ранее [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Картирование доменов Rpn4p, обеспечивающих устойчивость дрожжей к стрессовым факторам

Ранее нами проведен делеционный анализ *RPN4* и оценена роль участков этого фактора в активации транскрипции протеасомных генов [8, 25]. Теперь полученный ранее набор мутантных производных *RPN4* дополнен вариантами с делецией предполагаемого сигнала ядерной локализации (участок, кодирующий аминокислотные остатки 381–398) и N-концевого домена “цинковых пальцев” (участок, кодирующий аминокислотные остатки 444–468) (рис. 1а). В предыдущих работах картирование важных участков Rpn4p проводили в нормальных условиях роста дрожжей. Теперь основной задачей было определение участков Rpn4p, необходимых для обеспечения устойчивости дрожжевых клеток к различным стрессовым воздействиям, а именно: окислительному стрессу, вызванному действием перекиси водорода, ацетату кадмия и ингибитору трансляции – циклогексимида. Согласно полученным данным (рис. 1б), как и ожидалось, продукция полноразмерного белка Rpn4p, его более активного производного Rpn4(4K-R) с заменой лизинов на аргинины в N-концевом трансактиваторном домене (NTAD) [8] или варианта с делецией N-концевого кислого домена (NAD), служащего убиквитинзависимым сигналом деградации Rpn4p [28], восстанавливает устойчивость мутантного штамма с делецией гена *RPN4*, ко всем стрессовым воздействиям. Делеция участка, состоящего из первых 56 аминокислот (Rpn4 Δ 56), который входит в состав N-концевого сигнала убиквитиннезависимой деградации Rpn4p [29], лишь немного снижает защитную функцию Rpn4p.

Неожиданно дальнейшая делеция N-концевого домена Rpn4p привела к полной потере устойчивости дрожжей ко всем видам стресса, несмотря на то, что форма Rpn4 Δ 109 сохраняла довольно высокую транскрипционную активность в отношении протеасомных генов [8]. Далее, хотя делеция 210 N-концевых а.о. полностью инактивировала Rpn4p в отношении транскрипции протеасомных генов [8, 25], мутантный вариант защищал клетки от действия окислительного стресса и кадмия. Следует отметить, что вариант с делецией 180 а.о. не обеспечивал защиту дрожжей от действия кадмия и окислительного стресса. Эти данные указывают на то, что между 180 и 210 а.о. может находиться репрессорный домен, действующий в отношении непротеасомных генов-мишеней Rpn4p. Ранее нами и другими авторами выявлена способность Rpn4p функционировать в качестве репрессора транскрипции [12, 30]. Делеция C-концевого кислого домена (CAD), функционирующего как трансактиваторный домен [8], ожидаемо подавляла устойчивость дрожжей к

Таблица 2. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Олигонуклеотид	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'	Источник
Клонирование делеционных форм <i>RPN4</i>		
RPN4-NcoI-F RPN4-XhoI-R RPN4-ΔNLS-F RPN4-ΔNLS-R RPN4-ΔNZnF-F RPN4-ΔNZnF-R	AGAGAGAGAC CCATGG CTTCTACGGAACTTAGT ^a ACACACAGAC CTCGAG ACGGGGGTAAGTATATAATATAAT AACGGCACATTAGAAAATTATACTAAGAAGCACTTA CTTAGTATAATTTTCTAATGTGCCGTTTTTCATT GATAATGAATGCTAAAAGGAAGATTGTCTTC TCSTTTTAGCATTCAATTATCTGACACGTAA	Данная работа
RPN4-ΔNCZnF-R	CGACTGACG CTCGAG TTAATTCATTATCTGACACGTAA	[25]
Клонирование генов в векторы дрожжевой двугибридной системы		
RPN2-EcoRI-F RPN2-XhoI-R NAS2-NcoI-F NAS2-XhoI-R pGAD-GBT-iMCS-F pGAD-GBT-iMCS-R	GAGAGAGA AGAATT CTCTTTGACGACTGCTGCTCCT GAGAGAGA ACTCGAG CTAAGCACTAGGGAAGTCGAC CAGAGAC CATGG AGGAAGAAGATTAAGT TACTG CCTCGAG TTATAGCTCTTGATCCTACAACC AATTG ACCATGG CACATATGACACCACA ACTCGAGG AATTCCTCGAGTTGTGGTGT CATATGTGCCATGGTC	Данная работа
DamID ^b		
RPT6-ND-F RPT6-ND-R ACT1+880-F ACT1+880-R ADH1-251-F ADH1-251-R RPT6-545-F RPT6-545-R	TAAACGTGAAGGACTTAAAG CTTTTTCCACCATCATCAAC GATGTCACGGACAATTTCTC CTGGTTTCTCTCTACCTCAC CAAGAACCGTTCAACCATTTG CGTTAAATACTCTGGTGTCTG CTACAGTTCTGAATTTGAGC GACCAAATCTGAATAATCACG	[23]
CLN1+300-F CLN1+300-R CLN2+319-F CLN2+319-R	GTATCAACTTTCAGTGATGAC CTTGGTCSTTTAACACTACTC GCATAATAGTTACCAGAGTCG CCTACTGAAAAACGGAAAGG	Данная работа
ПЦР в реальном времени		
PDA1-EX-RT-F PDA1-EX-RT-R CLN2+319-F CLN2+319-R	AGTTTGCTAAGGACTGGTGTGTC AATTGGATCGTTCTTGGATC GCATAATAGTTACCAGAGTCG CCTACTGAAAAACGGAAAGG	Данная работа

^a Жирным шрифтом выделены сайты эндонуклеаз рестрикции. ^b DamID – метод картирования участков генома, взаимодействующих с белками, с использованием ДНК-метилазы *Escherichia coli*.

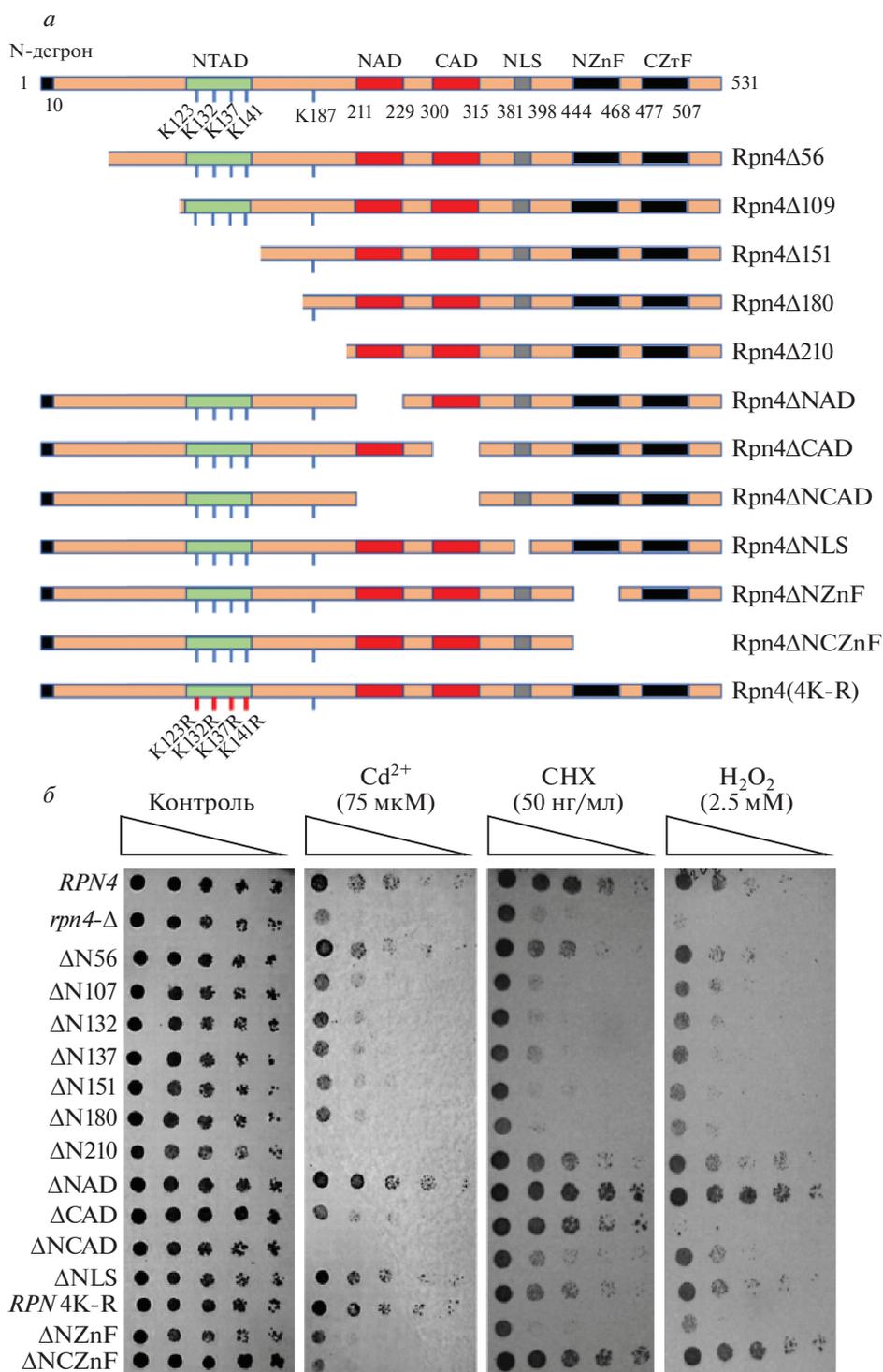


Рис. 1. Определение участков Rpn4p, обеспечивающих устойчивость дрожжей к стрессу. *a* – Схема положения делеций в Rpn4p. *b* – Результаты теста на устойчивость к стрессовым агентам штамма 334t *rpn4-Δ*, синтезирующего делеционные формы Rpn4p. Представлены фотографии репрезентативных чашек Петри после инкубации в течение 2 или 3 суток. В качестве положительного контроля использовали мутантный штамм *rpn4-Δ*, трансформированный плазмидой, кодирующей полноразмерный ген *RPN4* (самый верхний ряд разведений), а в качестве отрицательного контроля – штамм *rpn4-Δ*, трансформированный вектором pPDX2 (второй ряд разведений сверху). CHX – циклогексимид.

окислительному стрессу и кадмию, но при этом защитные свойства в отношении циклогексимида сохранялись. Делеция центральной части бел-

ка, включающей оба кислых домена и участок между ними, инактивировала фактор в случае действия кадмия и значительно ослабляла при

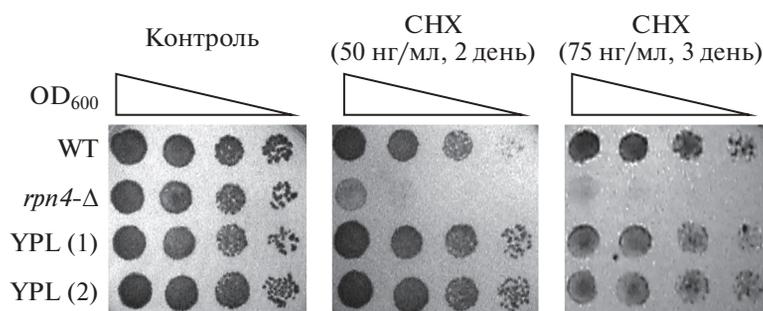


Рис. 2. Проверка устойчивости к циклогексимиду (СНХ) штаммов дикого типа и мутантов с нарушенной функцией протеасомы. Представлены фотографии репрезентативных чашек Петри после инкубации в течение 2 или 3 суток при 30°C. В эксперименте использованы штамм дикого типа BY4742 (WT), производный от него вариант с делецией гена *RPN4* (*rpn4-Δ*) и две независимые колонии штамма YPL с нарушенной Rpn4-зависимой регуляцией экспрессии гена *PRE1*, кодирующего субъединицу 20S протеолитического комплекса протеасомы.

воздействию циклогексимида и окислительного стресса. Можно предположить, что полной инактивации не происходит из-за наличия NTAD у этих делеционных вариантов белка. На основании этих данных можно говорить о том, что делеция предполагаемого сигнала ядерной локализации Rpn4p не влияет на его функции, а также предположить наличие в его структуре еще одного сигнала ядерной локализации или возможность его транспорта в ядро в качестве белка, ассоциированного с протеасомой [4, 29]. Наиболее значимым и неожиданным результатом оказалось то, что при полной делеции ДНК-связывающего домена Rpn4p дрожжи сохраняют устойчивость к циклогексимиду и перекиси водорода, но становятся чувствительными к кадмию. Следует отметить, что при этом удаление N-концевого “цинкового пальца” с сохранением С-концевого “цинкового пальца” инактивировало Rpn4p в отношении всех видов стресса. Таким образом, для функционирования Rpn4p как антистрессорного фактора необязательно наличие ДНК-связывающего домена. Возможно, в этом случае Rpn4p вовлечен в белок-белковые взаимодействия.

Мутантный штамм с нарушенной экспрессией субъединицы 20S протеасомы проявляет повышенную устойчивость к циклогексимиду

Ранее при поиске мутаций, вызывающих сверхустойчивость к циклогексимиду, выявлены штаммы с мутациями в генах 20S протеолитического субкомплекса протеасомы [31]. Поскольку Rpn4p с делецией ДНК-связывающего домена не активирует транскрипцию протеасомных генов [8, 25], интересно было выяснить, способен ли мутантный штамм YPL с нарушенной Rpn4-зависимой регуляцией гена субъединицы *PRE1* [15] проявлять сверхустойчивость к циклогексимиду. Согласно полученным результатам (рис. 2), штамм YPL проявлял повышенную устойчивость к циклогек-

симиду по сравнению со штаммом дикого типа при концентрации циклогексимида 50 нг/мкл. Однако при более высокой концентрации циклогексимида, 75 нг/мкл, разница в скорости формирования колоний мутанта и дикого типа отсутствовала. Ранее U. Gerlinger и соавт. сообщали [31], что не все мутации, в частности в гене *PRE1*, ведут к четко выраженному фенотипу сверхустойчивости к циклогексимиду. Как правило, таким фенотипом обладают штаммы, несущие мутации одновременно в двух генах (например, *pre1-1 pre4-1*), что соответствует очень сильному нарушению протеасомзависимого протеолиза. Можно отметить, что в штамме 334t *rpn4-Δ* нарушена деградация белков в двух внутриклеточных протеолитических системах: УПС (отсутствие трансаактиватора) и аутофагии (отсутствие ключевой протеазы Prb1p, обеспечивающей активацию других протеаз в аутофагосомах [32]). Возможно, такое серьезное нарушение внутриклеточного протеолиза функционально соответствует двойным мутациям в протеасомных генах и вносит вклад в наблюдаемый фенотип устойчивости к циклогексимиду в присутствии Rpn4Δ210 и Rpn4ΔNCZnF.

Rpn2p и Nas2p не взаимодействуют с Rpn4 в двугибридной дрожжевой системе

Полученные нами данные указывают на то, что нарушение экспрессии протеасомных генов вряд ли служит основным механизмом, посредством которого мутант Rpn4ΔNCZnF обеспечивает устойчивость дрожжей к стрессу. Логично предположить, что в отсутствие ДНК-связывающей активности мутантный Rpn4p функционирует за счет взаимодействия с белками-партнерами и белковыми комплексами. Ранее показано, что Rpn4p может очищаться вместе с протеасомой [33] и способен связываться с отдельными субъединицами 19S регуляторного комплекса протеасомы, включая Rpn2p [4, 29]. Кроме того, в мас-

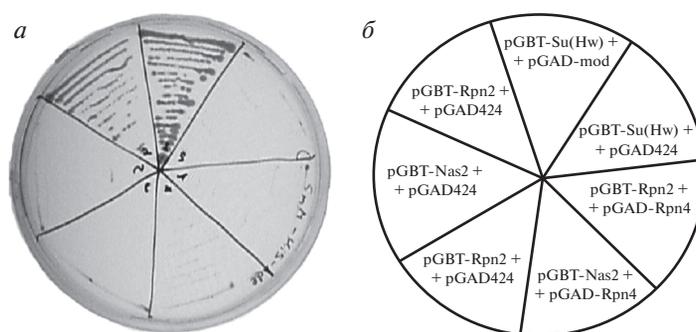


Рис. 3. Анализ взаимодействия Rpn4p с субъединицей 19S регуляторного комплекса протеасомы Rpn2p и шапероном Nas2p в дрожжевой двугибридной системе. *a* – Фотография репрезентативной чашки Петри. *б* – Схема комбинаций плазмид, использованных при трансформации дрожжей. Штамм PJ69-4a, трансформированный комбинацией плазмид pGBT-Su(Hw) и pGAD-mod, служил положительным контролем наличия белок-белковых взаимодействий.

штабных исследованиях белок-белковых взаимодействий показано, что Rpn4p физически взаимодействует с Nas2p [34], который служит одним из специализированных шаперонов, обеспечивающих сборку 19S регуляторного субкомплекса протеасомы [35]. Чтобы проверить полученные ранее данные о взаимодействии Rpn4p с Rpn2p и Nas2p, мы использовали дрожжевую двугибридную систему. Положительным контролем служили конструкции, продуцирующие белки Su(Hw) и Mod(mdg4), взаимодействие между которыми в двугибридной системе показано ранее [26]. Согласно полученным данным (рис. 3а), Rpn4p, будучи соединенным с ДНК-связывающим доменом Gal4p, может активировать экспрессию репортерных генов и в отсутствие белка-партнера с трансаактиваторным доменом. Очевидно, это происходит благодаря наличию собственных трансаактиваторных доменов Rpn4p. В парах pGBT-Rpn2/pGAD425-Rpn4 и pGBT-Nas2/pGAD425-Rpn4 не выявлено активации репортерных генов, что выражается в отсутствии роста дрожжевых колоний на селективной среде. Следует отметить, что дрожжи росли в присутствии 5 мМ 3-АТ, — чтобы надежно подавлять фоновую активацию репортерных генов. Полученные нами данные согласуются с результатами систематического анализа, проведенного G. Cagneu и др. [36], по взаимодействию между субъединицами протеасомы в дрожжевой двугибридной системе. Авторы тоже не обнаружили продуктивного взаимодействия между Rpn4p и Rpn2p при использовании 3-АТ, но выявили взаимодействие Rpn4p со структурной субъединицей 20S протеасомы Rpn7p. Однако позже S. На и соавт. [29] с помощью высокочувствительного метода переноса биотиновой метки показали взаимодействие Rpn4p *in vitro* с такими субъединицами 19S регуляторного комплекса протеасомы, как Rpn2p, Rpn5p, Rpn1p и Rpn6p. Можно предположить, что выявленные взаимодействия Rpn4p с протеасомными субъединицами крат-

ковременные и служат “инструментом” деградации Rpn4p в протеасоме.

*Rpn4p может привлекаться
к промоторным областям генов
за счет белок-белковых взаимодействий*

В ходе исследования взаимодействия Rpn4p с промоторными областями генов, как содержащих его сайты связывания (PACe или MACe), так и не содержащих их, нами неожиданно обнаружено, что Rpn4p может привлекаться к промотору гена циклина *CLN2*, который не содержит сайтов связывания фактора. Более того, мутантный Rpn4p с ДНК-связывающим доменом, инактивированным путем внесения замен остатков цистеина на аланины, также привлекается к промотору *CLN2*, хотя и с меньшей силой (рис. 4а). Полученные данные указывают на то, что Rpn4p может привлекаться к регуляторным областям генов, по-видимому, за счет белок-белковых взаимодействий. Из литературных данных известно, что привлечение фактора транскрипции к гену может быть непродуктивным, то есть не приводит к изменению экспрессии гена [37]. С целью выяснить, продуктивно ли привлечение Rpn4p к *CLN2*, мы определили уровень мРНК *CLN2* в штамме BY4742 с мутацией *rpn4-Δ* относительно изогенного штамма дикого типа. Оказалось, что в мутантном штамме уровень мРНК *CLN2* повышен в среднем в 2 раза (рис. 4б). Из этого следует, что Rpn4p служит репрессором гена *CLN2*. Кроме того, проверили происходит ли взаимодействие мутантного Rpn4p с делецией ДНК-связывающего домена, Rpn4ΔNCZnF, с геном *CLN2*. Согласно полученным данным (рис. 4в), взаимодействие Rpn4ΔNCZnF усилилось и превысило уровень, наблюдаемый в случае белка дикого типа. Взаимодействие Rpn4ΔNCZnF усилилось также и с промоторными областями Rpn4p-зависимых генов: *RPT6*, содержащего PACe, и *MAG1*, содер-

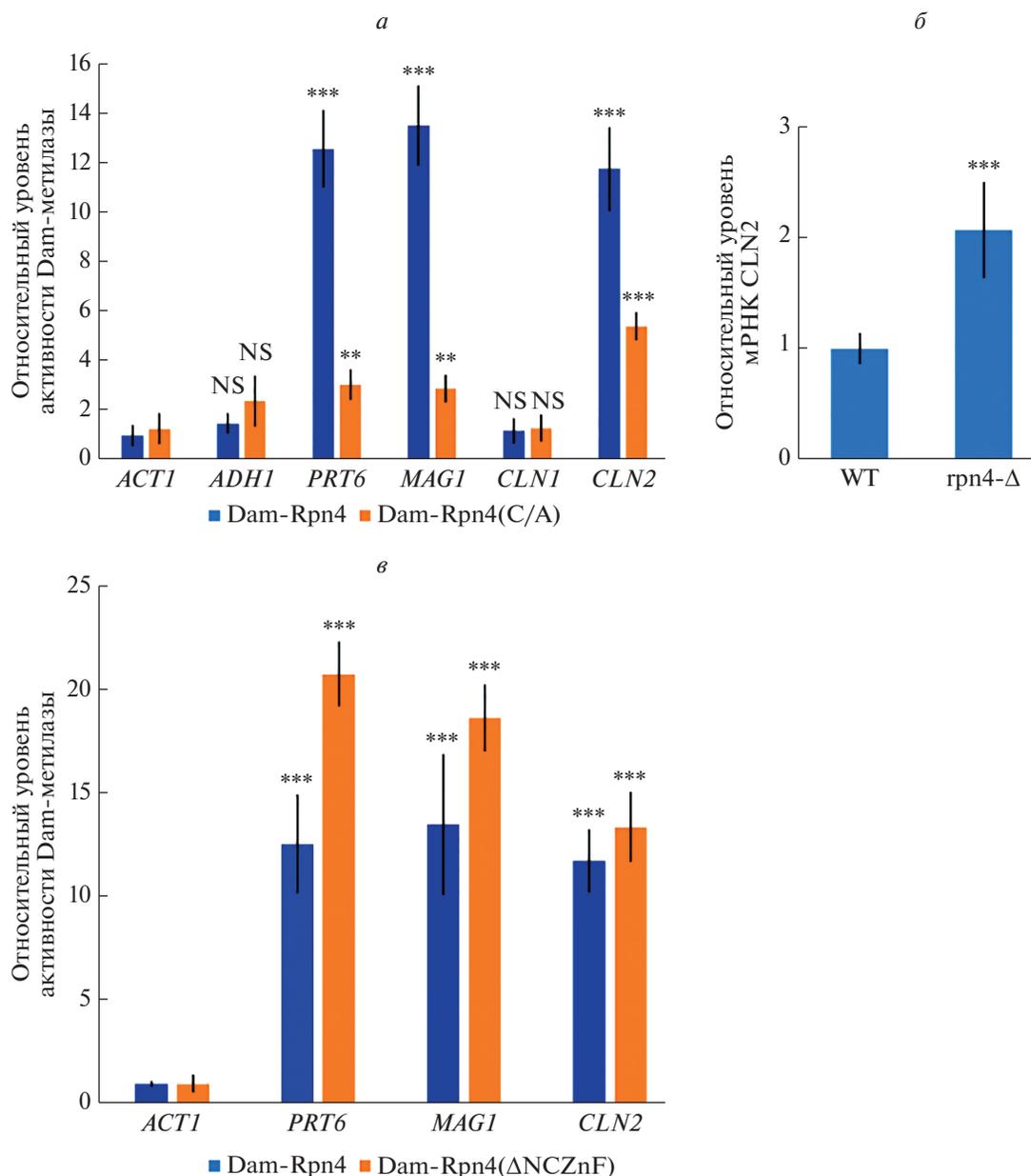


Рис. 4. Rpn4p может привлекаться к промоторным областям регулируемых им генов за счет белок-белковых взаимодействий. *а* – Привлечение Rpn4p к промоторным областям генов-мишеней и генов, не регулируемых Rpn4p. В анализе DamID за единицу активности принят сигнал, полученный при метилировании гена *ACT1* химерным белком Dam-Rpn4. *б* – Анализ относительного уровня мРНК гена *CLN2* с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. В качестве референсного гена использован *PDA1*. *в* – Результаты анализа DamID с использованием химерного белка Dam-Rpn4ΔNCZnF. Данные представлены в виде среднего для трех независимых повторов, разброс данных представлен стандартным отклонением. В экспериментах использованы штаммы BY4742 и производный от него BY4742 *rpn4-Δ*. Статистическая значимость различий в средних определена с помощью *t*-критерия Стьюдента. NS – отличия статистически незначимы; **0.001 < *p*-value < 0.01; ****p*-value < 0.001.

жащего MACE. Эти результаты можно объяснить полученными нами ранее данными о том, что уровень экспрессии мутантного белка Rpn4ΔNCZnF значительно выше, чем белка дикого типа [25]. Таким образом, показано, что Rpn4p может привлекаться к регулируемым им генам за счет белок-белковых взаимодействий и этот процесс стимулируется в случае делеции ДНК-связывающего домена.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В этой работе мы использовали набор делеционных производных Rpn4p, чтобы картировать функционально важные участки этого транскрипционного фактора, ответственные за его “работу” в условиях воздействия различных видов стресса. Установлено, что большая часть N-концевой обла-

сти, содержащая трансактиваторный домен NTAD, а также кислый трансактиваторный домен CAD нужны для устойчивости дрожжей ко всем видам стресса. В то же время без NAD, предполагаемого сигнала ядерной локализации или ДНК-связывающего домена Rpn4p может продолжать обеспечивать защиту дрожжей от стрессовых воздействий. Результаты, полученные с помощью DamID-анализа, указывают на возможность Rpn4p, лишённого ДНК-связывающего домена, участвовать в регуляции экспрессии генов за счет белок-белковых взаимодействий.

Отметим, что мутантные варианты Rpn4p без NAD и NCZnF наиболее активны в отношении устойчивости дрожжей к циклогексимиду и окислительному стрессу (рис. 1б). Эти данные можно объяснить повышением содержания соответствующих мутантных вариантов Rpn4p, которые наблюдали ранее [25]. В случае делеции NAD стабилизация Rpn4p связана, по-видимому, с нарушением его деградации по убиквитинзависимому пути [28]. На данный момент неясно, по какой причине происходит стабилизация Rpn4p при делеции ДНК-связывающего домена.

Отсутствие активности предполагаемого сигнала ядерной локализации можно рассматривать как указание на наличие, как минимум, еще одного сигнала транспорта Rpn4p в ядро, который компенсирует отсутствие этого участка. Таким сигналом может служить N-концевой дегрон, который распознается α -кариоферинном Srp1p в комплексе с Sts1p [38]. Это предположение согласуется с полученными нами данными, указывающими на то, что делеция первых 56 а.о., включающих значительную часть N-дегрона, незначительно влияет на активность Rpn4p. Однако делеция 109 а.о., включающая в себя полный N-дегрон, подавляет способность Rpn4p обеспечивать устойчивость дрожжей к стрессу (рис. 1б). Отметим, что мутантный белок сохраняет некоторую активность активатора транскрипции протеасомных генов [8]. Это не исключает того, что делеция 109 а.о. может подавлять способность Rpn4p регулировать экспрессию непротеасомных генов. Не исключено также, что предполагаемый сигнал ядерной локализации менее активен, чем N-концевой дегрон.

Полученные нами и другими авторами данные позволяют сформулировать несколько предположений о том, каким образом Rpn4p, лишённый ДНК-связывающей функции, обеспечивает устойчивость дрожжей к стрессу.

Первое предположение заключается в том, что Rpn4p без ДНК-связывающего домена может нарушать деградацию субстратов протеасомы, включая белки, обеспечивающие устойчивость к рассматриваемым видам стресса. Эта гипотеза основана на данных о том, что делеция ДНК-

связывающего домена повышает содержание Rpn4 [25], а так как при этом сохранена N-концевая область Rpn4p, обеспечивающая взаимодействие с 19S регуляторным комплексом протеасомы [29], то мутантный Rpn4p продолжает более интенсивно связываться с протеасомой, конкурируя с другими ее субстратами. Кроме того, мутантный Rpn4p сохраняет также Ubr2-зависимый дегрон [28], благодаря чему может конкурировать за связывание и полиубиквитинирование с другими субстратами Ubr2-лигазы, вызывая их стабилизацию.

