СОДЕРЖАНИЕ

Том 55, номер 5, 2021

ОБЗОРЫ

Транскрипционные факторы прямого пронейронального репрограммирования в онтогенезе и *ex vivo*

Е. М. Самойлова, В. В. Белопасов, В. П. Баклаушев 707

Бета-амилоид, ТАУ-белок и нейровоспаление: попытка объединения различных гипотез патогенеза болезни Альцгеймера

Д. Г. Гарбуз, О. Г. Зацепина, М. Б. Евгеньев 734

Структурные, функциональные и эволюционные характеристики белков с повторами

Е. И. Дерюшева, А. В. Мачулин, О. В. Галзитская 748

Гуаниновые квадруплексы в метаболизме клеточного ядра

Е. В. Мариловцева, В. М. Студитский 772

Адресация, транспорт и локальная трансляция мРНК в клетках эукариот: от классического взгляда к многообразию современных концепций

К. А. Лашкевич, С. Е. Дмитриев 796

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

Определение субклональной структуры опухоли по данным высокопроизводительного секвенирования на примере острого миелоидного лейкоза у детей и акральной меланомы

Г. С. Краснов, Л. Г. Гукасян, И. С. Абрамов, Т. В. Наседкина 829

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Репортерная система люцифераза-EGFP для оценки метилирования ДНК в клетках млекопитающих

X. X. Wang, H. J. Jia, Y. R. Lv, H. H. Sun, X. L. Wei, J. Y. Tan, Z. Z. Jing 846

Митоксантрон ингибирует индуцируемые FMLP дегенеративные изменения в нейтрофилах человека

S. G. Ali, D. Shehwar, M. R. Alam 858

Аннексин A8 регулирует пролиферацию клеток немелкоклеточного рака легкого человека линии A549 за счет регуляции сигнального пути EGFR-Akt-mTOR

G.-Z. Zhou, Y.-H. Sun, Y.-Y. Shi, Q. Zhang, L. Zhang, L.-Q. Cui, G.-C. Sun 870

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 5, с. 707–733

ОБЗОРЫ

УДК 57.085.23

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ ПРЯМОГО ПРОНЕЙРОНАЛЬНОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ В ОНТОГЕНЕЗЕ И *EX VIVO*

© 2021 г. Е. М. Самойлова[a], *, В. В. Белопасов[b], В. П. Баклаушев[a]

[a] *Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации, Москва, 115682 Россия*

[b] *Кафедра неврологии, Астраханская государственная медицинская академия, Астрахань, 414000 Россия*

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

Поступила в редакцию 11.10.2020 г.
После доработки 14.12.2020 г.
Принята к публикации 15.12.2020 г.

Технология прямого репрограммирования позволяет получать различные специфические типы клеток, включая специализированные нейроны, из легко доступных аутологичных соматических клеток. Это открывает уникальные возможности для развития персонализированной медицины – от разработки *in vitro* моделей наследственных и дегенеративных неврологических заболеваний до создания нейрорегенеративных технологий. За последние 10 лет опубликовано множество различных протоколов первичного репрограммирования, однако воспроизводимое получение гомогенных популяций репрограммированных в нейрональном направлении клеток по сей день остается трудновыполнимой задачей. Объединяет все существующие протоколы то, что в них используются транскрипционные факторы, так или иначе участвующие в эмбриональном нейрогенезе. Можно предположить, что именно там кроется ключ к получению высокоэффективных и воспроизводимых технологий для осуществления нейрогенеза *ex vivo*. Анализ функциональных особенностей транскрипционных факторов в эмбриональном и взрослом нейрогенезе позволит не только усовершенствовать протоколы репрограммирования, но и путем детекции клеточных маркеров точно определить – на какую стадию нейрогенеза выводит тот или иной протокол. Цель данного обзора – охарактеризовать общие факторы, играющие ключевую роль в нейрогенезе в эмбриональном и взрослом периодах, а также в клеточном репрограммировании, и оценить соответствие получаемых в результате репрограммирования клеток формам онтогенетического ряда нервной системы – от плюрипотентных стволовых клеток до специализированных нейронов.

Ключевые слова: эмбриональный нейрогенез, взрослый нейрогенез, морфогенные факторы, пронейрональные факторы, прямое репрограммирование, нейральные стволовые клетки, нейральные прогениторные клетки, индуцированные нейроны, PAX6, MSI1, GSX2, DLX, ASCL1, NGN2, BRN2, MYT1l, NEUROD1

DOI: 10.31857/S0026898421050086

ВВЕДЕНИЕ

До недавнего времени проведение исследований в области регенеративной терапии некурабельных заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) было затруднительным из-за отсутствия возможности получения необходимых типов клеток нервной ткани, включая все переходные формы: от мультипотентных стволовых клеток до высокоспециализированных нейронов. Создание технологии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs; induced pluripotent stem cells), а затем и технологии прямого репрограммирования (получение нейральных прогениторных клеток напрямую – без стадии индуцированной плюрипотентности) стало началом новой эры в области нейрорегенерации [1–5]. Известно, что при большинстве нейродегенеративных заболеваний преимущественно повреждаются определенные подтипы нейронов. Так, при болезни Паркинсона дегенерируют дофаминергические нейроны среднего мозга, при

Сокращения: ГАМК – γ-аминомаслянная кислота; НСК – нейральные стволовые клетки; РГ – радиальная глия; BMP (bone morphogenetic protein) – костный морфогенетический белок; drNPCs (directly reprogrammed neural precursor cell) – прямо репрограммированные нейральные прогениторные клетки; DV (dorsal-ventral) – дорсально-вентральная (ось); FGF (fibroblast growth factors) – факторы роста фибробластов; iPSCs (induced pluripotent stem cells) – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; LGE (lateral ganglionic eminence) – латеральное ганглиозное возвышение; NCCs (neural crest cells) – клетки нервного гребня; RA (retinoic acid) – ретиноевая кислота; RC (rostral-caudal) – рострально-каудальная (ось).

болезни Хантингтона повреждаются ГАМКергические нейроны стриатума (γ-аминомасляная кислота (ГАМК) – нейротрансмиттер), при спинальной мышечной атрофии и боковом амиотрофическом склерозе дегенерируют двигательные нейроны [6]. Клеточное репрограммирование открывает перспективы для воссоздания утраченных специализированных нейронов, а также для создания специфичных для пациента клеточных моделей, включая генетические и спорадические заболевания, для исследования интимных механизмов патогенеза и разработки новых методов терапии некурабельных на данном этапе психоневрологических и нейродегенеративных заболеваний [7, 8].

Некоторые исследователи отмечают, что развитие клеток контролируется не только биохимическим, но и пространственно-временным контекстом окружения [9–11]. С этой точки зрения технология получения iPSCs и прямое репрограммирование принципиально отличаются друг от друга, поскольку при получении iPSCs происходит “обнуление” эпигенетического возраста трансформированной клетки [10]. Прямое репрограммирование соматических клеток взрослого пациента позволяет миновать неустойчивую и потенциально небезопасную стадию iPSCs и при этом сохранить основной эпигенетический “портрет” исходной клетки [11]. Сохранение возрастных особенностей обусловливает предпочтительное применение прямо репрограммированных нейральных прогениторных клеток (directly reprogrammed neural precursor cells; drNPCs) [2], например при исследованиях возрастных нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Гентингтона [11].

Открытием многих транскрипционных факторов и целого ряда малых молекул, применяющихся сейчас для прямого репрограммирования, мы обязаны исследованиям в области биологии развития нервной системы. Более того, в настоящее время становится очевидным, что и нейрорегенеративные технологии восстановления пирамидной системы при таких заболеваниях, как тяжелая спинальная травма или инсульт, с помощью iPSCs или drNPCs не могут быть разработаны без глубокого понимания и моделирования процессов эмбрионального нейрогенеза. Простая имплантация даже сингенных эмбриональных нейральных стволовых клеток (НСК) не приводит к полноценной регенерацией взрослой ЦНС вследствие несовпадения эпигенетических сигналов, отсутствия градиентов морфогенных факторов и других важных компонентов клеточного микроокружения, без которых нейрорегенерация невозможна [9–11].

Цель обзора – охарактеризовать общие факторы, играющие ключевую роль в нейрогенезе в эмбриональном и взрослом периодах, а также в клеточном репрограммировании и оценить соответствие получаемых в результате репрограммирования клеток формам онтогенетического ряда нервной системы – от плюрипотентных стволовых клеток до специализированных нейронов.

НЕЙРОГЕНЕЗ В ЭМБРИОНАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

В эмбриогенезе развитие нервной системы или нейральная индукция начинаются на стадии гаструлы, когда нервная пластина складывается, образуя нервную трубку, из которой затем развиваются головной и спинной мозг. Источником различных типов клеток спинного мозга у позвоночных служат нейромезодермальные предшественники (neuromesodermal progenitors), расположенные в каудолатеральной области эпибласта (caudal lateral epiblast) [12–14]. Процесс нейральной индукции определятся градиентами нескольких морфогенных факторов вдоль рострально-каудальной (rostral-caudal; RC) и дорсально-вентральной (dorsal-ventral; DV) осей, что обеспечивает радиальную и продольную/тангенциальную миграцию клеток-предшественников. К основным морфогенам, отвечающим за паттерн формирования RC-оси, относят факторы сигнального пути Wnt, ретиноевую кислоту (retinoic acid; RA) и семейство факторов роста фибробластов (Fibroblast Growth Factors; FGF), тогда как в формировании паттерна DV-оси участвуют факторы сигнальных путей Wnt и SHH[1], а также семейство костных морфогенетических белков (bone morphogenetic proteins; BMP) (рис. 1*а*).

К основным каудализирующим морфогенам относятся белки семейств WNT, FGF, а также RA. WNT1 и FGF-8 продуцируются клетками на границе среднего и заднего мозга и необходимы для формирования идентичности среднего и заднего мозга посредством регуляции генов *OTX1* (кодируемый белок, homeobox protein OTX1, определяет границы переднего и среднего мозга) и *GBX2* (кодируемый белок, gastrulation brain homeobox 2, определяет границы заднего мозга) [15]. Принудительная активация пути Wnt малой молекулой CHIR99021 способствует формированию региональных нейрональных предшественников; при этом чем выше доза CHIR99021 (и активность соответственно WNT), тем большую каудальную идентичность приобретают клетки [16]. С помощью такого дозозависимого эффекта удалось по-

[1] Работы, рассматриваемые в обзоре, выполнены на разных видах животных – с видоспецифичным написанием генов-ортологов и кодируемых ими белков. С целью не загромождать текст соответствующими комментариями мы приводим названия генов и белков по базе GeneCards для генома человека.

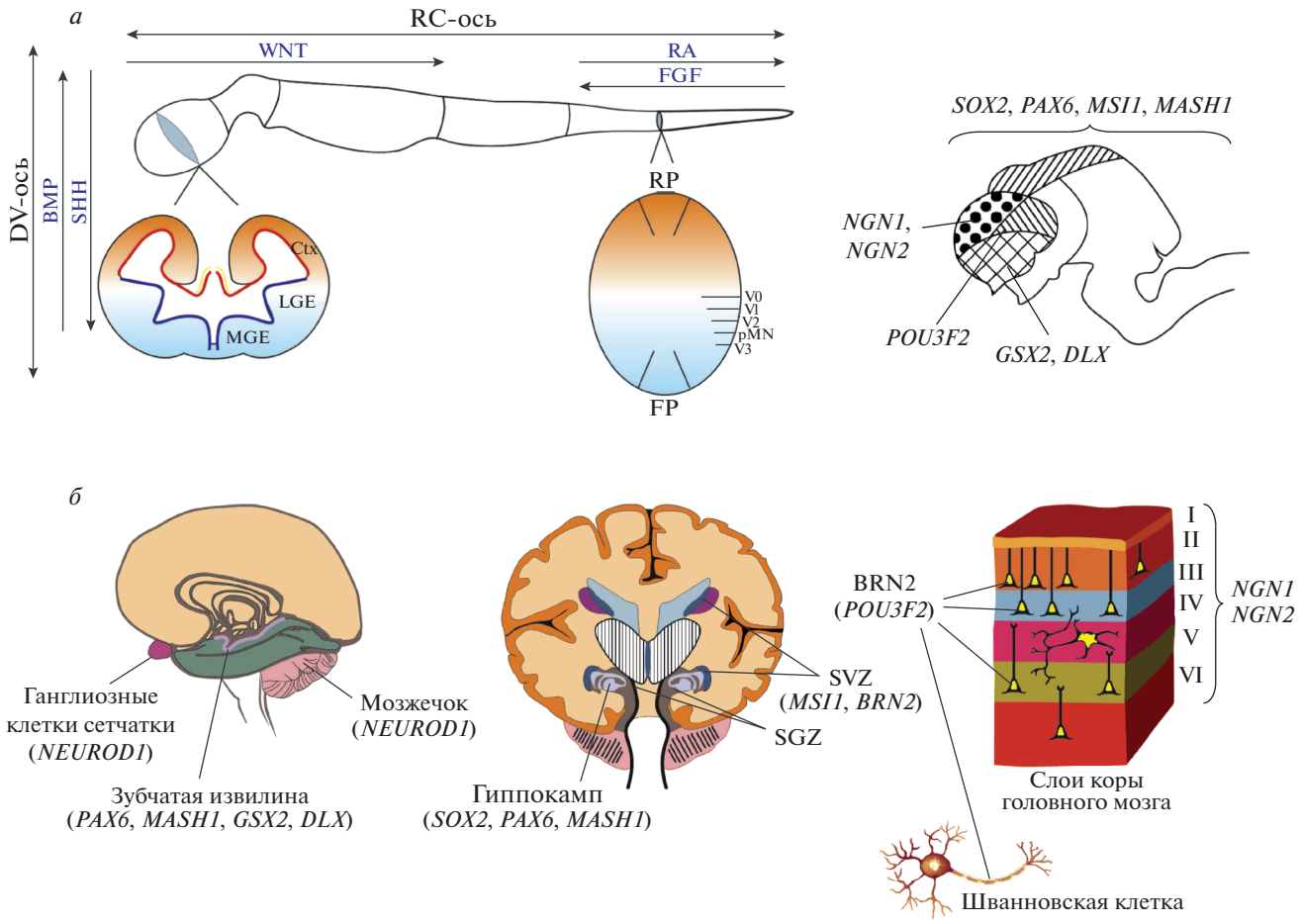

Рис. 1. Факторы нейрогенеза в эмбриональном и взрослом мозге человека. *а* – Основные морфогенные градиенты эмбрионального мозга на раннем этапе развития и зоны функционирования пронейральных транскрипционных факторов в эмбриональном мозге на стадии мозговых пузырей (справа). *б* – Области экспрессии и мишени пронейральных транскрипционных факторов во взрослом мозге. Продольный срез: зубчатая извилина, сетчатка и мозжечок; поперечный срез: гиппокамп, субгранулярная (SGZ) и субвентрикулярная/субэпендимальная (SVZ) зоны. На схеме слоя коры показано, что гены нейрогенина-1 и -2 (*NGN1* и *NGN2)* экспрессируются в пирамидных нейронах всех слоев коры взрослого головного мозга и звездчатых клетках IV слоя коры головного мозга, а ген белка BRN2 (*POU3F2*) экспрессируется в пирамидных нейронах II, III и V слоев коры взрослого головного мозга, а также в шванновских клетках. Обозначения: Ctx (cortex) – кора головного мозга; LGE (lateral ganglionic eminence) – латеральное ганглиозное возвышение; MGE (medial ganglionic eminence) – медиальное ганглиозное возвышение; RP (roof plate) – дорзальная часть хорды; FP (floor plate) – вентральная пластина; V0–V3 (ventral interneurons) – вентральные интернейроны; pMN (motoneuron progenitors) – прогениторы моторный нейронов.

лучить нейрональные предшественники, идентичные клеткам переднего, среднего, заднего мозга, а также переднего спинного мозга [16]. Точность дозозависимого влияния CHIR99021 на морфогенные свойства белков WNT настолько высока, что с помощью подбора концентрации этой молекулы можно получить предшественники, специфичные для очень близких областей, например вентрального среднего мозга и субталамического ядра [17]. RA функционирует в обратном, ростральном, направлении и ослабляет влияние сигнальных путей Wnt и FGF [18, 19]. На молекулярном уровне RA ингибирует экспрессию гена *FGF8*, тем самым препятствуя дальнейшему удлинению каудального отдела спинного мозга [20, 21].

Транскрипционные факторы семейства SHH продуцируются хордой и мезодермальной тканью под вентральным полюсом нервной трубки и за счет активации одноименного сигнального пути формируют основной вентральный паттерн, а транскипционные факторы семейства BMP, в частности BMP2, BMP4, BMP5, BMP7 и другие, секретируемые в дорсальной части хорды (roof plate), и WNT, напротив, определяют дорсальный паттерн [13, 22, 23]. Эти морфогены формируют антипараллельные градиенты сигналов, контролирующих работу транскрипционных факторов, экспрессия которых, в свою очередь, делит спинной мозг на 14 отдельных доменов в DV-направлении с различными типами клеток [24, 25]. Так,

градиент SHH за счет активации транскрипционных факторов семейств PAX (paired box), NKX (NK2 homeobox 1), DBX (developing brain homeobox protein) и IRX (iroquois homeobox protein) в вентральном отделе спинного мозга определяет формирование предшественников моторных нейронов и интернейронов (V0–V3), а также клеток вентральной пластины (floor platec cells). Напротив, клетки нервного гребня и предшественники интернейронов dI1–dI6 генерируются в дорсальной части нервной трубки под влиянием градиента BMP [26]. Эмбриональный конечный мозг включает в себя два основных региона: дорсальный (паллий) и вентральный (субпаллий). Передняя и боковая части дорсального конечного мозга образуют неокортекс и палеокортекс, задняя и медиальная области позже развиваются в гиппокамп (архикортекс), кортикальную кромку (один из основных источников клеток Кахаля–Ретциуса) и хороидное сплетение [27]. В вентральной части конечного мозга формируются латеральное, медиальное и хвостовое ганглиозные возвышения, которые участвуют в формировании базальных ганглиев, ГАМКергических интернейронов коры и рострального миграционного тракта [28–31]. Формирование этих доменов в эмбриональном мозге контролируется морфогенами WNT, BMP, SHH, FGF и PAX6. Экспрессия белков PAX6, WNT и BMP прежде всего определяет формирование дорсального конечного мозга [29, 32], а повышение уровня SHH – его вентральных отделов [33]. PAX6 относится к факторам транскрипции, экспрессия которых формирует границу между дорсальным и вентральным отделами мозга совместно с экспрессией гена *GSX2*, продукт которого, GSH2, локализуется в вентральной части конечного мозга [34]. Дорсальная граница экспрессии *GSX2* примыкает к вентральной границе паллиального домена PAX6 с узким перекрытием, а перекрестные репрессивные взаимодействия между *GSX2* и *PAX6* устанавливают паллиально-субпаллиальную границу [35–37].

СПЕЦИФИКАЦИЯ ТЕРМИНАЛЬНЫХ НЕЙРОННЫХ ПОДТИПОВ

Помимо морфогенов, определяющих RC- и DV-ориентацию, существует немало транскрипционных факторов, обеспечивающих специализацию формирующихся нейронов. Наиболее исследован этот процесс в регионе конечного мозга, так как именно из его дорсальной части формируется кора. Первичные кортикальные нейроны зарождаются из активно делящейся радиальной глии в более глубоком слое (слой VI) и лишь потом – в верхнем (слой I), а затем последовательно генерируются нейроны, находящиеся в слоях V, IV, III и II. Сначала активируются факторы FOXP2 (forkhead box protein P2) и CTIP2, ответственные за формирование нейронов в слоях V–VI, после чего появляются клетки, экспрессирующие POU3F3 (POU class 3 homeobox 3), CUX1/2 (Cut-like homeobox 1/2) и LHX2 (LIM homeobox 2) в слое IV, далее клетки, экспрессирующие LMO3 (LIM domain only protein 3) и TLE3 (transducin-like enhancer protein 3) в слое III, и, наконец, клетки, экспрессирующие PLXND1 (Plexin D1) в слое II [38]. Показано, что PAX6, NGN1 (Neurogenin 1) и NGN2 определяют образование глутаматергических нейронов и ингибируют астроглиальную дифференцировку [39–42]. PAX6 может активировать нейрогенез как через NGN-зависимый механизм и далее через активацию факторов нейрогенной дифференцировки NeuroD (neuronal differentiation), а также TBR1 и TBR2 (T-box brain protein 1/2) [39], так и через NGN-независимый механизм [32]. Активность NGN1 и NGN2 индуцируется WNT [42, 43]. Ганглиозные возвышения дают начало соматостатиновым ГАМКергическим и холинергическим интернейронам и нейропептид Y-иммунопозитивным (NPY) интернейронам [31, 44]. Один из основных индукторов ГАМКергическх нейронов – транскрипционный фактор ASCL1 (Achaete-scute homolog 1; ген *MASH1*) [40, 45–47]. ГАМКергические нейроны характеризуются экспрессией фактора LHX6 [48, 49], а холинергические – LHX8 или ISL1 [48, 50]. За специализацию нейронов в вентральном отделе конечного мозга также отвечают гены, кодирующие семейство транскрипционных факторов DLX (*Distal-less* homeobox) [51, 52], и сигнального пути SHH: GLI1, GLI2 и GLI3 [53, 54]. В формировании дофаминергических нейронов черной субстанции среднего мозга принимают участие факторы FGF2, FGF8 и WNT. Под их действием образуются тирозингидроксилаза-позитивные нейроны, экспрессирующие гены *PITX3* (pituitary homeobox 3) и *NR4A2* (кодирует белок NURR1; nuclear receptor related 1 protein) [55].

Таким образом, в результате пространственно-временной организации перечисленных факторов транскрипции – мастер-регуляторов – и запускаемых ими вторичных морфогенетических и специализирующих факторов в процессе нейрональной индукции образуется все многообразие нейронов и глиальных клеток в конечных структурах головного и спинного мозга. В этом обзоре мы не будем подробно останавливаться на факторах специализации терминальных нейрональных подтипов в контексте прямого репрограммирования, так как протоколы терминальной дифференцировки универсальны и не зависят от способа репрограммирования.

ОСОБЕННОСТИ НЕЙРОГЕНЕЗА ВО ВЗРОСЛОМ МОЗГЕ

Нейрогенез во взрослом мозге – это возникновение функционально активных нейронов *de novo* из клеток-предшественников (радиальная глия, НСК), происходящее на протяжении всей жизни в субвентрикулярной (SVZ) и субгранулярной (SGZ) зонах головного мозга [56, 57]. Нейрогенез, впервые обнаруженный у певчих птиц в 70-х годах прошлого века, затем был обнаружен в SVZ и SGZ мозга мелких млекопитающих, а чуть позже в тех же зонах мозга приматов и человека (см. обзоры [58, 59]). В последнее время появляются данные о нейрогенезе и в других областях мозга млекопитающих, таких как гипоталамус, нигростриарная система, миндалевидное тело и различные отделы коры, хотя пока рано утверждать, что там происходит именно нейрогенез, а не миграция клеток из SVZ и SGZ [57]. Основные функции нейрогенеза во взрослом мозге – регенерация ольфакторных клеток и образование новых нейронов и глиоцитов в структурах, осуществляющих функционирование памяти и других когнитивных процессов, поддержание нейрональной пластичности в целом [57–59]. В условиях патологии все процессы в нишах стволовых клеток мозга претерпевают существенные изменения. Так, активация нейрогенеза во взрослом мозге происходит в ответ на массовую гибель нейронов при инсультах, черепно-мозговых травмах, нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, эпилепсия и др. [57–59].

Нейральные стволовые/прогениторные клетки субэпендимальной и субгранулярной зон происходят из эмбриональных НСК, образующихся в процессе раннего нейрогенеза и затем находящихся в состоянии покоя вплоть до постнатального периода [60]. Постанатально эти клетки проходят несколько делений, прежде чем в SGZ дать начало клеткам радиальной глии (РГ) I типа или их аналогам – клеткам B1 в SVZ, которые формируют нишу стволовых клеток взрослого мозга. Принято считать, что НСК в SVZ и SGZ взрослого мозга облигатно экспрессируют GFAP (glial fibrillary acidic protein) и нестин и опционально SOX2 (sex determining region Y (SRY)-box 2) или SHH, – что свидетельствует о гетерогенности их популяции [61].

В SVZ клетки РГ I типа подвергаются ассиметричному делению, в результате которого образуются прогениторные клетки II типа, имеющие астроглиальный фенотип (2a), а также промежуточные нейрональные прогениторы (клетки 2b), дающие начало молодым нейронам [62]. Проглиальные клетки 2a характеризуются экспрессией SHH, WNT, инсулинподобного фактора роста 1 (IGF-1), FGF-2, SOX2 и ядерного белка TLX (T Cell Leukemia Homeobox) [61]. Активность путей SHH, WNT, IGF-1 и FGF-2 необходима для дифференцировки и созревания клеток II типа, а локальные изменения концентрации IGF-1 определяют направление миграции [63]. Эти клетки также экспрессируют рецепторы ГАМК и реагируют на наличие ГАМК в окружающей среде [62]. Кроме ГАМК пролиферацию и созревание клеток II типа также регулируют дофамин и серотонин, о чем свидетельствует экспрессия в них генов дофаминовых (D2/D3) и серотониновых (5-HT) рецепторов [64, 65]. Пронейрональные клетки 2b, помимо общих для всех клеток II типа факторов, экспрессируют гены *DCX* (Doublecortin), *NT3* (neurotrophin-3), *TBR2*, *MASH1*, *NEUROD1* и *PROX1* (prospero homeobox protein 1) [61]. Клетки 2b в дальнейшем дифференцируются в клетки III типа (нейробласты и преддеференцированные нейроны). Раннюю стадию формирования этих клеток называют фазой постмитотического созревания [62]. В этом процессе клетки III типа меняют свою пространственную ориентацию на более вертикальную в толще SGZ и приобретают полярную форму, выпуская дендриты в зубчатый молекулярный слой и аксоны, уходящие к слою пирамидных клеток в области CA3 [66]. Далее эти клетки созревают, формируя дендритные шипики и удлиняя аксоны в зону CA2 [61]. В молодых клетках III типа продолжается экспрессия пронейрональных генов, активных в клетках I и II типа (*DCX*, *WNT*, *NOTCH*, *GABA*, *NEUROD1* и *PROX1*) [67], которую затем заменяет экспрессия генов зрелых нейронов, таких как *BDNF* (кодирует нейротрофический фактор головного мозга), *RELIN* (рилин), *CREB* (cAMP response element-binding protein), *RBFOX3* (RNA binding FOX-1 homolog 3), *CALB2* (кальретинин), *AP1* (activating protein 1) [67]. Релин представляет собой гликопротеин внеклеточного матрикса, регулирующий процессы миграции, позиционирования нейронов и формирование дендритных шипиков [68]. Фосфорилирование CREB активирует транскрипцию генов других ключевых молекул, таких как c-FOS, JUN-B, BCL-2, GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor), и различных нейротрофинов для регулирования выживания и регенерации нейронов [69]. Сигнальный каскад Wnt активирует AP-1, который представляет собой гетеродимер, состоящий из субъединиц c-FOS и c-JUN, и влияет на пролиферацию, дифференцицировку и апоптоз нейронов [70].

SVZ боковых желудочков, или субэпендимальная зона, содержит большое количество НСК, называемых клетками РГ типа B1, которые морфологически напоминают взрослые радиальные астроциты, экспрессируют гены *GFAP*, транспортеров глутамата и аспартата, липидсвязывающего белка мозга и контактируют своими отростками с капиллярами [57, 71, 72]. Активированные клетки

B1 экспрессируют нестин и ассиметрично делятся с образованием клеток B2, также имеющих астроглиальный фенотип и взаимодействующих с капиллярами, но не контактирующих с апикальной поверхностью эпендимы, а также с образованием транзиторно амплифицирующихся промежуточных клеток типа C, экспрессирующих маркеры ASCL1 и DLX. Клетки типа C несколько раз ассиметрично делятся и формируют пул клеток типа A (нейроболастов), которые затем мигрируют по ростральному миграционному пути в обонятельные луковицы [57, 71, 73]. Для клеток типа A характерна экспрессия DCX, CRMP-4 (collapsin-response mediator protein 4), PSA-NCAM (prostate-specific antigen–neural cell adhesion molecule), ганглиозида 9-O-ацетил-GD3 и других белков клеточной адгезии и интегринов, которые обеспечивают эффективную миграцию клеток к обонятельным луковицам, регулируемую такими факторами, как TN-C (тенасцин-C) и PK2 (прокинетицин-2) [57].

Нейрогенез во взрослом мозге обычно рассматривается как ограниченное и упрощенное продолжение эмбрионального нейрогенеза [13]. Сходство эмбрионального и взрослого нейрогенеза, в частности, заключается в том, что и в эмбриональном, и во взрослом мозге нейроны происходят от клеток РГ [74]. Однако во взрослом и эмбриональном нейрогенезе есть и принципиальные различия, заключающиеся как в особенностях окружения, так и в ключевых молекулярных механизмах. Так, анализ транскриптома показал, что эмбриональные клетки РГ наиболее близки к нейробластам и транзиторно амплифицирующимся прогениторным клеткам (ТАП-клетки), в то время как паттерн экспрессии клеток РГ во взрослом мозге более соответствует дифференцированным астроцитам и эпендимальным клеткам [9]. Последние играют важную роль в формировании ниши стволовых клеток в субэпендимальном пространстве и SGZ взрослого мозга [75] и отсутствуют в окружении НСК раннего эмбрионального мозга [76]. Эта особенность микроокружения, вероятно, приводит к тому, что эмбриональные НСК дифференцируются преимущественно в нейрональном направлении, а взрослые НСК предпочтительно осуществляют глиогенез [9].

В экспериментах с трансплантацией показано, что культивированные эмбриональные и взрослые НСК, которые *in vitro* легко дифференцируются в нейроны, при пересадке в паренхиму головного мозга взрослого животного меняют направление дифференцировки в сторону глиогенеза [13]. Интересно, что только в зубчатой извилине гиппокампа трансплантированные клетки могут продуцировать нейроны, хотя и там взрослые НСК окружены глиальными клетками, отсутствующими на эмбриональных стадиях, такими как зрелые олигодендроциты, NG2-глия и астроциты [13]. Это связывают с наличием специализированных механизмов подавления глиогенеза за счет активации сигнального пути BMP [13, 77]. Кроме того, обнаружено, что трансплантация нейрогенно активных клеток в зоны ЦНС, где у взрослого организма отсутствует естественный нейрогенез, приводит к нарушению дифференцировки трансплантированных клеток, в результате чего они либо сохраняют стволовость, либо дифференцируются в глию [78]. К этому же выводу пришли исследователи, показавшие резкое снижение экспрессии пронейрогенных факторов транскрипции, таких как PAX6, ASCL1 и NGN2, после трансплантации *in vivo* при высокой их активности *in vitro* [79, 80].

Интересно, что эмбриональная радиальная глия изначально обладает повышенным уровнем экспрессии нейрогенных факторов транскрипции по сравнению с глией во взрослом мозге [9]. НСК во взрослом мозге способны к нейрогенезу только через промежуточные формы и без дополнительной транскрипционной поддержки на последующих стадиях могут сменить направление на глиогенез [81]. Показано, что факторы, регулирующие нейрогенез на ранних этапах развития, такие как PAX6, GSX2, DLX, ASCL1, NGN2 и NEUROD1, также участвуют в регуляции взрослого нейрогенеза [9, 82]. Важное отличие состоит в том, что эмбриональная радиальная глия изначально склонна к прямой нейрональной дифференцировке, в то время как для взрослых НСК необходима серия промежуточных делений для наработки необходимого уровня пронейрональных транскрипционных факторов [81, 83–85].

Еще одно существенное отличие взрослого нейрогенеза от эмбрионального связано с особенностями регулирования клеточного цикла. Так, в эмбриональном периоде клеточный цикл НСК длится от 10 до 18 ч, что связано с необходимостью в короткий срок сформировать достаточно большой объем нервной ткани, в то время как во взрослом мозге клеточный цикл радиальных глиальных клеток в зубчатой извилине, SVZ и SGZ длится от нескольких суток до двух недель [86–88].

На основании вышеприведенных сведений можно прийти к заключению, что взрослые НСК – это особый, выделенный на ранних этапах развития, пул клеток, имеющий свои функции и механизмы регуляции пролиферации и дифференцировки. Ключевой особенностью НСК в нише стволовых клеток взрослого мозга является преимущественная склонность к глиогенезу, а не к нейрональной дифференцировке [13, 89]. Эту склонность и “глиогенность” микроокружения взрослого мозга необходимо учитывать при разработке всех нейрорегенеративных технологий, включающих нейрональную дифференцировку.

ПРОНЕЙРОНАЛЬНЫЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ В РЕПРОГРАММИРОВАНИИ

В отличие от технологии iPSC, при применении которой получают плюрипотентные клетки, аналогичные эмбриональным стволовым клеткам (ЭСК), при прямом репрограммировании могут быть получены как прогениторные клетки, так и нейробласты и нейроны той или иной степени зрелости [2, 90, 91]. На основании современных представлений об эмбриональном и взрослом нейрогенезе мы составили онтогенетический ряд клеток ЦНС – от плюрипотентной ЭСК до специализированных нейронов – и попытались систематизировать опубликованные в литературе протоколы репрограммирования с точки зрения соответствия получаемых в результате клеток тем или иным позициям в онтогенетическом ряду (рис. 2, табл. 1).

Среди факторов транскрипции, играющих определяющую роль в эмбриональном и взрослом нейрогенезе, при нейрональном репрограммировании применяют такие мастер-регуляторы, как SOX2 [142] и PAX6 [43]. Последний, в свою очередь, регулирует экспрессию гена *NEUROG2*, продукт которого, белок NGN2, принимает активное участие в регулировании пролиферации НСК [143]. В дополнение к экспрессии SOX2, PAX6 и NGN2, еще одно общее условие для успешного нейронального репрограммирования – подавление функции репрессора транскрипции REST (RE1-silencing transcription factor), также известного как фактор рестриктивного подавления нейронов (neuron-restrictive silencer factor; NRSF). Продукт гена *REST* подавляет экспрессию

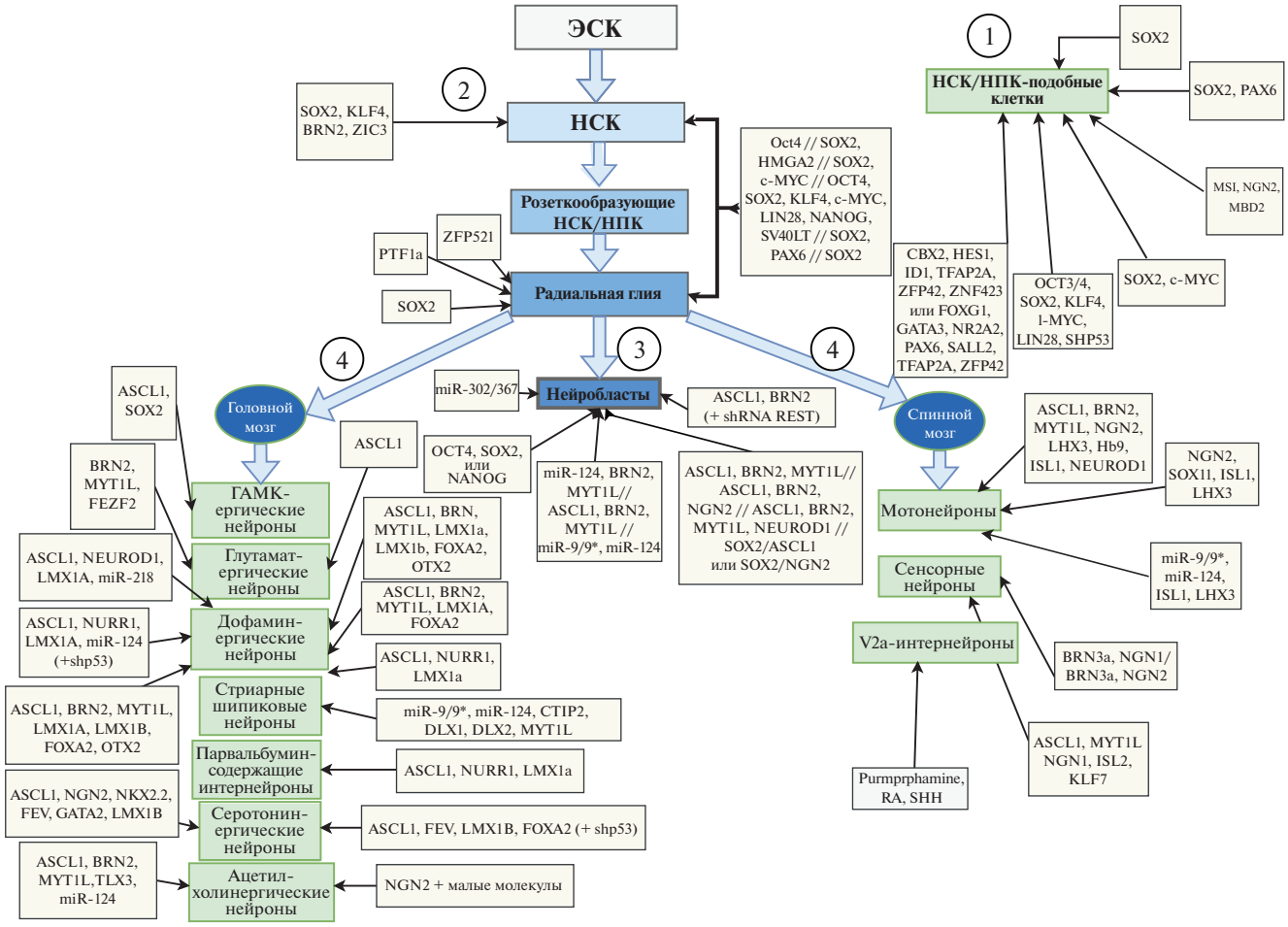

Рис. 2. Онтогенетический ряд клеток, от плюрипотентной ЭСК до специализированных нейронов, и протоколы прямого репрограммирования. Стрелками показано соответствие полученных в результате репрограммирования конечных типов клеток тем или иным позициям в онтогенетическом ряду. Указаны протоколы, приводящие к получению смешанной/гетерогенной популяции НСК, НПК, ТАП-клеток, нейробластов (1); охарактеризованных НПК (2); преддифференцированных нейронов (3); терминально дифференцированных нейронов головного и спинного мозга (4). Обозначения: ЭСК – эмбриональная стволовая клетка; ТАП – транзиторно амплифицирующиеся предшественники; НПК – нейральные прогениторные клетки; НСК – нейральные стволовые клентки.