Второе предположение заключается в привлечении Rpn4p в качестве трансактиваторного домена к генам, не имеющим его сайтов связывания. В отсутствие ДНК-связывающего домена происходит диссоциация мутантного Rpn4p от участков его связывания в геноме и тогда, взаимодействуя с другими факторами транскрипции, он становится участником регуляции другого набора генов, в том числе вовлеченных в устойчивость к исследуемым видам стресса.

И, наконец, третье предположение состоит в том, что Rpn4p связывается с другими белками, не имеющими отношение к регуляции транскрипции генов, но вовлеченными в экспрессию генетической информации на других этапах, в том числе и в устойчивость дрожжей к циклогексимиду и окислительному стрессу. Так, согласно информации, представленной в базе данных *Saccharomyces cerevisiae* database (<https://www.yeastgenome.org/> посещение 06.02.2022), обнаружено физическое взаимодействие Rpn4p с 29 белками. Почти половину из этих белков составляют субъединицы протеасомы или ее шапероны (Nas2p, Pre2p, Pre7p, Rpn2p, Rpn5p, Rpn6p, Rpn10p, Rpn12p, Sem1p, Rpt1p, Rpt2p, Rpt3p, Rpt5p, Rpt6p), а также ферменты системы полиубиквитинирования белков (Ubr1p и Mub1p) и Hsp40p (Arj1p), вовлеченный в SUMO-опосредованную деградацию белковых агрегатов. Взаимодействие с этими белками, по-видимому, функционально ведет к деградации Rpn4p. К этой же группе можно отнести Srp1p, гомолог кариоферина- α , который, помимо импорта белков в ядро, взаимодействует с рибосомой и протеасомой и опосредует деградацию новосинтезированных белков [38]. Показано, что Srp1p взаимодействует с областью N-концевого дегрона Rpn4p и обеспечивает его деградацию в протеасоме, а нарушение функционирования Srp1p повышает чувствительность дрожжей к циклогексимиду и другим стрессовым факторам, вызывающим накопление неправильно свернутых белков [38]. Помимо Srp1p в связывании и транспорте Rpn4p в ядро может участвовать Mog1p, который, в свою очередь, связывается с Ran-GTPазой [39]. Другая часть белков, взаимодействующих с Rpn4, вовлечена в регуляцию экспрессии генов на уровне организации хроматина

(Ccr4p, Esa1p, Isw1p), метаболизма мРНК (Nab2p, Dhh1p, Puf3p), регуляции трансляции (Caf20p, Hek2p) и сворачивания новосинтезированных белков (Ssb2p). Отдельно нужно отметить взаимодействие Rpn4p с Dpb2p – второй большой субъединицей ДНК-полимеразы II, участвующей в репликации и репарации ДНК [40]. Известно, что ДНК-полимераза II, участвует в репаративном синтезе ДНК в ходе устранения повреждений ДНК, вызванных окислительным стрессом [41].

Полученные нами и другими авторами [36] данные указывают на то, что взаимодействие Rpn4p с компонентами УПС имеет временный характер и ведет к расщеплению Rpn4p. Возможно, такое же значение имеют взаимодействия Rpn4p с шаперонами, участвующими в сворачивании новосинтезированных белков. Взаимодействие Rpn4p (прямое или опосредованное) с белками, участвующими в регуляции экспрессии генов на уровне организации хроматина, по-видимому, связано с его функциями как регулятора экспрессии генов. На сегодняшний день неясно, имеет ли функциональное значение взаимодействие Rpn4p с регуляторами трансляции и ДНК-полимеразой II, которые, в свою очередь, имеют отношение к ответу дрожжей на действие циклогексимида и окислительный стресс. Очевидно, что взаимодействие с этими белками не требует участия ДНК-связывающего домена Rpn4p. Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день данные указывают на то, что Rpn4p может быть вовлечен в белок-белковые взаимодействия, которые выходят за рамки его функций как субстрата протеасомы или фактора транскрипции. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы верифицировать обнаруженные белки-партнеры и установить значение взаимодействий Rpn4p с ними.

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

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 17-74-30030).

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

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

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Glickman M.H., Ciechanover A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**(2), 373–428.
- Lecker S.H., Goldberg A.L., Mitch W.E. (2006) Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**(7), 1807–1819.
- Карпов Д.С., Лысов Ю.П., Карпов В.Л. (2019) Эволюция системы координированной регуляции экспрессии протеасомных генов у дрожжей-сахаромицетов. *Молекуляр. биология.* **53**(6), 1029–1037.
- Xie Y., Varshavsky A. (2001) RPN4 is a ligand, substrate and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**(6), 3056–3061.
- Xie Y. (2010) Feedback regulation of proteasome gene expression and its implications in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* **29**(4), 687–693.
- Mannhaupt G., Feldmann H. (2007) Genomic evolution of the proteasome system among Hemiascomycetous yeasts. *J. Mol. Evol.* **65**(5), 529–540.
- Mannhaupt G., Schnell R., Karpov V., Vetter I., Feldmann H. (1999) Rpn4 acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett.* **450**, 27–34.
- Karpov D.S., Tutyayeva V.V., Karpov V.L. (2008) Mapping of yeast Rpn4p transactivation domains. *FEBS Lett.* **582**(23–24), 3459–3464.
- Ju D., Xu H., Wang X., Xie Y. (2010) The transcription activation domain of Rpn4 is separate from its degrons. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**(2), 282–286.
- Karpov D.S., Grineva E.N., Leinsoo A.T., Nadolinskaia N.I., Danilenko N.K., Tutyayeva V.V., Spasskaya D.S., Preobrazhenskaya O.V., Lysov Y.P., Karpov V.L. (2017) Functional analysis of *Debaryomyces hansenii* Rpn4 on a genetic background of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **17**(1), fow098.
- Nelson M.K., Kurihara T., Silver P.A. (1993) Extragenic suppressors of mutations in the cytoplasmic C terminus of SEC63 define five genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **134**(1), 159–173.
- Jelinsky S.A., Estep P., Church G.M., Samson L.D. (2000) Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. *Mol. Cell Biol.* **20**, 8157–8167.
- Капранов А.Б., Преображенская О.В., Тютяева В.В., Штука Р., Фельдман Х., Карпов В.Л. (2001) Выделение и идентификация PACE-связывающего белка Rpn4 – нового транскрипционного активатора, участвующего в регуляции 26S протеасомных и других генов. *Молекуляр. биология.* **35**, 420–431.
- Shirozu R., Yashiroda H., Murata S. (2015) Identification of minimum Rpn4-responsive elements in genes related to proteasome functions. *FEBS Lett.* **589**(8), 933–940.

15. Karpov D.S., Spasskaya D.S., Tutyaeva V.V., Mironov A.S., Karpov V.L. (2013) Proteasome inhibition enhances resistance to DNA damage via upregulation of Rpn4-dependent DNA repair genes. *FEBS Lett.* **587**(18), 3108–3114.
16. Spasskaya D.S., Nadolinskaia N.I., Tutyaeva V.V., Lysov Y.P., Karpov V.L., Karpov D.S. (2020) Yeast Rpn4 links the proteasome and DNA repair via RAD52 regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(21), 8097.
17. Karpov D.S., Spasskaya D.S., Nadolinskaia N.I., Tutyaeva V.V., Lysov Y.P., Karpov V.L. (2019) Dereglуlation of the 19S proteasome complex increases yeast resistance to 4-NQO and oxidative stress via upregulation of Rpn4- and proteasome-dependent stress responsive genes. *FEMS Yeast Res.* **19**(2), foz002.
18. Teixeira M.C., Dias P.J., Simoes T., Sa-Correia I. (2008) Yeast adaptation to mancozeb involves the upregulation of FLR1 under the coordinate control of Yap1, Rpn4, Pdr3, and Yrr1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**(2), 249–255.
19. James P., Halladay J., Craig E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.* **144**(4), 1425–1436.
20. Gietz R.D., Woods R.A. (2002) Transformation of yeast by the LiAc/ss carrier DNA/PEG method. *Methods Enzymol.* **350**, 87–96.
21. Christianson T.W., Sikorski R.S., Dante M., Shero J.H., Hieter P. (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene.* **110**(1), 119–122.
22. Gietz R.D., Sugino A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene.* **74**(2), 527–534.
23. Спасская Д.С., Карпов Д.С., Карпов В.Л. (2011) Dam-метилаза *Escherichia coli* как молекулярный инструмент для картирования сайтов связывания дрожжевого фактора транскрипции Rpn4p. *Молекуляр. биология.* **45**(4), 642–651.
24. Козлов Д.Г., Чеперегин С.Э., Честков А.В., Крылов В.Н., Цыганков Ю.Д. (2010) Клонирование и экспрессия гена лизоцима бактериофага FMV в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*. *Генетика.* **46**(3), 340–348.
25. Карпов Д.С., Тютяева В.В., Берестень С.Ф., Карпов В.Л. (2008) Картирование участков Rpn4p, ответственных за активацию транскрипции протеасомных генов. *Молекуляр. биология.* **42**(3), 526–532.
26. Melnikova L., Kostyuchenko M., Parshikov A., Georgiev P., Golovnin A. (2018) Role of Su(Hw) zinc finger 10 and interaction with CP190 and Mod(mdg4) proteins in recruiting the Su(Hw) complex to chromatin sites in *Drosophila*. *PLoS One.* **13**(2), e0193497.
27. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Smith J.A., Seidman J.G., Struhl K. (1998) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley-Interscience.
28. Ju D., Xie Y. (2006) Identification of the preferential ubiquitination site and ubiquitin-dependent degradation signal of Rpn4. *J. Biol. Chem.* **281**, 10657–10662.
29. Ha S.W., Ju D., Xie Y. (2012) The N-terminal domain of Rpn4 serves as a portable ubiquitin-independent degron and is recognized by specific 19S RP subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **419**(2), 226–231.
30. Карпов Д.С., Осипов С.А., Преображенская О.В., Карпов В.Л. (2008) Rpn4p – позитивный и негативный регулятор транскрипции убиквитин-протеасомной системы. *Молекуляр. биология.* **42**(3), 518–525.
31. Gerlinger U.M., Guckel R., Hoffmann M., Wolf D.H., Hilt W. (1997) Yeast cycloheximide-resistant crl mutants are proteasome mutants defective in protein degradation. *Mol. Biol. Cell.* **8**(12), 2487–2499.
32. He C., Klionsky D.J. (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 67–93.
33. Fujimoro M., Tanaka K., Yokosawa H., Toh-e A. (1998) Son1p is a component of the 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **423**, 149–154.
34. Drees B.L., Sundin B., Brazeau E., Caviston J.P., Chen G.C., Guo W., Kozminski K.G., Lau M.W., Moskow J.J., Tong A., Schenkman L.R., McKenzie A., 3rd, Brennwald P., Longtine M., Bi E., Chan C., Novick P., Boone C., Pringle J.R., Davis T.N., Fields S., Drubin D.G. (2001) A protein interaction map for cell polarity development. *J. Cell Biol.* **154**(3), 549–571.
35. Funakoshi M., Tomko R.J., Jr., Kobayashi H., Hochstrasser M. (2009) Multiple assembly chaperones govern biogenesis of the proteasome regulatory particle base. *Cell.* **137**(5), 887–899.
36. Cagney G., Uetz P., Fields S. (2001) Two-hybrid analysis of the *s* 26S proteasome. *Physiol. Genomics.* **7**(1), 27–34.
37. Lickwar C.R., Mueller F., Hanlon S.E., McNally J.G., Lieb J.D. (2012) Genome-wide protein-DNA binding dynamics suggest a molecular clutch for transcription factor function. *Nature.* **484**(7393), 251–255.
38. Ha S.W., Ju D., Xie Y. (2014) Nuclear import factor Srp1 and its associated protein Sts1 couple ribosome-bound nascent polypeptides to proteasomes for cotranslational degradation. *J. Biol. Chem.* **289**(5), 2701–2710.
39. Baker R.P., Harreman M.T., Eccleston J.F., Corbett A.H., Stewart M. (2001) Interaction between Ran and Mog1 is required for efficient nuclear protein import. *J. Biol. Chem.* **276**(44), 41255–41262.
40. Jain R., Aggarwal A.K., Rechkoblit O. (2018) Eukaryotic DNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **53**, 77–87.
41. Chalissery J., Jalal D., Al-Natour Z., Hassan A.H. (2017) Repair of oxidative DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst.)*. **51**, 2–13.

Rpn4p WITHOUT THE DNA-BINDING DOMAIN PROVIDES *Saccharomyces cerevisiae* RESISTANCE TO OXIDATIVE STRESS AND CYCLOHEXIMIDE

D. S. Karpov^{1, *}, D. S. Spasskaya¹, V. V. Tutyaeva¹, and V. L. Karpov²

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

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

**e-mail: aleom@yandex.ru*

The ubiquitin-proteasome system is involved in the control of all essential molecular processes under normal and stressed conditions. Rpn4p serves as a key transcriptional regulator of the proteasome in the *Saccharomyces cerevisiae* yeast and also involves in the cellular response to various stresses. In addition to proteasomal genes, Rpn4p affects the expression of several hundred other genes, including genes involved in DNA repair and response to oxidative stress. However, the molecular mechanisms used by Rpn4p in the control of its target genes and acting as a regulator of cell response to stress conditions remain largely unclear. This work aims to identify the Rpn4p domains required for cell resistance to various stress conditions. We showed that the N-terminal and central parts of the protein contain the sites necessary for resistance to all types of stress. The putative nuclear localization signal is not essential for Rpn4p function. Unexpectedly, with a deletion of both “zinc finger” domains forming the DNA-binding domain, the protein provides resistance to oxidative stress and cycloheximide. Moreover, we show that Rpn4p could be recruited to the promoter regions of genes it regulates, even if they do not contain its binding sites. The findings indicate that Rpn4 might mediate gene regulation and cellular response to stress through protein-protein interactions.

Keywords: Rpn4p, deletion analysis, DNA-binding domain, oxidative stress

УДК 616.62-006.6-07:577.21

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВОВЛЕЧЕННОСТИ В ПРОЦЕСС МАЛИГНИЗАЦИИ ВИЗУАЛЬНО НОРМАЛЬНОЙ СЛИЗИСТОЙ ПРИ УРОТЕЛИАЛЬНОМ РАКЕ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

© 2022 г. Т. А. Богущ^{а, *}, А. А. Башарина^а, З. М. Сафаров^а, И. Э. Мизаева^а,
А. Н. Гришанина^а, Е. А. Богущ^б, Я. В. Гриднева^а, М. И. Волкова^а,
В. Б. Матвеев^а, В. С. Косоруков^а

^аНациональный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 115478 Россия

^бПервый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский Университет), Москва, 119991 Россия

*e-mail: tatbogush@mail.ru

Поступила в редакцию 17.02.2022 г.

После доработки 09.03.2022 г.

Принята к публикации 09.03.2022 г.

Иммунофлуоресцентным методом и проточной цитометрией провели количественную оценку экспрессии опухоль-ассоциированного белка β III-тубулина (TUBB3) в ткани уротелиального рака мочевого пузыря и визуально нормальной слизистой (суммарно – 56 образцов). Экспрессия маркера выявлена в 100% случаев, при значительной гетерогенности уровня экспрессии TUBB3 как в опухоли, так и в “нормальной” слизистой. Уровень TUBB3 в “нормальной” слизистой не зависел от удаленности относительно опухоли (1 см или более 3 см) и в среднем по группе был статистически значимо ниже, чем в опухолевой ткани (соответственно $21.8 \pm 10.8\%$ и $24.9 \pm 13.2\%$ vs $35.2 \pm 12.4\%$; $p = 0.04$ и 0.005). Выявлено повышение экспрессии TUBB3 в опухоли и в “нормальной” слизистой при инвазивной по сравнению с неинвазивной в мышечный слой формой рака мочевого пузыря. Таким образом, при уротелиальном раке мочевого пузыря опухоль-ассоциированный белок TUBB3 может являться молекулярным маркером вовлеченности в процесс малигнизации слизистой мочевого пузыря и прогнозировать риск мышечной инвазии опухоли, что влияет на формулировку показаний к ранней цистэктомии.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, β III-тубулин, проточная цитометрия, слизистая мочевого пузыря, прогноз

DOI: 10.31857/S0026898422040036

ВВЕДЕНИЕ

Бета-тубулины – семейство белков, входящих в состав микротрубочек, среди которых наиболее полно изучен β III-тубулин (TUBB3). Белок регистрируют в широком спектре опухолей разных локализаций [1] и традиционно ассоциируют с устойчивостью к противоопухолевым препаратам из группы таксанов [2–4]. Эти препараты, связываясь с β -тубулином, нарушают динамику микротрубочек, вызывают остановку митоза и, в конечном счете, апоптоз [5, 6]. Сообщалось, что TUBB3 связан с резистентностью к еще одной группе анти-тубулиновых агентов – алкалоидам Винка [7].

Уровень TUBB3 в опухоли ассоциирован также с агрессивностью заболевания и регионарным метастазированием. В экспериментах *in vitro* показано, что экспрессия TUBB3 связана с реализацией

клеточного фенотипа, устойчивого к неблагоприятным воздействиям, таким как гипоксия, недостаток глюкозы или окислительный стресс [8–10]. Включение данной изоформы β -тубулина в состав микротрубочек изменяет их динамические свойства, усиливает клеточную подвижность и позволяет эпителиальным клеткам терять связь с базальной мембраной и мигрировать за нее [11–13]. В итоге гиперэкспрессия TUBB3 в опухоли увеличивает ее метастатический потенциал.

Уникальность TUBB3 как потенциального опухолевого маркера заключается в том, что этот белок практически не экспрессируется в эпителиальных тканях. В норме его экспрессия регистрируется только в нейронах, меланоцитах, эндотелиоцитах и макрофагах с низким уровнем и интенсивностью, на порядки отличающихся от аналогичных показателей в опухоли [1]. Это позволило нам сформули-

ровать гипотезу о возможности диагностики локальной молекулярной распространенности опухолевого процесса в пораженном органе на основании оценки экспрессии TUBB3 в нормальной ткани, окружающей опухолевый очаг. Реальность этого предположения была подтверждена в экспериментах на животных [14] и затем – при клинических исследованиях [15–17]. Наличие клеток, экспрессирующих TUBB3, выявлено в визуально нормальной ткани соответствующего органа при опухолях разных локализаций: немелкоклеточном раке легкого, раке желудка и пищевода, – при этом уровень экспрессии маркера значительно варьировал от пациента к пациенту [15–17].

Таким образом, белок TUBB3 как потенциальный молекулярный маркер имеет три модальности: предиктивную (предсказывающую резистентность к химиотерапии), прогностическую (предсказывающую агрессивность течения болезни) и диагностическую (определяющую локальную распространенность опухолевого процесса в пораженном органе).

В настоящем исследовании мы развили последнее направление, предложив возможность молекулярной диагностики вовлеченности визуально нормальной слизистой мочевого пузыря в процесс малигнизации при поражении органа уротелиальным раком мочевого пузыря. Это заболевание принято рассматривать как исходно многофокусное поражение слизистой мочевого пузыря [18–20], а потому выявление опухолеассоциированного маркера TUBB3 в визуально нормальной слизистой может быть показателем степени ее вовлеченности в процесс малигнизации. В свою очередь такого рода данные могут стать дополнительным ориентиром в прогнозе агрессивности течения болезни, что особенно ценно при исследовании материала, полученного в ходе трансуретральной резекции.

Сказанное и определило цель исследования, в котором проведена сравнительная количественная оценка уровня экспрессии TUBB3 в ткани

уротелиального рака мочевого пузыря и окружающей нормальной слизистой органа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материал исследования. Дизайн исследования включал сравнительный анализ уровня экспрессии TUBB3 в образце ткани уротелиального рака мочевого пузыря и в двух образцах визуально нормальной слизистой того же больного. Всего исследовано 56 образцов нормальной и опухолевой ткани 18 пациентов. Характеристика больных, включенных в исследование, представлена в табл. 1.

Непосредственно сразу после выполнения трансуретральной резекции или цистэктомии образцы ткани объемом от 8 до 125 мм³ помещали в 4%-ный раствор формальдегида (рН 7.4). У каждого пациента исследована опухолевая ткань, а также два образца визуально нормальной слизистой: вблизи опухоли (на расстоянии около 1 см) и вдали от нее (на расстоянии более 3 см).

Не менее чем через двое суток фиксации в формальдегиде каждый образец подвергали многоступенчатой процедуре подготовки одноклеточной суспензии, пригодной для работы на проточном цитометре. Подробно метод описан ранее [21].

Иммунофлуоресцентное окрашивание и проточная цитометрия. Суспензию опухолевых клеток (2×10^5 клеток/мл) в 0.5%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA), приготовленном в фосфатном буфере (рН 7.4), инкубировали в течение 1.5 ч при комнатной температуре в темноте с первичными моноклональными кроличьими антителами к TUBB3 (ab52623, клон EP1569Y, “Abcam”, Великобритания) в разведении 1 : 500. После однократной отмывки в 20-кратном объеме 0.5%-ного раствора BSA, приготовленного в фосфатном буфере (рН 7.4), клетки инкубировали в течение 1.5 ч при 4°C в темноте со вторичными антикроличьими антителами, конъюгированными с флуоресцентной меткой DyLight 650 (ab98510, “Abcam”), в разведении 1 : 500. Для удаления из анализа разрушенных клеток и эритроцитов суспензию

Таблица 1. Характеристика больных раком мочевого пузыря, включенных в исследование ($n = 18$)

Характеристики	
Средний возраст (годы) – 61.1 ± 10.3	
Пол	мужчины – 83.3%
	женщины – 16.7%
Гистологический тип опухоли, согласно классификации ВОЗ (2004 г.)	
Уротелиальный рак <i>in situ</i> – 16.7%	
Папиллярный уротелиальный рак	низкой степени злокачественности – 50.0%
	высокой степени злокачественности – 33.3%

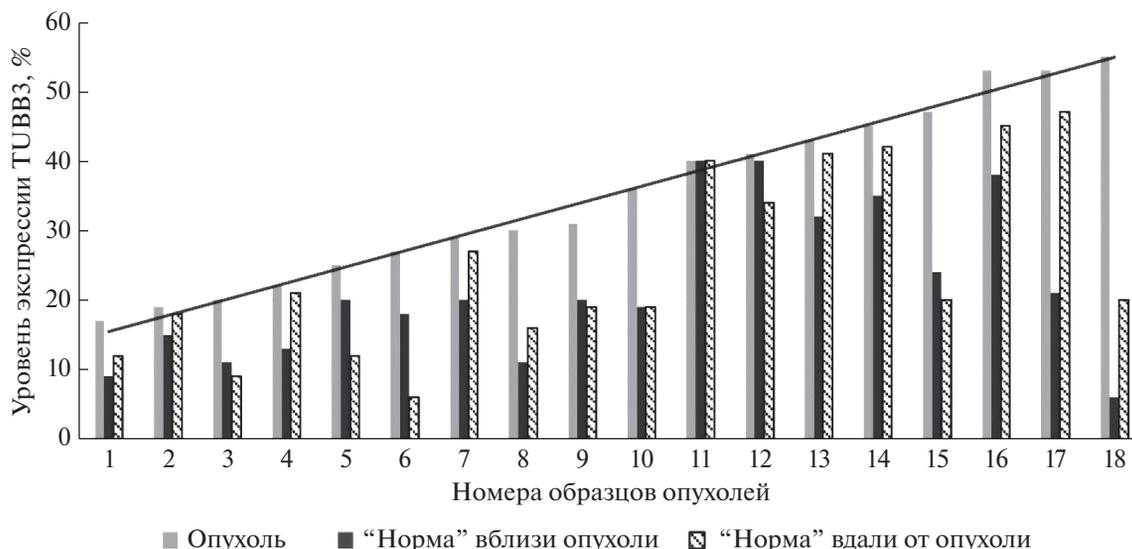


Рис. 1. Распределение образцов ткани рака мочевого пузыря и визуально нормальной слизистой органа по уровню экспрессии TUBB3. Образцы ранжированы от минимального до максимального значения уровня экспрессии TUBB3 в ткани рака мочевого пузыря. Серая линия – это линия тренда, построенная по показателям уровня экспрессии TUBB3 в опухолевой ткани.

в течение 15 мин инкубировали с ДНК-красителем Hoechst 33258 (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 1.2 мкг/мл, после чего дважды отмывали 20-кратным объемом 0.5%-ного раствора BSA.

Иммунофлуоресцентное окрашивание образцов опухолевой и нормальной ткани мочевого пузыря, полученных от одного больного, проводили в одном эксперименте. В качестве контроля активности антител в каждом опыте использовали культуру клеток рака молочной железы MCF-7 (ATCC, США).

Измерение флуоресценции клеток проводили на проточном цитометре Navios (“Beckman Coulter”, США). Флуоресценцию красителей DuLight 650 и Hoechst 33258 регистрировали на каналах FL6 и FL9 соответственно.

В работе оценен уровень экспрессии TUBB3 – количество специфически флуоресцирующих клеток (%) относительно контроля (инкубация клеток только с вторичными антителами), – рассчитанный в программе FlowJo 10.0 (FlowJo, LLC) с помощью теста Колмогорова–Смирнова.

Ранжирование молекулярного прогноза течения болезни в соответствии с уровнем экспрессии TUBB3 в визуально нормальной слизистой мочевого пузыря проведено следующим образом:

- 1) благоприятный – уровень экспрессии TUBB3 в “норме” не превышает 20%;
- 2) настороженный – уровень экспрессии TUBB3 в “норме” >20%, но <40%;
- 3) неблагоприятный – уровень экспрессии TUBB3 в “норме” ≥ 40%.

Статистический анализ. Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью метода квантильных диаграмм, критерия Шапиро–Уилка, для попарного сравнения групп использовали Тьюки-тест. Эти методы включены в пакет GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия TUBB3 в визуально нормальной слизистой и в ткани рака мочевого пузыря

Из 36 хирургических образцов нормальной слизистой мочевого пузыря экспрессия TUBB3 выявлена в 100% случаев (рис. 1). Учитывая, что исследование включает опухоли на самых ранних этапах их развития, этот результат подтверждает правомочность рассмотрения немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря как “болезни слизистой”. Молекулярная вовлеченность визуально нормальной ткани в процесс малигнизации у разных больных оказалась различной, так как в разных парах сравнения отмечены в разной степени выраженные различия между уровнем экспрессии TUBB3 в “норме” по сравнению с опухолью того же больного – от практически полного совпадения (образец 11) до 9-кратно более низкого значения (образец 18). Ни у одного пациента не выявлено более высокой экспрессии TUBB3 в нормальной слизистой по сравнению с опухолью.

На рис. 2 представлены квантильные диаграммы, на которых приведен характер распределения

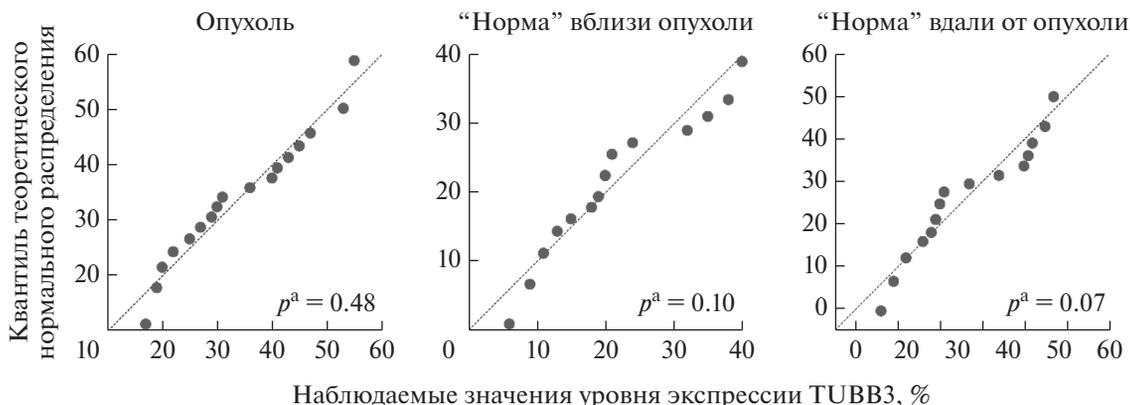


Рис. 2. Квантильные диаграммы характера распределения показателей уровня экспрессии TUBB3 в опухолевой и “нормальной” слизистой мочевого пузыря. Прямая линия на рисунке соответствует нормальному распределению (линия регрессии); p^a – уровень значимости, рассчитанный с помощью критерия Шапиро–Уилка; нулевая гипотеза о нормальности распределения показателя в выборке принималась при $p > 0.05$.

уровня экспрессии TUBB3 в опухоли и в “нормальной” слизистой мочевого пузыря. Видно, что во всех трех случаях значения уровня экспрессии TUBB3 подчинялись закону нормального распределения ($p > 0.05$), что учтено при дальнейшей статистической обработке результатов.

Несомненный самостоятельный интерес представляет результат анализа количественных показателей уровня экспрессии TUBB3 у разных больных. Данные, представленные на рис. 1 и в табл. 2, демонстрируют значительную гетерогенность опухолей по количественным показателям уровня экспрессии TUBB3 у разных пациентов: от минимального значения – 17%, до максимального – 55% (медиана – 33.5%, среднее значение – $35.2 \pm 12.4\%$).

Столь же гетерогенна по уровню экспрессии TUBB3 “нормальная” ткань мочевого пузыря по

группе в целом; при этом как медианы показателей для образцов нормальной слизистой вблизи опухоли и в отдалении, так и средние значения не различались между собой и составили 20.5% vs 20.0% и $21.8 \pm 10.8\%$ vs $24.9 \pm 13.2\%$ соответственно.

Статистический анализ результатов с использованием Тьюки-теста показал, что количественный уровень экспрессии TUBB3 статистически значимо выше в опухолях по сравнению с образцами визуальной нормальной слизистой мочевого пузыря – как вблизи ($p = 0.005$), так и вдали от новообразования ($p = 0.04$).

Уровень экспрессии TUBB3 в зависимости от инвазии опухоли в мышечный слой

В табл. 3 представлен анализ результатов исследования уровня экспрессии TUBB3 в образцах

Таблица 2. Количественные показатели экспрессии TUBB3 в клетках рака мочевого пузыря и в визуальной нормальной слизистой

№ группы	Образец ткани		Уровень экспрессии TUBB3, %			
			Среднее значение ^a	Медиана [Q1; Q2] ^b	Тьюки-тест	
					группы сравнения	p^c
I	Опухоль		35.2 ± 12.4	33.5 [24.5; 45.5]	I vs II	0.005
II	“Норма” ^d	1	21.8 ± 10.8	20.5 [12.5; 32.5]	II vs III	0.72
III		2	24.9 ± 13.2	20.0 [15.0; 40.5]	I vs III	0.04

^a Среднее значение \pm стандартное отклонение. ^b Нижняя и верхняя квартили соответственно. ^c Уровень значимости, рассчитанный при попарном сравнении групп Тьюки-тестом; нулевая гипотеза об отсутствии различий по показателю экспрессии маркера при попарном сравнении групп отклонялась при $p < 0.05$. Полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия. ^d Здесь и далее: образцы визуальной нормальной слизистой мочевого пузыря вблизи и вдали от опухоли: 1 – на расстоянии 1 см, 2 – на расстоянии более 3 см.

Таблица 3. Уровень экспрессии TUBB3 в образцах визуально нормальной слизистой и поверхностного рака мочевого пузыря

№	Гистологический диагноз	Уровень экспрессии TUBB3, %			Прогноз ^а	Вид операции ^б
		опухоль	“норма”			
			1	2		
1	I. Без инвазии в мышечный слой	17	9	12	благоприятный	ТУР
2		19	15	18		
3		20	11	9		
4		22	13	21		
5		25	20	12		
6		27	18	6		
7		30	11	16		
8		31	20	19		
9		29	20	27	настороженный	
10		45	35	42	неблагоприятный	
11	II. Инвазия в мышечный слой	41	40	34	неблагоприятный	ЦЭ
12		53	38	45		
13		40	40	40		
14		43	32	41		ТУР → ЦЭ
15	III. Неизвестно	47	24	20	настороженный	ТУР
16		53	21	47	неблагоприятный	
17		36	19	19	благоприятный	
18		55	6	20		

^аПрогноз развития заболевания на основании уровня экспрессии TUBB3 в визуально нормальных тканях: благоприятный ($\leq 20\%$); настороженный ($>20\%$, но $<40\%$); неблагоприятный ($\geq 40\%$). ^бХирургическое лечение проведено методом трансуретральной резекции (ТУР), цистэктомии (ЦЭ) или реализовано оба подхода (ТУР → ЦЭ).

уротелиального рака мочевого пузыря и визуально нормальной слизистой органа. Деление на группы сравнения проведено в зависимости от наличия инвазии опухоли в мышечный слой – с инвазией (группа I) и без инвазии (группа II). В группу III включены образцы опухолей и “нормальной” слизистой мочевого пузыря, когда диагностировать наличие мышечной инвазии опухоли не удалось из-за отсутствия в материале фрагментов мышечной ткани.

Прежде всего, стоит обратить внимание на различие средних значений уровня экспрессии TUBB3 в опухоли между группами I и II – 26.5% vs 44.3%. Это может указывать на ассоциацию уровня экспрессии TUBB3 в опухоли с инвазией в

мышечный слой, то есть с нарастанием агрессивности опухолевого процесса.

В группе I отчетливо просматриваются также различия по уровню экспрессии TUBB3 в опухоли и в образцах визуально нормальной слизистой мочевого пузыря независимо от ее удаленности от новообразования. Суммарно, среднее значение уровня экспрессии TUBB3 в “норме” составило 17.7%, что статистически значимо отличается от показателя в опухоли – 26.5% ($p = 0.01$).

Другая картина отмечена в группе II с инвазией опухоли в мышечный слой и высокими показателями уровня экспрессии TUBB3: не выявлено статистически значимых различий в уровне экспрессии TUBB3 в опухоли и в образцах “нор-

мальной” слизистой мочевого пузыря. Суммарный средний уровень экспрессии TUBB3 в “норме” составил 38.8%, а в опухоли – 44.3% ($p > 0.05$).

Ранжирование молекулярного прогноза течения болезни в соответствии с уровнем экспрессии TUBB3 в визуально нормальной слизистой мочевого пузыря проведено, опираясь на следующие данные. Так, в группе I без инвазии опухоли в мышечный слой в 80% случаев индивидуальный показатель уровня экспрессии TUBB3 не превысил 20% (при среднем значении 17.7%). Учитывая, что существует некий фон показателя, ассоциированный с наличием в исследуемом материале нейтронов, клеток эндотелия и макрофагов с крайне низкой экспрессией TUBB3, который, по данным литературы и собственным оценкам, суммарно может достигать 10% [1, 14], выявленный в исследуемом образце ткани уровень экспрессии TUBB3 $\leq 20\%$ является крайне низким. Именно поэтому уровень экспрессии TUBB3 в визуально нормальной слизистой $\leq 20\%$ следует рассматривать как указание на благоприятный прогноз течения болезни.

Только у двух из 10 больных в группе I без инвазии опухоли в мышечный слой отмечен более высокий уровень экспрессии TUBB3 в нормальной ткани (табл. 3, образцы № 9 и № 10). По нашему мнению, в этих случаях прогноз течения болезни необходимо рассматривать соответственно как “настороженный” и “неблагоприятный”.

Согласно такой оценке, у всех пациентов группы II с подтвержденной инвазией опухоли в мышечный слой по результатам молекулярного фенотипирования TUBB3 можно прогнозировать неблагоприятное течение заболевания. Следует отметить, что у всех больных в этой группе высокий уровень экспрессии TUBB3 в опухоли практически не отличался от “нормальной” слизистой мочевого пузыря, как вблизи, так и отдаленно от опухолевого узла.

Подтверждением правомочности подобного рассмотрения результатов молекулярного фенотипирования может быть клинический случай, приведенный в нашем исследовании (образец № 14 в табл. 3). По результатам анализа образцов опухоли и визуально нормальной ткани, полученных во время трансуретральной резекции, у больного диагностирован неблагоприятный молекулярный прогноз течения болезни. Спустя 3 месяца по совокупности клинических признаков диагностировано прогрессирование болезни и больному выполнена цистэктомия.

Что же касается группы III, в которой из-за отсутствия адекватного материала не удалось оценить инвазию опухоли в мышечный слой, по результатам молекулярного тестирования в нее вошли больные с разным прогнозом. Эти пациенты, а

также все больные из группы I остаются под динамическим наблюдением в реальном времени для того, чтобы достоверно оценить практическую информативность молекулярной диагностики “нормальной” слизистой в прогнозе агрессивности течения уротелиального рака мочевого пузыря. Особенно важным это может оказаться для тех случаев, когда при трансуретральном вмешательстве не удается получить фрагмент мышечной ткани и достоверно оценить степень ее инвазии опухолевыми клетками. А случаев таких, как видно из представленного материала, немало – 4 из 14 трансуретральных резекций (около 30%).

Реальные гистограммы распределения клеток по интенсивности внутриклеточной флуоресценции после завершения иммунофлуоресцентного окрашивания, по результатам которого количественно оценивается уровень экспрессии белка TUBB3 в исследуемой ткани, представлены на рис. 3.

Первый ряд гистограмм демонстрирует результат анализа, который дает благоприятный молекулярный прогноз заболевания (табл. 3, № 1). Видно, что уровень экспрессии TUBB3 низкий как в опухоли, так и в двух образцах “нормальной” слизистой: 17, 9 и 12% соответственно.

Второй ряд гистограмм демонстрирует результат анализа, который выявил уровень экспрессии TUBB3 в опухоли и в одном из образцов “нормы” около 30% (табл. 3, № 9). Согласно предложенной градации, молекулярный диагноз распространенности опухолевого процесса в слизистой мочевого пузыря в этом случае настороженный, хотя при гистологическом исследовании инвазии опухоли в мышечный слой не выявлено.

И наконец, третий пример относится к неблагоприятному молекулярному прогнозу (табл. 3, образец № 12). Как в опухоли, так и в “нормальной” слизистой выявлен высокий уровень экспрессии TUBB3: 53, 38 и 45% соответственно. В совокупности это указывает на выраженную локальную распространенность опухолевого процесса в слизистой мочевого пузыря и в данном случае молекулярный диагноз совпадает с гистологическим заключением о наличии мышечной инвазии опухоли.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Молекулярная диагностика опухолей является важнейшим ориентиром в мотивированном выборе тактики хирургического и лекарственного ведения пациентов с разными злокачественными новообразованиями. Раздел, который мы развиваем в последние годы, – молекулярная диагностика локальной распространенности процесса в пораженном органе с использованием уникального маркера TUBB3.

молекулярный маркер, позволяющий надежно, количественно оценить при поверхностном раке мочевого пузыря вовлеченность в процесс малигнизации визуально нормальной слизистой. Следует заметить, что в большом числе исследований сообщается о безусловном вкладе TUBB3 как в резистентность к противоопухолевой терапии, так и в агрессивность течения онкологических заболеваний [7, 22, 23].

Какова фундаментальная и практическая значимость описания новой модальности TUBB3? Прежде всего, это важно с точки зрения оценки агрессивности на разных этапах течения болезни, что потенциально может быть ориентиром в выборе тактики хирургического и лекарственного лечения опухолей вообще и уротелиального рака мочевого пузыря в частности. В последнем случае это особенно актуально для немышечно-инвазивных опухолей, при которых дополнительный фактор риска рецидива может повлиять на решение вопроса о показаниях к повторной трансуретральной резекции мочевого пузыря, на выбор вида и продолжительности адьювантной внутривезикулярной терапии, а также на интенсивность наблюдения за пациентом. Весьма перспективным в практическом плане представляется дальнейшее изучение выявленной корреляции между вовлеченностью в процесс малигнизации нормальной слизистой мочевого пузыря и инвазией опухоли в мышечный слой. По результатам проведенного исследования обнаружение опухолевых ассоциированных белков TUBB3 более чем в 40% клеток “нормальной” слизистой указывает на инвазию опухоли в мышечный слой, то есть на ее агрессивность. Теоретически, появление молекулярного маркера, свидетельствующего не только о высоком риске поражения уротелия, локализуемого за пределами визуально определяемой опухоли, но и о риске мышечной инвазии, способно оказать влияние на формулировку показаний к ранней цистэктомии.

Учитывая тот факт, что гиперэкспрессия TUBB3 является молекулярным маркером резистентности опухоли к ряду анти tubулиновых противоопухолевых препаратов [2–4], следует отметить, что оценка уровня экспрессии этого молекулярного маркера в опухоли имеет самостоятельное значение и должна быть использована для мотивированного включения этих препаратов в схемы лечения рака мочевого пузыря.

И наконец, необходимо подчеркнуть, что полученные результаты подтверждают справедливость ранее высказанного нами утверждения, что морфологически нормальная ткань, окружающая опухоль, является источником актуальной информации и должна подвергаться молекулярной диагностике наряду с тканью новообразования.

Как и в случае с TUBB3, при этом могут быть получены важные сведения для понимания “молекулярного патогенеза” малигнизации слизистой мочевого пузыря.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение о субсидии № 075-15-2021-1060 от 28.09.2021) и в рамках НИР ФГБУ “НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России 2020–2022 гг. (№ АААА-А20-120020690077-0).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Person F., Wilczak W., Hube-Magg C., Burdelski C., Möller-Koop C., Simon R., Noriega M., Sauter G., Steurer S., Burdak-Rothkamm S., Jacobsen F. (2017) Prevalence of β III-tubulin (TUBB3) expression in human normal tissues and cancers. *Tumour Biol.* **39**(10), 1010428317712166.
2. Prassanawar S.S., Panda D. (2019) Tubulin heterogeneity regulates functions and dynamics of microtubules and plays a role in the development of drug resistance in cancer. *Biochem. J.* **476**(9), 1359–1376.
3. Parker A.L., Teo W.S., McCarroll J.A., Kavallaris M. (2017) An emerging role for tubulin isotypes in modulating cancer biology and chemotherapy resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **18**(7), 1434.
4. Duran G.E., Wang Y.C., Moisan F., Francisco E.B., Sikic B.I. (2017) Decreased levels of baseline and drug-induced tubulin polymerisation are hallmarks of resistance to taxanes in ovarian cancer cells and are associated with epithelial-to-mesenchymal transition. *Br. J. Cancer.* **116**(10), 1318–1328.
5. Čermák V., Dostál V., Jelínek M., Libusová L., Kovář J., Rösel D., Brábek J. (2020) Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment. *Eur. J. Cell Biol.* **99**(4), 151075.
6. Kaul R., Risinger A.L., Mooberry S.L. (2019) Microtubule-targeting drugs: more than antimetotics. *J. Nat. Prod.* **82**(3), 680–685.
7. Krause W. (2019) Resistance to anti-tubulin agents: from vinca alkaloids to ephedilones. *Cancer Drug Resist.* **2**, 82–106.
8. Kanakkanthara A., Miller J.H. (2021) β III-tubulin overexpression in cancer: causes, consequences, and potential therapies. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* **1876**(2), 188607.
9. Raspaglio G., Filippetti F., Prislei S., Penci R., De Maria I., Cicchillitti L., Mozzetti S., Scambia G., Ferlini C.

- (2008) Hypoxia induces class III beta-tubulin gene expression by HIF-1alpha binding to its 3' flanking region. *Gene*. **409**(1–2), 100–108.
10. Raspaglio G., De Maria I., Filippetti F., Martinelli E., Zannoni G.F., Prislei S., Ferrandina G., Shahabi S., Scambia G., Ferlini C. (2010) HuR regulates β -tubulin isotype expression in ovarian cancer. *Cancer Res*. **70**(14), 5891–5900.
 11. Sobierajska K., Wiczorek K., Ciszewski W.M., Sacewicz-Hofman I., Wawro M.E., Wiktorska M., Boncela J., Papiewska-Pajak I., Kwasniak P., Wyroba E., Cierniewski C.S., Niewiarowska J. (2016) β -III tubulin modulates the behavior of Snail overexpressed during the epithelial-to-mesenchymal transition in colon cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta*. **1863**(9), 2221–2233.
 12. Liu Z., Li S., Dong J., Miao Y. (2021) TUBB3 promotes growth and invasion of gallbladder cancer cells by Akt/mTOR signal pathway. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol*. **40**(2), 23–33.
 13. Sekino Y., Han X., Babasaki T., Miyamoto S., Kitano H., Kobayashi G., Goto K., Inoue S., Hayashi T., Teishima J., Sakamoto N., Sentani K., Oue N., Yasui W., Matsubara A. (2020) TUBB3 is associated with high-grade histology, poor prognosis, p53 expression, and cancer stem cell markers in clear cell renal cell carcinoma. *Oncology*. **98**(10), 689–698.
 14. Богуш Т.А., Маяк М.А., Сапрыкина Н.С., Башарина А.А., Рябинина О.М., Гришанина А.Н., Богуш Е.А., Каменский А.А., Косоруков В.С. (2021) Экспериментальная проверка гипотезы о возможности молекулярной диагностики локальной распространенности опухоли на модели рака легкого Льюис. *Вест. Моск. ун-та, сер. 2, Химия*. **4**, 341–347.
 15. Bogush T.A., Mamichev I.A., Dudko E.A., Grishanina A.N., Ramanauskaitė R.J., Vichljantzeva N.O., Tjulandin S.A., Polotsky B.E., Davydov M.I. (2015) The comparative estimation of TUBB3 expression in non-small-cell lung carcinoma and adjacent lung tissue. *Ann. Oncol*. **26**(Suppl. 1), i10–i14.
 16. Мамичев И.А., Богуш Т.А., Богуш Е.А., Гришанина А.Н., Вихлянцева Н.О., Сапрыкина Н.С., Каменский А.А. (2019) Экспрессия бета-III тубулина в ткани рака пищевода и окружающей морфологически нормальной ткани. *Росс. биотерапевтический журнал*. **18**(3), 48–52.
 17. Богуш Т.А., Капура-Бреховских Е.М., Башарина А.А., Богуш Е.А., Кирсанов В.Ю., Абу-Хайдар О.Б., Лозбина П.А., Вихлянцева Н.О., Косоруков В.С. (2021) Сравнительный иммунофлуоресцентный анализ экспрессии бета-III тубулина (TUBB3) в ткани злокачественных новообразований желудка и морфологически нормальной окружающей ткани органа. *Вест. Моск. ун-та, сер. 2, Химия*. **3**, 223–229.
 18. Матвеев Б.П., Фигурин К.М., Карякин О.Б. (2001) *Рак мочевого пузыря*. Москва: Вердана. 254 с.
 19. Acar Ö., Özkurt E., Demir G., Saraç H., Alkan C., Esen T., Somel M., Lack N.A. (2015) Determining the origin of synchronous multifocal bladder cancer by exome sequencing. *BMC Cancer*. **15**, 871.
 20. Wu C.H., Silvers C.R., Messing E.M., Lee Y.F. (2019) Bladder cancer extracellular vesicles drive tumorigenesis by inducing the unfolded protein response in endoplasmic reticulum of nonmalignant cells. *J. Biol. Chem*. **294**(9), 3207–3218.
 21. Bogush T.A., Basharina A.A., Eliseeva B.K., Kaliuzhny S.A., Bogush E.A., Kirsanov V.Y., Davydov M.M., Kosorukov V.S. (2020) A new approach to epithelial-mesenchymal transition diagnostics in epithelial tumors: double immunofluorescent staining and flow cytometry. *Biotechniques*. **69**(4), 257–263.
 22. Miyata Y., Matsuo T., Nakamura Y., Yasuda T., Ohba K., Takehara K., Sakai H. (2018) Expression of class III beta-tubulin predicts prognosis in patients with cisplatin-resistant bladder cancer receiving paclitaxel-based second-line chemotherapy. *Anticancer Res*. **38**(3), 1629–1635.
 23. Hirsch A., Chaker A., Burdelski C., Koop C., Tsourlakis M.C., Steurer S., Rink M., Eichenauer T.S., Wilczak W., Wittmer C., Fisch M., Simon R., Sauter G., Büschek F., Clauditz T., Minner S., Jacobsen F. (2017) β III-tubulin overexpression is linked to aggressive tumor features and genetic instability in urinary bladder cancer. *Hum. Pathol*. **61**, 210–220.

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF INVOLVEMENT OF VISUALLY NORMAL MUCOSA IN THE MALIGNANCY PROCESS IN UROTHELIAL BLADDER CANCER

T. A. Bogush¹, *, A. A. Basharina¹, Z. M. Safarov¹, I. E. Mizaeva¹, A. N. Grishanina¹, E. A. Bogush², Ya. V. Gridneva¹, M. I. Volkova¹, V. B. Matveev¹, and V. S. Kosorukov¹

¹ Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 115478 Russia

² Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: tatbogush@mail.ru

Immunofluorescent method by flow cytometry was used to quantify the expression of the tumor-associated protein β III-tubulin (TUBB3) in the tissue of urothelial bladder cancer and visually normal mucosa (56 sam-

ples in total). The expression of the marker was detected in 100% of cases, and heterogeneity of TUBB3 expression level both in tumor tissue and in “normal” mucosa was revealed. The level of TUBB3 in the “normal” mucosa did not depend on the distance from the tumor (1 cm or more than 3 cm) and, on average, it was lower than in the tumor tissue ($35.2 \pm 12.4\%$ vs $21.8 \pm 10.8\%$ and $24.9 \pm 13.2\%$; $p = 0.005$ and 0.04 , respectively). An increase of the TUBB3 expression in the tumor and in the “normal” mucosa was revealed in muscle invasive bladder cancer compared to non-muscle invasive one. Thus, in urothelial bladder cancer, the tumor-associated protein TUBB3 is a molecular marker of bladder mucosa involvement in the malignancy process and predicts the risk of tumor muscle invasion, which may influence on indications for early cystectomy.

Keywords: bladder cancer, β III-tubulin, flow cytometry, bladder mucosa, prognosis

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.21:577.112.4

РЕЛЕВАНТНОСТЬ ЭКСПОНИРОВАННЫХ НА ПОВЕРХНОСТИ ЛАККАЗЫ
ОСТАТКОВ ЛИЗИНА, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ
ДЛЯ ЕЕ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ¹© 2022 г. А. А. Arteaga-Castrejón^a, М. R. Trejo-Hernández^a, Y. Mekmouche^b,
А. Amouric^b, P. Rousselot-Pailley^b, V. Robert^b, T. Tron^{b,*}, F. Martínez-Morales^{a,**}^aCentro de Investigación en Biotecnología, Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62209 México^bCentrale Marseille, CNRS, Aix Marseille Université, iSm2 UMR 7313, Marseille, 13397 France

*e-mail: thierry.tron@univ-amu.fr

**e-mail: fernandomm@uaem.mx

Поступила в редакцию 05.09.2021 г.

После доработки 02.12.2021 г.

Принята к публикации 10.12.2021 г.

Лакказы грибов – это оксидоредуктазы с низкой субстратной специфичностью. Для получения гибридных катализаторов с новыми свойствами на основе лакказы необходимо знать характеристики поверхности этого фермента. Мишенями для реакций иммобилизации служат молекулы лизина, экспонированные на поверхности лакказы. В качестве платформы для выявления экспонированных на поверхности лакказы сайтов, потенциально пригодных для замещения остатками лизина, мы использовали LAC3-K0, лишенный остатков лизина. На основе 3D модели LAC3-K0 были выбраны семь сайтов и с помощью сайт-направленного мутагенеза получены мутанты с единичными остатками лизина (UNIK_n, где n – номер остатка). Все мутанты экспрессировали в клетках *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A. По способности окислять гваякол или 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновую кислоту) (ABTS) на чашках с агаром их отнесли к функционально секретиремым белкам. Все варианты, как и ожидалось, были активными при кислых, но не при нейтральных значениях pH. Эти варианты оставались стабильными при температуре 15–55°C и полностью утрачивали активность при 70°C. Показано, что замена одного или двух поверхностных остатков лизина сильно влияла на активность фермента и его субстратную специфичность независимо от расстояния этих остатков от сайта T1. Каталитические параметры (K_M^{app} и k_{cat}^{app}), измеренные по отношению к ABTS, различались у разных вариантов; V_{max}^{app} была в 1.5–2 раза выше у UNIK₂₆₉ и у тройного мутанта с $V_M^{app} = 0.27$ и 0.30 соответственно; k_{cat}^{app} равна 30.25 у UNIK₂₃₈ и 32.34 у тройного мутанта. Установлено, что свойства гидрофобных областей на поверхности LAC3-K0 следует учитывать при взаимодействии гибридных материалов. Все полученные нами варианты с уникальными поверхностными остатками лизина содержат сайты, пригодные для контролируемой ориентации лакказы при дизайне гибридных материалов.

Ключевые слова: лакказа, ориентированная функционализация, сайт-направленный мутагенез, UNIK**DOI:** 10.31857/S0026898422040024

ВВЕДЕНИЕ

Лакказы – *n*-дифенолоксидоредуктазы [КФ 1.10.3.2] – “мультимедные” ферменты, содержащие четыре иона меди, организованных в два активных центра. Расположенный на поверхности медный сайт типа I участвует в окислении фенольных субстратов, тогда как скрытый трехядерный медный центр участвует в сопутствующем восстановлении O₂ до воды [1, 2]. Лакказы

рассматриваются как “зеленые катализаторы”, благодаря их способности использовать молекулярный O₂ как акцептор электронов с образованием воды в качестве единственного побочного продукта [3–5]. Низкая специфичность лакказ позволяет им катализировать окисление широкого круга фенольных соединений, ароматических аминов и ионов металлов. Лакказы, широко распространенные в природе, выполняют разнообразные биологические функции, включая участие в морфогенезе, защите от стресса и деградацию лигнина [6]. Лакказы грибов обладают высоким редокс-потенциалом (730–790 мВ), однако для дегра-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898422040024 для авторизованных пользователей.

дации некоторых компонентов лигнина и других субстратов с высоким редокс-потенциалом требуют присутствие редокс-медиаторов [7, 8].

В последние 10 лет лакказы привлекали особое внимание из-за их редокс-свойств и надежности как катализаторов. Они используются в экологически чистых производствах, включающих биотехнологические процессы получения текстиля, косметических средств, пищевых продуктов, лекарственных препаратов, биотоплива и энергии. Недавно лакказы нашли применение в нанобиотехнологиях [6, 9], области, возникшей на переднем крае биотехнологии, в которой технологии функционализации и иммобилизации используются для интеграции ферментов при дизайне гибридных наноматериалов (NM) с улучшенными характеристиками и свойствами, еще не обнаруженными в природе.

Иммобилизация — давно известный мощный инструмент улучшения свойств природных ферментов [10], применение которых затрудняется такими постпроизводственными проблемами, как недостаточная стабильность, длительность хранения, условия применения (рН и температура), восстановление и рециклинг катализатора. Для иммобилизации используют свойства аминокислотных остатков, локализованных на поверхности молекулы фермента, такие как, например, активные группы цистеина или лизина, которые могут участвовать в ковалентном связывании [10]. Как описано в обзоре Noagau и соавт. [11], химически хорошо охарактеризованные самособирающиеся монослойные (SAM) поверхности, образованные короткими цепочками этиленгликоля и цистеин-активными малеимидными группами, могут использоваться для ковалентного связывания остатков цистеина, расположенных на поверхности фермента. Прогресс в изучении взаимодействий на молекулярном уровне между белками и материалом подложек, которые вносят вклад в повышение стабильности и активности, обеспечивают разработку методов, которые модулируют взаимодействие фермент-подложка. Один из таких подходов — рациональный дизайн вариантов с контролируемой ориентацией фермента по отношению к поверхности подложки [11–13]. Обеспечить нужную ориентацию можно путем сайт-направленного замещения аминокислотных остатков, расположенных на поверхности, остатками с активными функциональными группами, которые будут мишенями последующих реакций сопряжения с выбранным материалом. Например, описана ориентация лакказ на поверхности модифицированных карбоновых нанотрубок с целью синтеза эффективных биокатодов через специфичную ковалентную функционализацию уникальных остатков лизина [14, 15]. Ориентация молекул фермента (при увеличении числа “связанных” молекул) на поверхности электрода позволяет измерить

прямой перенос электронов (DET) с электрода на фермент; DET может модулироваться как функция ориентации фермента [14, 15].

Благодаря хорошо изученной топографии, некоторые лакказы идеальны для получения представлений о модуляции функций фермента посредством сайт-направленного мутагенеза поверхностных аминокислотных остатков, предсказанных с помощью биоинформатических инструментов, для дизайна точных изменений. Лакказа LAC3 *Trametes* sp. штамм С30 катализирует окисление природных и синтетических соединений [16, 17], ее активность модулируется путем создания на поверхности разных сайтов функционализации [14, 15, 18]. Использование варианта LAC3, лишённого лизиновых групп, позволяет ввести уникальные остатки лизина в любое место поверхности фермента [18].