Таблица 1. Перечень протоколов прямого репрограммирования к рисунку 2

Целевой тип клеток	Факторы репрограммирования	Литературный источник
НСК	SOX2, KLF4, BRN2, ZIC3	Thier M.C. et al. [92]
	OCT4	Zhu S. et al. (2014) [93]
	SOX2, HMGA2	Yu K.R. et al. (2015) [94]
	SOX2, c-MYC	Sheng C. et al. (2018) [95]
	OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, LIN28, NANOG, SV40LT	Cheng L. et al. (2017) [96]
	SOX2, PAX6	Connor B. et al. (2018) [97]
	SOX2	Kim B.E. et al. (2018) [98]
НСК/НПК-подобные клетки	CBX2, HES1, ID1, TFAP2A, ZFP42, ZNF423 или FOXG1, GATA3, NR2A2, PAX6, SALL2, TFAP2A, ZFP42	Hou P.S. et al. (2017) [99]
	OCT3/4, SOX2, KLF4, l-MYC, LIN28, shp53	Capetian P. et al. (2016) [100]
	SOX2, c-MYC	Giorgetti A. et al. (2012) [101]
	SOX2, c-MYC	Castaño J. et al. (2016) [102]
	MSI, NGN2, MBD2	Ahlfors J.-E. et al. (2019) [2]
	SOX2, PAX6	Maucksch C. et al. (2012) [103]
	SOX2	Ring K.L. et al. (2012) [104]
Радиальная глия	ZFP521	Shahbazi E. et al. (2016) [105]
	PTF1a	Xiao D. et al. (2018) [106]
	SOX2	Mirakhori F. et al. (2015) [107]
Нейробласты	miR-302/367	Ghasemi-Kasman M. et al. (2015) [108]
	OCT4, SOX2 или NANOG	Corti S. et al. (2012) [109]
	miR-124, BRN2, MYT1L	Yoo A.S. et al. (2011) [110]
	miR-124, BRN2, MYT1L	Ambasudhan, R. et al. (2011) [111]
	miR-124, ASCL1, BRN2, MYT1L	Lau S. et al. (2014) [112]
	miR-9/9*, miR-124	Huh C.J. et al. (2016) [113]
	ASCL1, BRN2, MYT1L	Torper O. et al. (2013) [79]
	ASCL1, BRN2, MYT1L	Pereira M. et al. (2014) [114]
	ASCL1, BRN2, MYT1L	Vierbuchen T. et al. (2010) [115]
	ASCL1, BRN2, NGN2	Meng F. et al. (2012) [116]
	ASCL1, BRN2, NGN2	Mertens J. et al. (2015) [117]
	ASCL1, BRN2, MYT1L, NEUROD1	Pang Z.P. et al. (2011) [118]
	ASCL1, BRN2, MYT1L, NEUROD1	Matsuda T. et al. (2019) [119]
	SOX2/ASCL1 или SOX2/NGN2	Araújo J. et al. (2018) [120]
	ASCL1, BRN2 (+ shRNA REST)	Drouin-Ouellet J. et al. (2017) [121]
ГАМКергические нейроны	ASCL1, SOX2	Karow M. et al. (2012) [122]
Глутаматергические нейроны	BRN2, MYT1L, FEZF2	Miskinyte G. et al. (2017) [123]
	ASCL1	Chanda S. et al. (2014) [124]

Таблица 1. Окончание

Целевой тип клеток	Факторы репрограммирования	Литературный источник
Дофаминергические нейроны	ASCL1, NEUROD1, LMX1A, miR-218	Rivetti di Val Cervo et al. (2017) [125]
	ASCL1, NURR1, LMX1A, miR-124 (+shp53)	Jiang H. et al. (2015) [126]
	ASCL1, BRN2, MYT1L, LMX1A, LMX1B, FOXA2, OTX2	Pereira M. et al. (2014) [114]
	ASCL1, BRN2, MYT1L, LMX1A, LMX1B, FOXA2, OTX2	Torper O. et al. (2013) [79]
	ASCL1, BRN2, MYT1L, LMX1A, FOXA2	Pfisterer U. et al. (2011) [127]
	ASCL1, NURR1, LMX1a	Caiazzo M. et al. (2011) [128]
Стриатарные шипиковые нейроны	miR-9/9*, miR-124, CTIP2, DLX1, DLX2, MYT1L	Victor M.B. et al. (2014) [129]
Парвальбуминсодержащие интернейроны	ASCL1, NURR1, LMX1a	Pereira M. et al. (2017) [130]
Серотонинергические нейроны	ASCL1, NGN2, NKX2.2, FEV, GATA2, LMX1B	Vadodaria K.C. et al. (2016) [131]
	ASCL1, FEV, LMX1B, FOXA2 (+ shp53)	Xu Z. et al. (2016) [132]
Ацетилхолинергические нейроны	ASCL1, BRN2, MYT1L, TLX3, miR-124	Liang X.G. et al. (2018) [133]
	NGN2 + малые молекулы	Liu M.L. et al. (2013) [134]
Мотонейроны	ASCL1, BRN2, MYT1L, NGN2, LHX3, Hb9, ISL1, NEUROD1	Son E.Y. et al. (2011) [135]
	NGN2, SOX11, ISL1, LHX3	Liu M.L. et al. (2016) [136]
	miR-9/9*, miR-124, ISL1, LHX3	Abernathy D.G. et al. (2017) [137]
	NGN2, SOX11, ISL1, LHX3	Tang Y. et al. (2017) [138]
Сенсорные нейроны	BRN3a, NGN1 или BRN3a, NGN2	Blanchard J.W. et al. (2015) [139]
	ASCL1, MYT1L, NGN1, ISL2, KLF7	Wainger B.J. et al. (2015) [140]
V2a-интернейроны	Purmprphamine, RA, SHH	Brown C.R. et al. (2014) [141]

нейронспецифичных генов путем привлечения других корепрессоров: mSin3A/B [144], N-CoR, CtBP [145] или CoREST, – блокируя промоторы кодирующих и некодирующих генов-мишеней [43]. Будучи негативным мастер-регулятором нейрогенеза, REST играет фундаментальную роль как для поддержания покоящегося пула НСК, так и в постмитотических нейронах, где он регулирует экспрессию генов, важных для синаптической пластичности. REST активен во всех ненейрональных клетках и тканях, где он также подавляет экспрессию нейронспецифичных генов. Именно поэтому без инактивации этого супрессора провести пронейрональное репрограммирование соматических клеток невозможно [144].

Кроме упомянутых выше мастер-факторов, таких как SOX2 и PAX6, есть еще немало подконтрольных им генов или кофакторов, участвующих в нейрогенезе и относящихся к потенциальным факторам репрограммирования. В результате проведенного анализа литературы выявлено, что в различных методиках прямого репрограммирования применяют и такие факторы, как MSI1 (Musashi RNA binding protein 1), ASCL1, BRN2, нейрогенины, NEUROD1, MYT1L (myelin transcription factor 1 like), GSX2, DLX, а также микроРНК и малые молекулы. Рассмотрим перечисленные факторы более подробно.

Фактор транскрипции SOX2

SOX2 (SRY-box 2) – многофункциональный транскрипционный мастер-фактор, участвующий в поддержании пролиферации, плюрипотентности стволовых клеток, развитии нервной системы и во многих других процессах в организме [146, 147]. В некоторых исследованиях показано, что уровень экспрессии гена *SOX2* в ЭСК жестко регулируется, а небольшие изменения в нем приводят к значительным колебаниям направления дифференцировки, так как SOX2, в противовес OCT4, активно участвует в процессе мезенхимально-эпителиального перехода [148,

149]. SOX2 также предотвращает выход клеток из клеточного цикла и дифференцировку НСК [150, 151]. Показано, что нокаут *SOX2* значительно снижает активность пролиферации клеток I типа в SGZ. Интересно, что некоторые нейроны и клетки глии сохраняют высокую экспрессию *SOX2*, что необходимо для их функционирования [152]. SOX2 непосредственно регулирует экспрессию пути SHH и одновременно подавляет экспрессию *NEUROD1* и *WNT* – чтобы поддерживать способность НСК к самообновлению [153]. Более того, SOX2 контролирует экспрессию ядерного рецептора TLX, который, в свою очередь, поддерживает пролиферацию и самообновление взрослых НСК [43].

Bergsland и соавт. [154] обнаружили, что белки SOX2 запускают в клетках генетическую программу нейрального профиля, активируя нейрональные энхансеры и пронейрональные гены. В частности, с экспрессией SOX2 была связана активация генов *SOX1*, *SOX3*, *OLIG2* (oligodendrocyte transcription factor 2), *NCAM* (neural cell adhesion molecule), *PAX6* и др. Таким образом, последовательная координация дифференцировки нейронов из стволовых клеток может быть инициирована экспрессией *SOX2*, что подтверждает его роль в качестве мастер-гена.

В эмбриональном нейрогенезе SOX2 экспрессируется в развивающихся клетках нервной трубки и пролиферирующих предшественниках нервных клеток. Помимо того, что SOX2 входит в состав хорошо известного “коктейля Яманаки”, необходимого для генерации iPSC [1], его активно применяют в drNPCs. Так, в определенных условиях культивирования экспрессия *SOX2* индуцировала трансформацию фибробластов мыши и человека в НСК [104, 155]. Показано, что SOX2 относится к тем немногим транскрипционным факторам, индукция которых необходима и достаточна для прямого репрограммирования мышиных астроцитов [156, 157]. Фактически к тем же результатам пришла еще одна группа исследователей [104], преобразовав корковую NG2-глию в нейроны с помощью ретровирусного вектора с геном *SOX2*. А Ring и соавт. [104] показали, что эктопической экспрессия *SOX2* достаточно для репрограммирования не только мышиных, но и человеческих эмбриональных фибробластов в НСК. По-видимому, SOX2, будучи первичным фактором транскрипции, способен взаимодействовать с локально нераскрученными участками ДНК [104, 158]. Выяснилось, что SOX2 стимулирует пронейрональную индукцию через взаимодействие с другим первичным фактором – ASCL1, а также с PAX6 и NR2E1 (nuclear receptor subfamily 2 group E member 1) [159, 160]. Так, Karow и соавт. [161] успешно репрограммировали клетки первичной культуры перицитов человека в индуцированные нейроны с помощью факторов SOX2 и ASCL1. Lujan и соавт. [162] показали, что лентивирусной трансдукиции факторов SOX2, BRN2 и FOXG1 (Forkhead box protein G1) достаточно для превращения эмбриональных фибробластов мыши в индуцированные нейральные клетки-предшественники с потенциалом дальнейшей дифференцировки в нейроны, астроциты и олигодендроциты. Интересно, что комбинация SOX2 и FOXG1 привела к образованию индуцированных нейронных клеток-предшественников, которые дали начало астроцитам и функциональным нейронам. Факторы транскрипции FOXG1 и BRN2 по-отдельности также генерировали клетки-предшественники нейронов, но образующиеся нейроны оказались менее зрелыми, чем под действием SOX2.

Другая группа исследователей для получения НПК из фибробластов взрослой мыши использовала комбинацию пяти транскрипционных факторов: SOX2, BRN2, TLX, c-MYC и BMI1 (B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog) [163]. Полученные клетки обладали свойствами, аналогичными первичным НПК, включая уровень пролиферации, самообновления и эффективность дифференцировки. Han и соавт. [164] исследовали возможность прямого репрограммирования мышиных фибробластов в нейрональные клетки и показали, что сочетание основных факторов: SOX2, c-MYC и KLF4 (Kruppel like factor 4) – и двух дополнительных: BRN4 и E47 – приводило к успешному репрограммированию. Однако у полученных НПК была нарушена дифференцировка в олигодендроциты. Наконец, Maucksch и др. [103] показали, что комбинированная эктопическая экспрессия *SOX2* и *PAX6* с использованием невирусной доставки индуцирует преобразование фибробластов взрослого человека в клетки-предшественники нейронов. В результате были получены НПК, экспрессирующие маркеры нейральных предшественников и дифференцирующиеся в функциональные нейроны и астроциты, но не олигодендроциты.

Фактор транскрипции PAX6

PAX6 (белок аниридии II) – тканеспецифичный фактор транскрипции, один из координирующих генов при развитии глаз и нервной системы в эмбриональном периоде. Ген *PAX6* экспрессируется в НСК и на начальных периодах эмбрионального нейрогенеза, формируя мультипотентный потенциал клеток. В процессе дифференцировки и созревания экспрессию *PAX6* ингибируют некоторые микроРНК, в частности miR-7a [165, 166], так как непрерывная экспрессия *PAX6* блокирует дифференцировку [167]. Однако во взрослом нейрогенезе этот регуляторный механизм функционирует иначе, обеспечивая повышенную экс-

прессию в НПК и ограничивая ее в НСК с помощью той же miR-7a [166].

В развивающемся мозге PAX6 выполняет множество функций: регуляцию клеточного цикла, нейрогенеза и глиогенеза, формирование пространственно-временных паттернов и даже запуск генерации специализированных подтипов нейронов при взаимодействии с NGN2 [167, 168]. PAX6 запускает экспрессию генов, необходимых для пролиферации и пронейрональной дифференцировки: *HMGA2* (high mobility group AT-hook 2), *CDK4* (cyclin-dependent kinase 4), *GADD45G* (growth arrest and DNA damage inducible gamma), *NEUROD1, SSTR2* (somatostatin receptor *2*) и *HES6* (HES family BHLH transcription factor 6) [152]. Кроме того, PAX6 регулирует экспрессию гена *NEUROG2*, продукт которого, белок NGN2, принимает активное участие в регуляции пролиферации и дифференцировки НСК [153].

Интересно, что ряд аналогичных механизмов запускается и во взрослом мозге млекопитающих в ответ на травматическую гибель нейронов *in vivo* [80, 169]. Показано, что во взрослом мозге млекопитающих PAX6 функционирует только вместе с содержащим BRG1 (Brahma-related gene-1) комплексом BAF семейства факторов ремоделирования хроматина SWI/SNF [81]. По-видимому, это обусловлено способностью PAX6 связываться только со свободной ДНК, которая превалирует в эмбриональном периоде, но отсутствует во взрослом мозге. PAX6 и BRG1-содержащий BAF-комплекс образуют гетеродимер и активируют регуляторную сеть из трех нейрогенных факторов: BRN2, SOX4/11 и NFIA/B (nuclear factor 1 A/B-type) [81]. Стоит отметить, что в эмбриональном мозге эти механизмы не задействованы, поскольку в нем, как уже отмечалось, превалирует свободный хроматин и нейрогенез происходит в нейрогенной среде, не требующей дополнительной пронейрональной поддержки [169, 170]. Таким образом, по-видимому, только во взрослом мозге активация PAX6 связана с массивным ремоделированием хроматина для активации нижележащей регуляторной сети.

Примеров прямого репрограммирования с помощью PAX6 не так много, как хотелось бы, но нескольким группам исследователей удалось получить функциональные нейроны из глиальных клеток (астроцитов и предшественников олигодендроцитов) с помощью принудительной экспрессии этого фактора [81, 171, 172] (рис. 2).

Фактор транскрипции MSI1

MSI1 (RNA-binding protein Musashi homolog 1) связывает РНК двумя консервативными тандемными мотивами. Этот белок постоянно экспрессируется в НСК/клетках-предшественниках – от эмбриональной [173] до взрослой стадии [174]. Он необходим для поддержания стволовых свойств НСК, вероятно, путем усиления передачи сигналов NOTCH через репрессию трансляции мРНК m-NUMB [175]. Мутация в гене *MSI1* приводит к развитию аутосомно-рецессивной первичной микроцефалии. В мозге взрослого млекопитающего MSI1 присутствует в эпендимальных клетках, субэпендимальных клетках и астроцитах, в нишах стволовых клеток, но не в микроглии, олигодендроцитах или зрелых нейронах [173, 174]. Показано, что кластеробразующие пролиферирующие клетки в SVZ после острой или хронической ишемии, очаговой ишемии переднего мозга экспрессируют ген *MSI1*, но не экспрессируют *GFAP* [176].

Ввиду того, что экспрессия гена *MSI1* характерна только для НСК, его использование в качестве фактора прямого репрограммирования довольно ограничено, хотя есть работы, в которых *MSI1* был включен в состав репрограммирующих коктейлей [2]. Используя первичные транскрипционные факторы MSI1 и NGN2 и вторичный BRN2, авторы получили из мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток человека жизнеспособные функциональные НСК, позитивные на основные маркеры: SOX2, NESTIN, β-III-TUBULIN и GFAP – и дифференцирующиеся в нейроны, астроциты и олигодендроциты [2].

Фактор транскрипции ASCL1

ASCL1 (продукт гена *MASH1*) входит в семейство bHLH (“спираль-петля-спираль”). Для успешного связывания ASCL1 с ДНК необходима димеризация с другими белками bHLH. ASCL1 играет ключевую роль в дифференцировке нейронов и индукции обонятельных и вегетативных нейронов [157, 177]. Очень интересны различия в функциях ASCL1 между эмбриональным нейрогенезом и нейрогенезом во взрослом мозге. Так, сниженная активность ASCL1 в эмбриональный период не приводит к каким-либо серьезным последствиям, но ингибирование ASCL1 в клетках зубчатой извилины взрослого мозга практически полностью останавливает нейрогенез [178]. Эктопическая экспрессия *MASH1* достаточна для стимулирования нейрональной дифференцировки эмбриональных стволовых клеток, НСК и ранней постнатальной астроглии [124]. Как и SOX2, ASCL1 – первичный фактор транскрипции, так что изначально не нуждается в дополнительных кофакторах [179, 180], однако репрограммирование одним ASCL1 оказалось эффективным только для соматических клеток мыши, но не человека [161]. Для прямого репрограммирования соматических клеток человека необходимы как минимум два фактора транскрипции, например SOX2 и ASCL1 [161]. Однако результаты, полученные группой исследователей под руковод-

ством M. Werning [124], ставят под сомнение этот факт – им удалось получить TUJ1- и MAP2-положительные индуцированные нейроны из эмбриональных и постнатальных фибробластов с помощью одного только фактора ASCL1, правда, с гораздо меньшей эффективностью, чем из мышиных клеток. На этом основании авторы сделали вывод, что ASCL1 относится к необходимым и достаточным факторам для прямого пронейронального репрограммирования. В дальнейших экспериментах с использованием технологии РНК-секвенирования в режиме "single cell" они показали [181], что сверхэкспрессия пронейронального первичного фактора ASCL1 приводит к четко определенной инициализации, заставляя клетки выходить из клеточного цикла и перефокусировать экспрессию генов в пронейрональном направлении посредством активации генов нижележащего сигнального каскада. Поначалу первичный генный ответ достаточно однороден, однако дальнейшее проявление конкурирующей миогенной программы ограничивает эффективность репрограммирования. Интересно, что фактор FOXO3 (forkhead box O3), который играет важную роль в негативном контроле нейрогенеза в эмбриональном и постнатальном развитии мозга, также имеет общие гены-мишени с ASCL1 и ингибирует ASCL1-зависимый нейрогенез [182, 183]. Так, успешно проведено прямое репрограммирование мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток пуповины в функциональные нейроны коктейлем из трех факторов транскрипции: ASCL1, SOX2 и NGN2 [120]. В сочетании с Brn2/BRN2 и Myt1L/MYT1L или с Lmx1a/LMX1A и Nurr1/NURR1 (nuclear receptor related 1 protein) Ascl1/ASCL1 индуцировал нейрональную конверсию фибробластов мыши и человека в культуре [115, 128, 179]. Получившиеся клетки были названы индуцированными нейрональными клетками. Эти две комбинации трех транскрипционных факторов также напрямую превращали астроциты и NG2-глию в нейроны в полосатом теле взрослой мыши, хотя эти нейроны не были DARPP32 (dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein)-положительными нейронами стриатальной проекции или дофаминергическими нейронами [184]. Очень похожий коктейль факторов использовала и группа M. Werning [3] для получения функциональных индуцированных нейронов из клеток крови человека. Это сочетание факторов BRN2, ASCL1, MYT1L и NGN2 (BAMN). Ими же продемонстрирована возможность преобразования функциональных гепатоцитов мыши в индуцированные нейроны с помощью факторов Brn2 (BRN2), Ascl1 (ASCL1) и Myt1L (MYT1L) [185]. Хотя одного Ascl1 (ASCL1) достаточно для генерации индуцированных нейронов, экзогенный Myt1L (MYT1L) значительно повышал эффективность перепрограммирования и функциональное созревание полученных клеток [186]. Некоторые научные группы сообщали, что явная нейральная индукция с помощью ASCL1 наблюдалась только тогда, когда трансдукцию проводили с помощью аденовирусного вектора [80, 187]; при использовании аналогичной конструкции с лентивирусным или ретровирусным вектором ASCL1 стимулировал глиогенез [187].

Фактор транскрипции BRN2

BRN2 (продукт гена *POU3F2*) относится к классу нейрональных транскрипционных факторов POU-III, экспрессируется в клетках-предшественниках SVZ, играя важную роль во взрослом нейрогенезе, а также в постмитотических пирамидных нейронах II, III и V кортикальных слоев [188, 189]. BRN2 связывается с последовательностью распознавания, которая состоит из двух отдельных субдоменов: GCAT и TAAT, – разделенных неконсервативной спейсерной областью из 0, 2 или 3 нуклеотидов [190]. BRN2 совместно с другими факторами транскрипции регулирует ряд генов нейрогенеза, таких как *Delta1*, который кодирует лиганд NOTCH [191]. Он участвует в развитии неокортекса у мышей и ассоциирован с единичным нуклеотидным полиморфизмом rs1906252, который определяет когнитивный фенотип – скорость обработки информации [192]. Также показано, что BRN2 совместно с BRN1 регулируют радиальную миграцию постмитотических нейронов, а их потеря приводит к ламинарной инверсии коры головного мозга [193]. Кроме того, BRN1/2 необходимы для миграции клеток V слоя и для фактического производства клеток слоев II–IV [194], однако механизмы, осуществляющие этот процесс, пока неясны. Помимо пронейрональной дифферецнировки BRN2 играет важную роль в развитии шванновских клеток [195]. Роль BRN2 в нейрогенезе подтверждается тем, что для перепрограммирования фибробластов в нейроны *in vitro* его можно использовать в сочетании с экспрессией *MASH1* и *MYT1L* [115, 179, 184]. Несмотря на решающую роль BRN2 в нейрогенезе, его гены-мишени и способ действия остаются плохо изученными. В связи с тем, что BRN2 не относится к первичным транскрипционным факторам, он не способен самостоятельно репрограммировать соматические клетки – для взаимодействия с ДНК ему необходим "проводник" [179].

Нейрогенины

Семейство нейрогенинов, как и ASCL1, относится к факторам транскрипции, содержащим структурный мотив bHLH. В семейство входят 3 фактора: нейрогенин-1 (NGN1), нейрогенин-2 (NGN2) и нейрогенин-3 (NGN3). Из них только первые два участвуют в развитии нервной системы. NGN1 присутствует в коре головного мозга и

выступает в качестве стимулятора дифференцировки за счет связывания со своим кофакторным комплексом CBP/p300/SMAD1 [196]. Как и ASCL1, нейрогенины, чтобы связаться с ДНК, формируют димер с другим фактором bHLH-типа. Коактиваторный комплекс CBP/p300/SMAD1 связан с активностью сигнального пути BMP, поэтому в присутствии NGN1 BMP стимулирует дифференцировку нейронов. В то же время NGN1 опосредованно блокирует астроцитарную дифференцировку за счет изоляции комплекса CBP/p300/SMAD1 от ДНК генов, задействованных в глиогенезе, таких как факторы транскрипции STAT. В эмбриональном переднем мозге NGN1 совместно с NGN2 и PAX6 ассоциируется с формированием дорсального паттерна и спецификацией нейронов.

NGN2 активирует экспрессию пронейральных генов и управляет нейронной спецификацией, ингибируя экспрессию глиальных генов в НПК [196]. Интересно, что фактор транскрипции OLIG2 стимулирует экспрессию NGN2 в НПК, хотя и NKX2.2 (homeodomain transcription factors 2.2), и OLIG2 сами по себе стимулируют глиогенез [197]. Считается, что NGN2 участвует в спецификации моторных нейронов и вентральных интернейронов [198]. NGN2 – это еще один первичный транскрипционный фактор, так что в сочетании с другими факторами или малыми молекулами может репрограммировать человеческие фибробласты в холинергические нейроны *in vitro* [2, 120], а клетки крови человека – в индуцированные нейроны [184]. Ретровирусная экспрессия NGN2 в пролиферирующих клетках индуцировала образование нейронов в спинном мозге, стриатуме и коре [58, 163]. Такую нейрональную индукцию *in vivo* дополнительно можно усиливать факторами роста или путем совместной экспрессии с BCL2 [199]. В результате образовывались преимущественно глутаматергические пирамидальные нейроны в коре головного мозга [163] или ГАМКергические, но DARPP32-негативные нейроны в полосатом теле [80].

Фактор транскрипции NEUROD1

NEUROD1 – транскрипционный фактор нейрогенной дифференцировки 1 – также относится к структурному семейству bHLH. Как и NGN1, NEUROD1 связывается с коактиваторным комплексом CBP/p300, способствуя регуляции нескольких путей дифференцировки клеток в нервной системе, в том числе тех, которые участвуют в образовании ранних ганглиозных клеток сетчатки, сенсорных нейронов внутреннего уха и гранулярных клеток, образующих либо слой мозжечка, либо слой зубчатой извилины гиппокампа [200]. NEUROD1 также необходим для морфогенеза и поддержания дендритов в коре мозжечка [200]. С помощью эктопической экспрессии ретровирусным вектором с геном *NEUROD1* удалось репрограммировать кортикальные астроциты в глутаматергические нейроны и NG2-глию в глутаматергические и ГАМКергические нейроны [125, 201]. Эти преобразованные нейроны давали спонтанные и вызванные синаптические ответы, что указывало на их интеграцию в локальные нервные цепи. Группа M. Werning [115], используя транскрипционные факторы NEUROD1, ASCL1 и LMX1A и микроРНК miR-128, репрограммировала человеческие астроциты *in vitro* и мышиные астроциты *in vivo* в дофаминергические нейроны. Важно заметить, что эффективность репрограммирования повышалась под действием низкомолекулярных соединений, которые способствовали ремоделированию хроматина и активации сигнальных путей TGF-β, SHH и WNT. Они же показали возможность прямого репрограммирования фетальных и постнатальных фибробластов человека в индуцированные нейроны под действием коктейля факторов BRN2, ASCLl1, MYT1L и NEUROD1 [118].

Фактор транскрипции GSX2

GSX2 (GS homeobox 2, продукт гена *GSX2*) – один из транскрипционных факторов, связывающих последовательность 5'-CNAATTAG-3' ДНК и отвечающих за вентрализацию конечного мозга во время эмбрионального развития, где он формирует раннюю спецификацию предшественников латерального ганглиозного возвышения (LGE), медиального ганглиозного возвышения (MGE) и вентральной перегородки [34] и в зависимости от стадии развития определяет нейронную спецификацию. *GSX2* необходим для развития полосатых проекционных нейронов и интернейронов обонятельной луковицы – двух основных производных LGE [202]. Аналогично *PAX6* и *EMX2* (empty spiracles homeobox 2) в дорсальном конечном мозге, ген *GSX2* необходим не только для формирования паттернов предшественников LGE, но и для контроля их пролиферации [203]. *GSX2* может экспрессироваться в нескольких областях. Так, область с высокой экспрессией *GSX2* определяет дорсальную область LGE, которая служит основным источником интернейронов, тогда как более вентральная область LGE ответственна за продукцию нейронов полосатого тела [82]. Аналогичная картина наблюдается в распределении экспрессии *GSX2* в зубчатой извилине взрослого мозга: GSX2-положительными НСК чаще обогащена дорсолатеральная область [82]. Интересно, что дорсальнее GSX2-положительных НСК в зубчатой извилине находится небольшая зона PAX6-положительных клеток, а в вентральной зоне пониженной экспрессии GSX2 экспрессируется его ближайший гомолог GSX1 и NKX2.1. Таким образом, в зубчатой извилине взрослого

мозга формируется 4 различных субдомена: PAX6-положительный, PAX6/GSX2-положительный, GSX1-положительный латеральный и медиальный субдомены и GSX1/NKX2.1-положительный вентральный субдомен [37, 82]. Показано, что инактивация PAX6 и GSX2 приводит к потере отдельных подмножеств нейронов, в частности тирозингидроксилаза-положительных и кальретинин-гломерулярных нейронов, что свидетельствует о важности региональной идентичности НСК как в эмбриональном, так и во взрослом мозге [9, 82, 204]. Однако в ответ на инактивацию GSX2 в эмбриональном мозге компенсаторно расширяются зоны PAX6-положительного дорсального домена и GSX1-положительного вентрального домена, чего не наблюдается во взрослом мозге [82]. Кроме того, доля утраченных популяций нейронов при инактивации GSX2 во взрослом мозге значительно меньше, чем в эмбриональном, что говорит об ограниченной роли GSX2 во взрослом мозге [82]. Для регенеративной медицины очень важно, что GSX2 участвует в специфической регуляции нейрогенеза в ответ на повреждение мозга у взрослых млекопитающих. Обнаружено, что при постишемическом нейрогенезе экспрессия *GSX2* в зубчатой извилине затрагивает те субдомены, в которых отсутствует в норме, а направленное ингибирование экспрессии *GSX2* в НСК зубчатой извилины останавливает посттравматический нейрогенез [82]. Еще одно различие между экспрессией *GSX2* в эмбриональном и взрослом мозге состоит в ограничении распространения *GSX2* среди субпопуляций НСК зубчатой извилины: в эмбриональном мозге экспрессия *GSX2* длится до самых поздних стадий, а во взрослом мозге она ограничена переходом от НСК к нейробластам через стадию транзиторно амплифицирующихся предшественников [82]. Интересно, что на этом этапе GSX2 практически одновременно и активирует, и блокирует дальнейший нейрогенез, то есть, чтобы НСК перешли в транзиторно амплифицирующиеся клетки-предшественники и нейробласты, необходимо сначала активировать, а затем ингибировать экспрессию этого транскрипционного фактора. Предполагается, что основная роль GSX2 во взрослом мозге заключается в привлечении НСК в клеточный цикл.

Фактор транскрипции DLX

Факторы транскрипциии семейства DLX (DLX1, DLX2, DLX5 и DLX6) регулируют дифференцировку НСК в преоптической зоне в ГАМКергические нейроны [205]. DLX1 и DLX2 функционально избыточны, так как их раздельное ингибирование не приводит к серьезным нарушениям дифференцировки, но совместный нокаут их генов значительно снижает эффективность образования ГАМКергических нейронов [206]. По отношению к GSX2 факторы DLX1 и DLX2 задействованы в нижележащем сигнальном каскаде и их экспрессия зависят от уровня GSX2. Так, при переходе от транзиторных амплифицирующихся клеток-предшественников к нейробластам экспрессия *GSX2* сменяется именно на экспрессию *DLX*. Также эктопическая экспрессия *GSX1* или *GSX2* может индуцировать устойчивую экспрессию *MASH1* и *DLX* во многих областях конечного мозга [207]. Сходная связь между *GSX1* и *GSX2*, *MASH1* и *DLX* в восходящем и нисходящем направлениях обнаружена в мозге взрослого человека. Экспрессия *MASH1* и *DLX* снижается в дорсолатеральной области зубчатой извилины при ингибировании GSX2 [82]; условная инактивация ASCL1 и DLX приводит к серьезной потере нейрогенеза во взрослых НСК [178]. В целом, эти результаты показывают, что генетический каскад *GSX2/MASH1/DLX* участвует в координации нейрогенеза в эмбриональном и взрослом мозге. Исследования прямого репрограммирования и роли ASCL1 в нем показали, что активация комплекса нижележащих генов: *ZFP238, SOX8* и *DLX3* – ключевой момент работы генной сети ASCL1 [181].

Фактор транскрипции MYT1L

Первичный транскрипционный фактор MYT1L (myelin transcription factor 1 like) – онтогенетический репрессор REST (RE1-silencing transcription factor) и Groucho (transducin-like enhancer; TLE), блокирующий активацию пронейрональных генных сетей. Репрессорная функция MYT1L опосредуется рекрутированием комплекса, содержащего SIN3B, путем связывания с ранее не охарактеризованным N-концевым доменом [186]. В соответствии с его репрессорной функцией сайты связывания MYT1L сходны в нейронах и фибробластах и преимущественно находятся в открытой конфигурации хроматина. MYT1L подавляет путь передачи сигналов Notch через супрессию экспрессии нескольких его членов, включая HES1 [186]. Нокдаун *MYT1L* в развивающемся мозге мыши имитирует фенотип, опосредованный активацией пути Notch, подтверждая, что MYT1L позволяет эмбриональным нейронам избегать активации пути Notch во время нормального развития. Истощение MYT1L в первичных постмитотических нейронах активирует непронейрональные программы и нарушает экспрессию и функционирование нейрональных генов [186]. Выше описано, как MYT1L может использоваться в прямом репрограммировании, где он выступает как первичный транскрипционный фактор, моделирующий конфигурацию хроматина и подавляющий миогенные программы клетки [180, 185–187].

МикроРНК

Помимо транскрипционных факторов для прямого пронейрального репрограммирования используются также микроРНК. Это класс некодирующих РНК длиной 20–25 нуклеотидов, которые регулируют стабильность и трансляцию своей мРНК-мишени посредством связывания с ее 3'-нетранслируемой областью (UTR) или с кодирующей последовательностью [208]. МикроРНК регулируют различные биологические процессы на всех стадиях развития организма, множество разных микроРНК участвует и в нейрогенезе. К ним относится miR-19, которая в эмбриональном нейрогенезе стимулирует пролиферацию НСК и экспансию радиальных клеток глии [208]. Кластер miR-17-92, наоборот, ингибирует экспрессию *TBR2,* предотвращая переход радиальных клеток глии в нейрональные промежуточные клетки-предшественники [209]. miR-184, miR-let-7b, miR-137, miR-9 и miR-124, о которых мы поговорим далее, оказывают регуляторное действие на нейрогенез у взрослых путем нацеливания на различные нейрально экспрессируемые гены [210–213].

miR-184 экспрессируется под действием MBD1 (methyl-CpG-binding domain protein 1), который способен модифицировать структуру хроматина через взаимодействие с SETDB1 – гистон-лизин-N-метилтрансферазой. Повышение экспрессии miR-184 снижает уровень мРНК MBD1 с образованием отрицательной петли обратной связи, что способствует пролиферации и ингибирует дифференцировку НСК [213]. Известная мишень miR-184 – ген *NUMB*, играющий важную роль в функционировании эмбриональных НСК и развитии коры [214]. Напротив, miR-let-7b способствует подавлению пролиферации и стимулирует дифференцировку нейронов через взаимодействие с генами *TLX* и *CCND1*, последний из которых кодирует циклин D1 [212].

miR-137 экспрессируется в мозге и способствует дифференцировке НСК через регуляторную петлю с транскрипционным корепрессором TLX, снижая уровень мРНК лизинспецифичной гистон-деметилазы-1 (LSD1), которая, в свою очередь, подавляет транскрипцию miR-137 [211]. Известно, что MSI1 и miR-137 имеют противоположные паттерны воздействия на клетки [215]. Также показано, что дисфункция miR-137 способствует развитию некоторых типов рака человека, таких как нейробластома [216] и мультиформная глиобластома [217]. Обнаружено, что miR-137 может непосредственно нацеливаться на гистон-деметилазу JARID1B (ген *KDM5B*) – что приводит к дифференцировке ЭСК мыши [218], – экспрессируется в митотической фазе клеточного цикла и сильно активируется во время дифференцировки ЭСК в нервные клетки [219]. Эта активация приводит к репрессии двух факторов транскрипции ЭСК: KLF4 и TBX3, – на которые непосредственно воздействует miR-137. Противоположный эффект miR-137 в модуляции пролиферации и дифференцировки обнаружен в НСК взрослого мозга. Так, miR-137 усиливает пролиферацию и ингибирует дифференцировку посредством посттранскрипционной супрессии *EZH2* [220]. На основании этих результатов логично предположить, что выполняемая miR-137 роль определяется контекстом. Интересно, что наличие хотя бы одного функционального аллеля miR-137 важно для нормального эмбрионального развития [221]. Также miR-137 вовлечена в развитие многих психических заболеваний, таких как шизофрения, большое депрессивное расстройство, болезнь Хантингтона [221] и другие.

miR-9 – одна из наиболее высокоэкспрессируемых древних микроРНК в развивающемся и зрелом мозге позвоночных [222, 223]. Это универсальная многопрофильная микроРНК, регулирующая самые разные процессы. Ее уровни экспрессии динамически регулируются во время развития мозга и во время индуцированного *in vitro* нейрогенеза [224]. Если для подавляющего большинства микроРНК после ассоциации их дуплексов с комплексом RISC сохраняется только одна цепь (5' или 3'), то в случае miR-9 направляющая цепь может быть сгенерирована либо из 5'- (miR-9-5p/miR-9), либо из 3'-плеча (miR-9-3p/miR-9*) – в зависимости от рассматриваемого гена [225]. Экспрессия miR-9 впервые происходит в середине эмбриогенеза, после специализации основных подразделов мозга, сначала в конечном мозге, а затем распространяется на более каудальные области головного и спинного мозга. Во всей ЦНС экспрессия miR-9 преимущественно связана с областями желудочковых НПК [226], хотя некоторые дифференцированные нейроны также экспрессируют miR-9, особенно в дорсальном конечном мозге и спинном мозге [224]. Экспрессия miR-9 определяет активные нейрогенные области и регулируется сигнальным каскадом Notch [226]. В экспериментах *in vitro* показано, что miR-9/9* способствует дифференцировке взрослых НСК, но только совместно с малыми молекулами форсколина или RA [227]. Также выявлена возможность прямого репрограммирования фетальных фибробластов человека в постмитотические нейроны лентивирусными векторами, содержащими miR-9/9* и miR-124, посредством активации NEUROD2. Однако это преобразование зависит от экспрессии всех трех микроРНК [110]. Удивительно, но ингибирование miR-9 индуцирует повышенную пролиферацию эмбриональных НПК [226] или НСК взрослых мышей [227], но с последующим возобновлением дифференцировки [226], что говорит о факультативности контроля miR-9 над НПК и НСК. Сообщалось, что miR-9

может выполнять противоположные функции, что зависит от клеточного контекста и, вероятно, связано с дифференциальной экспрессией мРНК-мишеней и синергизмом между miR-9 и другими факторами, регулирующими мРНК [224]. У miR-9 много мРНК-мишеней. К ним, например, относятся гены семейства *HES* – основные эффекторы передачи сигналов Notch и ингибиторы дифференцировки путем репрессии пронейральных генов, таких как *MASH1* [228]. Некоторые другие мишени miR-9 также контролируют пролиферацию НПК. К ним относятся факторы транскрипции FOXG1 [224], GSX2 [224], TLX/NR2E1 [229] и ZIC5 [229]. miR-9 и TLX образуют отрицательную петлю обратной связи – чтобы способствовать преждевременной дифференцировке нейронов [229, 230]. Интересно, что miR-9 также участвует в ремоделировании ландшафта микроРНК в нервных клетках, например, ингибируя плюрипотентные факторы LIN28A и LIN28B – РНК-связывающие белки, которые блокируют процессинг некоторых микроРНК, включая miR-let-7 [230]. miR-9 стимулирует дифференцировку нейронов, ингибируя экспрессию факторов пролиферации и специфических для предшественников эпигенетических факторов [226]. Экспрессию miR-9 можно обнаружить и на более поздних этапах развития клетки. Так, miR-9 временно экспрессируется во время дифференцировки мотонейронов спинного мозга, расположенных в боковой моторной колонке и иннервирующих мышцы конечностей. Это действие miR-9 обусловлено ее взаимодействием со своими мишенями: *FOXP1* и *ISL1/2*, – которые экспрессируются в мотонейронах [231]. Кроме того, выявлено участие miR-9 в созревании корковых нейронов – ее экспрессию обнаружили в аксонах и дендритах дифференцированных нейронов [224].

miR-124 – еще одна распространенная в нейральных клетках микроРНК. Считается, что miR-124 способствует дифференцировке НСК, ингибируя экспрессию *SOX9*, что подтверждается сохранением мультипотентности НСК при нокдауне miR-124 в SVZ [232]. Экспрессия miR-124 обнаружена в резидентной микроглии ЦНС, что, возможно, связано с горизонтальным переносом микроРНК из нейронов в глию [233]. В результате макрофаги подавляли маркеры активации главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса II и CD45 в клетках микроглии [234]. Кроме классического эксперимента, доказавшего эффективность прямого репрограммирования фибробластов человека с помощью miR-9/9* и miR-124 [110], есть исследование, в котором продемонстрирована возможность прямого репрограммирования первичных дермальных фибробластов взрослого человека в функциональные нейроны с использованием “коктейля” из miR-124 и факторов транскрипции MYT1L и BRN2 [111].