С целью выяснения влияния локализации остатков лизина на поверхности лакказы на функцию лакказы нами получен и охарактеризован набор вариантов LAC3 с оригинальными единичными остатками лизина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы, среды и плазмиды. Во всех манипуляциях с ДНК использовали штамм *Escherichia coli* DH5 α (F Δ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYAargF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(*rk, mk* +) *phoA supE44 thi lgyrA96 relA1* λ). Клетки *E. coli* растили в среде Luria–Bertani (LB, 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl). При необходимости добавляли ампициллин (100 мкг/л). Плазмиды и праймеры, использованные в настоящей работе, приведены в табл. 1. Рекомбинантные лакказы экспрессировали в дрожжевой плазмиде pAKLAC3-K0 [16, 18], используемой в качестве исходной плазмиды для получения мутантных производных лакказы. Штамм *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A (*MATa*{*leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*}) использовали для экспрессии лакказы. Трансформанты *S. cerevisiae* выращивали в селективной среде (6.7 г/л YNB без аминокислот, 5 г/л казаминокислот, 90 мг/л аденина; 40 мг/л триптофана; 50 мМ сукцинатного буфера рН 5.3; 0.5% v/v гваякола; 100 мкМ CuSO $_4$) и 20 г/л глюкозы в качестве источника углерода (SD).

Молекулярная модель. На сервере Swiss Model (swissmodel.expasy.org) сгенерирована замещенная 3D модель, основанная на кристаллической структуре лакказы 1GYC *T. versicolor* в качестве матрицы (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org>). Эту модель использовали для предсказания экспонированных на поверхности аминокислотных остатков LAC3 (GenBank AAR00925.1) с применением программ GetArea (www.expasy.org) и PyMOL (pymol.org). Для предсказания гидрофобных

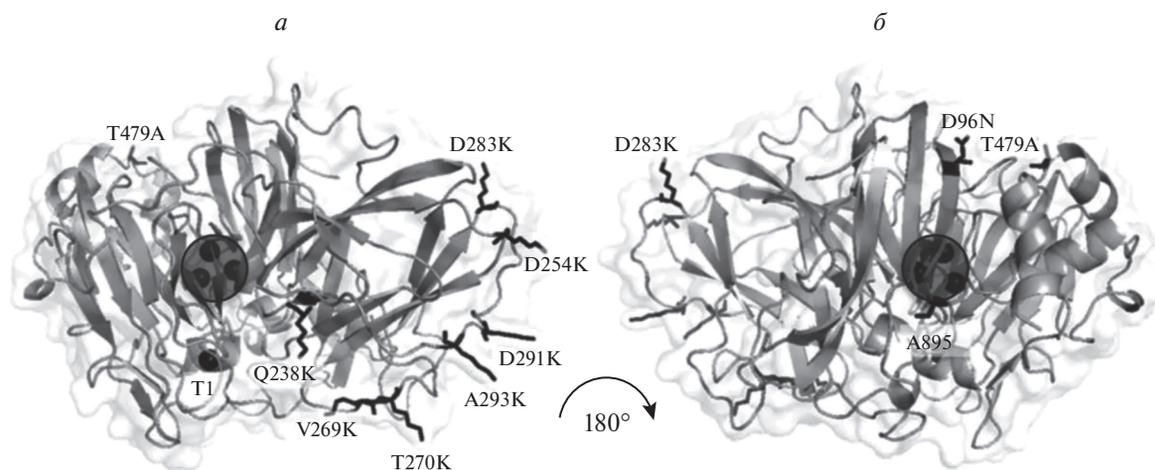


Рис. 1. 3D модель LAC3-K0, представленная в виде серых ленточных диаграмм (а и б). Поверхностные аминокислотные остатки, выбранные для мутагенеза, выделены черными палочками, медь в сайте T1 показана черной сферой, трехядерный медный сайт обведен кружком. В качестве образца использованы координаты кристаллической структуры лакказы (1GYC) *Trametes versicolor*.

участков (НР) на поверхности белков использовали web server protein-sol (<http://protein-sol.manchester.ac.uk/>) [19].

Дизайн и конструирование мутантов. Плазмиду pAKLAC3-K0, кодирующую вариант LAC3, не содержащий остатков лизина ($K_0 = K_{40} > M, K_{71} > H$), использовали как ДНК-матрицу для получения единичных лизиновых мутантов, названных UNIK_{*n*}, где *n* – положение остатка лизина в последовательности LAC3. Для получения вариантов UNIK, названных UNIK₂₃₈ (Q238K), UNIK₂₅₄ (D254K), UNIK₂₆₉ (V269K), UNIK₂₇₀ (T270K), UNIK₂₈₃ (D283K), UNIK₂₉₁ (D291K) и UNIK₂₉₃ (A293K), использовали набор Quick-change mutagenesis kit (“Thermo Scientific”, США). Последовательности мутагенных праймеров, сконструированных в этой работе, приведены в табл. 1. Правильность мутантных последовательностей подтверждена секвенированием. В двух случаях, обусловленных, возможно, ошибками ДНК-полимеразы, обнаружены случайные мутации (выделены полужирным) в вариантах UNIK₂₆₉ (**D96N/V269K/T479A**) и UNIK₂₉₁ (**A89S/D291K**). Поскольку эти мутации картированы на поверхности 3D модели LAC3-K0, а мутантные варианты ферментативно активны, мы решили включить их в исследование и сравнить активности этих вариантов и реципрокных единичных мутантов (рис. 1).

Трансформация клеток дрожжей и анализ активности лакказы на чашках. Штамм *S. cerevisiae* W303-1A трансформировали плазмидами по протопиту с использованием ацетата лития/ДНК-носителя /PEG [20]. После трансформации клетки распределяли по поверхности чашек с селективной средой SD и инкубировали при 28°C в течение 4 дней. Лакказную активность определяли

количественно на чашках со средой SD, содержащей 100 мкМ CuSO₄ и 0.5% v/v гваякола. Ферменты LAC3 и LAC3-K0, использованные в качестве контроля, получали, как описано Zhou и соавт. [21].

Продукция вариантов лакказы в дрожжах и определение лакказной активности. Клетки дрожжей, продуцирующие варианты лакказы, культивировали в течение 60 ч при начальной плотности $OD_{600} = 0.1$ в 50 мл среды SD в 250 мл колбах при 28°C и 160 об./мин. После центрифугирования (4200 об./мин, 10 мин), супернатант фильтровали через бумажный фильтр (Whatman № 1), затем пропускали через фильтр из стекловолокна (поры 1.6 мкм) и концентрировали в ячейке для ультрафильтрации (“Amicon”, США) с мембраной для белков 10 кДа (“Millipore”, США). Концентрат фермента хранили при –80°C в 30% (w/v) глицерине. Активность лакказы (5 мкл концентрированного супернатанта) определяли при 25°C путем окисления 1 мМ 2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолина-6-сульфоновой кислоты) (ABTS) в 100 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 4.4) в суммарном объеме 1 мл. Окисление ABTS измеряли при 436 нм ($\epsilon = 29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), используя спектрофотометр DU640 (“Beckman”). Ферментативную активность выражали в международных единицах (U). За одну единицу активности принимали количество фермента, необходимое для окисления 1 мкмоль/мин ABTS. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда [22].

Характеристика кинетических параметров (кажущаяся V_{\max} и K_M) и условия стабильности грубого экстракта лакказы. Значения кажущейся V_{\max} и K_M определяли по уравнению Михаэлиса–Ментен, затем рассчитывали значения k_{cat} . Использовали ABTS в концентрации 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 3.0 и

Таблица 1. Плазмиды и праймеры, использованные в работе

Плаزمида	Положение кодона	Расстояние до T1, Å ^a	Ссылка
pAK145-LAC3	K ₄₀ /K ₇₁	31.8/27	[16]
pAK-145-K0	M ₄₀ /H ₇₁	31.8/27	[14]
pAK-145-Q238K	238	17.5	Эта работа
pAK145-D254K	254	42	То же
pAK145-V269K	269	20.8	»
pAK145-T270K	270	24.5	»
pAK145-D283K	283	41	»
pAK145-D291K	291	36.4	»
pAK145-A293K	293	32.8	»
pAK145-D96N/V269K/T479A	96/269/479	30.6/20.8/33	»
pAK145-A89S/D291K	89/291	30/36.4	»
Праймер	Нуклеотидная последовательность (5' → 3') ^a		
Q238KFwd	GTCGACTCGATC <u>AAA</u> ATTTTCGCCGGG		
Q238KRev	CCCGGCGAAAATTTTGATCGAGTCGAC		
D254KFwd	ACCGCGGATCAAAAATCGGTAACACTAC		
D254KRev	GTAGTTACCGATTTTTTGATCCGCGGT		
V269KFwd	CTAACACCGGTACA <u>AAA</u> ACCACCGATGG		
V269KRev	CCATCGGTGGTTTTTGATCCGGTGTTAG		
T270KFwd	GGTACAGTCA <u>AAA</u> ACCGATGGCGGC		
T270KRev	GCCGCCATCGGTTTTGACTGTACC		
D283KFwd	CATCTGCGTTACA <u>AAA</u> ACGGCGGACCC		
D283KRev	GGGTCCGCCGTTTTGTAACGCAGAATG		
D291KFwd	CGATCGAACCC <u>AAA</u> GCCGCAGACC		
D291KRev	GGTCTGCGGCTTTGGGTTTCGATCG		
A293KFwd	GAACCCGACGCC <u>AAA</u> GACCCACACAG		
A293KRev	CTGGTGGGGTCTTTGGCGTCCGGGTTTC		

^a Подчеркнут кодон, кодирующий мутантный лизин AAA/TTT.

5.0 мМ в 100 мМ натрий-ацетатном буфере (рН 4.4) с 5 мкл концентрированного фермента в объеме 1 мл. Все измерения проводили в трех повторностях в описанных ранее условиях. Поскольку в катализе лакказы участвуют два субстрата и инвариантный [O₂], который, как полагают, присутствует в насыщающей концентрации, K_M для разных субстратов считали кажущейся (K_M^{app}). При допущении, что 100% лакказы участвует в катализе как активный фермент, измеренные k_{cat} и V_{max} также считали кажущимися (k_{cat}^{app} и V_{max}^{app}).

Температурная и рН-стабильность лакказы. Термостабильность выбранных вариантов лакказы анализировали, инкубируя грубый концентрированный супернатант среды культивирования при разных температурах (15, 25, 37, 55 и 70°C) в течение 120 мин и оставляли при 4°C до измерения активности. Лакказную активность определяли при 25°C в предварительно описанных условиях с 1 мМ АВТС в качестве субстрата в 100 мМ натрий-ацетатном буфере (рН 4.4). Влияние рН

на стабильность лакказы исследовали, инкубируя супернатанты при разных значениях рН в 100 мМ ацетатном буфере (рН 3.5–4.5) или в 100 мМ фосфатном буфере (рН 5–7.5) в течение 180 мин при 25°C. Концентрированные супернатанты переносили в стандартные реакционные смеси для определения лакказной активности с 1 мМ АВТС в качестве субстрата (рН 4.4), затем рассчитывали удельную активность каждого варианта (SA).

Влияние температуры и рН на активность лакказы. Для изучения действия температуры концентрированные супернатанты инкубировали при 15, 25, 37, 55 и 70°C в течение 30 мин, активность лакказы определяли при соответствующей температуре в стандартных условиях [21]. Влияние рН на активность лакказы определяли в концентрированном супернатанте в 100 мМ ацетатном буфере/100 мМ фосфатном буфере (рН 3.5–7.5) при 25°C с 1 мМ АВТС в качестве субстрата, затем рассчитывали удельную активность каждого варианта.

Скрининг окисления фенольных соединения. Окисление соединений определяли по прото-

колу, описанному Pardo и соавт. [7] с некоторыми изменениями. Катехол, ванильную кислоту, галловую кислоту, феруловую кислоту и ванилин получили от “Sigma-Aldrich” (ФРГ). Исходные 10 мМ растворы готовили в 20%-ном этаноле за исключением катехола, который растворяли в воде. Реакции проводили в 96-луночных планшетах, добавляя 10 мкл концентрированного экстракта лакказы, 180 мкл 100 мМ ацетатного буфера pH 5.0 и 20 мкл исходного раствора субстрата в лунку. Контрольную реакцию проводили в отсут-

ствии субстрата. Реакции проводили в двух повторах для каждого варианта в планшетном ридере (“Bio-Rad”, США, Model 680) с каждым субстратом при подходящей длине волны (400–450 нм). Показания снимали после инкубации в течение 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 и 24 ч. Среднее значение ΔAbs на 1 мкг белка рассчитывали для каждого варианта и нормировали по активности LAC3 дикого типа. Относительную активность каждого варианта по отношению к активности контрольной LAC3 рассчитывали согласно следующей формуле [7]:

$$\frac{[(\Delta Abs_x - \Delta Abs_{blank}) / (\text{protein})_x]}{[(\Delta Abs_{control} - \Delta Abs_{blank}) / (\text{protein})_{control}]},$$

где ΔAbs – изменение поглощения; ΔAbs_x – изменение поглощения в реакции мутанта с единичной заменой; $\Delta Abs_{control}$ – изменение поглощения в реакции LAC3 дикого типа; ΔAbs_{blank} – изменение поглощения в реакции без фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн и экспрессия вариантов UNIK лакказы

С целью получения единичных экспонированных функционализированных остатков лизина, локализованных на разных расстояниях от медных сайтов T1 или T2/3, сначала анализировали 3D модель поверхности фермента LAC3-K0. На поверхности K0 экспонированы 115 аминокислотных остатков, остатки глицина и пролина мы не рассматривали, чтобы избежать потенциально крупных изменений структурно-функциональных отношений в молекуле белка. Из оставшихся 85 аминокислотных остатков с разной степенью экспонированности растворителю для замены на остаток лизина были отобраны семь в домене 2 (который содержит небольшое число консервативных остатков). Эти остатки локализованы на разных расстояниях от медного сайта 1, из них консервативным в лакказах является только Q238 (рис. 1). Расстояние от сайта мутации до T1 во всех потенциальных вариантах UNIK LAC3 рассчитывали на основе модели. Таким образом, на первом этапе мы ввели остатки K, которые будут находиться на расстоянии от 17.5 до 41 Å от T1 (табл. 1). В этой работе все варианты UNIK лакказы, экспрессируемые в *S. cerevisiae* в виде секретрируемых белков, обладали способностью окислять гваякол, ABTS и выбранные субстраты (рис. S1 Приложения, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2022/4/supp_Arteaga-Castrejon_rus.pdf). Примечательно, что спонтанные мутации, возникшие в ходе мутагенеза и приведшие к дополнительным заменам на поверхности двух производных UNIK – UNIK₂₆₉ (D96N/V269K/T479A) и UNIK₂₉₁ (A89S/D291K) – без нарушения ферментативной активности.

Поэтому эти мутанты включили в исследование и сравнили с соответствующими единичными UNIK-мутантами. Биохимические свойства вариантов анализировали с использованием грубых супернатантов без дальнейшей очистки. Активности нормировали по содержанию белка (относительная удельная активность).

Определение кажущихся кинетических параметров

Кажущиеся кинетические параметры (V_{max}^{app} , k_{cat}^{app} и K_M^{app}) получали путем подгонки кривой $V_i = f([ABTS])$ по уравнению Михаэлиса–Ментен.

Величины K_M^{app} имели субмиллимолярные значения (≈ 0.3 – 0.9 мМ). Примечательно, что они находились в том же диапазоне, что и у контрольного фермента – 0.27–0.30 у UNIK₂₆₉ тройного мутанта.

Значения V_{max}^{app} были относительно близкими у разных вариантов за исключением мутантного варианта V269K, у которого оно было немного выше – в 1.5–2 раза (табл. 2). С другой стороны, UNIK₂₃₈ и UNIK_{D96N/V269K/T479A} имели сходные значения k_{cat}^{app} – 30.25 и 32.24, соответственно, более высокие, чем у остальных вариантов.

pH и температурная стабильность

Стабильность вариантов лакказы оценивали, преинкубируя ферменты при разных температурах или значениях pH и определяя остаточную активность окисления ABTS. Стабильность вариантов оставалась постоянной в интервале pH 5.5–7.5 с ABTS в качестве субстрата и слегка увеличивалась при pH 5.5 у большинства вариантов в отличие от стабильности лакказы UNIK₂₉₁, сниженной примерно на 20% при pH 5.5 и 6.5. Показано, что LAC3-K0 была более стабильной, чем мутантные варианты, причем стабильность увеличивалась на 53% при pH 6.5 (рис. 2a). Обнаружено, что все варианты остаются стабильными при температуре от 15 до 37°C; после 120 мин инкубации при 55°C сохраняется от 63 до 75% исходной активности. Все вариан-

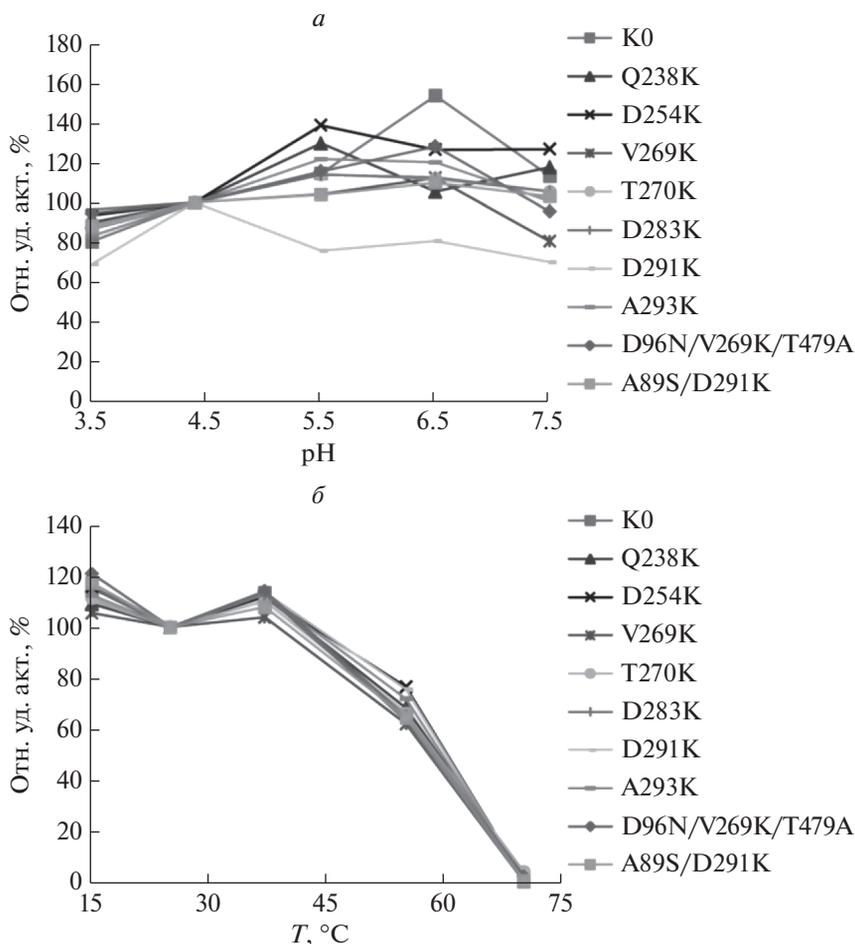


Рис. 2. pH-стабильность (а) и температурная стабильность (б) вариантов лакказы. Все тесты проводили с 1 мМ АВТС в качестве субстрата. Удельную активность рассчитывали для каждого варианта и нормировали по активности LAC3.

ты полностью инактивируются после продолжительной инкубации при 70°C (рис. 2б).

Влияние pH и температуры на активность лакказы

Самая высокая активность лакказы обнаружена при кислых значениях pH 4.5 (рис. 3а). При более высоких значениях pH активность лакказы во

всех случаях снижается почти до нуля (при pH 7.5 потеря активности достигает 98%). Активность вариантов лакказы, достаточно стабильная в интервале 15–55°C, резко снижается при температуре выше 55°C у большинства вариантов. Напротив, относительные активности K0-контроля и варианта UNIK_{A89S/D291K} оставались стабильными до 70°C (рис. 3б).

Таблица 2. Кинетические параметры ферментативной активности вариантов LAC3 в концентрированном грубом экстракте^а

Параметр	K0	Q238K	D254K	V269K	T270K	D283K	D291K	A293K	D96N/V269K/T479A	A89S/D291K
SA ^б , У/мг	2.52 ± 0.20	3.92 ± 0.27	3.58 ± 0.15	4.44 ± 0.21	2.80 ± 0.08	2.90 ± 0.11	2.42 ± 0.06	6.07 ± 0.36	18.58 ± 0.27	21.02 ± 0.24
V _{max} , мкМ/мин	5.54 ± 0.27	4.55 ± 0.18	5.24 ± 0.10	8.22 ± 0.29	2.85 ± 0.075	2.96 ± 0.10	2.98 ± 0.09	3.94 ± 0.06	11.98 ± 0.21	6.00 ± 0.07
K _M , мМ	0.64 ± 0.08	0.28 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.27 ± 0.001	0.40 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.45 ± 0.03	0.46 ± 0.03	0.30 ± 0.004	0.81 ± 0.01
k _{cat} , с ⁻¹	16.7376	30.2539	11.8157	18.0768	3.7858	4.8349	5.5861	10.1747	32.3469	10.0784

^а В качестве субстрата использовали АВТС в различных концентрациях. ^б Удельная активность.

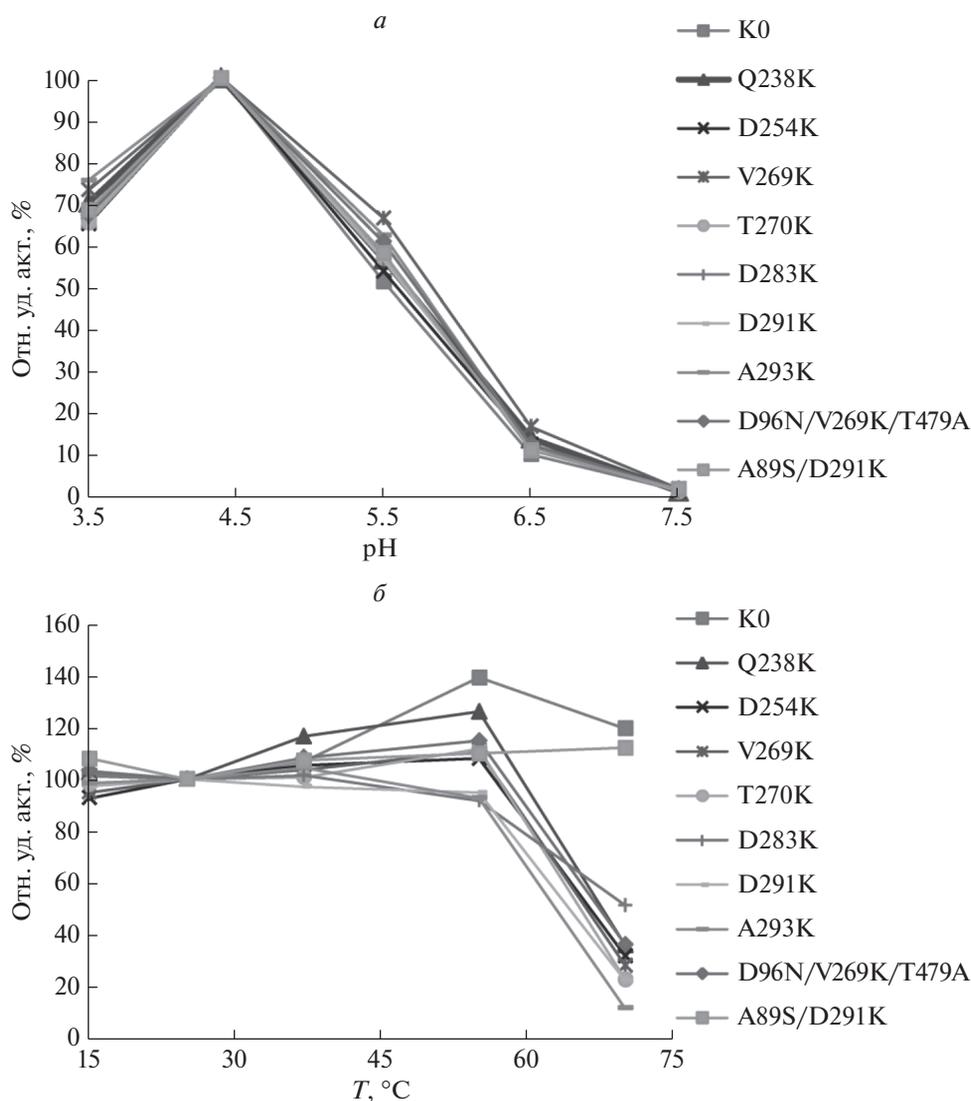


Рис. 3. Влияние pH и температуры на активность лакказы в концентрированном грубом экстракте при pH 3.5–7.5 (а) и температуре 25–70°C (б). Все опыты проведены с использованием 1 мМ АВТС в качестве субстрата.

Окисление фенольных соединений

Лакказы грибов известны своей способностью к окислению соединений, образующихся из лигнина [23]. В качестве субстратов лакказ были выбраны пять фенольных соединений с разными химическими структурами (табл. 1S, см. Приложение). Окисление фенольных соединений изучали с использованием концентрированных экстрактов каждого варианта. Все варианты и контроль K0 сохраняют способность окислять все пять соединений (рис. 4). Относительные активности нормировали по активности LAC3, определенной с использованием каждого субстрата.

Обнаружено, что мутанты UNIK₂₉₃ и UNIK_{D96N/V269K/T479A} наиболее активно окисляли ванилин, тогда как UNIK₂₃₈, UNIK₂₆₉ и UNIK₂₇₀

активнее других окисляли феруловую кислоту. UNIK₂₃₈ окисляет галловую кислоту в 1.4 раза лучше, чем K0. Способность к окислению катехола повышена у всех вариантов, особенно у UNIK₂₃₈, UNIK₂₉₃ и UNIK_{D96N/V269K/T479A}. Наконец, UNIK₂₃₈ окисляет ванилиновую кислоту в 10 раз быстрее, чем LAC3, что делает этот вариант наиболее эффективным для окисления тестируемых соединений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Лакказы грибов являются “зелеными” катализаторами со значительным биотехнологическим потенциалом во многих приложениях [9]. Недавно эти ферменты начали использовать для разработки гибридных NM. Ковалентное связывание лакказ с поверхностью NM может придавать им

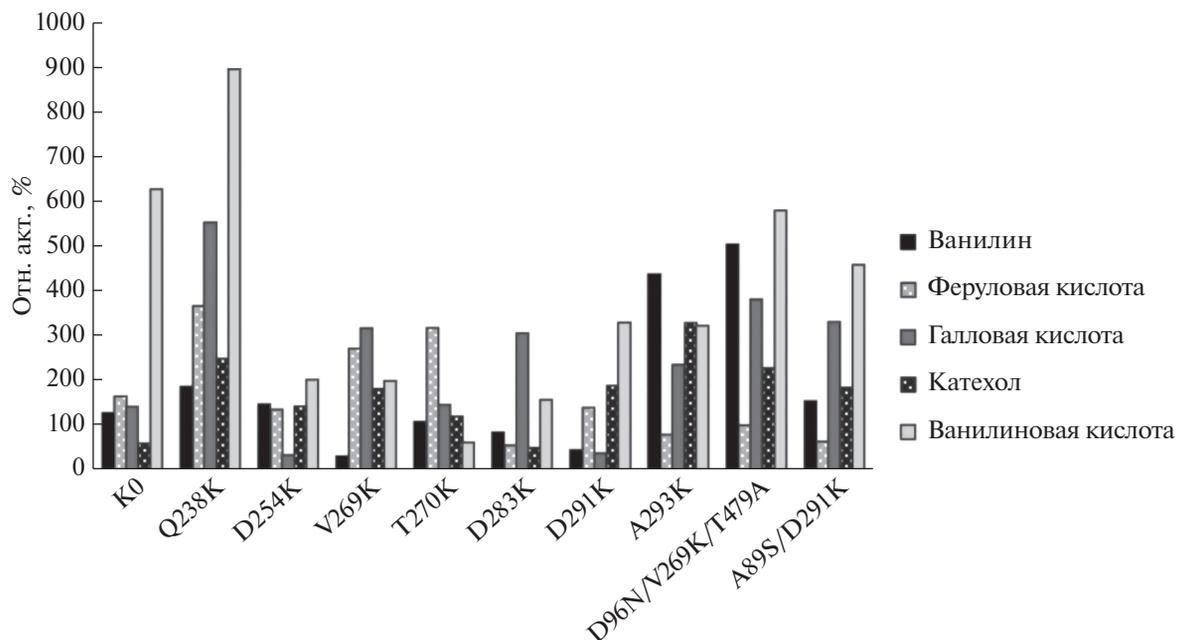


Рис. 4. Значения относительной активности вариантов лакказы по отношению к разным фенольным соединениям, использованным в качестве субстрата. Активность вариантов нормировали по активности LAC3.