Малые молекулы

Эпигенетический метод прямого репрограммирования реализуется с помощью малых молекул – низкомолекулярных соединений, влияющих на основные сигнальные пути клетки, доступность и состояние хроматина, метаболизм, активность цитоскелета и т.д. [235, 236]. Несмотря на то, что в некоторых работах продемонстрирована самодостаточность малых молекул как факторов прямого пронейронального репрограммирования [237, 238], метод характеризуется низкой воспроизводимостью, недостаточной специфичностью и, как следствие, большой вариабельностью результатов [239]. В связи с этим большинство исследователей использует малые молекулы вместе с другими факторами репрограммирования. Очень важным вспомогательным направлением при прямом пронейральном репрограммировании считается изменение эпигенетического фона первичной клетки, которая чаще всего имеет мезодермальное происхождение. В первую очередь, этого можно добиться с помощью молекул, повышающих доступность ДНК трансформируемых клеток: вальпроевой кислоты, N-фталил-*L*-триптофана (RG108)) [239] – и ингибирующих мезодермальную дифференцировку. Например, используя белок Noggin и малую молекулу A-83-01, ингибируют передачу сигналов TGF-β, SMAD и ALK (anaplastic lymphoma kinase) [239]. Значительно повышают эффективность преобразования молекулы, поддерживающие жизнедеятельность и пролиферацию, такие как форсколин, опосредующий активацию аденилатциклазы [134, 240], и Y-27632, ингибирующий RHO-ассоциированную протеинкиназу (ROCK) [241]. Кроме того, существуют малые молекулы, влияние которых на мезодермально-эктодермальный переход более явное. Например, CHIR99021 ингибирует GSK3β (glycogen synthase kinase 3 beta), тем самым активируя сигнальный путь Wnt, который, как упоминалось выше, принимает участие в контроле нейрогенеза; а изоксазол-9 (ISX9) – через опосредованную активацию транскрипционных факторов семейства MEF2 (myocyte enhancer factor-2) регулирует активность таких нейральных транскрипционных факторов, как NEUROD, ASCL1 и BRN2 [242–245]. Использование вспомогательных факторов позволяет значительно облегчить процесс преобразования и направленной дифференцировки и минимизировать число транскрипционных факторов. Так, с помощью NGN2, ASCL1, белка Noggin и коктейля малых молекул (CHIR-99021, SB-431542, LDN-193189, A-83–01, форсколин и дибутирил-cAMP) удалось репрограммировать человеческие фибробласты в функциональные нейроны [246].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного анализа многочисленных протоколов репрограммирования выявлено, что практически все они основаны на использовании первичных и вторичных факторов транскрипции, опосредующих нейрогенез в эмбриональном и взрослом мозге. Наиболее часто успех репрограммирования обеспечивают SOX2, PAX6, MSI1 ASCL1, BRN2, нейрогенины, NEUROD1, MYT1L, GSX2 и DLX. Получаемые в результате прямого репрограммирования клеточные типы крайне разнообразны – от стволоподобных нейральных предшественников/нейральных прогениторных клеток и клеток, имеющих характеристики радиальной глии, до нейробластов и "молодых" нейронов, экспрессирующих основные нейрональные маркеры. Гораздо в меньшем числе исследований в результате прямого репрограммирования удалось получить терминально дифференцированные типы нейронов: промежуточные, моторные, сенсорные и осуществляющие специализированную нейротрансмиссию. В отличие от технологии iPSC при получении drNPC большое значение имеет эпигенетический контекст исходных клеток. К важным аспектам относится инактивация супрессии нейронспецифичных генов в исходных соматических клетках, а также преодоление исходной "глиогенности" микроокружения взрослого мозга. Моделирование микроокружения возможно с помощью различных подходов, например применения гидрогелей, содержащих пронейрональные факторы роста, микроРНК и малые молекулы, белки внеклеточного матрикса, биологически активные самособирающиеся пептиды и др. [247–251].

Авторы благодарят Марию Андреевну Лагарькову за консультативную помощь в написании обзора.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 16-15-10432.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takahashi K., Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. **126**(4), 663–676.
2. Ahlfors J.E., Azimi A., El-Ayoubi R., Velumian A., Vonderwalde I., Boscher C., Mihai O., Mani S., Samoilova M., Khazaei M., Fehlings M.G., Morshead C.M. (2019) Examining the fundamental biology of a novel population of directly reprogrammed human neural precursor cells. *Stem Cell Res. Ther.* **10**(1), 166.
3. Tanabe K., Ang C.E., Chanda S., Olmos V.H., Haag D., Levinson D.F., Südhof T.C., Wernig M. (2018) Transdifferentiation of human adult peripheral blood T cells into neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **115**(25), 6470–6475.
4. Mall M., Wernig M. (2017) The novel tool of cell reprogramming for applications in molecular medicine. *J. Mol. Med.* (Berl.). **95**(7), 695–703.
5. Tanabe K., Haag D., Wernig M. (2015). Direct somatic lineage conversion. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **370**(1680), 20140368.
6. Kanning K.C., Kaplan A., Henderson C.E. (2010) Motor neuron diversity in development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **33**, 409–440.
7. Koch P., Breuer P., Peitz M., Jungverdorben J., Kesavan J., Poppe D., Doerr J., Ladewig J., Mertens J., Tüting T., Hoffmann P., Klockgether T., Evert B.O., Wüllner U., Brüstle O. (2011) Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado–Joseph disease. *Nature.* **480**(7378), 543–546.
8. Brennand K.J., Simone A., Jou J., Gelboin-Burkhart C., Tran N., Sangar S., Li Y., Mu Y., Chen G., Yu D., McCarthy S., Sebat J., Gage F.H. (2011) Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature.* **473**(7346), 221–225.
9. Götz M., Nakafuku M., Petrik D. (2016) Neurogenesis in the developing and adult brain-similarities and key differences. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**(7), a018853.
10. Miller J.D., Ganat Y.M., Kishinevsky S., Bowman R.L., Liu B., Tu E.Y., Mandal P.K., Vera E., Shim J.W., Kriks S., Taldone T., Fusaki N., Tomishima M.J., Krainc D., Milner T.A., Rossi D.J., Studer L. (2013) Human iPSC-based modeling of late-onset disease *via* progerin-induced aging. *Cell Stem Cell*. **13**(6), 691–705.
11. Victor M.B., Richner M., Olsen H.E., Lee S.W., Monteys A.M., Ma C., Huh C.J., Zhang B., Davidson B.L., Yang X.W., Yoo A.S. (2018) Striatal neurons directly converted from Huntington's disease patient fibroblasts recapitulate age-associated disease phenotypes. *Nat. Neurosci.* **21**(3), 341–352.
12. Tao Y., Zhang S.C. (2016) Neural subtype specification from human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. **19**(5), 573–586.
13. Gouti M., Metzis V., Briscoe J. (2015) The route to spinal cord cell types: a tale of signals and switches. *Trends Genet*. **31**(6), 282–289.
14. Henrique D., Abranches E., Verrier L., Storey K.G. (2015) Neuromesodermal progenitors and the making of the spinal cord. *Development.* **142**(17), 2864–2875.
15. Appolloni I., Calzolari F., Corte G., Perris R., Malatesta P. (2008) Six3 controls the neural progenitor status in the murine CNS. *Cereb. Cortex.* **18**(3), 553–562.
16. Kirkeby A., Grealish S., Wolf D.A., Nelander J., Wood J., Lundblad M., Lindvall O., Parmar M. (2012) Generation of regionally specified neural progenitors and functional neurons from human embryonic stem cells under defined conditions. *Cell Rep*. **1**(6), 703–714.

17. Kee N., Volakakis N., Kirkeby A., Dahl L., Storvall H., Nolbrant S., Lahti L., Björklund Å.K., Gillberg L., Joodmardi E., Sandberg R., Parmar M., Perlmann T. (2016) Single-cell analysis reveals a close relationship between differentiating dopamine and subthalamic nucleus neuronal lineages. *Cell Stem Cell.* **20**(1), 29–40.
18. del Corral R.D., Olivera-Martinez I., Goriely A., Gale E., Maden M., Storey K. (2003) Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron.* **40**(1), 65–79.
19. Shum A.S., Poon L.L., Tang W.W., Koide T., Chan B.W., Leung Y.C., Shiroishi T., Copp A.J. (1999) Retinoic acid induces down-regulation of Wnt3a, apoptosis and diversion of tail bud cells to a neural fate in the mouse embryo. *Mech. Dev.* **84**(1–2), 17–30.
20. Olivera-Martinez I., Harada H., Halley P.A., Storey K.G. (2012) Loss of FGF-dependent mesoderm identity and rise of endogenous retinoid signalling determine cessation of body axis elongation. *PLoS Biol.* **10**(10), e1001415.
21. Kumar S., Duester G. (2014) Retinoic acid controls body axis extension by directly repressing Fgf8 transcription. *Development.* **141**(15), 2972–2977.
22. Kiecker C., Lumsden A. (2012) The role of organizers in patterning the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **35**. 347–367.
23. Le Dreau G., Marti E. (2012) Dorsal-ventral patterning of the neural tube: a tale of three signals. *Dev. Neurobiol.* **72**(12), 1471–1481.
24. Briscoe J., Pierani A., Jessell T.M., Ericson J. (2000) A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell.* **101**(4), 435–445.
25. Alaynick W.A., Jessell T.M., Pfaff S.L. (2011) SnapShot: spinal cord development. *Cell.* **146**(1), 178.
26. Simoes-Costa M., Bronner M.E. (2015) Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development.* **142**(2), 242–257.
27. Molyneaux B.J., Arlotta P., Menezes J.R., Macklis J.D. (2007) Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**(6), 427–437.
28. Campbell K. (2003) Dorsal-ventral patterning in the mammalian telencephalon. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**(1), 50–56.
29. Kudoh T., Wilson S.W., Dawid I.B. (2002) Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development.* **129**(18), 4335–4346.
30. Marin O., Rubenstein J.L. (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**, 441–483.
31. Wichterle H., Turnbull D.H., Nery S., Fishell G., Alvarez-Buylla A. (2001) *In utero* fate mapping reveals distinct migratory pathways and fates of neurons born in the mammalian basal forebrain. *Development.* **128**(19), 3759–3771.
32. Quinn J.C., Molinek M., Martynoga B.S., Zaki P.A., Faedo A., Bulfone A., Hevner R.F., West J.D., Price D.J. (2007) Pax6 controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism. *Dev. Biol.* **302**(1), 50–65.
33. Xu Q., Guo L., Moore H., Waclaw R.R., Campbell K., Anderson S.A. (2010) Sonic hedgehog signaling confers ventral telencephalic progenitors with distinct cortical interneuron fates. *Neuron.* **65**(3), 328–340.
34. Carney R.S., Cocas L.A., Hirata T., Mansfield K., Corbin J.G. (2009) Differential regulation of telencephalic pallial-subpallial boundary patterning by Pax6 and Gsh2. *Cereb. Cortex.* **19**(4), 745–759.
35. Toresson H., Potter S.S., Campbell K. (2000) Genetic control of dorsal-ventral identity in the telencephalon: opposing roles for Pax6 and Gsh2. *Development.* **127**(20), 4361–4371.
36. Young K.M., Fogarty M., Kessaris N., Richardson W.D. (2007) Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the olfactory bulb. *J. Neurosci.* **27**(31), 8286–8296.
37. Stenman J., Toresson H., Campbell K. (2003) Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. *J. Neurosci.* **23**(1), 167–174.
38. Gaspard N., Bouschet T., Hourez R., Dimidschstein J., Naeije G., van den Ameele J., Espuny-Camacho I., Herpoel A., Passante L., Schiffmann S.N., Gaillard A., Vanderhaeghen P. (2008) An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature.* **455**(7211), 351–357.
39. Mattar P., Britz O., Johannes C., Nieto M., Ma L., Rebeyka A., Klenin N., Polleux F., Guillemot F., Schuurmans C. (2004) A screen for downstream effectors of Neurogenin2 in the embryonic neocortex. *Dev. Biol.* **273**(2), 373–389.
40. Parras C.M., Schuurmans C., Scardigli R., Kim J., Anderson D.J., Guillemot F. (2002) Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev.* **16**(3), 324–338.
41. Schuurmans C., Guillemot F. (2002) Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**(1), 26–34.
42. Schuurmans C., Armant O., Nieto M., Stenman J.M., Britz O., Klenin N., Brown C., Langevin L.M., Seibt J., Tang H., Cunningham J.M., Dyck R., Walsh C., Campbell K., Polleux F., Guillemot F. (2004) Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* **23**(14), 2892–2902.
43. Galichet C., Guillemot F., Parras C.M. (2008) Neurogenin 2 has an essential role in development of the dentate gyrus. *Development.* **135**(11), 2031–2041.
44. Wonders C.P., Anderson S.A. (2006) The origin and specification of cortical interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**(9), 687–696.
45. Molyneaux B.J., Arlotta P., Fame R.M., MacDonald J.L., MacQuarrie K.L., Macklis J.D. (2009) Novel subtype-specific genes identify distinct subpopulations of callosal projection neurons. *J. Neurosci.* **29**(39), 12343–12354.
46. Parras C.M., Galli R., Britz O., Soares S., Galichet C., Battiste J., Johnson J.E., Nakafuku M., Vescovi A.,

Guillemot F. (2004) Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J.* **23**(22), 4495–4505.

47. Wang B., Waclaw R.R., Allen Z.J., Guillemot F., Campbell K. (2009) *Ascl1* is a required downstream effector of *Gsx* gene function in the embryonic mouse telencephalon. *Neural Dev.* **4**, 5.
48. Fragkouli A., van Wijk N.V., Lopes R., Kessaris N., Pachnis V. (2009) LIM homeodomain transcription factor-dependent specification of bipotential MGE progenitors into cholinergic and GABAergic striatal interneurons. *Development.* **136**(22), 3841–3851.
49. Liodis P., Denaxa M., Grigoriou M., Akufo-Addo C., Yanagawa Y., Pachnis V. (2007) Lhx6 activity is required for the normal migration and specification of cortical interneuron subtypes. *J. Neurosci.* **27**(12), 3078–3089.
50. Zhao Y., Marin O., Hermesz E., Powell A., Flames N., Palkovits M., Rubenstein J.L., Westphal H. (2003) The LIM-homeobox gene *Lhx8* is required for the development of many cholinergic neurons in the mouse forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**(15), 9005–9010.
51. Long J.E., Cobos I., Potter G.B., Rubenstein J.L. (2009) Dlx1&2 and Mash1 transcription factors control MGE and CGE patterning and differentiation through parallel and overlapping pathways. *Cereb. Cortex.* **19**(Suppl. 1), i96–i106.
52. Petryniak M.A., Potter G.B., Rowitch D.H., Rubenstein J.L. (2007) *Dlx1* and *Dlx2* control neuronal versus oligodendroglial cell fate acquisition in the developing forebrain. *Neuron.* **55**(3), 417–433.
53. Yu W., Wang Y., McDonnell K., Stephen D., Bai C.B. (2009) Patterning of ventral telencephalon requires positive function of Gli transcription factors. *Dev. Biol.* **334**(1), 264–275.
54. Fuccillo M., Rallu M., McMahon A.P., Fishell G. (2004) Temporal requirement for hedgehog signaling in ventral telencephalic patterning. *Development.* **131**(20), 5031–5040.
55. Kriks S., Shim J.W., Piao J., Ganat Y.M., Wakeman D.R., Xie Z., Carrillo-Reid L., Auyeung G., Antonacci C., Buch A., Yang L., Beal M.F., Surmeier D.J., Kordower J.H., Tabar V., Studer L. (2011) Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature.* **480**(7378), 547–551.
56. Gross C.G. (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**(1), 67–73.
57. Jurkowski M.P., Bettio L., K Woo E., Patten A., Yau S.Y., Gil-Mohapel J. (2020) Beyond the hippocampus and the SVZ: adult neurogenesis throughout the brain. *Front. Cell. Neurosci.* **14**, 576444.
58. Fares J., Bou Diab Z., Nabha S., Fares Y. (2019) Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles. *Int. J. Neurosci.* **129**(6), 598–611.
59. Toda T., Parylak S.L., Linker S.B., Gage F.H. (2019) The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Mol. Psychiatry.* **24**(1), 67–87.
60. Fuentealba L.C., Rompani S.B., Parraguez J.I., Obernier K., Romero R., Cepko C.L., Alvarez-Buylla A. (2015) Embryonic origin of postnatal neural stem cells. *Cell.* **161**(7), 1644–1655.
61. Abbott L.C., Nigussie F. (2020) Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Anat. Histol. Embryol.* **49**(1), 3–16.
62. Kempermann G., Song H., Gage F.H. (2015) Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**(9), a018812.
63. Nieto-Estevez V., Oueslati-Morales C.O., Li L., Pickel J., Morales A.V., Vicario-Abejon C. (2016) Brain insulin-like growth factor-I directs the transition from stem cells to mature neurons during postnatal/ adult hippocampal neurogenesis. *Stem Cells.* **34**(8), 2194–2209
64. Salvi R., Steigleder T., Schlachetzki J. C., Waldmann E., Schwab S., Winner B., Winkler J., Kohl Z. (2016) Distinct effects of chronic dopaminergic stimulation on hippocampal neurogenesis and striatal doublecortin expression in adult mice. *Front. Neurosci.* **10**, 77.
65. Kohl Z., Ben Abdallah N., Vogelgsang J., Tischer L., Deusser J., Amato D., Anderson S., Müller C.P., Riess O., Masliah E., Nuber S., Winkler J. (2016) Severely impaired hippocampal neurogenesis associates with an early serotonergic deficit in a BAC α-synuclein transgenic rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **85**, 206–217.
66. Danzer S.C., Kotloski R.J., Walter C., Hughes M., McNamara J.O. (2008) Altered morphology of hippocampal dentate granule cell presynaptic and postsynaptic terminals following conditional deletion of TrkB. *Hippocampus.* **18**(7), 668–678.
67. Gonçalves J.T., Schafer S.T., Gage F.H. (2016) Adult neurogenesis in the hippocampus: from stem cells to behavior. *Cell.* **167**(4), 897–914.
68. Ampuero E., Jury N., Hartel S., Marzolo M.P., van Zundert B. (2017) Interfering of the Reelin/ ApoER2/PSD95 signaling axis re-activates dendritogenesis of mature hippocampal neurons. *J. Cell. Physiol.* **232**(5), 1187–1199.
69. Zhang D., Wang X., Lu X.Y. (2016) Adiponectin exerts neurotrophic effects on dendritic arborization, spinogenesis, and neurogenesis of the dentate gyrus of male mice. *Endocrinology.* **157**(7), 2853–2869.
70. Bengoa-Vergniory N., Kypta R.M. (2015) Canonical and nonca- nonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**(21), 4157–4172.
71. Obernier K., Alvarez-Buylla A. (2019) Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development.* **146**(4), dev156059.
72. Mich J.K., Signer R.A.J., Nakada D., Pineda A., Burgess R.J., Vue T.Y., Johnson J.E., Morrison S.J. (2014) Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *eLife.* **3**, e02669.
73. Ponti G., Obernier K., Alvarez-Buylla A. (2013) Lineage progression from stem cells to new neurons in the adult brain ventricular-subventricular zone. *Cell Cycle.* **12**(11), 1649–1650.
74. Taverna E., Götz M., Huttner W.B. (2014) The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30**, 465–502.

75. Paez-Gonzalez P., Abdi K., Luciano D., Liu Y., Soriano-Navarro M., Rawlins E., Bennett V., Garcia-Verdugo J.M., Kuo C.T. (2011) Ank3-dependent SVZ niche assembly is required for the continued production of new neurons. *Neuron*. **71**(1), 61–75.

76. Fuentealba L.C., Obernier K., Alvarez-Buylla A. (2012) Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell*. **10**(6), 698–708.

77. Mira H., Andreu Z., Suh H., Lie D.C., Jessberger S., Consiglio A., San Emeterio J., Hortigüela R., Marqués-Torrejón M.A., Nakashima K., Colak D., Götz M., Fariñas I., Gage F.H. (2010) Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*. **7**(1), 78–89.

78. Barnabé-Heider F., Göritz C., Sabelström H., Takebayashi H., Pfrieger F.W., Meletis K., Frisén J. (2010) Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell*. **7**(4), 470–482.

79. Torper O., Pfisterer U., Wolf D.A., Pereira M., Lau S., Jakobsson J., Björklund A., Grealish S., Parmar M. (2013) Generation of induced neurons *via* direct conversion *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**(17), 7038–7043.

80. Grande A., Sumiyoshi K., López-Juárez A., Howard J., Sakthivel B., Aronow B., Campbell K., Nakafuku M. (2013) Environmental impact on direct neuronal reprogramming *in vivo* in the adult brain. *Nat. Commun*. **4**, 2373.

81. Ninkovic J., Steiner-Mezzadri A., Jawerka M., Akinci U., Masserdotti G., Petricca S., Fischer J., von Holst A., Beckers J., Lie C.D., Petrik D., Miller E., Tang J., Wu J., Lefebvre V., Demmers J., Eisch A., Metzger D., Crabtree G., Irmler M., Poot R., Götz M. (2013) The BAF complex interacts with Pax6 in adult neural progenitors to establish a neurogenic cross-regulatory transcriptional network. *Cell Stem Cell*. **13**(4), 404–408.

82. López-Juárez A., Howard J., Ullom K., Howard L., Grande A., Pardo A., Waclaw R., Sun Y.Y., Yang D., Kuan C.Y., Campbell K., Nakafuku M. (2013) Gsx2 controls region-specific activation of neural stem cells and injury-induced neurogenesis in the adult subventricular zone. *Genes Dev*. **27**(11), 1272–1287.

83. Costa M.R., Ortega F., Brill M.S., Beckervordersandforth R., Petrone C., Schroeder T., Götz M., Berninger B. (2011) Continuous live imaging of adult neural stem cell division and lineage progression in vitro. *Development*. **138**(6), 1057–1068.

84. Haubst N., Berger J., Radjendirane V., Graw J., Favor J., Saunders G.F., Stoykova A., Götz M. (2004) Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development. *Development*. **131**(24), 6131–6140.

85. Sohn J., Orosco L., Guo F., Chung S.H., Bannerman P., Mills Ko E., Zarbalis K., Deng W., Pleasure D. (2015) The subventricular zone continues to generate corpus callosum and rostral migratory stream astroglia in normal adult mice. *J. Neurosci*. **35**(9), 3756–3763.

86. Arai Y., Pulvers J.N., Haffner C., Schilling B., Nüsslein I., Calegari F., Huttner W.B. (2011) Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat. Commun*. **2**, 154.

87. Bonaguidi M.A., Wheeler M.A., Shapiro J.S., Stadel R.P., Sun G.J., Ming G.L., Song H. (2011) *In vivo* clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*. **145**(7), 1142–1155.

88. Lugert S., Vogt M., Tchorz J.S., Müller M., Giachino C., Taylor V. (2012) Homeostatic neurogenesis in the adult hippocampus does not involve amplification of Ascl1 (high) intermediate progenitors. *Nat. Commun*. **3**, 670.

89. Ortega F., Gascón S., Masserdotti G., Deshpande A., Simon C., Fischer J., Dimou L., Chichung Lie D., Schroeder T., Berninger B. (2013) Oligodendrogliogenic and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nat. Cell Biol*. **15**(6), 602–613.

90. Gascón S., Masserdotti G., Russo G.L., Götz M. (2017) Direct neuronal reprogramming: achievements, hurdles, and new roads to success. *Cell Stem Cell*. **21**(1), 18–34.

91. Colasante G., Rubio A., Massimino L., Broccoli V. (2019) Direct neuronal reprogramming reveals unknown functions for known transcription factors. *Front. Neurosci*. **13**, 283.

92. Thier M.C., Hommerding O., Panten J., Pinna R., García-González D., Berger T., Wörsdörfer P., Assenov Y., Scognamiglio R., Przybylla A., Kaschutnig P., Becker L., Milsom M.D., Jauch A., Utikal J., Herrmann C., Monyer H., Edenhofer F., Trumpp A. (2019) Identification of embryonic neural plate border stem cells and their generation by direct reprogramming from adult human blood cells. *Cell Stem Cell*. **24**(1), 166–182.

93. Zhu S., Ambasudhan R., Sun W., Kim H.J., Talantova M., Wang X., Zhang M., Zhang Y., Laurent T., Parker J., Kim H.S., Zaremba J.D., Saleem S., Sanz-Blasco S., Masliah E., McKercher S.R., Cho Y.S., Lipton S.A., Kim J., Ding S. (2014) Small molecules enable OCT4-mediated direct reprogramming into expandable human neural stem cells. *Cell Res*. **24**(1), 126–129.

94. Yu K.R., Shi J.H., Ki J.J., Koo M.G., Lee J.Y., Choi S.W., Kim H.S., Seo Y., Lee S., Shin T.H., Jee M.K., Kim D.W., Jung S.J., Shin S., Han D.W., Kang K.S. (2015) Rapid and efficient direct conversion of human adult somatic cells into neural stem cells by HMGA2/let-7b. *Cell Rep*. **10**(3), 441–452.

95. Sheng C., Jungverdorben J., Wiethoff H., Lin Q., Flitsch L.J., Eckert D., Hebisch M., Fischer J., Kesavan J., Weykopf B., Schneider L., Holtkamp D., Beck H., Till A., Wüllner U., Ziller M.J., Wagner W., Peitz M., Brüstle O. (2018) A stably self-renewing adult blood-derived induced neural stem cell exhibiting patternability and epigenetic rejuvenation. *Nat. Commun*. **9**(1), 4047.

96. Cheng L., Lei Q., Yin C., Wang H.Y., Jin K., Xiang M. (2017) Generation of urine cell-derived non-integrative human iPSCs and iNSCs: a step-by-step optimized protocol. *Front. Mol. Neurosci*. **10**, 348.

97. Connor B. (2018) Concise review: the use of stem cells for understanding and treating Huntington's disease. *Stem Cells*. **36**(2), 146–160.

98. Kim B.E., Choi S.W., Shin J.H., Kim J.J., Kang I., Lee B.C., Lee J.Y., Kook M.G., Kang K.S. (2018) Single-factor SOX2 mediates direct neural reprogramming of human mesenchymal stem cells *via* transfection of *in vitro* transcribed mRNA. *Cell Transplant.* **27**(7), 1154–1167.

99. Hou P.S., Chuang C.Y., Yeh C.H., Chiang W., Liu H.J., Lin T.N., Kuo H.C. (2017) Direct conversion of human fibroblasts into neural progenitors using transcription factors enriched in human ESC-derived neural progenitors. *Stem Cell Reports*. **8**(1), 54–68.

100. Capetian P., Azmitia L., Pauly M.G., Krajka V., Stengel F., Bernhardi E.M., Klett M., Meier B., Seibler P., Stanslowsky N., Moser A., Knopp A., Gillessen-Kaesbach G., Nikkhah G., Wegner F., Döbrössy M., Klein C. (2016) Plasmid-based generation of induced neural stem cells from adult human fibroblasts. *Front. Cell. Neurosci*. **10**, 245.

101. Giorgetti A., Marchetto M.C., Li M., Yu D., Fazzina R., Mu Y., Adamo A., Paramonov I., Cardoso J.C., Monasterio M.B., Bardy C., Cassiani-Ingoni R., Liu G.H., Gage F.H., Izpisua Belmonte J.C. (2012) Cord blood-derived neuronal cells by ectopic expression of Sox2 and c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**(31), 12556–12561.

102. Castaño J., Menendez P., Bruzos-Cidon C., Straccia M., Sousa A., Zabaleta L., Vazquez N., Zubiarrain A., Sonntag K.C., Ugedo L., Carvajal-Vergara X., Canals J.M., Torrecilla M., Sanchez-Pernaute R., Giorgetti A. (2014) Fast and efficient neural conversion of human hematopoietic cells. *Stem Cell Reports*. **3**(6), 1118–1131.

103. Maucksch C., Firmin E., Butler-Munro C., Montgomery J., Dottori M., Connor B. (2012) Non-viral generation of neural precursor-like cells from adult human fibroblasts. *J. Stem Cells Regen. Med*. **8**(3), 162–170.

104. Ring K.L., Tong L.M., Balestra M.E., Javier R., Andrews-Zwilling Y., Li G., Walker D., Zhang W.R., Kreitzer A.C., Huang Y. (2012) Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell Stem Cell*. **11**(1), 100–109.

105. Shahbazi E., Moradi S., Nemati S., Satarian L., Basiri M., Gourabi H., Zare Mehrjardi N., Günther P., Lampert A., Händler K., Hatay F.F., Schmidt D., Molcanyi M., Hescheler J., Schultze J.L., Saric T., Baharvand H. (2016) Conversion of human fibroblasts to stably self-renewing neural stem cells with a single zinc-finger transcription factor. *Stem Cell Reports*. **6**(4), 539–551.

106. Xiao D., Liu X., Zhang M., Zou M., Deng Q., Sun D., Bian X., Cai Y., Guo Y., Liu S., Li S., Shiang E., Zhong H., Cheng L., Xu H., Jin K., Xiang M. (2018) Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by single non-neural progenitor transcription factor Ptf1a. *Nat. Commun*. **9**(1), 2865.

107. Mirakhori F., Zeynali B., Kiani S., Baharvand H. (2015) Brief azacytidine step allows the conversion of suspension human fibroblasts into neural progenitor-like cells. *Cell J*. **17**(1), 153–158.

108. Ghasemi-Kasman M., Hajikaram M., Baharvand H., Javan M. (2015) MicroRNA-mediated *in vitro* and *in vivo* direct conversion of astrocytes to neuroblasts. *PloS One*. **10**(6), e0127878.

109. Corti S., Nizzardo M., Simone C., Falcone M., Donadoni C., Salani S., Rizzo F., Nardini M., Riboldi G., Magri F., Zanetta C., Faravelli I., Bresolin N., Comi G.P. (2012) Direct reprogramming of human astrocytes into neural stem cells and neurons. *Exp. Cell Res*. **318**(13), 1528–1541.

110. Yoo A.S., Sun A.X., Li L., Shcheglovitov A., Portmann T., Li Y., Lee-Messer C., Dolmetsch R.E., Tsien R.W., Crabtree G.R. (2011) MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature*. **476**(7359), 228–231.

111. Ambasudhan R., Talantova M., Coleman R., Yuan X., Zhu S., Lipton S.A., Ding S. (2011) Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell*. **9**(2), 113–118.

112. Lau S., Rylander Ottosson D., Jakobsson J., Parmar M. (2014) Direct neural conversion from human fibroblasts using self-regulating and nonintegrating viral vectors. *Cell Rep*. **9**(5), 1673–1680.

113. Huh C.J., Zhang B., Victor M.B., Dahiya S., Batista L.F., Horvath S., Yoo A.S. (2016) Maintenance of age in human neurons generated by microRNA-based neuronal conversion of fibroblasts. *eLife*. **5**, e18648.

114. Pereira M., Pfisterer U., Rylander D., Torper O., Lau S., Lundblad M., Grealish S., Parmar M. (2014) Highly efficient generation of induced neurons from human fibroblasts that survive transplantation into the adult rat brain. *Sci. Rep*. **4**, 6330.

115. Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P., Kokubu Y., Sudhof T.C., Wernig M. (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*. **463**(7284), 1035–1041.

116. Meng F., Chen S., Miao Q., Zhou K., Lao Q., Zhang X., Guo W., Jiao J. (2012) Induction of fibroblasts to neurons through adenoviral gene delivery. *Cell Res*. **22**(2), 436–440.

117. Mertens J., Paquola A., Ku M., Hatch E., Böhnke L., Ladjevardi S., McGrath S., Campbell B., Lee H., Herdy J.R., Gonçalves J.T., Toda T., Kim Y., Winkler J., Yao J., Hetzer M.W., Gage F.H. (2015) Directly reprogrammed human neurons retain aging-associated transcriptomic signatures and reveal age-related nucleocytoplasmic defects. *Cell Stem Cell*. **17**(6), 705–718.

118. Pang Z.P., Yang N., Vierbuchen T., Ostermeier A., Fuentes D.R., Yang T.Q., Citri A., Sebastiano V., Marro S., Südhof T.C., Wernig M. (2011) Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*. **476**(7359), 220–223.

119. Matsuda T., Irie T., Katsurabayashi S., Hayashi Y., Nagai T., Hamazaki N., Adefuin A.M.D., Miura F., Ito T., Kimura H., Shirahige K., Takeda T., Iwasaki K., Imamura T., Nakashima K. (2019) Pioneer factor neuroD1 rearranges transcriptional and epigenetic profiles to execute microglia-neuron conversion. *Neuron*. **101**, 472–485.

120. Araújo J.A.M., Hilscher M.M., Marques-Coelho D., Golbert D.C.F., Cornelio D.A., Batistuzzo de Medeiros S.R., Leão R.N., Costa M.R. (2018) Direct re-

programming of adult human somatic stem cells into functional neurons using *Sox2*, *Ascl1*, and *neurog2*. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 155.

121. Drouin-Ouellet J., Lau S., Brattås P.L., Rylander Ottosson D., Pircs K., Grassi D.A., Collins L.M., Vuono R., Andersson Sjöland A., Westergren-Thorsson G., Graff C., Minthon L., Toresson H., Barker R.A., Jakobsson J., Parmar M. (2017) REST suppression mediates neural conversion of adult human fibroblasts *via* microRNA-dependent and -independent pathways. *EMBO Mol. Med.* **9**(8), 1117–1131.
122. Karow M., Sánchez R., Schichor C., Masserdotti G., Ortega F., Heinrich C., Gascón S., Khan M.A., Lie D.C., Dellavalle A., Cossu G., Goldbrunner R., Götz M., Berninger B. (2012) Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. *Cell Stem Cell.* **11**(4), 471–476.
123. Miskinyte G., Devaraju K., Grønning Hansen M., Monni E., Tornero D., Woods N.B., Bengzon J., Ahlenius H., Lindvall O., Kokaia Z. (2017) Direct conversion of human fibroblasts to functional excitatory cortical neurons integrating into human neural networks. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 207–225.
124. Chanda S., Ang C.E., Davila J., Pak C., Mall M., Lee Q.Y., Ahlenius H., Jung S.W., Sudhof T.C., Wernig M. (2014) Generation of induced neuronal cells by the single reprogramming factor ASCL1. *Stem Cell Reports.* **3**(2), 282–296.
125. Rivetti di Val Cervo P., Romanov R.A., Spigolon G., Masini D., Martín-Montañez E., Toledo E.M., La Manno G., Feyder M., Pifl C., Ng Y.H., Sánchez S.P., Linnarsson S., Wernig M., Harkany T., Fisone G., Arenas E. (2017) Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes *in vitro* and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nat. Biotechnol.* **35**(5), 444–452.
126. Jiang H., Xu Z., Zhong P., Ren Y., Liang G., Schilling H.A., Hu Z., Zhang Y., Wang X., Chen S., Yan Z., Feng J. (2015) Cell cycle and p53 gate the direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Nat. Commun.* **6**, 10100.
127. Pfisterer U., Kirkeby A., Torper O., Wood J., Nelander J., Dufour A., Björklund A., Lindvall O., Jakobsson J., Parmar M. (2011) Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**(25), 10343–10348.
128. Caiazzo M., Dell'Anno M.T., Dvoretskova E., Lazarevic D., Taverna S., Leo D., Sotnikova T.D., Menegon A., Roncaglia P., Colciago G., Russo G., Carninci P., Pezzoli G., Gainetdinov R.R., Gustincich S., Dityatev A., Broccoli V. (2011) Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature.* **476**(7359), 224–227.
129. Victor M.B., Richner M., Hermanstyne T.O., Ransdell J.L., Sobieski C., Deng P.Y., Klyachko V.A., Nerbonne J.M., Yoo A.S. (2014) Generation of human striatal neurons by microRNA-dependent direct conversion of fibroblasts. *Neuron.* **84**(2), 311–323.
130. Pereira M., Birtele M., Shrigley S., Benitez J.A., Hedlund E., Parmar M., Ottosson D.R. (2017) Direct reprogramming of resident NG2 glia into neurons with properties of fast-spiking parvalbumin-containing interneurons. *Stem Cell Reports.* **9**(3), 742–751.
131. Vadodaria K.C., Mertens J., Paquola A., Bardy C., Li X., Jappelli R., Fung L., Marchetto M.C., Hamm M., Gorris M., Koch P., Gage F.H. (2016) Generation of functional human serotonergic neurons from fibroblasts. *Mol. Psychiatry.* **21**(1), 49–61.
132. Xu Z., Jiang H., Zhong P., Yan Z., Chen S., Feng J. (2016) Direct conversion of human fibroblasts to induced serotonergic neurons. *Mol. Psychiatry.* **21**(1), 62–70.
133. Liang X.G., Tan C., Wang C.K., Tao R.R., Huang Y.J., Ma K.F., Fukunaga K., Huang M.Z., Han F. (2018) Myt1l induced direct reprogramming of pericytes into cholinergic neurons. *CNS Neurosci. Ther.* **24**(9), 801–809.
134. Liu M.L., Zang T., Zou Y., Chang J.C., Gibson J.R., Huber K.M., Zhang C.L. (2013) Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons. *Nat. Commun.* **4**, 2183.
135. Son E.Y., Ichida J.K., Wainger B.J., Toma J.S., Rafuse V.F., Woolf C.J., Eggan K. (2011) Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell.* **9**(3), 205–218.
136. Liu M.L., Zang T., Zhang C.L. (2016) Direct lineage reprogramming reveals disease-specific phenotypes of motor neurons from human ALS patients. *Cell Rep.* **14**(1), 115–128.
137. Abernathy D.G., Kim W.K., McCoy M.J., Lake A.M., Ouwenga R., Lee S.W., Xing X., Li D., Lee H.J., Heuckeroth R.O., Dougherty J.D., Wang T., Yoo A.S. (2017) MicroRNAs induce a permissive chromatin environment that enables neuronal subtype-specific reprogramming of adult human fibroblasts. *Cell Stem Cell.* **21**(3), 332–348.
138. Tang Y., Liu M.L., Zang T., Zhang C.L. (2017) Direct reprogramming rather than iPSC-based reprogramming maintains aging hallmarks in human motor neurons. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 359.
139. Blanchard J.W., Eade K.T., Szűcs A., Lo Sardo V., Tsunemoto R.K., Williams D., Sanna P.P., Baldwin K.K. (2015) Selective conversion of fibroblasts into peripheral sensory neurons. *Nat. Neurosci.* **18**(1), 25–35.
140. Wainger B.J., Buttermore E.D., Oliveira J.T., Mellin C., Lee S., Saber W.A., Wang A.J., Ichida J.K., Chiu I.M., Barrett L., Huebner E.A., Bilgin C., Tsujimoto N., Brenneis C., Kapur K., Rubin L.L., Eggan K., Woolf C.J. (2015) Modeling pain *in vitro* using nociceptor neurons reprogrammed from fibroblasts. *Nat. Neurosci.* **18**(1), 17–24.
141. Brown C.R., Butts J.C., McCreedy D.A., Sakiyama-Elbert S.E. (2014) Generation of V2a interneurons from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **23**(15), 1765–1776.
142. Wegner M. (2011) SOX after SOX: SOXession regulates neurogenesis. *Genes Dev.* **25**(23), 2423–2428.
143. Mercurio S., Serra L., Nicolis S.K. (2019) More than just stem cells: functional roles of the transcription factor Sox2 in differentiated glia and neurons. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(18), 4540.
144. Naruse Y., Aoki T., Kojima T., Mori N. (1999) Neural restrictive silencer factor recruits mSin3 and histone deacetylase complex to repress neuron-specific target

genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**(24), 13691–13696.