новые свойства, еще не обнаруженные в природе, а контролируемое направленное связывание фермента с поверхностью NM может быть предпосылкой к тонкой настройке эффективности гибридного материала. Поэтому экспонируемая растворителю поверхность молекулы каждого фермента представляет собой требующий изучения ландшафт для выявления горячих точек рациональной функционализации остатками лизина, участвующими в дальнейших реакциях сопряжения. В этой работе нами использован фермент, лишенный остатков лизина (K0), полученный из лакказы LAC3 (содержит два природных остатка лизина), продуцируемой штаммом *Trametes* sp. C30. K0 функционирует как платформа для введения новых единичных остатков лизина в отобранные сайты на поверхности фермента (рис. 1). На первом этапе семь из 85 экспонированных на поверхности остатков, расположенных на разном расстоянии от T1Cu, заместили остатками К. Все уникальные производные UNIK, включая варианты со спонтанными поверхностными заменами, в дополнение к единственному остатку лизина, остаются активными по отношению к набору испытанных субстратов, что свидетельствует о консервативности свойств *sine qua non* лакказ, которые желательно сохранить консервативными. Близость T1Cu к сайту функционализации может усилить положительный эффект после ковалентной иммобилизации лакказы, например, отмечено увеличение эффективности DET при контролируемой ориентации фермента по отношению к материалу электрода [18, 24]. Ковалентное связывание с по-

верхностью NM, происходящее при алкилировании остатков лизина, создает бимолекулярный интерфейс, определяемый химической природой материала и микроокружения экспонированных на поверхности остатков вокруг точки функционализации.

Все варианты UNIK, сконструированные в работе, и два мутанта LAC3 с единичными остатками лизина (UNIK₁₅₇ и UNIK₁₆₁), ранее охарактеризованные Robert и соавт. [18], имели сравнимую или даже несколько повышенную активность, а также сходную с LAC3 и K0 pH- и термостабильность (рис. 3 и табл. 2). На первом этапе для исключения потери ферментативной активности мы выбрали неконсервативные аминокислотные остатки, включая спонтанные мутанты; консервативным у лакказ был только Q238 [25].

Все варианты UNIK сохранили способность окислять все пять выбранных фенольных соединений в разной степени. Величина K_M^{app} у мутантов Q238K (68%), V269K (69%), D96N/V269K/T479A (66%) была ниже, чем у LAC3. Величина k_{cat} возросла с 2.2 до 7 раз у большинства вариантов. Более значительное повышение отмечено у UNIK₂₃₈, UNIK₂₆₉ и UNIK_{D96N/V269K/T479A} (табл. 2). Влияние этих мутаций на K_M и k_{cat} соответствовало данным Mollania и соавт. [26]. Из единичных мутантов самую высокую каталитическую эффективность в отношении всех исследованных субстратов имел UNIK₂₃₈, локализованный на расстоянии 17.5 Å от T1. Таким образом, Q238 (консервативный у лак-

каз базидиомицетов) может критически влиять на аффинность к субстрату, благодаря гибкости боковой цепи лизина и увеличению локальной гидрофобной сети. Более того, большинство вариантов сохраняют способность окислять производные *n*-гидробензойной кислоты (галловая и ванилиновая кислоты). Напротив, ванилин-*n*-гидроксibenзальдегид эффективно окисляется вариантами UNIK_{D96N/V269K/T479A} и UNIK₂₉₃, тогда как другие варианты были менее активными. С другой стороны, UNIK₂₃₈, UNIK₂₉₃ и UNIK_{D96N/V269K/T479A} лучше окисляли катехол. Феруловая кислота, производное *n*-гидроксикоричной кислоты, хорошо окислялась вариантами UNIK₂₃₈, UNIK₂₆₉ и UNIK₂₇₀. Эти результаты подтверждают предположение Festa и соавт. [27], согласно которому мутации, не затрагивающие каталитический карман в лакказах, могут влиять на эффективность и стабильность фермента, хотя эти белки содержат обширные высококонсервативные и функционально важные районы. Относительная удельная активность случайно полученного варианта UNIK_{D96N/V269K/T479A} была заметно выше, чем у единичного мутанта UNIK₂₆₉. Дополнительные замены поверхностных остатков D96N и T479A, найденные в этом варианте, не сближены пространственно с целевой заменой V269K. Однако из внимательного анализа нашей модели следует, что положения 96 и 479 расположены “лицом к лицу” в интерфейсе между капредоксин-подобным доменом 1 и доменом 3. Поэтому вполне вероятно, что эта новая комбинация аминокислот (N96, A479) локально влияет на третичную структуру лакказы на границе D1/D3 с дистанционным влиянием на окисление субстрата. В целом, можно думать, что если мутантные сайты не находятся в тесном контакте, то высока вероятность аддитивного мутационного эффекта. Напротив, если такие мутации контактируют, то их вклад оказывается низким [28, 29]. Феноменом аддитивности можно объяснить положительный эффект, наблюдаемый у UNIK_{D96N/V269K/T479A}, но такой эффект отсутствует у варианта UNIK_{A89S/D291K}.

Не обнаружено общей тенденции во взаимосвязи между структурой субстрата и активностью разных вариантов, а высокий редокс-потенциал лакказы не всегда гарантирует более эффективное окисление субстрата [30]. Гидрофобное окружение T1C1 является одной из главных биохимических детерминант в модуляции редокс-потенциала лакказ грибов, и введение даже более интенсивной гидрофобной сети вблизи сайта T1C1 может приводить к положительному эффекту. Редокс-потенциал можно повысить без полной модификации каталитического кармана, поскольку подобная модификация может затруднить взаимодействие с субстратом [31]. Такие элементы белка, как локальный заряд, HP и гликозильные остатки могут

вносить важный вклад в новый межмолекулярный интерфейс, образующийся после ковалентного связывания NM и лакказы. Хорошо документировано, что HP являются главными элементами, модулирующими лиганд-рецепторные взаимодействия [32]. Распределение HP можно рассматривать, вероятно, как главный фактор, влияющий на интерфейс между лакказой и NM, или интерфейс, образованный соседними молекулами LAC3 на поверхности NM. Разные HP, разбросанные по поверхности K0 (рис. S2, см. Приложение), могут быть важными для дизайна взаимодействующих областей в зависимости от природы используемого NM. Отметим, что распределение остатков K, по-видимому, вносит главный вклад в границы полярных/неполярных поверхностей в разных HP [32, 33] и положительно влияет на структурно-функциональные отношения в молекуле лакказы. Поэтому, помимо рационального выбора остатков лизина для функционализации (селективность реакции, распределение в природном ферменте), наиболее целесообразным представляется использование этой специфической аминокислоты, способной играть главную роль в дизайне гетерогенных интерфейсов. Например, у варианта Q238K остатки, окружающие положение 238 (N211; S236; F240, P300, рис. S3 Приложения, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2022/4/supp_Arteaga-Castrejón_rus.pdf), формируют *bona fide* HP, которые могут способствовать гидрофобному вкладу лизина и положительно влиять на гидрофобный карман вблизи T1. Однако при планировании проведения функционализации необходимо тщательно изучать поведение каждого мутанта, чтобы выяснить роль, которую играет HP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все варианты UNIK сохраняют такие ферментативные свойства, как окислительная активность и операционная стабильность. Таким образом, относительно большая область поверхности LAC3, экспонированная растворителю, по-видимому, может оставаться толерантной к мутациям в разных сайтах без драматического изменения структурно-функциональных отношений. Это поддерживает представления о том, что лакказа может быть функционализирована из любого положения на поверхности, встроенной в редокс-структуру (материал электрода или комплекс переходного металла). По этой причине UNIK₂₃₈, UNIK₂₆₉ и UNIK₂₇₀ можно использовать для последующего встраивания электродов в ориентации, способствующей DET к T1. С другой стороны, UNIK₂₅₄, UNIK₂₈₃, UNIK₂₉₁ или UNIK₂₉₃ обеспечивают точку для закрепления на конце домена 2 и создают таким образом возможность проверки противоположной ориентации DET. Таким образом, для тонкой на-

стройки взаимодействий между иммобилизованной ЛАК3 и встроенным материалом необходимо изучение множественных сайтов.

Мы признательны Dr. Bertrand B. (ICF, UNAM) за обсуждение работы и критические замечания.

Выполнение работы поддержано CONACyT – ANUIES ECOS NORD и ECOS NORD UNIVERSITÉ PARIS 13 project no. 277027, а также грантом Conacyt scholarship для Ariana Arteaga (Plateforme AVB).

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

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mate D.M., Alcalde M. (2017) Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnol.* **10**, 1457–1467.
- Stanzione I., Pezzella C., Giardina P., Sannia G., Piscitelli A. (2020) Beyond natural laccases: extension of their potential applications by protein engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**, 915–924.
- Bertrand B., Martinez-Morales F., Trejo-Hernandez M.R. (2017) Upgrading laccase production and biochemical properties: strategies and challenges. *Biotechnol. Prog.* **33**, 1015–1034.
- Martínez A.T., Ruiz-Dueñas F.J., Camarero S., Serrano A., Linde D., Lund H., Vind J., Tovborg M., Herold-Majumdar O.M., Hofrichter M., Liers C., Ullrich R., Scheibner K., Sannia G., Piscitelli A., Pezzella C., Sener M.E., Kılıç S., van Berkel W.J.H., Guallar V., Lucas M.F., Zuhse R., Ludwig R., Hollmann F., Fernández-Fueyo E., Record E., Faulds C.B., Tortajada M., Winckelmann I., Rasmussen J.-A., Gelo-Pujic M., Gutiérrez A., Del Río J.C., Rencoret J., Alcalde M. (2017) Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnol. Adv.* **35**, 815–831.
- Pardo I., Rodríguez-Escribano D., Aza P., de Salas F., Martínez A.T., Camarero S. (2018) A highly stable laccase obtained by swapping the second cupredoxin domain. *Sci. Rep.* **8**, 15669.
- Su J., Fu J., Wang Q., Silva C., Cavaco-Paulo A. (2018) Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of polyphenols. *Crit. Rev. Biotechnol.* **38**, 294–307.
- Pardo I., Camarero S. (2015) Exploring the oxidation of lignin-derived phenols by a library of laccase mutants. *Molecules.* **20**, 15929–15943.
- Yin Q., Zhou G., Peng C., Zhang Y., Kües U., Liu J., Xiao Y., Fang Z. (2019) The first fungal laccase with an alkaline pH optimum obtained by directed evolution and its application in indigo dye decolorization. *AMB Express.* **9**, 151.
- Pezzella C., Guarino L., Piscitelli A. (2015) How to enjoy laccases. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 923–940.
- Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microbiol. Technol.* **40**, 1451–1463.
- Hoarau M., Badieyan S., Marsh E.N.G. (2017) Immobilized enzymes: understanding enzyme – surface interactions at the molecular level. *Org. Biomol. Chem.* **15**, 9539–9551.
- Shen L., Zhu J. (2016) Oriented protein nanoarrays on block copolymer template. *Macromol. Rapid Commun.* **37**, 494–499.
- Liu Y., Ogorzalek T.L., Yang P., Schroeder M.M., Marsh E.N.G., Chen Z. (2013) Molecular orientation of enzymes attached to surfaces through defined chemical linkages at the solid–liquid interface. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 12660–12669.
- Lalaoui N., Rousselot-Pailley P., Robert V., Mekmouche Y., Villalonga R., Holzinger M., Cosnier S., Tron T., Le Goff A. (2016) Direct electron transfer between a site-specific pyrene-modified laccase and carbon nanotube/gold nanoparticle supramolecular assemblies for bioelectrocatalytic dioxygen reduction. *ACS Catalysis.* **6**, 1894–1900.
- Gentil S., Rousselot-Pailley P., Sancho F., Robert V., Mekmouche Y., Guallar V., Tron T., Le Goff A. (2020) Efficiency of site-specific clicked laccase–carbon nanotubes biocathodes towards O₂ reduction. *Chemistry – A Eur. J.* **26**, 4798–4804.
- Klonowska A., Gaudin C., Asso M., Fournel A., Réglier M., Tron T. (2005) LAC3, a new low redox potential laccase from *Trametes* sp. strain C30 obtained as a recombinant protein in yeast. *Enzyme Microbiol. Technol.* **36**, 34–41.
- Mekmouche Y., Schneider L., Rousselot-Pailley P., Faure B., Simaan A.J., Bochot C., Réglier M., Tron T. (2015) Laccases as palladium oxidases. *Chem. Sci.* **6**, 1247–1251.
- Robert V., Monza E., Tarrago L., Sancho F., De Falco A., Schneider L., Npetgat Ngoutane E., Mekmouche Y., Pailley P.R., Simaan A.J., Guallar V., Tron T. (2017) Probing the surface of a laccase for clues towards the design of chemo-enzymatic catalysts. *ChemPlusChem.* **82**, 607–614.
- Hebditch M., Warwicker J. (2019) Web-based display of protein surface and pH-dependent properties for assessing the developability of biotherapeutics. *Sci. Rep.* **9**, 1969.
- Gietz R.D., Woods R.A. (2006) Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method in yeast protocol. Ed. Xiao W. Totowa, N.J.: Humana Press, pp. 107–120.
- Zhou S., Rousselot-Pailley P., Ren L., Charmasson Y., Dezord E.C., Robert V., Tron T., Mekmouche Y. (2018) Production and manipulation of blue copper oxidases for technological applications. *Methods Enzymol.* **613**, 17–61.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**, 248–254.
- Wang X., Yao B., Su X. (2018) Linking enzymatic oxidative degradation of lignin to organics detoxification. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3373.

24. Li Y., Zhang J., Huang X., Wang T. (2014) Construction and direct electrochemistry of orientation controlled laccase electrode. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 201–205.
25. Koschorreck K., Schmid R.D., Urlacher V.B. (2009) Improving the functional expression of a *Bacillus licheniformis* laccase by random and site-directed mutagenesis. *BMC Biotechnol.* **9**, 12.
26. Mollania N., Khajeh K., Ranjbar B., Hosseinkhani S. (2011) Enhancement of a bacterial laccase thermostability through directed mutagenesis of a surface loop. *Enzyme Microb. Technol.* **49**, 446–452.
27. Festa G., Autore F., Fraternali F., Giardina P., Sannia G. (2008) Development of new laccases by directed evolution: functional and computational analyses. *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics.* **72**, 25–34.
28. Ming D., Chen R., Huang H. (2018) Amino-acid network clique analysis of protein mutation non-additive effects: a case study of lysozyme. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1427.
29. Konishi A., Ma X., Yasukawa K. (2014) Stabilization of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by site-directed mutagenesis of surface residue Val433. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 75–78.
30. Glazunova O.A., Trushkin N.A., Moiseenko K.V., Filimonov I.S., Fedorova T.V. (2018) Catalytic efficiency of basidiomycete laccases: redox potential versus substrate-binding pocket structure. *Catalysts.* **8**, 152.
31. Mateljak I., Monza E., Lucas M.F., Guallar V., Aleksejeva O., Ludwig R., Leech D., Shleev S., Alcalde M. (2019) Increasing redox potential, redox mediator activity, and stability in a fungal laccase by computer-guided mutagenesis and directed evolution. *ACS Catalysis.* **9**, 4561–4572.
32. Lijnzaad P., Berendsen H.J.C., Argos P. (1996) Hydrophobic patches on the surfaces of protein structures. *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics.* **25**, 389–397.
33. Ernst H.A., Jørgensen L.J., Bukh C., Piontek K., Platner D.A., Østergaard L.H., Larsen S., Bjerrum M.J. (2018) A comparative structural analysis of the surface properties of asco-laccases. *PLoS One.* **13**, e0206589.

RELEVANCE OF SURFACE-EXPOSED LYSINE RESIDUES DESIGNED FOR FUNCTIONALIZATION OF LACCASE

A. A. Arteaga-Castrejón¹, M. R. Trejo-Hernández¹, Y. Mekmouche², A. Amouric², P. Rousselot Pailley², V. Robert², T. Tron², *, and F. Martínez-Morales¹, **

¹ Centro de Investigación en Biotecnología, Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, 62209 México

² Centrale Marseille, CNRS, Aix Marseille Université, iSm2 UMR 7313, Marseille, 13397 France

*e-mail: thierry.tron@univ-amu.fr

**e-mail: fernandomm@uaem.mx

Fungal laccases are oxidoreductases with low-substrate specificity. The characterization of laccase's surface is a prerequisite used to obtain hybrid catalysts with new properties. Surface-exposed lysine residues are targets in immobilization reactions. In this work, LAC3-K0, an enzyme devoid of lysine, was used as a platform to detect potential surface-exposed sites suitable for replacement with a lysine residue. Seven sites were selected from a LAC3-K0 3-D model, and single lysine mutants (UNIK_n, n = residue number) were obtained by site-directed mutagenesis. All mutants were expressed in *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A and detected as functional secreted proteins by their ability to oxidize guaiacol or 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) on agar plates. All variants were active at acidic pH but presented no activity at neutral pH, as expected. Likewise, variants were stable at temperatures between 15–55°C, and were completely inactivated at 70°C. Oxidation assays revealed that the replacement of one or two surface residues greatly affected enzyme activity and substrate selectivity regardless of the distance to the T1 site. The catalytic parameters (K_M^{app} and $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$) determined with ABTS were found to be different among the variants; the $V_{\text{max}}^{\text{app}}$ was 1.5–2 fold higher in UNIK₂₆₉ and triple mutant, with a K_M^{app} of 0.27 and 0.30 respectively; $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ was 30.25 in UNIK₂₃₈ and 32.34 in the triple mutant. The role of hydrophobic patches detected on the surface of LAC3-K0 was determined to be a favorable factor to be considered in the interaction of hybrid materials. All variants with a unique surface lysine created in this work could offer appropriate sites for a controlled orientation of the laccase in the design of hybrid materials.

Keywords: laccase, oriented functionalization, site-directed mutagenesis, UNIK

УДК 575.112

АНАЛИЗ МНОЖЕСТВЕННЫХ ВЫРАВНИВАНИЙ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ 3D-СТРУКТУРНОЙ ИНФОРМАЦИИ ПО ОРИЕНТАЦИИ БОКОВЫХ ЦЕПЕЙ АМИНОКИСЛОТ

© 2022 г. Д. С. Тимонина^а, Д. А. Суплатов^{б, *}^аФакультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия^бНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*e-mail: d.a.suplatov@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 31.01.2022 г.

После доработки 25.02.2022 г.

Принята к публикации 02.03.2022 г.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей гомологичных белков — ключевой инструмент современной биоинформатики и эволюционного анализа. Различия в пространственной ориентации боковых цепей аминокислот могут предопределять существенное функциональное разнообразие представителей одного суперсемейства, однако это обстоятельство никак не учитывают при построении выравниваний и последующем сравнительном анализе. Прежде всего, это связано с недостатками соответствующих алгоритмов, которые опираются на биохимическое сходство “алфавита” аминокислотных замен и либо вообще не используют информацию о 3D-структурной организации белков, либо ограничиваются сравнением остова (атомов основной цепи). Впервые разработано программное обеспечение для систематического исследования специфической ориентации боковых цепей аминокислот в эквивалентных позициях структур гомологов. Программа предназначена для использования в качестве вспомогательного средства при анализе множественных выравниваний аминокислотных последовательностей белков. Новый метод, основанный на алгоритме машинного обучения HDBSCAN, позволяет выявить статистически значимые различия в положении боковых цепей аминокислот в каждой позиции множественного выравнивания и классифицировать их на подсемейства. Метод апробирован на широкой выборке данных. Полученные результаты позволяют говорить о феномене специфической ориентации боковых цепей аминокислот как о достаточно распространенном явлении, требующем дальнейшего изучения и заслуживающем внимания при сравнительном анализе функционально разнообразных суперсемейств белков. Разработанное программное обеспечение находится в свободном доступе по адресу: <https://github.com/TimoninaDaria/Subfamily-Specific-Sidechain-Orientations>.

Ключевые слова: множественное выравнивание, биоинформатический анализ, суперсемейство белков, боковая цепь, специфическая позиция, машинное обучение

DOI: 10.31857/S0026898422040139

Сравнительный биоинформатический анализ гомологов, реализующих различные свойства в рамках общей 3D-структурной организации, признан эффективным инструментом изучения структурно-функциональных взаимосвязей в суперсемействах белков и механизмов их действия [1–4]. Один из примеров такого анализа заключается в построении множественного выравнивания гомологов, обладающих разными свойствами, с последующим исследованием аминокислотных замен в столбцах выравнивания и их корреляции с функциональным разнообразием [5, 6]. В большинстве подобных работ используется выравнивание аминокислотных последовательностей белков. Этот

подход ведет свою историю с 1960-х годов, когда Эмиль Цукеркандль и Лайнус Полинг впервые высказали гипотезу о “выравнивании” аминокислотных последовательностей и их “побуквенном” сравнении для изучения эволюционных изменений в белках на молекулярном уровне [7]. Использование информации о пространственном расположении аминокислотных остатков позволит улучшить качество выравнивания и интерпретации функциональных особенностей гомологов [4]. Однако до недавнего времени сравнение белков на уровне 3D-структур имело ограниченное применение в практике [8, 9]. Это было связано, во-первых, с относительно небольшим

числом расшифрованных трехмерных структур белков в сравнении с числом известных последовательностей и, во-вторых, с существенно большей вычислительной трудоемкостью 3D-выравнивания.

Взрывное развитие новых методов расшифровки 3D-структур белков и появление новых доступных вычислительных технологий позволило по-новому взглянуть на проблему сравнительного анализа [8, 9]. В последние годы все более активно развиваются новые решения в биоинформатике, направленные на внедрение 3D-данных в повседневную практику [3, 10]. Так, в недавно опубликованных нами работах [11, 12] сделан акцент на методах анализа 3D-структурной информации по эволюционно родственным белкам с разными свойствами. Это обусловлено тем, что рассмотрение не только аминокислотных последовательностей, но и возрастающего объема трехмерных моделей при изучении больших суперсемейств, содержащих эволюционно удаленные гомологи, позволяет существенно повысить качество биоинформатического исследования. Нами разработан комплекс подходов для построения и анализа множественных выравниваний аминокислотных последовательностей с использованием в явном виде структурной информации по представителям функционально разнообразных семейств – метод Mustguseal для построения структурно опосредованных множественных выравниваний суперсемейств белков [11], а также платформа методов Zebra2, pocketZebra, Yosshi и visualSMAT для их анализа [12]. Эти программы позволяют изучать структурно-функциональные взаимосвязи в суперсемействах и улучшать дизайн ферментов и прототипов лекарственных средств. Появление Mustguseal и аналогичных ему алгоритмов (например, MAFFT-DASH [13]) позволило уйти от “классических” множественных выравниваний аминокислотных последовательностей, ориентированных только на “сходство алфавита”, в сторону потенциально более точного сравнения, использующего в качестве дополнительного критерия 3D-структурную информацию о репрезентативных белках. Активно развиваются алгоритмы построения и анализа истинно трехмерных выравниваний белков. Это метод ragMatt для ускоренного построения множественных 3D-выравниваний больших выборок белков с использованием суперкомпьютерных технологий [8], метод gaMatt для улучшения качества множественных 3D-выравниваний белков на основе генетического алгоритма и оптимизации направляющего дерева [14]. Одновременно с распространением трехмерных выравниваний появляются и методы для их анализа. Нами недавно предложен первый такой

метод Zebra3D – пионерный алгоритм для анализа 3D-выравниваний суперсемейств белков (то есть, именно координат в трехмерном пространстве, а не их “текстовое” отображение), позволяющий находить и классифицировать функционально значимые специфически организованные участки основной цепи в структурах гомологов [4].

Несмотря на возрастающее разнообразие биоинформатических алгоритмов сравнительного анализа белков, использование 3D-структурной информации в повседневной практике по-прежнему ограничено сравнением остова, то есть только атомов основной цепи гомологов. Уже хорошо известно, что отличия в ориентации боковых цепей аминокислот в эквивалентных позициях в структурах гомологов могут предопределять их функциональное разнообразие [4, 15]. Тем не менее ориентация боковых цепей аминокислот пока никак не учитывается при построении выравниваний и последующем сравнительном анализе. В этой работе мы впервые вводим понятие “специфическая ориентация боковых цепей аминокислот”. Оно характеризует такие позиции (“колонки”) во множественном 3D-структурном выравнивании гомологов, в которых атомы основной цепи разных белков расположены в пространстве эквивалентно друг относительно друга, а боковые радикалы аминокислот ориентированы не единообразно и не хаотично, а распределены по нескольким часто встречающимся состояниям, что позволяет классифицировать их на группы (подсемейства). Подобный термин введен нами по аналогии со специфическими позициями подсемейств – такими колонками множественного выравнивания последовательностей, в которых аминокислоты консервативны внутри функциональных подсемейств, но различаются между ними, что может говорить о роли соответствующей позиции в формировании функционального разнообразия [5, 16]. Единственный описанный в литературе аналог специфических позиций на 3D-структурном уровне – “специфические участки подсемейств”, поиск которых реализован в алгоритме Zebra3D [4]. Такие участки могут быть ассоциированы с функциональным разнообразием свойств, а также указывать на функционально значимую конформационную пластичность в суперсемействе. Насколько нам известно, систематических исследований специфической организации боковых радикалов в выравнивании гомологов до настоящего момента не проводилось. В представленной работе описаны первые шаги в изучении этого феномена. В рамках исследования разработано новое программное обеспечение, объединяющее методы машинного обучения и статистического анализа для поиска и классификации специфиче-

ских ориентаций боковых цепей аминокислот. С его помощью проанализирована большая выборка реальных биологических данных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Алгоритм анализа данных. Новый алгоритм основан на представлении боковых радикалов аминокислот в виде векторов, что позволяет адекватно сравнивать не только идентичные, но и функционально схожие боковые радикалы (например, аспартата и глутамата). Реализация представления боковых цепей аминокислот в виде векторов выполнена в соответствии с ранее описанным протоколом [17]. Например, аминокислота аланин представлена в виде вектора от атома CA в направлении CB, аминокислота глутамин – от координат атома CG в направлении точки, находящейся посередине между атомами NE2 и OE1, триптофан – от координат атома CD1 в направлении точки, находящейся посередине между атомами CZ2 и CZ3, и так далее (имена атомов приведены в соответствии со стандартной схемой формата Protein Data Bank [18]).

На вход новому алгоритму подается выравнивание аминокислотных последовательностей и 3D-структур белков в форматах FASTA и PDB, которые далее анализируют в три этапа: (1) идентификация “общих/консенсусных” и “вариабельных” позиций в 3D-выравнивании гомологов, (2) кластеризация боковых цепей тех аминокислот, которые принадлежат “общим/консенсусным” позициям, и (3) статистический анализ результатов. Первый этап с точки зрения программной реализации идентичен первому этапу алгоритма Zebra3D [4], а второй этап – качественно противоположен. Задачей Zebra3D был поиск участков основной цепи, которые специфически различались в структурах гомологов. Задача нового алгоритма, наоборот, заключается в поиске таких участков выравнивания, в которых основная цепь в гомологах устроена эквивалентно (в случае выравнивания последовательностей для описания подобных состояний колонки выравнивания применяется термин “консенсусный”, или “консервативный”), но которые различаются на уровне ориентации боковых цепей. Каждую “общую/консенсусную” позицию в 3D-выравнивании гомологов представляли в виде набора векторов, специфическую организацию которых анализировали с использованием машинного обучения. Рассчитывали все парные расстояния между векторами. Полученную матрицу расстояний использовали для кластеризации с помощью алгоритма машинного обучения HDBSCAN из библиотеки “hdbscan” [19]. На третьем этапе алгоритма

отобранные специфические ориентации боковых цепей ранжировали в порядке убывания S-score (оценка специфичности) и Z-score (оценка статистической значимости), при этом ранжирование по любой из этих двух оценок всегда идентичны. Наиболее визуально заметные и статистически значимые позиции ранжировались первыми. Оценки S-score и Z-score вычисляли в соответствии с протоколами, которые ранее описаны и протестированы на примере алгоритма Zebra3D [4]. Для вычисления оценки статистической значимости (Z-score) использована модель, описанная ниже.

Модель для оценки статистической значимости.