145. Garriga-Canut M., Schoenike B., Qazi R., Bergendahl K., Daley T.J., Pfender R.M., Morrison J.F., Ockuly J., Stafstrom C., Sutula T., Roopra A. (2006) 2-Deoxy-*D*-glucose reduces epilepsy progression by NRSF-CtBP-dependent metabolic regulation of chromatin structure. *Nat. Neurosci*. **9**(11), 1382–1387.
146. Berninger B., Costa M.R., Koch U., Schroeder T., Sutor B., Grothe B., Götz M. (2007) Functional properties of neurons derived from *in vitro* reprogrammed postnatal astroglia. *J. Neurosci*. **27**(32), 8654–8664.
147. Favaro R., Valotta M., Ferri A.L., Latorre E., Mariani J., Giachino C., Lancini C., Tosetti V., Ottolenghi S., Taylor V., Nicolis S.K. (2009) Hippocampal development and neural stem cell maintenance require *Sox2*-dependent regulation of *Shh*. *Nat. Neurosci*. **12**(10), 1248–1256.
148. Adachi K., Suemori H., Yasuda S.Y., Nakatsuji N., Kawase E. (2010) Role of *SOX2* in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes Cells*. **15**(5), 455–470.
149. Thomson M., Liu S.J., Zou L.N., Smith Z., Meissner A., Ramanathan S. (2011) Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell*. **145**(6), 875–889.
150. Bylund M., Andersson E., Novitch B.G., Muhr J. (2003) Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1–3 activity. *Nat. Neurosci*. **6**(11), 1162–1168.
151. Graham V., Khudyakov J., Ellis P., Pevny L. (2003) SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron*. **39**(5), 749–765.
152. Kuwabara T., Hsieh J., Muotri A., Yeo G., Warashina M., Lie D.C., Moore L., Nakashima K., Asashima M., Gage F.H. (2009) Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat. Neurosci*. **12**(9), 1097–1105.
153. Niklison-Chirou M.V., Agostini M., Amelio I., Melino G. (2020) Regulation of adult neurogenesis in mammalian brain. *Int. J. Mol. Sci*. **21**(14), 4869.
154. Bergsland M., Ramsköld D., Zaouter C., Klum S., Sandberg R., Muhr J. (2011) Sequentially acting Sox transcription factors in neural lineage development. *Genes Dev*. **25**(23), 2453–2464.
155. Suh H., Consiglio A., Ray J., Sawai T., D'Amour K.A., Gage F.H. (2007) *In vivo* fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of *Sox2*$^+$ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*. **1**(5), 515–528.
156. Su Z., Niu W., Liu M.L., Zou Y., Zhang C.L. (2014) *In vivo* conversion of astrocytes to neurons in the injured adult spinal cord. *Nat. Commun*. **5**, 3338.
157. Niu W., Zang T., Smith D.K., Vue T.Y., Zou Y., Bachoo R., Johnson J.E., Zhang C.L. (2015) SOX2 reprograms resident astrocytes into neural progenitors in the adult brain. *Stem Cell Reports*. **4**(5), 780–794.
158. Heinrich C., Bergami M., Gascon S., Lepier A., Viganò F., Dimou L., Sutor B., Berninger B., Gotz M. (2014) Sox2-mediated conversion of NG2 glia into induced neurons in the injured adult cerebral cortex. *Stem Cell Reports*. **3**(6), 1000–1014.
159. Iwafuchi-Doi M., Zaret K.S. (2016) Cell fate control by pioneer transcription factors. *Development*. **143**(11), 1833–1837.
160. Islam M.M., Smith D.K., Niu W., Fang S., Iqbal N., Sun G., Shi Y., Zhang C.L. (2015) Enhancer analysis unveils genetic interactions between TLX and SOX2 in neural stem cells and *in vivo* reprogramming. *Stem Cell Reports*. **5**(5), 805–815.
161. Karow M., Camp J.G., Falk S., Gerber T., Pataskar A., Gac-Santel M., Kageyama J., Brazovskaja A., Garding A., Fan W., Riedemann T., Casamassa A., Smiyakin A., Schichor C., Götz M., Tiwari V.K., Treutlein B., Berninger B. (2018) Direct pericyte-to-neuron reprogramming *via* unfolding of a neural stem cell-like program. *Nat. Neurosci*. **21**(7), 932–940.
162. Lujan E., Chanda S., Ahlenius H., Südhof T.C., Wernig M. (2012) Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**(7), 2527–2532.
163. Tian C., Ambroz R.J., Sun L., Wang Y., Ma K., Chen Q., Zhu B., Zheng J.C. (2012) Direct conversion of dermal fibroblasts into neural progenitor cells by a novel cocktail of defined factors. *Curr. Mol. Med*. **12**(2), 126–137.
164. Han D.W., Tapia N., Hermann A., Hemmer K., Höing S., Araúzo-Bravo M.J., Zaehres H., Wu G., Frank S., Moritz S., Greber B., Yang J.H., Lee H.T., Schwamborn J.C., Storch A., Schöler H.R. (2012) Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell*. **10**(4), 465–472.
165. Shibata M., Nakao H., Kiyonari H., Abe T., Aizawa S. (2011) MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by targeting multiple transcription factors. *J. Neurosci*. **31**(9), 3407–3422.
166. de Chevigny A., Coré N., Follert P., Gaudin M., Barbry P., Béclin C., Cremer H. (2012) miR-7a regulation of Pax6 controls spatial origin of forebrain dopaminergic neurons. *Nat. Neurosci*. **15**(8), 1120–1126.
167. Berger J., Berger S., Tuoc T.C., D'Amelio M., Cecconi F., Gorski JA., Jones K.R., Gruss P., Stoykova A. (2007) Conditional activation of Pax6 in the developing cortex of transgenic mice causes progenitor apoptosis. *Development*. **134**(7), 1311–1322.
168. Walcher T., Xie Q., Sun J., Irmler M., Beckers J., Öztürk T., Niessing D., Stoykova A., Cvekl A., Ninkovic J., Götz M. (2013) Functional dissection of the paired domain of Pax6 reveals molecular mechanisms of coordinating neurogenesis and proliferation. *Development*. **140**(5), 1123–1136.
169. Osumi N., Shinohara H., Numayama-Tsuruta K., Maekawa M. (2008) Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells*. **26**(7), 1663–1672.
170. Buffo A., Vosko M.R., Ertürk D., Hamann G.F., Jucker M., Rowitch D., Götz M. (2005) Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**(50), 18183–18188.

171. Georgala P.A., Carr C.B., Price D.J. (2011) The role of Pax6 in forebrain development. *Dev. Neurobiol.* **71**(8), 690–709.

172. Heins N., Malatesta P., Cecconi F., Nakafuku M., Tucker K.L., Hack M.A., Chapouton P., Barde Y.A., Götz M. (2002) Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat. Neurosci.* **5**(4), 308–315.

173. Sakakibara S., Imai T., Hamaguchi K., Okabe M., Aruga. J., Nakajima K., Yasutomi D., Nagata T., Kurihara Y., Uesugi S., Miyata T., Ogawa M., Mikoshiba K., Okano H. (1996) Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev. Biol.* **176**(2), 230–242.

174. Sakakibara S., Okano H. (1997) Expression of neural RNA-binding proteins in the post-natal CNS: implication of their roles in neural and glial cells development. *J. Neurosci.* **17**(21), 8300–8312.

175. Sakakibara S., Nakamura Y., Yoshida T., Shibata S., Koike M., Takano H., Ueda S., Uchiyama Y., Noda T., Okano H. (2002) RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**(23), 15194–15199.

176. Takasawa K., Kitagawa K., Yagita Y., Sasaki T., Tanaka S., Matsushita K., Ohstuki T., Miyata T., Okano H., Hori M., Matsumoto M. (2002) Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **22**(3), 299–307.

177. Huang C., Chan J.A., Schuurmans C. (2014) Proneural bHLH genes in development and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* **110**, 75–127.

178. Andersen J., Urbán N., Achimastou A., Ito A., Simic M., Ullom K., Martynoga B., Lebel M., Göritz C., Frisén J., Nakafuku M., Guillemot F.A. (2014) A transcriptional mechanism integrating inputs from extracellular signals to activate hippocampal stem cells. *Neuron.* **83**(5), 1085–1097.

179. Wapinski O.L., Vierbuchen T., Qu K., Lee Q.Y., Chanda S., Fuentes D.R., Giresi P.G., Ng Y.H., Marro S., Neff N.F., Drechsel D., Martynoga B., Castro D.S., Webb A.E., Südhof T.C., Brunet A., Guillemot F., Chang H.Y., Wernig M. (2013) Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons. *Cell.* **155**(3), 621–635.

180. Wapinski O.L., Lee Q.Y., Chen A.C., Li R., Corces M.R., Ang C.E., Treutlein B., Xiang C., Baubet V., Suchy F.P., Sankar V., Sim S., Quake S.R., Dahmane N., Wernig M., Chang H.Y. (2017) Rapid chromatin switch in the direct reprogramming of fibroblasts to neurons. *Cell Rep.* **20**(13), 3236–3247.

181. Treutlein B., Lee Q.Y., Camp J.G., Mall M., Koh W., Shariati S.A., Sim S., Neff N.F., Skotheim J.M., Wernig M., Quake S.R. (2016) Dissecting direct reprogramming from fibroblast to neuron using single-cell RNA-seq. *Nature.* **534**(7607), 391–395.

182. Ahlenius H., Chanda S., Webb A.E., Yousif I., Karmazin J., Prusiner S. B., Brunet A., Südhof T.C., Wernig M. (2016) FoxO3 regulates neuronal reprogramming of cells from postnatal and aging mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**(30), 8514–8519.

183. Webb A.E., Pollina E.A., Vierbuchen T., Urbán N., Ucar D., Leeman D.S., Martynoga B., Sewak M., RandoT.A., Guillemot F., Wernig M., Brunet A. (2013). FOXO3 shares common targets with ASCL1 genome-wide and inhibits ASCL1-dependent neurogenesis. *Cell Rep.* **4**(3), 477–491.

184. Torper O., Ottosson D.R., Pereira M., Lau S., Cardoso T., Grealish S., Parmar M. (2015) *In vivo* reprogramming of striatal NG2 glia into functional neurons that integrate into local host circuitry. *Cell Rep.* **12**(3), 474–481.

185. Marro S., Pang Z.P., Yang N., Tsai M.C., Qu K., Chang H.Y., Südhof T.C., Wernig M. (2011) Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. *Cell Stem Cell.* **9**(4), 374–382.

186. Mall M., Kareta M.S., Chanda S., Ahlenius H., Perotti N., Zhou B., Grieder S.D., Ge X., Drake S., Euong Ang C., Walker B.M., Vierbuchen T., Fuentes D.R., Brennecke P., Nitta K.R., Jolma A., Steinmetz L.M., Taipale J., Südhof T.C., Wernig M. (2017) Myt1l safeguards neuronal identity by actively repressing many non-neuronal fates. *Nature.* **544**(7649), 245–249.

187. Jessberger S., Toni N., Clemenson G.D. Jr., Ray J., Gage F.H. (2008) Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat. Neurosci.* **11**(8), 888–893.

188. Hagino-Yamagishi K., Saijoh Y., Ikeda M., Ichikawa M., Minamikawa-Tachino R., Hamada H. (1997) Predominant expression of Brn-2 in the postmitotic neurons of the developing mouse neocortex. *Brain Res.* **752**(1–2), 261–268.

189. Schonemann M.D., Ryan A.K., Erkman L., McEvilly R.J., Bermingham J., Rosenfeld M.G. (1998) POU domain factors in neural development. *Adv. Exp. Med. Biol.* **449**, 39–53.

190. Klemm J.D., Pabo C.O. (1996) Oct-1 POU domain-DNA interactions: cooperative binding of isolated subdomains and effects of covalent linkage. *Genes Dev.* **10**(1), 27–36.

191. Castro D.S., Skowronska-Krawczyk D., Armant O., Donaldson I.J., Parras C., Hunt C., Critchley J.A., Nguyen L., Gossler A., Göttgens B., Matter J.M., Guillemot F. (2006) Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev. Cell.* **11**(6), 831–844.

192. Mühleisen T.W., Leber M., Schulze T.G, Strohmaier J., Degenhardt F., Treutlein J., Mattheisen M., Forstner A.J., Schumacher J., Breuer R., Meier S., Herms S., Hoffmann P., Lacour A., Witt S.H., Reif A., Müller-Myhsok B., Lucae S., Maier W., Schwarz M., Vedder H., Kammerer-Ciernioch J., Pfennig A., Bauer M., Hautzinger M., Moebus S., Priebe L., Czerski P.M., Hauser J., Lissowska J., Szeszenia-Dabrowska N., Brennan P., McKay J.D., Wright A., Mitchell P.B., Fullerton J.M., Schofield P.R., Montgomery G.W., Medland S.E., Gordon S.D., Martin N.G., Krasnow V., Chuchalin A., Babadjanova G., Pantelejeva G., Abramova L.I., Tiganov A.S., Polonikov A., Khusnutdinova E., Alda M., Grof P.,

Rouleau G.A., Turecki G., Laprise C., Rivas F., Mayoral F., Kogevinas M., Grigoroiu-Serbanescu M., Propping P., Becker T., Rietschel M., Nöthen M.M., Cichon S. (2014) Genome-wide association study reveals two new risk loci for bipolar disorder. *Nat. Commun.* **5**, 3339.

193. McEvilly R.J., de Diaz M.O., Schonemann M.D., Hooshmand F., Rosenfeld M.G. (2002) Transcriptional regulation of cortical neuron migration by POU domain factors. *Science.* **295**(5559), 1528–1532.

194. Sugitani Y., Nakai S., Minowa O., Nishi M., Jishage K.-I., Kawano H., Mori K., Ogawa M., Noda T. (2002) Brn-1 and Brn-2 share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons. *Genes Dev.* **16**(14), 1760–1765.

195. Jaegle M., Ghazvini M., Mandemakers W., Piirsoo M., Driegen S., Levavasseur F., Raghoenath S., Grosveld F., Meijer D. (2003) The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development. *Genes Dev.* **17**(11), 1380–1391.

196. Morrison S.J. (2001) Neuronal differentiation: proneural genes inhibit gliogenesis. *Curr. Biol.* **11**(9), 349–351.

197. Marquardt T., Pfaff S.L. (2001) Cracking the transcriptional code for cell specification in the neural tube. *Cell.* **106**(6), 651–654.

198. Lai H.C., Johnson J.E. (2008) Neurogenesis or neuronal specification: phosphorylation strikes again! *Neuron.* **58**(1), 3–5.

199. Gascon S., Murenu E., Masserdotti G., Ortega F., Russo G.L., Petrik D., Deshpande A., Heinrich C., Karow M., Robertson S.P., Schroeder T., Beckers J., Irmler M., Berndt C., Angeli J.P., Conrad M., Berninger B., Gotz M. (2016) Identification and successful negotiation of a metabolic checkpoint in direct neuronal reprogramming. *Cell Stem Cell.* **18**(3), 396–409.

200. Schwab M.H., Bartholomae A., Heimrich B., Feldmeyer D., Druffel-Augustin S., Goebbels S., Naya F.J., Zhao S., Frotscher M., Tsai M.J., Nave K.A. (2000) Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX and BETA2/Neuro D) regulate terminal granule cell differentiation in the hippocampus. *J. Neurosci.* **20**(10), 3714–3724.

201. Guo Z., Zhang L., Wu Z., Chen Y., Wang F., Chen G. (2014) In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell.* **14**(2), 188–202.

202. Toresson H., Campbell K. (2001) A role for Gsh1 in the developing striatum and olfactory bulb of *Gsh2* mutant mice. *Development.* **128**(23), 4769–4780.

203. Waclaw R.R., Wang B., Pei Z., Ehrman L.A., Campbell K. (2009) Distinct temporal requirements for the homeobox gene *Gsx2* in specifying striatal and olfactory bulb neuronal fates. *Neuron.* **63**(4), 451–465.

204. Merkle F.T., Fuentealba L.C., Sanders T.A., Magno L., Kessaris N., Alvarez-Buylla A. (2014) Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nat. Neurosci.* **17**(2), 207–214.

205. Panganiban G., Rubenstein J.L. (2002) Developmental functions of the *Distal-less*/Dlx homeobox genes. *Development.* **129**(19), 4371–4386.

206. Cobos I., Calcagnotto M.E., Vilaythong A.J., Thwin M.T., Noebels J.L., Baraban S.C., Rubenstein J.L. (2005) Mice lacking *Dlx1* show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. *Nat. Neurosci.* **8**(8), 1059–1068.

207. Pei Z., Wang B., Chen G., Nagao M., Nakafuku M., Campbell K. (2011) Homeobox genes *Gsx1* and *Gsx2* differentially regulate telencephalic progenitor maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**(4), 1675–1680.

208. Li X., Jin P. (2010) Roles of small regulatory RNAs in determining neuronal identity. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**(5), 329–338.

209. Bian S., Hong J., Li Q., Schebelle L., Pollock A., Knauss J.L., Garg V., Sun T. (2013) MicroRNA cluster miR-17–92 regulates neural stem cell expansion and transition to intermediate progenitors in the developing mouse neocortex. *Cell Rep.* **3**(5), 1398–1406.

210. Dajas-Bailador F., Bonev B., Garcez P., Stanley P., Guillemot F., Papalopulu N. (2012) microRNA-9 regulates axon extension and branching by targeting Map1b in mouse cortical neurons. *Nat. Neurosci.* **15**(5), 697–699.

211. Sun G., Ye P., Murai K., Lang M.F., Li S., Zhang H., Li W., Fu C., Yin J., Wang A., Ma X., Shi Y. (2011) miR-137 forms a regulatory loop with nuclear receptor TLX and LSD1 in neural stem cells. *Nat. Commun.* **2**, 529.

212. Zhao C., Sun G., Li S., Lang M.F., Yang S., Li W., Shi Y. (2010) MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**(5), 1876–1881.

213. Liu C., Teng Z.Q., Santistevan N.J., Szulwach K.E., Guo W., Jin P., Zhao X. (2010) Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell Stem Cell.* **6**(5), 433–444.

214. Li H.S., Wang D., Shen Q., Schonemann M.D., Gorski J.A., Jones K.R., Temple S., Jan L.Y., Jan Y.N. (2003) Inactivation of Numb and Numblike in embryonic dorsal forebrain impairs neurogenesis and disrupts cortical morphogenesis. *Neuron.* **40**(6), 1105–1118.

215. Vo D.T., Qiao M., Smith A.D., Burns S.C., Brenner A.J., Penalva L.O.F. (2011) The oncogenic RNA-binding protein Musashi1 is regulated by tumor suppressor miRNAs. *RNA Biol.* **8**(5), 817–828.

216. Althoff K., Beckers A., Odersky A., Mestdagh P., Koster J., Bray I.M., Bryan K., Vandesompele J., Speleman F., Stallings R.L., Schramm A., Eggert A., Sprüssel A., Schulte J.H. (2013) MiR-137 functions as a tumor suppressor in neuroblastoma by downregulating KDM1A. *Int. J. Cancer.* **133**(5), 1064–1073.

217. Silber J., Lim D.A., Petritsch C., Persson A.I., Maunakea A.K., Yu M., Vandenberg S.R., Ginzinger D.G., James C.D., Costello J.F., Bergers G., Weiss W.A., Alvarez-Buylla A., Hodgson J.G. (2008) miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblas-

toma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med.* **6**, 14.