Для статистической оценки специфической ориентации боковых цепей аминокислот разработана модель, позволяющая исключить из последующего рассмотрения такие различия в ориентации боковых цепей в PDB-структурах гомологов, которые возникли скорее как результат случайных/тепловых колебаний и, следовательно, не ассоциированы с функцией. Как и в алгоритме Zebra3D, в основу статистической модели для нового алгоритма заложено допущение, что средний уровень конформационной пластичности боковых цепей аминокислот в достаточно широкой выборке структур белков случаен и вряд ли имеет прямое отношение к функции. Использовано 100 наборов данных из базы PDBFlex [20], каждый из которых содержал не менее 20 структур, которые представляли собой различные PDB-записи одного и того же белка (например, 325 PDB-структур р38 α MAP-киназы человека). Использованные наборы содержали 26–515 записей PDB на набор (среднее значение – 59). Все структуры в каждом наборе были использованы для построения 3D-структурного выравнивания с использованием parMatt [8]. Выравнивания, в которых на основании экспертного визуального анализа были обнаружены существенные различия между PDB-записями, позволяющими предположить их принадлежность к разным функциональным состояниям одного белка (такие как смещение доменов, очевидная реорганизация протяженных участков структуры в пространстве и др.), исключали из последующего рассмотрения. Оставшиеся выравнивания анализировали с помощью нового алгоритма, описанного выше. Результатом работы алгоритма был ранжированный список позиций выравнивания, в которых была обнаружена специфическая ориентация боковых цепей аминокислот. Медианную специфичность рассматривали как характеристику “случайной” конформационной пластичности, не ассоциированной с функцией, по аналогии с алгоритмом Zebra3D [4]. На основании полученных данных рассчитывали величины σ и μ (среднего и дисперсии нормального распределения, описы-

вающего случайную модель), которые используют при каждом анализе для расчета оценок статистической значимости (Z-score).

Имплементация программы для ЭВМ. Новый алгоритм имплементирован на языке Python3. Соответствующая программа свободно распространяется через ссылку на публичный репозиторий github (<https://github.com/TimoninaDaria/Subfamily-Specific-Sidechain-Orientations>). Установка новой программы, требования к формату входных файлов, а также формат и легенда выходных файлов аналогичны таковым для ранее разработанной нами программы Zebra3D, ссылка на документацию к которой приведена в соответствующей публикации [4]. Результатом работы новой программы был список позиций 3D-выравнивания гомологов, в которых была зарегистрирована специфическая ориентация боковых цепей аминокислот, ранжированных по убыванию статистической значимости. По умолчанию выводится не более 10 лучших позиций. Для каждой позиции приводятся следующие характеристики: оценка специфичности, оценка статистической значимости, число кластеров ориентаций боковых радикалов (потенциальных функциональных подсемейств). Также в результате работы программы формируется сессия в формате PyMol (PSE), в которой подсемейства показаны с использованием цветовой легенды.

Апробация и тестирование алгоритма. Для апробации алгоритма была составлена оригинальная выборка на основе базы Catalytic Site Atlas (CSA), содержащей аннотацию каталитически важных аминокислотных остатков в PDB-записях ферментов [21]. Из базы CSA случайно выбрали 195 ферментов, относящихся к разным семействам. Для каждого фермента брали аннотацию каталитических остатков из CSA и выбирали соответствующую PDB-запись с максимально высоким разрешением, закристаллизованную вместе с лигандом, расположенным в радиусе 5 Å от каталитических остатков. После этого выделяли все остатки в структуре фермента, расположенные на расстоянии 5 Å от выбранного лиганда. Проаннотированные в результате описанной процедуры остатки считали функционально важными на том основании, что они расположены в непосредственной близости от лиганда, и, значит, с высокой вероятностью принимают непосредственное участие в его связывании и/или превращении. Подобное допущение можно считать предсказанием, однако его широко используют в мировой биоинформатической практике для тестирования и апробации алгоритмов на большой выборке реальных биологических данных (например, см. [22]) и потому вполне допустимо и в данной работе. Таким образом, в автоматическом режиме была собрана

выборка репрезентативных ферментов из различных семейств с аннотацией потенциальных каталитических и субстратсвязывающих остатков в их структурах. Каждый репрезентативный фермент использовали в качестве входных данных для алгоритма Mustguseal для поиска неизбыточного набора из не более 32 структур гомологов в базе PDB со сходством не менее 70% по элементам вторичной структуры и построения соответствующего 3D-выравнивания [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С использованием нового алгоритма исследованы 3D-выравнивания 195 семейств ферментов. Получен список позиций, в которых зарегистрировали статистически значимую специфическую ориентацию боковых цепей аминокислот, из которых 448 позиций содержали каталитически важные и субстратсвязывающие остатки активного центра, проаннотированные нами в структурах репрезентативных ферментов. Для более детального анализа отобрали только такие позиции (“колонки” множественного 3D-структурного выравнивания), которые консервативны по аминокислотной последовательности (т.е. содержали остатки одного типа), однако характеризовались специфической организацией боковых цепей в соответствии с оценкой нового алгоритма. Обнаружили девять таких позиций в восьми различных семействах ферментов. Подробный анализ литературы подтвердил важность каждой идентифицированной позиции для функционирования фермента (табл. 1). Например, Arg409 в структуре тирозиновой протеинфосфатазы из *Yersinia* меняет ориентацию бокового радикала в процессе каталитического акта, что ранее объяснялось образованием новых водородных связей в результате взаимодействия с субстратом [23]. Идентификация этой позиции нашим алгоритмом объясняется тем, что PDB-структуры разных гомологов, случайно выбранных и использованных при построении 3D-выравнивания, были закристаллизованы в разных состояниях (с аналогом субстрата и без него) и на разных стадиях каталитического процесса. Исчерпывающий анализ остальных 439 обнаруженных позиций в структурах белков затруднен отсутствием достаточной информации о роли ориентации ротамеров в механизме их действия. Использованная в работе выборка семейств ферментов, соответствующие 3D-выравнивания и описание результатов их анализа с использованием новой программы предоставляются всем заинтересованным читателям журнала по запросу автору для переписки.

Таблица 1. Позиции множественного 3D-структурного выравнивания гомологов со специфической ориентацией боковых цепей аминокислот, которые соответствуют консервативным каталитически важным и субстратсвязывающим остаткам активного центра, а также критериям статистической значимости

№	Название	PDB	Остаток	Роль
1	Тирозиновая протеинфосфатаза из <i>Yersinia enterocolitica</i>	1YTW	ARG409	Участвует в связывании субстрата и каталитическом превращении [23]
2	6-пирувоилтетрагидро-птеринсинтаза крысы	1B66	GLU107	Участвует в связывании субстрата [24]
3	Аргининкиназа из <i>Limulus polyphemus</i>	1BG0	LEU187	Участвует в связывании субстрата
			TRP221	Участвует в связывании субстрата
4	S-аденозил-L-гомоцистеингидролаза из печени крысы	1B3R	THR157	Участвует в связывании субстрата [25]
5	UDP-глюкозо-6-дегидрогеназа из <i>Streptococcus pyogenes</i>	1DLI	GLU141	Непосредственно участвует в катализе [26]
6	Рибонуклеаза А крупного рогатого скота	1RUV	HIS119	Непосредственно участвует в катализе [27]
7	Нитрогеназа из <i>Azotobacter vinelandii</i>	1N2C	CYS62	Непосредственно участвует в катализе [28]
8	5'-дезоксигуанилат-5'-метилтио-аденозин-фосфориллаза человека	1CG6	MET196	Участвует в связывании субстрата [29]

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной статье сделана попытка систематически проанализировать множественные выравнивания 3D-структур гомологичных белков на уровне пространственной ориентации боковых цепей аминокислот. Сравнительный биоинформатический анализ, как правило, ограничен уровнем аминокислотных последовательностей. В последнее время получили развитие новые подходы, ориентированные на использование 3D-структурной информации относительно основной цепи белков при построении множественных выравниваний [4, 8, 11, 13, 14]. Сравнительный анализ ориентаций боковых радикалов в эквивалентных позициях родственных белков проводят редко – как правило, в режиме визуального экспертного анализа, – и ориентирован он на отдельные частные случаи. В этом плане наша работа – первое систематическое исследование подобного рода. Нами предложен новый алгоритм биоинформатического анализа 3D-структурного выравнивания белков суперсемейства. В результате работы алгоритма получен список позиций (“колонок” 3D-выравнивания), в которых выявлена специфическая ориентация боковых цепей аминокислот, ранжированных по убыванию статистической значимости. Апробация на большой выборке данных продемонстрировала способность нового алгоритма детектировать

функционально значимые позиции. Так, в структурах 195 семейств ферментов обнаружено 448 таких позиций, которые содержат каталитически важные и субстратсвязывающие остатки активного центра с боковыми радикалами в специфической ориентации. Недостаток данных о роли сходств и различий конфигурации боковых цепей аминокислот в формировании функционального разнообразия среди гомологов не позволяет нам провести формальную количественную оценку эффективности алгоритма и дать исчерпывающую характеристику каждому идентифицированному остатку.

Проведенное исследование позволяет говорить о том, что феномен специфической ориентации боковых цепей аминокислот не ограничивается частными случаями, а имеет все признаки достаточно распространенного явления, требующего дальнейшего изучения и достойного внимания при сравнительном анализе функционально разнообразных суперсемейств белков. Разработанный в рамках этой работы новый алгоритм и соответствующее программное обеспечение доступны в сети интернет. Программа может быть использована в качестве вспомогательного средства при анализе множественных выравниваний аминокислотных последовательностей гомологичных белков, для которых доступна 3D-структурная информация. Следует отдельно отметить, что потенциал применения этого подхода не ограничива-

ется экспериментально расшифрованными структурами, доступными в базе данных PDB. Последний год запомнился прогрессом в структурной биологии — появлением алгоритмов AlphaFold2 [30] и RoseTTAFold [31], способных с неожиданной точностью предсказывать 3D-структуру белка по его аминокислотной последовательности. Точность предсказания положения боковых цепей этими методами продолжает оставаться предметом дискуссий, однако это не мешает уже сейчас пытаться применять их для тех белков, 3D-структуры которых пока недоступны. В этом контексте свободное распространение нового программного обеспечения представляется нам важным шагом к коллективному решению проблемы изучения взаимосвязи структуры и функции в белках. Систематическое использование предложенной в этой статье программы в повседневной практике научных лабораторий позволит лучше понять взаимосвязь между ориентацией боковых цепей аминокислот в гомологах и механизмом их действия.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-13060).

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

Вклад авторов: идея работы и планирование эксперимента (Д.А.С), разработка алгоритма анализа данных и соответствующего программного обеспечения, сбор и обработка данных (Д.С.Т), написание и редактирование рукописи (Д.С.Т., Д.А.С).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chagoyen M., García-Martín J., Pazos F. (2016) Practical analysis of specificity-determining residues in protein families. *Brief. Bioinform.* **17**, 255–261. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv045>
- De Juan D., Pazos F., Valencia A. (2013) Emerging methods in protein co-evolution. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 249–261. <https://doi.org/10.1038/nrg3414>
- Marques S., Planas-Iglesias J., Damborsky J. (2021) Web-based tools for computational enzyme design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **69**, 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.01.010>
- Timonina D., Sharapova Y., Švedas V., Suplatov D. (2021) Bioinformatic analysis of subfamily-specific regions in 3D-structures of homologs to study functional diversity and conformational plasticity in protein superfamilies. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **19**, 1302–1311. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.02.005>
- Fesko K., Suplatov D., Švedas V. (2018) Bioinformatic analysis of the fold type I PLP-dependent enzymes reveals determinants of reaction specificity in L-threonine aldolase from *Aeromonas jandaei*. *FEBS Open Bio.* **8**(6), 1013–1028. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12441>
- Suplatov D., Sharapova Y., Geraseva E., Švedas V. (2020) Zebra2: advanced and easy-to-use web-server for bioinformatic analysis of subfamily-specific and conserved positions in diverse protein superfamilies. *Nucleic Acids Res.* **48**, W65–W71. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa276>
- Zuckerkanndl E., Pauling L. (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: *Evolving Genes and Proteins*. Eds Bryson V., Vogel H.J. New York: Academic Press, pp. 97–166. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-2734-4.50017-6>
- Shegay M., Suplatov D., Popova N., Švedas V., Voevodin V. (2019) parMATT: parallel multiple alignment of protein 3D-structures with translations and twists for distributed-memory systems. *Bioinformatics.* **35**(21), 4456–4458. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz224>
- Suplatov D., Shegay M., Sharapova Y., Timokhin I., Popova N., Voevodin V., Švedas V. (2021) Co-designing HPC-systems by computing capabilities and management flexibility to accommodate bioinformatic workflows at different complexity levels. *J. Supercomput.* **77**, 12382–12398. <https://doi.org/10.1007/s11227-021-03691-x>
- Sequeiros-Borja C.E., Surpeta B., Brezovsky J. (2021) Recent advances in user-friendly computational tools to engineer protein function. *Brief. Bioinform.* **22**(3), bbaa150. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa150>
- Suplatov D., Kopylov K., Popova N., Voevodin V., Švedas V. (2018) Mustguseal: a server for multiple structure-guided sequence alignment of protein families. *Bioinformatics.* **34**(9), 1583–1585. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx831>
- Suplatov D., Sharapova Y., Švedas V. (2021) Mustguseal and sister web-methods: a practical guide to bioinformatic analysis of protein superfamilies. In: *Multiple Sequence Alignment*. Ed. Katoh K. Humana Press, New York, pp. 179–200. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1036-7_12
- Rozewicki J., Li S., Amada K., Standley D., Katoh K. (2019) Mafft-dash: integrated protein sequence and structural alignment. *Nucleic Acids Res.* **47**, W5–W10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz342>
- Shegay M., Švedas V., Voevodin V., Suplatov D., Popova N. (2021) Guide tree optimization with genetic algorithm to improve multiple protein 3D-structure alignment. *Bioinformatics.* **38**(4), 985–989. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab798>
- Li J., Koehl P. (2014) 3D representations of amino acids-applications to protein sequence comparison and classification. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **11**(18), 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2014.09.001>
- Kalinina O., Mironov A., Gelfand M., Rakhmaninova A. (2004) Automated selection of positions determining

- functional specificity of proteins by comparative analysis of orthologous groups in protein families. *Protein Sci.* **13**(2), 443–456.
<https://doi.org/10.1110/ps.03191704>
17. Nadzirin N., Gardiner E., Willett P., Artymiuk P., Firdaus-Raih M. (2012) SPRITE and ASSAM: web servers for side chain 3D-motif searching in protein structures. *Nucleic Acids Res.* **40**(W1), W380–W386.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks401>
 18. Burley S., Berman H., Bhikadiya C., Bi C., Chen L., Di Costanzo L., Christie C., Dalenberg K., Duarte J., Dutta S., Feng Z. (2019) RCSB Protein Data Bank: biological macromolecular structures enabling research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology and energy. *Nucleic Acids Res.* **47**(D1), D464–D474.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1004>
 19. McInnes L., Healy J., Astels S. (2017) hdbscan: Hierarchical density based clustering. *J. Open Source Softw.* **2**(11), 205.
<https://doi.org/10.21105/joss.00205>
 20. Hrabec T., Li Z., Sedova M., Rotkiewicz P., Jaroszewski L., Godzik A. (2016) PDBFlex: exploring flexibility in protein structures. *Nucleic Acids Res.* **44**(D1), D423–D428.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1316>
 21. Porter C., Bartlett G., Thornton J. (2004) The Catalytic Site Atlas: a resource of catalytic sites and residues identified in enzymes using structural data. *Nucleic Acids Res.* **32**, D129–D133.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh028>
 22. Capra J., Singh M. (2008) Characterization and prediction of residues determining protein functional specificity. *Bioinformatics.* **24**(13), 1473–1480.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn214>
 23. Hoff R., Wu L., Zhou B., Zhang Z., Hengge A. (1999) Does positive charge at the active sites of phosphatases cause a change in mechanism? The effect of the conserved arginine on the transition state for phosphoryl transfer in the protein-tyrosine phosphatase from *Yersinia*. *J. Am. Chem. Soc.* **121**(41), 9514–9521.
<https://doi.org/10.1021/ja992361o>
 24. Ploom T., Thöny B., Yim J., Lee S., Nar H., Leimbacher W., Richardson J., Huber R., Auerbach G. (1999) Crystallographic and kinetic investigations on the mechanism of 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase. *J. Mol. Biol.* **286**(3), 851–860.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2511>
 25. Kusakabe Y., Ishihara M., Umeda T., Kuroda D., Nakanishi M., Kitade Y., Gouda H., Nakamura K., Tanaka N. (2015) Structural insights into the reaction mechanism of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *Sci. Rep.* **5**, 16641.
<https://doi.org/10.1038/srep16641>
 26. Ge X., Penney L., Van De Rijn I., Tanner M. (2004) Active site residues and mechanism of UDP-glucose dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **271**(1), 14–22.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03876.x>
 27. Kasireddy C., Ellis J., Bann J., Mitchell-Koch K. (2016) Tautomeric stabilities of 4-fluorohistidine shed new light on mechanistic experiments with labeled ribonuclease A. *Chem. Phys. Lett.* **666**, 58–61.
<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2016.10.072>
 28. Igarashi R., Seefeldt L. (2003) Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **38**(4), 351–384.
<https://doi.org/10.1080/10409230391036766>
 29. Guan R., Tyler P., Evans G., Schramm V. (2013) Thermodynamic analysis of transition-state features in picomolar inhibitors of human 5'-methylthioadenosine phosphorylase. *Biochemistry.* **52**(46), 8313–8322.
<https://doi.org/10.1021/bi401188w>
 30. Cramer P. (2021) AlphaFold2 and the future of structural biology. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **28**(9), 704–705.
<https://doi.org/10.1038/s41594-021-00650-1>
 31. Baek M., DiMaio F., Anishchenko I., Dauparas J., Ovchinnikov S., Lee G., Wang J., Cong Q., Kinch L.N., Schaeffer R.D., Millán C., Park H., Adams C., Glassman C.R., DeGiovanni A., Pereira J.H., Rodrigues A.V., van Dijk A.A., Ebrecht A.C., Opperman D.J., Sagmeister T., Buhlheller C., Pavkov-Keller T., Rathinaswamy M.K., Dalwadi U., Yip C.K., Burke J.E., Garcia K.C., Grishin N.V., Adams P.D., Read R.J., Baker D. (2021) Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science.* **373**(6557), 871–876.
<https://doi.org/10.1126/science.abj8754>

ANALYSIS OF MULTIPLE PROTEIN ALIGNMENTS USING 3D-STRUCTURAL INFORMATION ON THE ORIENTATION OF AMINO ACID SIDE-CHAINS

D. S. Timonina¹ and D. A. Suplatov^{2, *}

¹ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: d.a.suplatov@belozersky.msu.ru

Multiple alignment of amino acid sequences of homologous proteins is a key tool in state-of-the-art bioinformatics and evolutionary analysis. Differences in the spatial orientation of amino acid side-chains can pre-determine a significant functional diversity in members of one superfamily; however, this is usually not taken into account in any way when constructing alignments and during subsequent comparative analysis. First of all, this is due to the limitation of existing algorithms, which are guided by the biochemical similarity of the

“alphabet” of amino acid substitutions and either do not use information about 3D-structural organization of proteins at all, or are limited to comparing the backbone only (i.e. atoms of the main-chain). In this work, for the first time we introduce the software for a systematic analysis of specific orientation of amino acid side-chains in equivalent positions of homologous protein structures. The program is intended to assist the analysis of protein multiple sequence alignments. The new algorithm, based on machine learning HDBSCAN technique, can identify statistically significant differences in the side-chain orientations and classify them into sub-families at each position of multiple alignment. The method has been tested on a wide set of real biological data. The results obtained allow us to speak of the specific orientation of amino acid side-chains as a common phenomenon that requires further study and deserves attention in a comparative analysis of functionally diverse protein superfamilies. The developed software is freely available at <https://github.com/TimoninaDaria/Subfamily-Specific-Sidechain-Orientations>.

Keywords: multiple alignment, bioinformatics analysis, protein superfamily, side-chain, specific position, machine learning

УДК 57.083;57.088

ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ПРЕДОБРАБОТКИ ПРОТЕОМА МОЧИ ЧЕЛОВЕКА С ЦЕЛЬЮ АНАЛИЗА ОНКОБИОМАРКЕРОВ

© 2022 г. С. В. Тиллиб^{a,*}, О. С. Горяйнова^a, А. М. Сачко^a, Т. И. Иванова^{a, b},
М. Я. Гаас^c, Н. В. Воробьев^{a, d, e}, А. Д. Каприн^f, П. В. Шегай^{a, f}

^aИнститут биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

^bМедицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, Калужская область, 249036 Россия

^cМедицинский институт Российского университета дружбы народов, Москва, 117198 Россия

^dМосковский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125284 Россия

^eПервый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991 Россия

^fНациональный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125284 Россия

*e-mail: tillib@genebiology.ru

Поступила в редакцию 09.11.2021 г.

После доработки 13.12.2021 г.

Принята к публикации 14.12.2021 г.

Проведен анализ возможности применения ряда полученных нами ранее однодоменных антител (нанотел) к основным маркерным белкам крови для предобработки образцов мочи больных раком мочевого пузыря (РМП). Продемонстрированы уникальные возможности использования нанотел в неинвазивных диагностических исследованиях наряду с такими традиционными методами, как электрофорез и, в перспективе, масс-спектрометрический анализ. Путем анализа 22 образцов мочи больных РМП показано, что развитие РМП сопровождается увеличением содержания в моче мажорных белков крови, некоторые из которых уже были предложены в качестве биомаркеров РМП. Использование иммуносорбентов на основе нанотел позволяет как специфически обогащать, так и удалять из биологической жидкости заданные белки-антигены и субпротеомы, ассоциированные с ними. Особый интерес представляет выделение иммунных комплексов из мочи конкретного пациента. Первичное изучение этих комплексов выявляет в них не только увеличенное содержание IgA и IgG на поздних (инвазивных) стадиях болезни, но и другие компоненты, которые потенциально могут быть биомаркерами патологического процесса у конкретного пациента. Предлагаемые подходы мы планируем в дальнейшем использовать для более масштабного исследования образцов мочи на разных стадиях развития РМП с целью идентификации новых перспективных биомаркеров этого заболевания.

Ключевые слова: однодоменное антитело, нанотело, биомаркеры в моче, рак мочевого пузыря, иммуносорбент, аффинная хроматография, диагностика

DOI: 10.31857/S0026898422040127

ВВЕДЕНИЕ

Рак мочевого пузыря (РМП) – наиболее распространенное злокачественное заболевание мочевыводящих путей, занимает шестое место по распространенности среди мужского населения во всем мире и 10-е, если учитывать оба пола [1]. Основным гистологическим подтипом РМП является уротелиальная карцинома [2]. У подавляющего большинства больных (примерно 75%) диагноз РМП устанавливают на относительно ранней стадии

(мышечно-неинвазивный РМП (NMIBC)): Та, Т1 или карцинома *in situ* (CIS). Однако известно, что примерно у 10–30% пациентов болезнь будет прогрессировать до мышечно-инвазивной стадии (MIBC) [3, 4]. Примерно в 25% случаев первичный РМП диагностируется на поздней стадии (Т2, Т3 и Т4). Существует эффективный метод лечения мышечно-неинвазивного РМП в виде трансуретральной резекции опухоли (ТУР мочевого пузыря), позволяющий добиться достаточно

высоких показателей пятилетней прогнозируемой выживаемости (хотя крайне часты рецидивы заболевания и требуется регулярный мониторинг пациентов), однако в случае поздних инвазивных стадий РМП (Т2, Т3 и Т4) прогнозируемая выживаемость существенно ниже — 69.4, 34.9 и 4.8% соответственно [5]. Очевидно, что ранняя диагностика и выявление рецидивов опухолей представляют наиболее важную проблему в ведении пациентов данной группы. В настоящее время золотым стандартом диагностики РМП и контрольного наблюдения за пациентами, перенесшими лечение по поводу этого заболевания, считается комбинация цитологического исследования осадка мочи и цистоскопии [2, 6]. Однако как низкая чувствительность цитологических тестов (в среднем 38% при специфичности около 98% [7]), так и высокая инвазивность, сложность проведения цистоскопии, сопровождающаяся трудностями в интерпретации результатов относительно характера и степени инвазии опухоли, указывают на настоятельную необходимость поиска новых малоинвазивных методов клинической диагностики, мониторинга и методов лечения пациентов с РМП.

При разработке диагностических подходов к неинвазивной диагностике РМП, особенно с целью массового скрининга образцов мочи пациентов группы риска, первичным материалом для анализа традиционно являются надосадок (супернатант) мочи и первичный ее осадок, получаемые в результате низкоскоростного центрифугирования. В последние годы пытаются использовать и более сложно выделяемые компоненты мочи, например, внеклеточные везикулы. Это, безусловно, очень перспективные для диагностики компоненты, однако, в настоящий момент еще требуется разработка и оптимизация новых эффективных методов выделения и анализа внеклеточных везикул. На наш взгляд, недоисследованными и недооцененными остаются возможности прямого анализа белков мочи для персонализированной диагностики, особенно если учесть, что появляются новые возможности предобработки мочи с помощью иммуоаффинного фракционирования заданных белковых компонентов с использованием специально получаемых антител.

Начиная с 2003 года, в ИБГ РАН научным коллективом под руководством Тиллиба С.В. разрабатывается и используется технология генерирования особых однодоменных моноклональных рекомбинантных антител (нанотел) для получения новых инструментов и методов таргетирования широкого спектра заданных антигенов с целью решения актуальных биологических и медицинских задач [8–13]. В последние годы Тиллиб и соавт. получали множество новых высокоспецифичных нанотел к различным белкам плазмы крови как к богато представленным (сывороточному альбумину, разным классам иммуноглобу-

линов, фибриногену, фибронектину, трансферрину, альфа-2-макроглобулину, аполипопротеинам В и А1, лактоферрину и др. [10, 12]), так и к некоторым минорным белкам-маркерам (в том числе и опухолеассоциированным) [14, 15].

В данной работе мы изучали возможность применения ранее полученных нанотел к мажорным маркерным белкам крови для предобработки препаратов мочи больных РМП, чтобы повысить эффективность неинвазивного диагностического определения биомаркеров РМП. Наряду с предобработкой образцов мочи с помощью иммунных сорбентов на основе нанотел, мы использовали для фракционирования и анализа белков мочи широко применяемый в исследовательских лабораториях метод электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле (SDS-ПААГ) по Лэммли [16]. Несмотря на большую разрешающую силу современных вариантов двумерного (2D) электрофореза, мы считаем их слишком сложными и дорогими для рутинного использования в клинике. В качестве компромиссного варианта для разрабатываемого метода клинического тестирования белков мочи мы видим именно относительно простой метод 1D-электрофоретического фракционирования белков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы мочи и плазмы крови. В работе использовали образцы мочи 22 первичных больных, находящихся на лечении по поводу РМП в отделении онкоурологии Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена — филиала «НМИЦ радиологии» Минздрава России (табл. 1). У 18 больных диагностирована уротелиальная карцинома мочевого пузыря, представленная в большинстве случаев (12) немусечно-инвазивным РМП. У половины больных определена высокая степень злокачественности опухоли. Мышечно-инвазивный рак диагностирован у шести пациентов. У четверых обнаружены доброкачественные новообразования мочевого пузыря. Постановку диагноза и классификацию заболеваний проводили в соответствии с клиническими рекомендациями Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол от 20.12.2019 г. № 10/2-3-4).

Образцы утренней мочи вскоре после получения транспортировали из Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена в Институт биологии гена РАН, где образцы сразу подвергали низкоскоростному центрифугированию (2000 g, 15 мин) при комнатной температуре. Аликвоты супернатантов помещали на хранение в морозильник на -80°C . Осадки суспендировали в стандартном фосфатно-солевом буферном растворе ($1\times$ PBS), содержащем 20% глицерина и 0.025% Tween 20, переносили в про-

Таблица 1. Характеристика больных раком мочевого пузыря (номера присвоены согласно классификационным критериям опухоли по системе TNM и гистологическому анализу)

№	Пол, М. Ж	Возраст	Внешние характеристики мочи	Диагноз	Стадия TNM	Степень злокачественности*
1	М	60	Светло-желтая, слабомутная	Доброкачественное новообразование	—	—
2	М	61	Желтая, прозрачная	То же	—	—
3	Ж	74	Светло-желтая, слабомутная	»	—	—
4	Ж	61	Светло-желтая, прозрачная	»	—	—
5	М	42	Светло-желтая, прозрачная	Немышечно-инвазивный РМП	pT1N0M0	G1
6**	М	31	Светло-желтая, прозрачная	То же	cT1N0M0	То же
7	М	54	Желтая, очень мутная	»	pT1N0M0	»
8**	Ж	84	Розовая, слабомутная	»	cT1N0M0	»
9	М.	61	Желтая, прозрачная	»	pT1N0M0	»
10	Ж	44	Желтая, мутная	»	То же	HG (G2)
11	Ж	79	Желтая, мутная	»	»	То же
12	М	58	Светло-желтая, слабомутная	»	»	»
13	М	65	Темно-желтая, мутная	»	»	»
14	М	71	Темно-желтая, мутная	»	»	»
15	М	71	Желтая, мутная	»	cT1N0M0	HG
16***	Ж	83	Малиновая, мутная	»	pT1N0M0	—
17	М	81	Светло коричневая, мутная	Мышечно- инвазивный РМП	pT2N0M0	HG (G3)
18	М	80	Желтая, слабомутная	То же	pT2aN0M0	HG
19***	Ж	68	Желтая, очень мутная	»	pT2N0M0	—
20	М	62	Светло-желтая, очень мутная	»	pT2N0M0	HG
21	М	83	Темно коричневая, мутная	»	pT2aN0M0	HG (G3)
22	М	62	Розовая, мутная	»	pT4aN1M0	HG (G4)

* Высокая степень злокачественности, низкодифференцированная опухоль – HG (high-grade), G2–G4; низкая степень злокачественности, высокодифференцированная опухоль – LG (low grade), G1.

** Судить об инвазии нельзя, поскольку в гистологическом препарате мышечный слой не представлен.

*** Установить степень злокачественности клеток не представляется возможным. Примечание. Символ “p” означает, что стадия опухоли установлена после оперативного вмешательства; “c” – стадия установлена по данным неинвазивных методов обследования.

бирки объемом 1.5–2.0 мл и также помещали на хранение в морозильник на –80°С.

Образцы утренней мочи здоровых доноров брали у добровольцев разного пола не отличающихся значимо по возрасту от больных РМП исследуемой группы.

Плазма периферической крови здоровых доноров получена в Медицинском радиологическом научном центре им. А.Ф. Цыба – филиале “НМИРЦ” Минздрава России. В качестве коагулянта использовали гепарин (50 ед./мл).

Работа с нанотелами, создание и использование иммуносорбентов. Наша работа базируется на ранее полученных нами клонах последовательностей, кодирующих новые однодоменные антитела к ряду белков человека. Отобранные ранее последовательности однодоменных антител были переклонированы и отформатированы, после чего нанотела наработали, используя бактериальную систему экспрессии и эффективную процедуру выделения и очистки, охарактеризовали с помощью хроматографического, электрофорети-

ческого и иммуноферментного анализа, как описано ранее [9, 10, 12]. Получаемые нанотела содержат на С-конце длинную линкерную последовательность (28 аминокислот длинного варианта шарнирного участка неканонического верблюжьего антитела), после которой идут два пептидных фрагмента: гемагглютинин (НА)-таг, позволяющий детектировать наноантитело с помощью коммерческих антител к этому пептиду, и последовательность из шести остатков гистидина (His-таг), позволяющая эффективно очищать содержащий ее белок с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Используемый линкерный линейный участок содержит четыре удобно расположенных и хорошо доступных аминокислотных остатка лизина. По этим остаткам очень удобно проводить химические реакции пришивки других молекул, в том числе иммобилизовать наноантитело на BrCN-сефарозе.

Отобранные однодоменные антитела использовали для создания иммуносорбентов, специфически связывающих заданные белки плазмы крови и мочи человека.

Наработанные форматированные нанотела пришивали к CNBr-активированной сефарозе 4B ("GE Healthcare Life Sciences", США) согласно рекомендациям производителя и как описано ранее [10]. Количество используемой сефарозы рассчитывали для каждого иммуносорбента, исходя из количества иммобилизуемых нанотел. Как правило, на 1 мл сорбента пришивали 1–3 мг нанотела. В зависимости от объема реакционной смеси реакцию пришивки (связывания) проводили в пробирках объемом 2 или 15 мл. Содержимое пробирок перемешивали при комнатной температуре с использованием медицинского ротационного смесителя (ELMI Rotamix RM-1, Латвия) в течение 2–4 ч. Процедуру связывания останавливали, добавляя 1 М Трис-HCl, pH 8.0 до конечной концентрации 0.1 М, после чего снова качали пробирку со смесью на медицинском ротационном смесителе (1–2 ч при комнатной температуре). Обычно пробирки оставляли на 16–18 ч при +4°C, после чего отбирали водную фазу, содержащую несвязавшиеся антитела. Полученные иммуносорбенты последовательно промывали растворами с низким и высоким значением pH: 0.1 М ацетатом натрия, pH 4.0, содержащим 0.5 М NaCl, и 0.1 М Трис-HCl, pH 8.0, содержащим 0.5 М NaCl. Такую промывку проводили как минимум 3 раза из расчета 5 объемов буфера на 1 объем колонки. Полученную сефарозу с иммобилизованными однодоменными антителами хранили при +4°C либо в PBS, добавляя азид натрия в рабочей концентрации, либо в 20%-ном спирте. Иммуносорбент перед каждым использованием промывали 3–5 объемами PBS. Таким образом получали новые иммуносорбенты (иммуноаффинные колонки), специфичность которых определялась свойствами

иммобилизованных нанотел. Иммуносорбенты с иммобилизованными отобранными нанотелами использовали как для выделения связываемых белков (с целью их анализа и идентификации), так и для специфического истощения протеома мочи. Эти хроматографические эксперименты проводили, как описано ранее [10, 12]. В ходе работы получены и использованы высокоаффинные иммуносорбенты, связывающие следующие белки плазмы крови и мочи человека: сывороточный альбумин, иммуноглобулин А, иммуноглобулин G, фибриноген, трансферрин, альфа-2-макроглобулин, аполипопротеин А1, аполипопротеин В, фибронектин, лактоферрин. Подробная схема получения большинства представленных иммуносорбентов описана в [12]. Подробная схема получения однодоменных антител, связывающих лактоферрин, представлена в [10].

Получение специфически истощенной или обогащенной фракции белков надосадка мочи. На основе отобранных однодоменных антител получены как индивидуальные, так и комбинированные иммуносорбенты, связывающие описанные белки плазмы крови и надосадка мочи. Для получения истощенной или обогащенной фракции белков использовали свежеприготовленные или свежеразмороженные препараты мочи больных и здоровых доноров. Исходное количество анализируемых препаратов мочи рассчитывали индивидуально. Препараты последовательно пропускали через иммуносорбенты с иммобилизованными однодоменными антителами. Проводили дробную промывку иммуносорбента, связавшего антиген, 10 объемами солевого буфера PBS. Связавшийся белок элюировали при пониженных значениях pH, что позволяло разрушить комплекс антиген/антитела без нарушения функциональности варибельного домена, иммобилизованного на колонке. С этой целью использовали буфер глицин-HCl pH 2.7, конечный объем элюата составлял 3 объема колонки. Полученный элюат нейтрализовали, добавляя 1 М раствор Трис. Таким образом получены фракции проскока, из которых удалены заданные высокопредставленные белки, и фракции элюата, напротив, обогащенные целевыми белками и связанными с ними субпротеомами.

Подготовка проб для электрофоретического фракционирования белков в различных образцах крови и мочи. Для проведения электрофоретического анализа отбирали аликвоты исходного образца, проскока или элюата. Размер аликвот определяли в каждом конкретном случае. Объем наносимой на гель пробы уменьшали, концентрируя белки во фракциях с помощью фильтрационно-центрифужных приспособлений Amicon ("Millipore", США) с размером отсека 10 кДа или осаждали, используя метод Wessel-Fluegge [17]. В последнем случае к образцу объемом 150 мкл при перемешивании

вании добавляли 600 мкл метанола. Если объем образца превышал 150 мкл, то его распределяли по пробиркам (150 мкл в каждой). К полученной смеси добавляли 150 мкл хлороформа и перемешивали пробу с использованием вортекса (Heidolph geax top, Германия) до формирования однородной фазы. Затем добавляли 450 мкл деионизированной воды (mQ), тщательно перемешивали, после чего в течение минуты центрифугировали при 12000 g. После центрифугирования аккуратно удаляли верхнюю органическую фазу с сохранением интерфазы, содержащей белок. Затем добавляли 450 мкл метанола и тщательно перемешивали с использованием вортекса. Препарат центрифугировали в течение 2 мин при 12000 g, затем супернатант удаляли, а полученный осадок растворяли в Лэммли-буфере для нанесения на гель с целью последующего анализа образцов.

Электрофоретическое фракционирование белков в различных образцах крови и мочи. Пробы, полученные описанным выше способом, анализировали с использованием электрофореза в градиентном (5–19%) ПААГ. Электрофорез проводили по методу Лэммли [18] в стандартном SDS-буфере с использованием прибора MiniProtean III (“Bio-Rad”, США) и источника питания Эльф-4 (“ДНК-Технология”, Россия). В качестве восстанавливающего агента использовали дитиотреитол. В качестве белкового маркера использовали либо Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США), либо Precision Plus Protein Standards Dual Color (“Bio-Rad”).

Измерение концентрации креатинина и общего белка в образцах мочи. Количественное содержание креатинина и общего белка определяли с помощью анализатора мочи “URiСКАН-БК” производства фирмы “Эйлитон” (Россия) и наборов реагентов той же фирмы для количественного определения содержания креатинина (Креатинин-UTS) и белка (ПГК-UTS) в моче.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление обогащения протеома мочи больных РМП белками плазмы крови

Благодаря создаваемому нами (в рамках проекта РНФ) банку аннотированных образцов мочи больных РМП, мы смогли сравнить главные белки мочи, разделенные методом 1D электрофореза в 5–19%-ном градиентном ПААГ (в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях), здоровых людей, больных мышечно-неинвазивным и мышечно-инвазивным РМП.

Образцы для нанесения на гель готовили из 150 мкл супернатанта мочи больных РМП или из 1500 мкл супернатанта мочи здоровых доноров, которые дополнительно центрифугировали (12000 g, 30 мин), а затем концентрировали с помощью ультра-

трафилтрации (Amicon-картриджи, “Millipore”). Полученные электрофореграммы, представленные на рис. 1, нас весьма впечатлили. Сразу бросаются в глаза явные количественные различия в мажорных белках мочи из образцов здоровых доноров (специально взятых в десятикратном избытке, так как без этого белки не детектируются) и из образцов больных РМП. У всех больных РМП отмечено существенное увеличение содержания сывороточного альбумина, IgA, IgG, трансферрина. Причем заметная часть IgA в моче представлена, по-видимому, секреторной формой (sIgA) [19], состоящей из димера IgA (2× 160 кДа) и секреторного компонента (60 кДа). При электрофорезе в невосстанавливающих условиях IgA выявляется в самой верхней зоне геля, представленного на рис. 1 слева. В восстанавливающих условиях тяжелая цепь IgA практически сливается с альбумином. Только при сопоставлении интенсивностей полос на электрофореграммах, полученных в разных условиях, можно заключить, что IgA является основным вариантом иммуноглобулина (в дополнение к IgG), присутствующим как в виде мономера, так и димера, а также секреторного sIgA или иных олигомерных форм.

Стрелками, направленными слева направо, на рис. 1 обозначены полосы, соответствующие известным белкам, которые особенно наглядно можно видеть в разработанных нами маркерных смесях белков K1 и K2, состоящих из ряда мажорных белков крови, специально выделенных из плазмы крови здорового донора с помощью иммобилизованных на сефарозе нанотел, полученных нами ранее [12], которые узнают заданные белки. Проведено масс-спектрометрическое подтверждение (идентификация) белков крови, связываемых с используемыми в данной работе нанотелами [12].

На электрофореграмме явно выделяется ряд белковых полос, характерных именно для больных РМП. Одна из них соответствует одному из относительно мажорных белков крови размером примерно 150 кДа (чуть выше маркера 140 кДа и ниже приготовленного нами маркера – альфа-2-макроглобулина, размером 185 кДа в восстанавливающих условиях). Таким условиям соответствует практически только один белок – Factor F, который ингибирует активацию комплемента и является известным диагностическим маркером РМП (BTA, bladder tumor antigen). Другим РМП-специфическим маркером может быть еще неизвестный нам белок размером примерно 13 кДа. Когда этого белка особенно много, чуть ниже появляется еще одна полоса размером 12 кДа, возможно, это процессированный продукт. Другие подобные белки, содержание которых в моче больных РМП может быть значительно выше, чем в контрольных образцах, и которые можно увидеть уже при данном фракционировании (обозначены на рис. 1 стрелками, направленными справа налево).

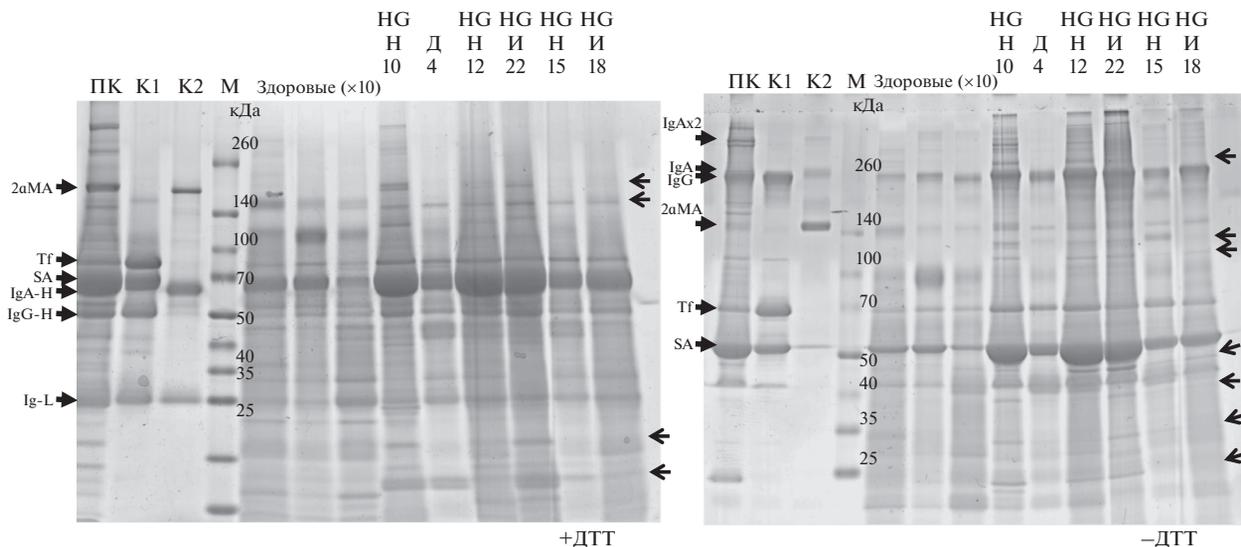


Рис. 1. Фракционирование в градиентном 5–19%-ном ПААГ белков из 150 мкл супернатанта мочи больных РМП (указаны номера образцов из табл. 1, степень инвазивности и злокачественности опухоли), трех образцов белков из 1500 мкл мочи здоровых доноров, а также контрольных белков из плазмы крови здорового донора (ПК, K1, K2). ПК – 0.1 мкл исходной плазмы крови; K1 – маркерная смесь белков 1 (трансферрин – Tf, сывороточный альбумин – SA, иммуноглобулин G – IgG); и K2 – маркерная смесь белков 2 (α 2-макроглобулин – α 2MA, иммуноглобулин A – IgA), выделенные нами из плазмы крови с помощью иммобилизованных на аффинных колонках нанотел, как описано ранее [12]. M – маркер молекулярной массы полипептидов. Стрелками, направленными направо, отмечено положение известных белков (из смесей K1 и K2). Стрелками, направленными налево, обозначены белки, которыми обогащена моча больных РМП по сравнению с контрольными образцами. HG – высокая степень злокачественности опухоли. H, И и Д – мышечно-неинвазивная, мышечно-инвазивная и доброкачественная опухоль соответственно. ДТТ – дитиотреитол.

Наглядность результатов, полученных при сравнении белков мочи, была настолько впечатляющей, что мы сравнили пробы мочи других больных РМП, хранящиеся в создаваемом нами банке образцов. На рис. 2 представлен результат подобного прямого электрофоретического анализа белков в моче 20 больных с различными стадиями РМП. На рис. 2 (в отличие от рис. 1) представлены образцы, отражающие более широкий диапазон вариантов заболевания. Можно наблюдать прямую зависимость степени обогащения мочи больных белками крови от стадии развития болезни.

Меньше всего белков крови обнаружено в моче больных с доброкачественными и неинвазивными опухолями с низкой степенью злокачественности. Соответственно, наибольшее количество белков, характерных для крови, выявлено в образцах мочи больных РМП с высокой степенью злокачественности, особенно в случае мышечно-инвазивных опухолей.

В двух из четырех образцов, полученных от пациентов с доброкачественными новообразованиями мочевого пузыря, наблюдается особая картина с одним главным доминирующим белком, предположительно (судя по положению в геле и в сравнении с нормальными пробами), это может быть уромодулин (белок Тамма–Хорсфолла). В образцах мочи здоровых людей это самый главный белок – гликопротеид с молекулярной массой при-

мерно 85–95 кДа (в геле движется чуть медленнее полосы маркера 100 кДа) [20].

Электрофореграммы белков остальных образцов мочи больных РМП (конечно, пока на данной ограниченной выборке) выявляют хорошую корреляцию с результатами инвазивных клинических анализов (табл. 1) и, по-видимому, позволяют предсказывать степень злокачественности опухолей, соответствующих данным образцам, и примерную стадию их развития (инвазивность).

Следует отметить, что известным симптомом РМП является гематурия (избыточное количество крови в моче). Однако она связана, в первую очередь, с повышенным содержанием эритроцитов в моче. Мы же наблюдали повышенное содержание мажорных белков крови в моче больных РМП, у которых может и не быть заметной гематурии (табл. 1).

Выделение (обогащение) субпротеомов, ассоциированных с определенными мажорными белками мочи, с помощью иммуноаффинной хроматографии на колонках с иммобилизованными нанотелами

Следующая часть работы посвящена использованию иммобилизованных нанотел к определенным белкам (компонентам мочи) для эффективного выделения заданного субпротеома. Та-

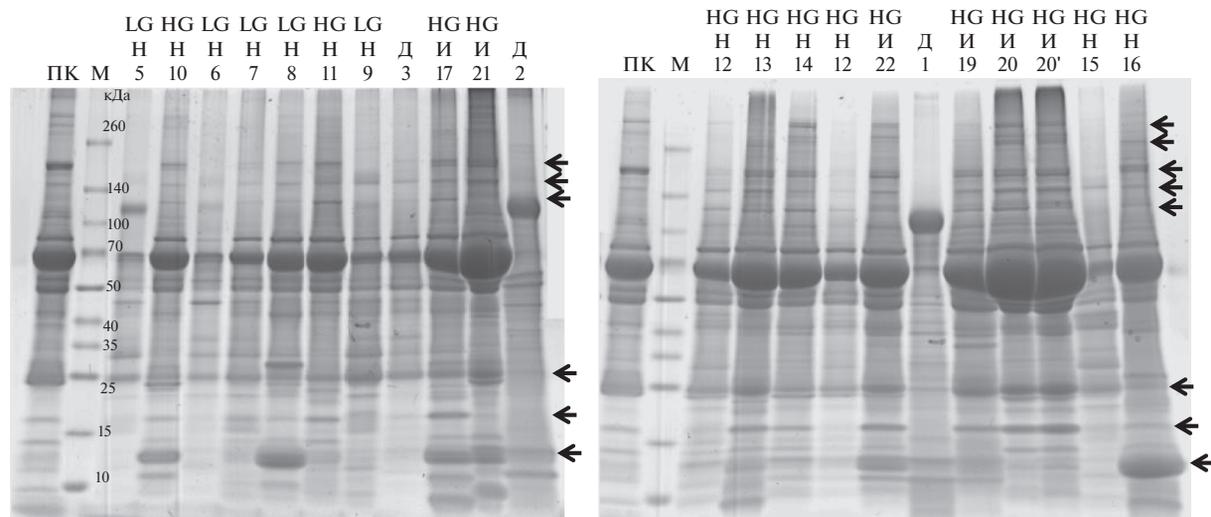


Рис. 2. Электрофоретическое фракционирование в градиентном 5–19%-ном ПААГ в восстанавливающих условиях белков из 75 мкл супернатанта мочи больных РМП (указаны номера образцов из табл. 1, степень инвазивности и злокачественности соответствующей опухоли). ПК – 0.1 мкл исходной плазмы крови, М – маркер молекулярной массы полипептидов. Стрелками обозначены белки, которыми обогащена моча больных РМП по сравнению с контрольными образцами и образцами больных с доброкачественными новообразованиями. HG – высокая степень злокачественности опухоли. Н, И и Д – мышечно-неинвазивные, мышечно-инвазивные и доброкачественные опухоли соответственно.

кое выделение может упростить задачу анализа как мажорных, так и минорных биомаркеров (в конкретном субпротеоме или в остаточной фракции после удаления основных компонентов). Мы использовали только четыре характерных образца мочи больных РМП:

- 1) № 7 (табл. 1), мышечно-неинвазивный РМП низкой степени злокачественности (G1);
- 2) № 10, мышечно-неинвазивный РМП умеренной степени злокачественности (G2);
- 3) № 20, мышечно-инвазивный РМП высокой степени злокачественности (G3);
- 4) № 22, мышечно-инвазивная опухоль высокой степени злокачественности с региональными метастазами (G4).

Каждый образец (1 мл) последовательно пропускали через четыре иммуносорбента с иммобилизованными нанотелами. Первый иммуносорбент содержал однодоменные антитела к сывороточному альбумину; второй – однодоменные антитела к IgA и трансферрину (Tf); третий – однодоменные антитела к фибриногену (Fg), аполипопротеинам A1 и B (ApoA1, ApoB); четвертый – однодоменные антитела к фибронектину (FN), альфа-2-макроглобулину ($\alpha 2$ MA), IgG и лактоферрину (Lf). Получены проскоки несвязавшегося материала и элюаты (Э) для каждого иммуносорбента. После пропускания образцов через иммуносорбент с иммобилизованными нанотелами к альбумину отбирали аликвоту для последующего нанесения на гель, соответствующую 150 мкл исходного образца. Полученные элюаты и аликвоту проскока

концентрировали с помощью фильтрационно-центрифужных приспособлений Amicon (“Millipore”) с размером отсека 10 кДа до 100 мкл, после чего для электрофоретического анализа отбирали объем, соответствующий 150 мкл исходного образца. Полученные образцы проверяли с помощью электрофореза в 5–20%-ном градиентном ПААГ. Результаты такого иммуноаффинного выделения и/или истощения представлены на рис. 3.

Из рис. 3 видно, что фракционирование позволяет более точно оценить соотношение ряда мажорных компонентов мочи в исследуемых образцах. Так, в элюатах 1 и 3 мы можем сравнить относительную представленность IgA и IgG. В элюатах 3 мы четко видим, особенно в случае злокачественных мышечно-инвазивных опухолей, фибронектин и альфа-2-макроглобулин. Во всех образцах в элюате 3 можно видеть лактоферрин (на геле расположен чуть выше трансферрина, перекрываясь с ним в исходном образце). Следует заметить, что проведенное фракционирование не учитывало такие известные факты, как возможное образование комплексов между IgA и сывороточным альбумином, между трансферрином и фибриногеном. Этим, предположительно, можно объяснить некоторые несовершенства фракционирования. Однако приведенный результат показывает перспективность аффинного выделения определенных субпротеомов, что может облегчить их последующий сравнительный анализ с помощью разных методов.

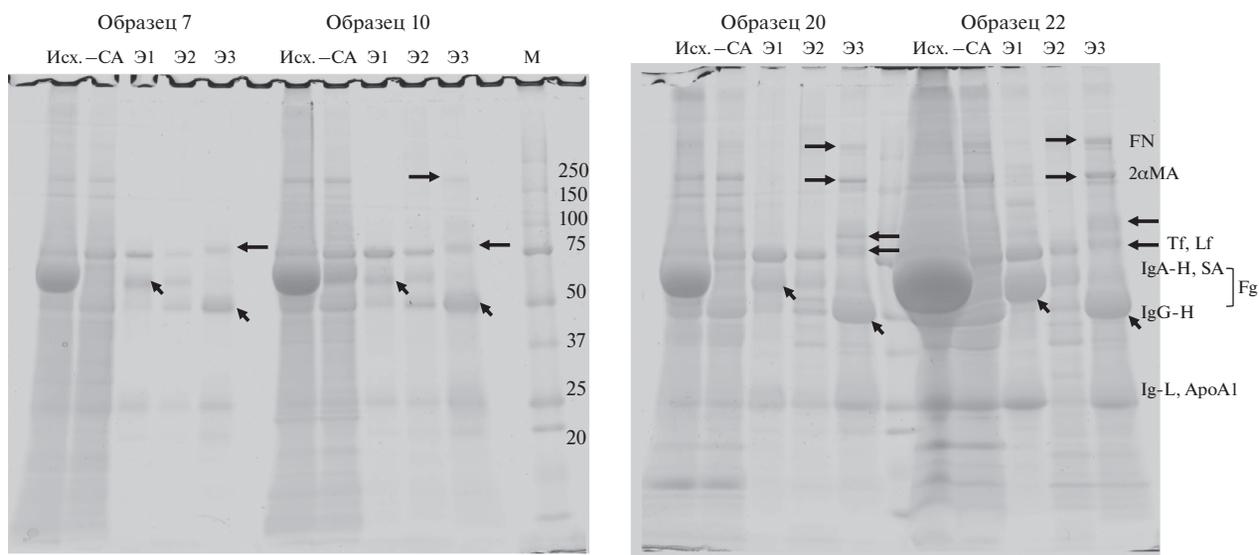


Рис. 3. Электрофоретическое разделение в 5–20% градиентном ПААГ белков мочи во фракциях, полученных в результате иммуоаффинного фракционирования белков четырех образцов мочи больных РМП. Исх. – исходный образец мочи; СА – проскок после удаления из исходной мочи сывороточного альбумина (SA); Э1 – элюат субпротеома, ассоциированного с белками IgA и трансферрином (Tf); Э2 – элюат субпротеома, ассоциированного с фибриногеном (Fg) и аполипопротеинами (Apo) A1 и B; Э3 – элюат субпротеома, ассоциированного с белками IgG, фибронектином (FN), лактоферрином (Lf) и α 2-макроглобулином (MA). Стрелками обозначены основные белки, которыми обогащены фракции, сокращенные названия этих белков приведены справа.

На рис. 4 представлены результаты последовательного фракционирования белков четырех образцов мочи больных РМП и взятого в 10-кратном избытке контрольного образца (К) на иммуноаффинных колонках с нанотелами, узнающими фибриноген (рис. 4а), аполипопротеин A1 (ApoA1) или α 2-макроглобулин (рис. 4б). На дорожки геля нанесены образцы, эквивалентные 200 мкл исходной мочи (образцы больных РМП) и 2 мл – в случае контрольного образца здорового человека. В ассоциированных с фибриногеном субпротеомах образцов (20 и 22) мышечно-инвазивного РМП на электрофореграмме (рис. 4а) видно увеличение количества белков по сравнению с образцами мышечно-неинвазивного РМП (7 и 10); также видна, по-видимому, заметная деградация этих белков в образцах инвазивного РМП. В нижней части рис. 4б можно видеть обогащение белками ApoA1 (A1) и α 2-макроглобулином (α 2M) также при мышечно-инвазивном РМП (их положение отмечено стрелками). В контрольном образце мочи здорового донора (К), взятого в 10-кратном избытке, выявлено относительно небольшое количество фибриногена (в 10 раз меньше, чем даже у больных мышечно-неинвазивным РМП) и, по-видимому, ApoA1, но не детектируется α 2-макроглобулин.

Следует отметить, что при последовательном пропускании образцов мочи через несколько колонок мы частично теряли некоторые маркерные белки, возможно, за счет их неспецифической

сорбции или ассоциации с другими отбираемыми компонентами, поэтому мы предполагаем использовать однократное пропускание исходного образца мочи через иммуносорбент, выбранный для предобработки.

Еще одно важное замечание: несмотря на выявление наглядной корреляции, мы пока анализировали аликвоты мочи равного объема. Однако при анализе биомаркеров количественные результаты принято нормировать не по объему мочи, а по концентрации креатинина или общего белка. Некоторые исследователи предполагают проводить нормализацию по концентрации сывороточного альбумина или трансферрина в моче. Мы проанализировали возможности подобных способов нормирования количественных оценок белковых компонентов в моче, выбрав четыре характерных образца мочи.

Изучение компонентов мочи после нормирования по концентрации креатинина или при выравнивании количества общего белка

Мы выбрали четыре характерных образца (№ 7, № 10, № 20 и № 22, табл. 1). Образец № 7 получен от пациента с ранней мышечно-неинвазивной опухолью низкой злокачественности (G1); № 10 – от пациента с мышечно-неинвазивной опухолью более высокой степени злокачественности (G2); № 20 – от пациента с мышечно-инвазивной опухолью высокой злокачественности (G3); № 22 –

от пациента с мышечно-инвазивной опухолью высокой злокачественности с метастазами.

В этих образцах, а также в контрольном образце, полученном от здорового донора, мы измерили концентрации креатинина и общего белка с помощью прибора URiСКАН-БК, специализированного анализатора мочи и наборов реагентов для диагностики протеинурии (“Эйлитон”, Россия). Результаты измерений представлены на рис. 5. Видно, что развитие и тяжесть РМП явно коррелируют с резким возрастанием соотношения концентраций белок/креатинин. Из представленных данных видна сложность нормализации по креатинину образцов мочи при РМП продвинутых стадий, особенно при высокой степени злокачественности. Так, в образце № 22 соотношение белок/креатинин примерно в 100 раз выше нормы, а если выровнять по креатинину этот образец и нормальный, то будет выявлена 100-кратная разница в количестве белка. С одной стороны, выравнивание проб по креатинину еще больше подчеркнет выявляемые в приведенных выше результатах эффекты обогащения определенными белками. С другой стороны, для обнаружения качественных различий в конкретных белковых продуктах более наглядным может быть использование проб, выравненных по общему белку (или по сывороточному альбумину, или трансферрину).

Мы решили сначала провести нормализацию образцов по общему белку, а затем фракционировать их: выделить IgG и IgA с ассоциированным субпротеомом, а затем альбумин с ассоциированными компонентами. Субпротеом мочи после этих выделений может оказаться перспективным для анализа менее представленных белков, которые могут быть плохо видны в исходном препарате, поскольку затенены указанными наиболее богато представленными белками. Для сравнения фракций, выделенных одинаковым способом из разных образцов, желателен наносить их в соседние дорожки одного геля. Мы проанализировали таким образом фракции, полученные из четырех образцов мочи (рис. 6 и 7). На рис. 6 представлены результаты фракционирования в 5–19%-ном ПААГ белков исходных образцов мочи (исходные), субпротеома, ассоциированного с сывороточным альбумином (элюаты (СА) белков мочи, связавшихся с иммуносорбентом, созданным на основе нанотел к сывороточному альбумину), а также проскоки белков мочи, не связавшихся ни с иммуносорбентом на основе нанотел к сывороточному альбумину, ни с иммуносорбентами, созданными на основе нанотел к иммуноглобулинам.

При таком нормализованном по общему белку анализе более наглядно видны относительные различия в представленности конкретных белковых полос внутри каждого образца. На рис. 7 представлен анализ фракций иммуноглобулинов

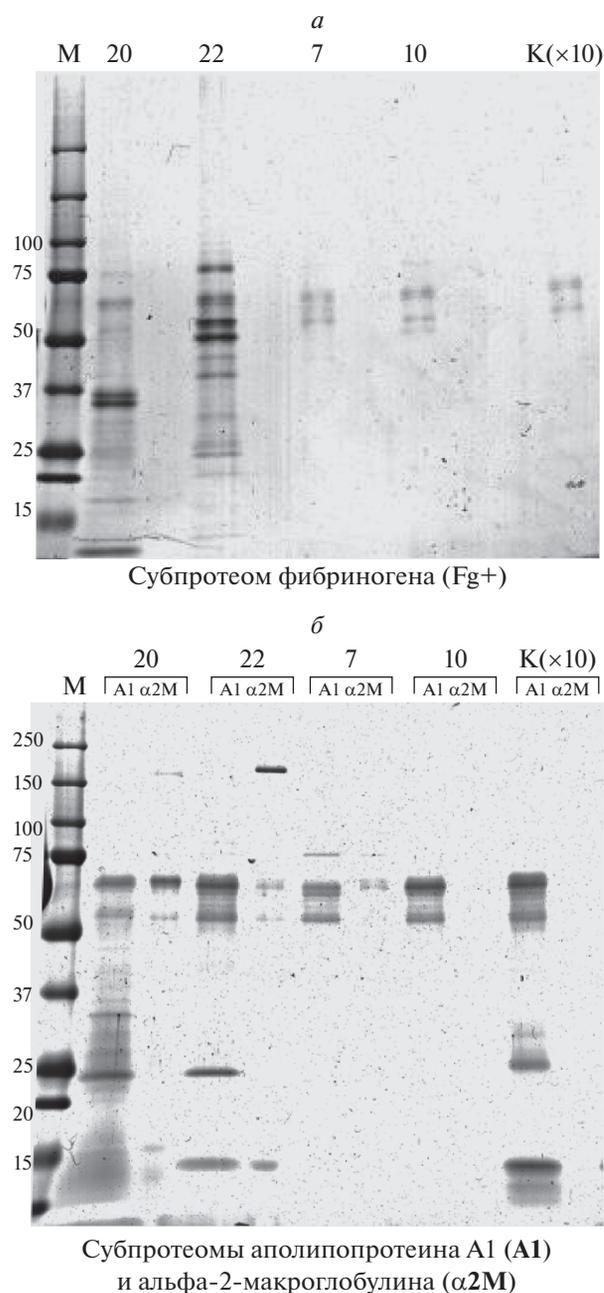


Рис. 4. Электрофоретическое разделение белков мочи в 5–20%-ном градиентном ПААГ во фракциях, полученных путем иммуноаффинного фракционирования белков четырех образцов, полученных от больных РМП, и взятого в 10-кратном избытке контрольного образца (К) от здорового донора: *a* – элюаты белков, связавшихся с иммуносорбентом на основе нанотел к фибриногену; *б* – элюаты белков, связавшихся с иммуносорбентами на основе нанотел к аполипопротеину A1 ($\alpha 2M$) или к $\alpha 2$ -макроглобулину ($\alpha 2M$). М – маркер. Стрелками обозначены выявляемые белки $\alpha 2M$ и апоA1.

(IgA и IgG) и ассоциированных с ними белков, полученных в результате связывания, промывки и элюции связавшихся белков с колонки, на ко-

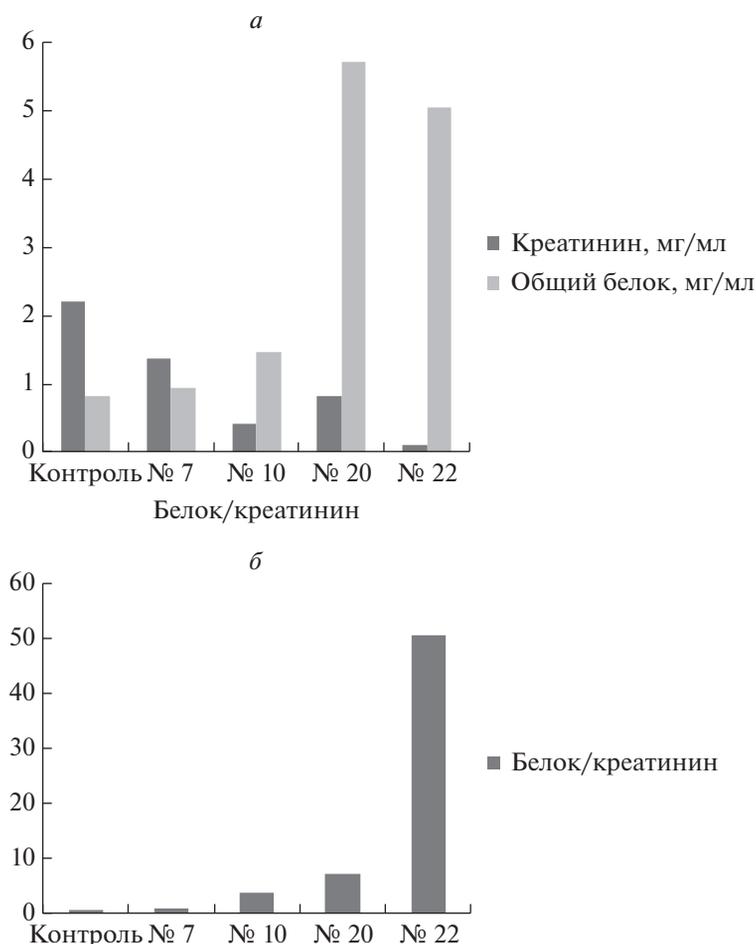


Рис. 5. Определение концентраций креатинина и общего белка в образцах мочи больных РМП (№ 7, № 10, № 20 и № 22), а также в контрольном образце здорового донора. *а* – Концентрации креатинина и белка (в мг/мл). *б* – Соотношение концентраций белка и креатинина.

торой иммобилизованы полученные нами ранее два разных нанотела, связывающие в совокупности константные участки IgG и IgA.

Выделенные субпротеомы содержат не только основные заданные белки, но и другие компоненты, которые потенциально могут быть важными для диагностических исследований. Получение фракции проскока, из которой удалены основные белки, может быть весьма полезным способом предобработки мочи для последующего исследования с помощью различных современных методов, таких как двумерный электрофорез, масс-спектрометрия и другие.

Особый интерес представляет выделение иммунных комплексов из мочи конкретного пациента. При первичном изучении в составе этих комплексов можно увидеть не только повышенное содержание IgA и IgG на инвазивных стадиях болезни, но также и многие другие компоненты, которые потенциально могут быть биомар-

керами патологического процесса у конкретного пациента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе проанализированы экспериментальные возможности применения ряда полученных нами ранее однодоменных антител (нанотел) к мажорным маркерным белкам крови для предобработки препаратов мочи больных РМП. Показаны уникальные возможности использования нанотел и новых инструментов на их основе (иммуносорбентов, специфически адаптированных парамагнитных частиц или иных носителей) для повышения эффективности неинвазивных диагностических исследований наряду с такими традиционными методами, как электрофорез, а, в перспективе, масс-спектрометрический анализ и другие самые современные подходы.

Одно из перспективных направлений использования нанотел – получение на их основе новых

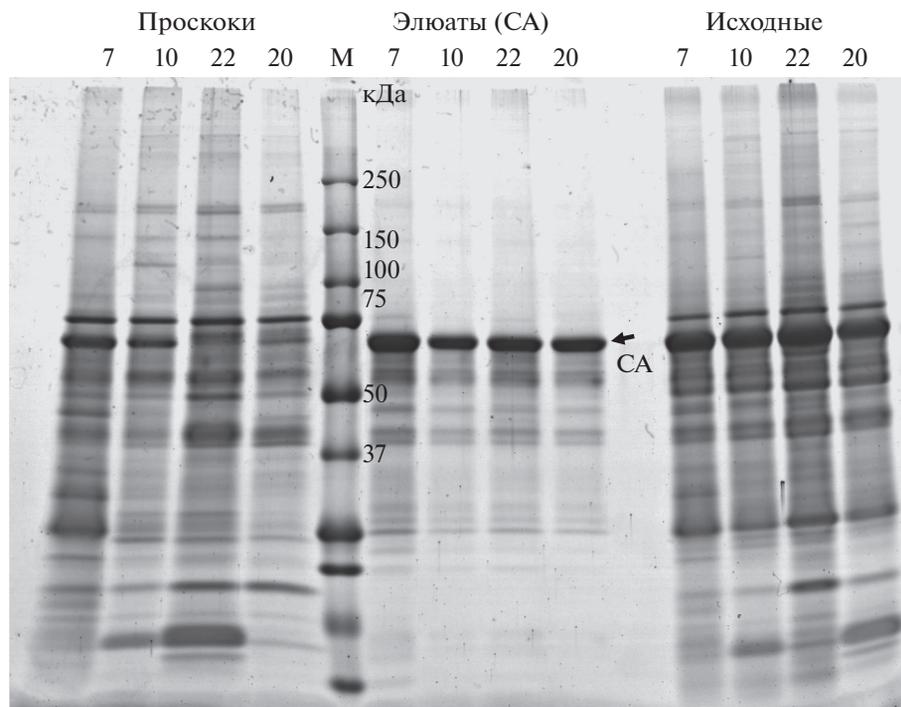


Рис. 6. Фракционирование исходных образцов мочи (исходные), нормализованных по общему белку, а также их фракций: субпротеома, ассоциированного с сывороточным альбумином (элюаты (СА)), и субпротеома проскока (проскоки) из несвязавшихся с анти-СА-иммуносорбентом белков. Номера образцов мочи указаны над электрофореграммой.

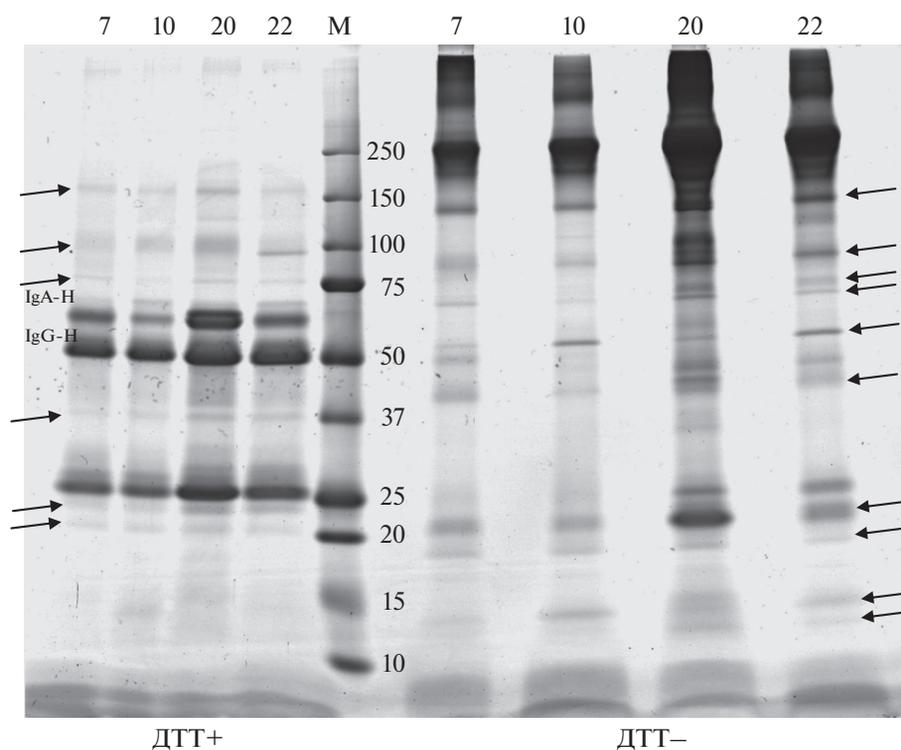


Рис. 7. Анализ фракций иммуноглобулинов (IgA и IgG) и ассоциированных с ними белков. Сверху указаны номера образцов мочи, которую подвергали фракционированию. М – маркер. Стрелками обозначены белковые продукты, отличающиеся от иммуноглобулинов, и потенциально с ними ассоциированные. На одном геле четыре образца слева фракционировали в восстанавливающих условиях (ДТТ+), а четыре образца справа – в невосстанавливающих (ДТТ-).

иммуносорбентов (или модифицированных парамагнитных частиц). Насколько нам известно, число публикаций, посвященных получению и адаптации нанотел для использования в составе иммуносорбентов, весьма ограничено. В качестве примера можно привести недавнюю публикацию об иммуносорбенте на основе нанотел к $\beta 2$ -микроглобулину для селективной очистки крови от этого белка, что может отсрочить возникновение диализного амилоидоза [21]. В этой работе описан метод создания иммуносорбента с помощью сайт-специфической пришивки нанотела, показана высокая эффективность получаемого продукта для удаления заданного белка из крови. Потенциал наших разработок намного выше. Здесь речь идет об использовании не одного, а сразу многих высокоаффинных нанотел, с высокой специфичностью связывающих конкретный мажорный белок крови или мочи (сывороточный альбумин, иммуноглобулин А, иммуноглобулин G, фибриноген, трансферрин, $\alpha 2$ -макроглобулин, аполипопротеин А1, аполипопротеин В, фибронектин, лактоферрин). Используемые в данной работе нанотела получены и описаны в руководимой Тиллибом лаборатории ИБГ РАН [10, 12]. Все эти нанотела новые и коммерчески недоступные.

Нами не найдено публикаций об использовании методов фракционирования белков мочи, основанных на классических антителах. Возможно, это связано с относительно высокой стоимостью и меньшей стабильностью традиционных моноклональных антител по сравнению с нанотелами. Наше преимущество состоит также в том, что мы имеем продуценты всех используемых в данной работе нанотел и можем в любой момент экономично наработать их в бактериальной системе экспрессии.

Нами показана возможность высокоспецифичного удаления (истощения) или обогащения конкретного белка мочи с помощью соответствующего иммуносорбента. Таким образом, можно специфически преобработать препарат мочи, плазмы крови (что показано нами ранее [12]) или иной биологической жидкости, удалив нежелательные белки, или наоборот, выделить субпротеомы, ассоциированные с конкретным мажорным плазматическим белком-носителем. Такая преобработка может быть полезной для последующего анализа маркерных молекул в соответствующих фракциях, например, с помощью масс-спектрометрии. Подобные обработки могут быть также полезны для повышения чувствительности традиционных методов иммуноферментного и иммунофлуоресцентного анализа.

Мы использовали комбинированный подход для исследования образцов надосадка мочи, полученной от пациентов с разными стадиями РМП. Этот подход заключался в использовании

иммуноаффинных колонок с иммобилизованными нанотелами для специфической преобработки образцов мочи и последующего фракционирования белков исходной или преобработанной мочи традиционным методом электрофореза в градиентном SDS-ПААГ, первую версию которого описал Лэммли много лет тому назад [18]. Удивительно, но 1D ПААГ-электрофорез, самый популярный в исследовательских лабораториях вариант, редко используется при проведении клинических анализов мочи. Мы присоединяемся к мнению ряда экспертов в области исследования протеома мочи [16] и видим именно этот относительно простой метод фракционирования белков как компромиссный вариант разрабатываемого рутинного метода клинического тестирования белков мочи.

Помимо технологических инноваций, связанных с использованием новых высокоспецифических нанотел, нами получены следующие важные результаты. Показано, что развитие РМП сопровождается увеличением содержания мажорных белков крови практически во всех 22 исследованных образцах мочи больных. Некоторые из этих белков уже предложены ранее в качестве биомаркеров РМП. Так, мы подтвердили опубликованные ранее данные и выявили повышение содержания ряда конкретных маркерных белков в образцах мочи больных РМП, особенно выраженное при прогрессировании опухоли от мышечно-неинвазивных к мышечно-инвазивным стадиям. Помимо сывороточного альбумина, трансферрина, IgA и IgG, нами выявлено также обогащение фибриногеном (причем при РМП высокой степени злокачественности наблюдали его дегградацию), лактоферрином, $\alpha 2$ -макроглобулином, аполипопротеином А1, фибронектином, что вполне согласуется с данными [22–26]. Вариант комбинированного иммуносорбента, содержащего использованные в данной работе нанотела к перечисленным выше маркерным белкам, имеющим диагностический потенциал для РМП, может использоваться также для разработки неинвазивного диагностического метода в ближайшем будущем с целью первичного скрининга пациентов из группы риска.

Отметим, что при удалении мажорных белков в колоночном формате возможна неконтролируемая потеря минорных компонентов за счет сорбционных эффектов. Возможно, для исследования минорных биомаркеров более перспективно выделять-обогащаться заданным субпротеомом с целью его более детального исследования.

На наш взгляд, особый интерес представляет выделение иммунных комплексов из мочи конкретного пациента. Наряду с увеличенным содержанием IgA и IgG на инвазивных стадиях болезни в составе этих комплексов можно увидеть и многие другие компоненты, которые потенциально

могут быть биомаркерами патологического процесса у конкретного пациента. Мы планируем использовать этот подход в более масштабных исследованиях с целью идентификации компонентов иммунных комплексов, которые могут быть ассоциированы с ответом иммунной системы пациента на растущую злокачественную опухоль, которая контактирует с мочой, что определяет важность использования для диагностики именно мочи.

Безусловно, наша работа это лишь первая пионерская работа в направлении разработки комбинированного диагностического метода начального исследования белков мочи. Мы планируем дальнейшую работу в этом направлении на основе полученных результатов. Для нормализации данных мы предполагаем использовать традиционную практику отнесения белковых данных к концентрации креатинина в моче. Из наших результатов следует, что в таком случае еще лучше будет видна разница между образцами мочи здоровых людей, пациентов с ранними формами РМП и с мышечно-инвазивными опухолями. Усреднение по содержанию общего белка может быть правильным при резком появлении или исчезновении конкретного биомаркера, а для детекции количественных изменений, на наш взгляд, более удачным будет выравнивание образцов по креатинину.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00305).

Все процедуры, выполненные с участием биологических жидкостей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого участника, включенного в исследование, получено информированное добровольное согласие. Работа одобрена Этическими комитетами ИБГ РАН (разрешение от 18.01.2021) и Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IARC, Cancer Today. Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages. (2021) <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table>
2. <https://uroweb.org/guideline/non-muscle-invasive-bladder-cancer/#3>
3. American Cancer Society. What is bladder cancer? (2020) (<https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/about/what-is-bladder-cancer.html>. Accessed September 2020)
4. van Rhijn B.W., Burger M., Lotan Y., Solsona E., Stief C.G., Sylvester R.J., Witjes J.A., Zlotta A.R. (2009) Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. *Eur. Urol.* **56** (3), 430–442. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2009.06.028>
5. Humphrey P.A., Moch H., Cubilla A.L., Ulbright T.M., Reuter V.E. (2016) The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs-part B: prostate and bladder tumours. *Eur. Urol.* **70** (1), 106–119.
6. Santoni G., Morelli M.B., Amantini C. Battelli N. (2018) Urinary markers in bladder cancer: an update. *Front. Oncol.* **7** (8), 362.
7. Blick C.G.T., Nazir S.A., Mallett S., Turney B.W., Onwu N.N., Roberts I.S.D., Jeremy P. Crew J.H., Cowan N.C. (2011) Evaluation of diagnostic strategies for bladder cancer using computed tomography (CT) urography, flexible cystoscopy and voided urine cytology: results for 778 patients from a hospital haematuria clinic. *BJU Int.* **110**, 84–94.
8. Тиллиб С.В., Иванова Т.И., Васильев Л.А. (2010) Фингерпринтный анализ селекции “наноантител” методом фагового дисплея с использованием двух вариантов фагов-помощников. *Acta Naturae.* **2**, 100–108.
9. Tillib S., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Rutovskaya M.V., Saakyan S.A., Gribova I.Y., Tutykhina I.L., Sedova E.S., Lysenko A.A., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. (2013) Formatted single-domain antibodies can protect mice against infection with influenza virus (H5N2). *Antiviral Res.* **97**, 245–254.
10. Tillib S.V., Privezentseva M.E., Ivanova T.I., Efimov G.A., Gursky Y.G., Georgiev G.P., Goldman I.L., Sadchikova E.R. (2014) Single-domain antibody-based ligands for immunoaffinity separation of recombinant human lactoferrin from the goat lactoferrin of transgenic goat milk. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **949–950**, 48–57.
11. Тиллиб С.В., Вятчанин А.С., Муилдерманс С. (2014) Молекулярный анализ структуры особых антител *Camelus bactrianus*, состоящих только из тяжелых цепей. *Биохимия.* **79**, 1687–1697.
12. Горайнова О.С., Иванова Т.И., Рutowская М.В., Тиллиб С.В. (2017) Метод параллельного и последовательного генерирования однодоменных антител для протеомного анализа плазмы крови человека. *Молекуляр. биология.* **51**(6), 985–996.
13. Тиллиб С.В. (2020) Перспективы использования однодоменных антител в биомедицине. *Молекуляр. биология.* **54**(3), 362–373.
14. Тиллиб С.В., Иванова Т.И., Лысюк Е.Ю., Ларин С.С., Кибардин А.В., Коробко Е.В., Вихрева П.Н., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Коробко И.В. (2012) Наноантитела для детекции и блокирования биологической активности фактора роста эндотелия сосудов A165 человека. *Биохимия.* **77**, 809–817.
15. Гарас М.Н., Тиллиб С.В., Зубкова О.В., Рогожин В.Н., Иванова Т.И., Васильев Л.А., Логунов Д.Ю., Шмаров М.М., Тутыхина И.Л., Есмагамбетов И.Б., Грибова И.Ю., Банделюк А.С., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. (2014) Мишень-специфичная доставка генов с помощью рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц, способных эффективно

- связываться с наноантителами. *Acta Naturae*. **6**(2), 102–113.
16. Marshall T., Williams K.M. (1998) Clinical analysis of human urinary proteins using high resolution electrophoretic methods. *Electrophoresis*. **19**, 1752–1770.
 17. Wessel D., Fluegge U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem*. **138**, 141–143.
 18. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685.
 19. Floege J., Boddeker M., Stolte H., Koch K.M. (1990) Urinary IgA, secretory IgA and secretory component in women with recurrent urinary tract infections. *Nephron*. **56**, 50–55.
 20. Machii R., Kubota R., Hiratsuka N., Sugimoto K., Masudo R., Kurihara Y., Kobayashi S., Shiba K. (2004) Urinary protein fraction in healthy subjects using cellulose acetate membrane electrophoresis followed by colloidal silver staining. *J. Clin. Lab. Anal.* **18**, 231–236.
 21. Huang C., Ren J., Ji F., Muyldermans S., Jia L. (2020) Nanobody-based high-performance immunosorbent for selective beta 2-microglobulin purification from blood. *Acta Biomaterialia*. **107**, 232–241.
 22. Betkerur V., Baumgartner G., Talluri K., Sharifi R., Nagubadi S., Guinan P. (1981) Urinary immunoglobulin A in the diagnosis of bladder cancer. *J. Surg. Oncol.* **16**, 215–217.
 23. Khalifa A., Fathi O., Mousa M.A., el Magraby H. (1987) Immunoglobulin A and alpha 2-macroglobulin as tumor markers in bladder cancer. *Chemioter.* **6**(Suppl. 2), 736–737.
 24. Li C., Li H., Zhang T., Li J., Liu L., Chang J. (2014) Discovery of Apo-A1 as a potential bladder cancer biomarker by urine proteomics and analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 1047–1052.
 25. Dong F., Shen Y., Xu T., Wang X., Gao F., Zhong S., Chen S., Shen Z. (2018) Effectiveness of urine fibronectin as a non-invasive diagnostic biomarker in bladder cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *World J. Surg. Oncol.* **16**, 61.
 26. Matsumura E., Kosuge N., Nakanishi S., Suda T., Sugawa A., Fujimura T., Miyagi R., Yoshimi N., Saito S. (2020) Urine lactoferrin as a potential biomarker reflecting the degree of malignancy in urothelial carcinoma of the bladder. *Tohoku J. Exp. Med.* **252**(3), 225–244.

SINGLE-DOMAIN ANTIBODIES FOR PRE-TREATMENT OF HUMAN URINE PROTEOME TO IMPROVE AN ANALYSIS OF ONCOBIOMARKERS

S. V. Tillib^{1, *}, O. S. Goryainova¹, A. M. Sachko¹, T. I. Ivanova^{1, 2}, M. Ya. Gaas³,
N. V. Vorob'ev^{1, 4, 5}, A. D. Kaprin⁶, and P. V. Shegay^{1, 6}

¹ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

² Tsyb Medical Radiological Research Centre – Branch of the National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, 249036 Russia

³ Institute of Medicine, RUDN University, Moscow, 117198 Russia

⁴ Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125284 Russia

⁵ Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 119991 Russia

⁶ Center for Innovative Radiological and Regenerative Technologies of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125284 Russia

*e-mail: tillib@genebiology.ru

This article is devoted to the analysis of the experimental possibilities of using a number of previously obtained single-domain antibodies (nanobodies) to major marker blood proteins for the preprocessing of urine preparations from patients with bladder cancer (BC) and demonstrating the unique possibilities of nanobody-based tools for non-invasive diagnostic studies along with other traditional methods, such as electrophoresis and, in the perspective, mass spectrometric analysis. It has been demonstrated that the development of bladder cancer in almost all 22 studied samples is accompanied by an increase in the content of major blood proteins in the urine, some of which have already been proposed as biomarkers of bladder cancer. The use of new immunosorbents based on nanobodies allows for both specific enrichment and removal of specified antigen proteins and sub-proteomes associated with them from a biological fluid. The isolation of immune complexes from the urine of a particular patient is of particular interest. During the initial study of these complexes, along with the increased content of IgA and IgG at advanced stages of the disease, many other components can be seen in their composition, which can potentially be biomarkers of a pathological process in a particular patient. We plan to use the approaches proposed in this paper in the future for a larger-scale study of urine samples from patients with bladder cancer at different stages of disease development in order to identify new promising biomarkers of bladder cancer.

Keywords: single-domain antibody, nanobody, urinary biomarkers, bladder cancer, immunosorbent, affinity chromatography, diagnostics