218. Tarantino C., Paolella G., Cozzuto L., Minopoli G., Pastore L., Parisi S., Russo T. (2010) miRNA 34a, 100, and 137 modulate differentiation of mouse embryonic stem cells. *FASEB J.* **24**(9), 3255–3263.
219. Jiang K., Ren C., Nair V.D. (2013) MicroRNA-137 represses Klf4 and Tbx3 during differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* **11**(3), 1299–1313.
220. Szulwach K.E., Li X., Smrt R.D., Li Y., Luo Y., Lin L., Santistevan N.J., Li W., Zhao X., Jin P. (2010) Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *J. Cell Biol.* **189**(1), 127–141.
221. Mahmoudi E., Cairns M.J. (2017) MiR-137: an important player in neural development and neoplastic transformation. *Mol. Psychiatry.* **22**(1), 44–55.
222. Sempere L.F., Freemantle S., Pitha-Rowe I., Moss E., Dmitrovsky E., Ambros V. (2004) Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* **5**(3), 13.
223. Krichevsky A.M., Sonntag K.-C., Isacson O., Kosik K.S. (2006) Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells.* **24**(4), 857–864.
224. Coolen M., Katz S., Bally-Cuif L. (2013) miR-9: a versatile regulator of neurogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 220.
225. Coolen M., Thieffry D., Drivenes Ø., Becker T. S., Bally-Cuif L. (2012) miR-9 controls the timing of neurogenesis through the direct inhibition of antagonistic factors. *Dev. Cell.* **22**(5), 1052–1064.
226. Zhao C., Sun G., Li S., Shi Y. (2009) A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**(4), 365–371.
227. Yoo A.S., Staahl B.T., Chen L., Crabtree G.R. (2009). MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature.* **460**(7255), 642–646.
228. Kageyama R., Ohtsuka T., Kobayashi T. (2008) Roles of Hes genes in neural development. *Dev. Growth Differ.* **50**(Suppl. 1), 97–103.
229. Bonev B., Pisco A., Papalopulu N. (2011). MicroRNA-9 reveals regional diversity of neural progenitors along the anterior-posterior axis. *Dev. Cell.* **20**(1), 19–32.
230. La Torre A., Georgi S., Reh T.A. (2013) Conserved microRNA pathway regulates developmental timing of retinal neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**(26), 2362–2370.
231. Otaegi G., Pollock A., Hong J., Sun T. (2011) MicroRNA miR-9 modifies motor neuron columns by a tuning regulation of FoxP1 levels in developing spinal cords. *J. Neurosci.* **31**(3), 809–818.
232. Cheng L.C., Pastrana E., Tavazoie M., Doetsch F. (2009) miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat. Neurosci.* **12**(4), 399–408.
233. Veremeyko T., Kuznetsova I.S., Dukhinova M., Yung A.W.Y., Kopeikina E., Barteneva N.S., Ponomarev E.D. (2019) Neuronal extracellular microRNAs miR-124 and miR-9 mediate cell-cell communication between neurons and microglia. *J. Neurosci. Res.* **97**(2), 162–184.
234. Ponomarev E.D., Veremeyko T., Barteneva N., Krichevsky A.M., Weiner H.L. (2011) MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages *via* the C/EBP-α-PU.1 pathway. *Nat. Med.* **17**(1), 64–70.
235. Qin H., Zhao A., Fu X. (2017) Small molecules for reprogramming and transdifferentiation. *Cell Mol. Life Sci.* **74**(19), 3553–3575.
236. Samoilova E.M., Kalsin V.A., Kushnir N.M., Chistyakov D.A., Troitskiy A.V., Baklaushev V.P. (2018) Adult neural stem cells: basic research and production strategies for neurorestorative therapy. *Stem Cells Int.* **2018**, 4835491.
237. Cheng L., Hu W., Qiu B., Zhao J., Yu Y., Guan W., Wang M., Yang W., Pei G. (2014) Generation of neural progenitor cells by chemical cocktails and hypoxia. *Cell Res.* **24**(6), 665–679.
238. Fu Y., Huang C., Xu X., Gu H., Ye Y., Jiang C., Qiu Z., Xie X. (2015) Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Res.* **25**(9), 1013–1024.
239. Samoilova E.M., Revkova V.A., Brovkina O.I., Kalsin V.A., Melnikov P.A., Konoplyannikov M.A., Galimov K.R., Nikitin A.G., Troitskiy A.V., Baklaushev V.P. (2019) Chemical reprogramming of somatic cells in neural direction: myth or reality? *Bull. Exp. Biol. Med.* **167**(4), 546–555.
240. Ladewig J., Mertens J., Kesavan J., Doerr J., Poppe D., Glaue F., Herms S., Wernet P., Kögler G., Müller F.J., Koch P., Brüstle O. (2012) Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nat. Methods.* **9**(6), 575–578.
241. Wu X., Wang S., Li M., Li J., Shen J., Zhao Y., Pang J., Wen Q., Chen M., Wei B., Kaboli P. J., Du F., Zhao Q., Cho C. H., Wang Y., Xiao Z., Wu X. (2020) Conditional reprogramming: next generation cell culture. *Acta Pharm. Sin. B.* **10**(8), 1360–1381.
242. Bettio L.E.B., Gil-Mohapel J., Patten A.R., O'Rourke N.F., Hanley R.P., Gopalakrishnan K., Wulff J.E., Christie B.R. (2017) Effects of Isx-9 and stress on adult hippocampal neurogenesis: experimental considerations and future perspectives. *Neurogenesis* (Austin). **4**(1), e1317692.
243. Li H., Radford J.C., Ragusa M.J., Shea K.L., McKercher S.R., Zaremba J.D., Soussou W., Nie Z., Kang Y.J., Nakanishi N., Okamoto S., Roberts A.J., Schwarz J.J., Lipton S.A. (2008) Transcription factor MEF2C influences neural stem/progenitor cell differentiation and maturation *in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**(27), 9397–9402.
244. Li X., Zuo X., Jing J., Ma Y., Wang J., Liu D., Zhu J., Du X., Xiong L., Du Y., Xu J., Xiao X., Wang J., Chai Z., Zhao Y., Deng H. (2015) Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neuros. *Cell Stem Cell.* **17**(2), 195–203.
245. Potthoff M.J., Olson E.N. (2007) MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development.* **134**(23), 4131–4140.

246. Herdy J., Schafer S., Kim Y., Ansari Z., Zangwill D., Ku M., Paquola A., Lee H., Mertens J., Gage F.H. (2019) Chemical modulation of transcriptionally enriched signaling pathways to optimize the conversion of fibroblasts into neurons. *eLife*. **8**, e41356.

247. Führmann T., Tam R.Y., Ballarin B., Coles B., Elliott Donaghue I., van der Kooy D., Nagy A., Tator C.H., Morshead C.M., Shoichet M.S. (2016) Injectable hydrogel promotes early survival of induced pluripotent stem cell-derived oligodendrocytes and attenuates longterm teratoma formation in a spinal cord injury model. *Biomaterials*. **83**, 23–36.

248. Guan X., Avci-Adali M., Alarçin E., Cheng H., Kashaf S.S., Li Y., Chawla A., Jang H.L., Khademhosseini A. (2017) Development of hydrogels for regenerative engineering. *Biotechnol. J.* **12**(5). https://doi.org/10.1002/biot.201600394

249. Silva J., Bento A.R., Barros D., Laundos T.L., Sousa S.R., Quelhas P., Sousa M.M., Pêgo A.P., Amaral I.F. (2017) Fibrin functionalization with synthetic adhesive ligands interacting with α6β1 integrin receptor enhance neurite outgrowth of embryonic stem cell-derived neural stem/progenitors. *Acta Biomater*. **59**, 243–256.

250. Goh K.L., Holmes D.F. (2017) Collagenous extracellular matrix biomaterials for tissue engineering: lessons from the common sea urchin tissue. *Int. J. Mol. Sci.* **18**(5), 901.

251. Baklaushev V.P., Bogush V.G., Kalsin V.A., Sovetnikov N.N., Samoilova E.M., Revkova V.A., Sidoruk K.V., Konoplyannikov M.A., Timashev P.S., Kotova S.L., Yushkov K.B., Averyanov A.V., Troitskiy A.V., Ahlfors J.E. (2019) Tissue engineered neural constructs composed of neural precursor cells, recombinant spidroin and PRP for neural tissue regeneration. *Sci. Rep.* **9**(1), 3161.

TRANSCRIPTION FACTORS OF DIRECT NEURONAL REPROGRAMMING IN ONTOGENESIS AND *EX VIVO*

E. M. Samoilova[1, *], V. V. Belopasov[2], and V. P. Baklaushev[1]

[1]*Federal Scientific and Clinical Center of Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, 115682 Russia*

[2]*Astrakhan State Medical University, Astrakhan, 414000 Russia*

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

Direct reprogramming technology allows obtaining several specific types of cells, including specialized neurons, from readily available autologous somatic cells. This presents unique opportunities for the development of personalized medicine, from *in vitro* models of hereditary and degenerative neurological diseases, to novel neuroregenerative technologies. Over the past decade, a plethora of protocols for primary reprogramming has been published, yet reproducible generation of homogeneous populations of neuronally reprogrammed cells still remains a challenge. All existing protocols, however, use transcription factors that are involved in embryonic neurogenesis. This, presumably, may constitute the key issue for obtaining highly efficient and reproducible protocols for *ex vivo* neurogenesis. An analysis of the functional features of transcription factors in embryonic and adult neurogenesis may not only lead to improvement of reprogramming protocols, but also, by analyzing cell markers, may determine exactly what stage of neurogenesis a particular protocol will reach. The purpose of this review is to characterize the general factors that play a key role in neurogenesis for embryonic and adult periods, as well as in cellular reprogramming, and to assess correspondence of the cell forms obtained as a result of cell reprogramming to the ontogenetic series of the nervous system, from pluripotent stem cells to specialized neurons.

Keywords: embryonic neurogenesis, adult neurogenesis, morphogenic factors, proneuronal factors, direct reprogramming, neural stem cells, neural progenitor cells, induced neurons, PAX6, MSI1, GSX2, DLX, ASCL1, NGN2, BRN2, MYT1l, NEUROD1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 5, с. 734–747

ОБЗОРЫ

УДК 577.24

БЕТА-АМИЛОИД, ТАУ-БЕЛОК И НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ: ПОПЫТКА ОБЪЕДИНЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ГИПОТЕЗ ПАТОГЕНЕЗА БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2021 г. Д. Г. Гарбуз[a], *, О. Г. Зацепина[a], М. Б. Евгеньев[a]

[a] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: dgarbuz@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.01.2021 г.
После доработки 04.03.2021 г.
Принята к публикации 05.03.2021 г.

Болезнь Альцгеймера (БА) – нейродегенеративное заболевание, неизбежно приводящее к деменции и гибели пациентов. На сегодняшний день не существует патогенетически обоснованных способов профилактики и лечения БА, а используемые схемы носят симптоматический характер и не способны значительно замедлить развитие деменции. Основной причиной нейродегенеративных изменений при БА долгое время считалось накопление в тканях головного мозга, в первую очередь гиппокампа и фронтальной коры, β-амилоидного пептида (Aβ) – склонного к спонтанной агрегации и обладающего нейротоксическими свойствами продукта процессинга сигнального белка APP (Amyloid Precursor Protein). Однако попытки терапии БА, основанные на снижении продукции и агрегации Aβ, не дали значимых клинических результатов. В настоящее время появляется все больше аргументов в пользу того, что гиперпродукция Aβ это, в большинстве случаев, не первопричина, а сопутствующее событие патологических процессов в ходе развития спорадической формы БА. На первый план выходит концепция нейровоспаления, предполагающая, что ведущую роль в инициации и развитии БА играют воспалительные реакции, причем как в тканях головного мозга, так и на периферии. Гипотеза о ключевой роли нейровоспаления в патогенезе БА открывает новые возможности для поиска путей лечения и профилактики этого социально значимого заболевания.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, нейродегенерация, β-амилоид, тау-белок, нейровоспаление

DOI: 10.31857/S0026898421050049

ВВЕДЕНИЕ

Термин “протеинопатии” объединяет ряд заболеваний, при которых наблюдается агрегация тех или иных белков в результате их гиперпродукции, мутаций, приводящих к изменению первичной структуры, или нарушений фолдинга [1–5]. Протеинопатии нервной системы, или нейродегенеративные заболевания, характеризуются постепенно прогрессирующей гибелью нервных клеток с последующими когнитивными и/или моторными нарушениями. Среди нейродегенеративных заболеваний наибольшее социально-экономическое значение имеет болезнь Альцгеймера (БА) [6, 7]. Течение БА носит затяжной характер с неуклонным, длящимся годами ухудшением состояния пациентов. При БА наблюдается прогрессирующая потеря памяти, когнитивные нарушения и развитие деменции. Исходом БА неизбежно является гибель пациентов (как правило, вследствие сопутствующих осложнений, таких как пневмония, пролежни и др.).

Типичная форма БА (спорадическая старческая форма) развивается обычно у лиц старше 65 лет. По состоянию на 2000 г. БА встречается у 1.6% населения в возрасте 65–74 лет, в группе 75–84 лет количество больных достигает 16%, а у лиц старше 84 лет увеличивается до 42%. Прогнозируется неизбежный рост заболеваемости, в первую очередь, в развитых странах, как следствие увеличения продолжительности жизни [6–8]. Помимо старческой формы БА, существует семейная (пресенильная) форма, которая связана с генетической предрасположенностью и характеризуется ранним развитием (в 45–50 лет) и агрессивным течением [9–12]. Диагностика, лечение и уход за больными БА представляют серьезную проблему для экономики развитых стран [7, 13], при том что сколько-нибудь эффективные средства лечения БА до настоящего времени отсутствуют [14–16].

Основной причиной развития БА считается накопление в тканях мозга нерастворимых агрегатов так называемого Aβ-пептида (β-амилоида,

далее Aβ). В настоящее время выдвинуты также альтернативные гипотезы, в которых ключевым фактором развития БА считаются агрегация гиперфосфорилированного тау-белка (таупатия), хроническое воспаление тканей головного мозга (нейровоспаление) или накопление мутаций в мтДНК, приводящее к дисфункции дыхательной цепи митохондрий и развитию окислительного стресса [10, 17, 18]. Наиболее перспективным представляется объединение нескольких гипотез (β-амилоидной, гипотезы таупатии и постулирующей ведущую роль нейровоспаления) в единую концепцию.

β-АМИЛОИДНАЯ ГИПОТЕЗА – ПЕРВАЯ ПОПЫТКА ПОНЯТЬ ПРИЧИНУ РАЗВИТИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Ведущий патоморфологический признак, встречающийся в 100% случаев БА и описанный в 1907 г. А. Альцгеймером, по имени которого впоследствии было названо заболевание, – образование так называемых сенильных бляшек, выявляемых окрашиванием посмертных гистологических срезов мозга больных. Впоследствии показали, что бляшки состоят из фибриллярных агрегатов Aβ длиной 40–42 а.о., имеющих массу 4 кДа. β-Амилоид образуется в результате протеолиза белка APP (amyloid precursor protein), трансмембранного белка, функции которого изучены недостаточно для полного понимания его роли. Известно, что APP участвует в межклеточных коммуникациях в ходе развития нервной системы и формирования синапсов [19]. Существуют два альтернативных пути процессинга APP с участием трех эндопротеаз – α-, β- и γ-секретаз. В первом, неамилоидогенном, пути секретируемая форма APP (эктодомен) и короткий пептид, обозначаемый как p3, генерируются путем расщепления α- и γ-секретазами; посредством амилоидогенного пути образуются секретируемая форма APP и набор пептидов длиной от 30 до 51 а.о. Кроме того, оба пути протеолиза APP генерируют внутриклеточный фрагмент AICD (Amyloid precursor protein Intracellular Cytoplasmic/C-terminal Domain), участвующий в различных сигнальных путях и напоминающий внутриклеточный домен, отщепляющийся при процессинге белка Notch [20]. У здоровых людей (без БА) наиболее представлены три формы Aβ-пептидов: $Aβ_{40}$ (50%), $Aβ_{38}$ (16%) и $Aβ_{42}$ (10%) [21]. За протеолиз APP по амилоидогенному пути отвечают β- и γ-секретазы [19]. Функции Aβ в течение долгого времени не были известны; в основном Aβ-пептиды рассматривали как “молекулярный мусор” – побочный продукт процессинга APP, главную роль в котором играет расщепление белка-предшественника на внеклеточный и внутриклеточный фрагменты, участвующие в межклеточных коммуникациях. В настоящее время получены данные об антимикробной активности Aβ-пептидов, позволяющие рассматривать их в качестве одного из компонентов системы врожденного иммунитета [22, 23].

Токсичность Aβ для нейронов показана *in vitro* и *in vivo* [24, 25]. Известно, что Aβ-пептиды, преимущественно $Aβ_{42}$ и в меньшей степени $Aβ_{40}$, склонны к агрегации и образованию нерастворимых фибрилл [10, 26]. Сенильные бляшки, обнаруживаемые в мозгу пациентов, умерших от БА, состоят преимущественно из фибриллярных отложений Aβ. В настоящее время известно, что образованию Aβ-фибрилл предшествует олигомеризация растворимых β-амилоидных пептидов, при этом растворимые олигомеры более токсичны для нейронов, чем крупные нерастворимые фибриллы [25, 27, 28]. Ключевое значение накопления и агрегации Aβ подтверждалось данными, полученными на пациентах с пресенильной (семейной) формой БА. Эта форма заболевания составляет до 5–10% от общего количества случаев БА, носит семейный характер и обусловлена мутациями в генах *APP* и пресенилинов (компонентов γ-секретазного комплекса), приводящими к гиперпродукции Aβ или образованию Aβ-пептидов с повышенной склонностью к агрегации [29–32]. Расположение гена *APP* на хромосоме 21 обусловливает повышенную частоту и раннее развитие БА у больных синдромом Дауна (трисомия по хромосоме 21) как следствие увеличения копийности гена *APP* [33]. Известны также мутации гена *APP*, оказывающие противоположный эффект и статистически значимо снижающие риск развития БА [34]. Кроме того, БА ассоциирована с некоторыми эпигенетическими изменениями, например, со снижением уровня метилирования ДНК в области промотора гена *APP* [35, 36].

На основании изучения наследственных форм БА и синдрома Дауна сформулирована гипотеза “амилоидного каскада” (она же амилоидная гипотеза) [37–39], остающаяся популярной и сегодня. Предполагалось, что β-амилоид, накапливающийся преимущественно в фибриллярной форме, сам по себе оказывает токсический эффект, приводящий к повреждению и гибели нейронов [10, 37]. В дальнейшем оказалось, что гораздо более высокой токсичностью обладают растворимые мономеры и олигомеры Aβ [25, 27, 28, 40–42]. По современным представлениям токсическое действие избыточного количества Aβ-пептида обусловлено его прямым взаимодействием с рядом белков-рецепторов как на поверхности, так и в цитоплазме нейронов. Показано, что мономерная форма Aβ взаимодействует с комплексом α1β1 Na,K-АТРазы, ингибируя ее активность, что приводит к нарушению трансмембранного потенциала нейронов [41, 42]. Олигомеры Aβ взаимодействуют с адренергическим рецептором α2A, увеличивая его активность, что приводит к активации киназы

3β-гликогенсинтазы (GSK-3β) и последующему гиперфосфорилированию тау-белка (см. ниже) [43]. Повышенная концентрация Aβ способствует гиперактивации NMDA-рецепторов (эксайтотоксичности), вызывая нарушение гомеостаза клеточного кальция [44]. Эффектами токсического действия Aβ считаются также нарушения холинергической системы, окислительный стресс и др. Все эти и другие изменения приводят к нарушению долговременной потенциации, повреждению синапсов и нейродегенерации путем апоптоза и некроза [45].

ГИПЕРФОСФОРИЛИРОВАНИЕ И АГРЕГАЦИЯ ТАУ-БЕЛКА – ВТОРОЕ КЛЮЧЕВОЕ СОБЫТИЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Второй характерный морфологический признак БА – нейрофибриллярные клубки (Neurofibrillary tangles, NFT), которые образуются в цитоплазме нейронов (особенно в аксоплазме) и представляют собой нерастворимые филаменты, состоящие главным образом из гиперфосфорилированного тау-белка (относящегося к группе белков, ассоциированных с микротрубочками) [46–48]. Нарушения функций тау-белка приводят к потере стабильности и деполимеризации микротрубочек; разрушение микротрубочек вызывает разобщение внутриклеточного транспорта в цитоплазме, потерю синапсов и, в конечном итоге, гибель нервных клеток. Образование агрегатов Aβ сопровождается агрегацией тау-белка и предшествует развитию структурных нарушений в тканях головного мозга на более поздних стадиях заболевания. Открытым остается вопрос о взаимосвязи между накоплением олигомеров и агрегатов Aβ и гиперфосфорилированием тау с последующей агрегацией, поскольку Aβ – это секретируемый пептид, который накапливается в основном в межклеточном пространстве, а тау – белок внутриклеточный. Одна из предложенных моделей рассматривает гиперфосфорилирование тау-белка в качестве основного пускового механизма его агрегации. Показано, что в фосфорилировании тау участвуют протеинкиназы: Ca^{2+}/кальмодулинзависимая протеинкиназа (CaMKII), протеинкиназа C (PKC), cAMP-зависимая протеинкиназа (PKA), GSK-3β, киназы семейства MAPK: ERK2, JNK и p38/SAPK (протеинкиназы, активируемые стрессом) [20, 46, 49–51]. Активность этих протеинкиназ повышается при развитии БА, возможно, как следствие реакции на образование олигомеров Aβ, либо в ответ на воспаление в тканях головного мозга. Одним из возможных путей активации протеинкиназ, участвующих в фосфорилировании тау, считается гиперактивация рецепторов глутамата, вызываемая прямым взаимодействием с $Aβ_{42}$. В результате этого наблюдается активация фосфолипазы C, выход ионов Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума и активация PKC [52]. Кроме того, в ходе развития БА GSK-3β активируется через адренорецептор α2A после его взаимодействия с Aβ [43]. Таким образом, причиной потери синаптической активности и апоптоза нейронов может быть не прямой повреждающий эффект агрегатов Aβ, а длительный постадийный процесс индукции сигнальных каскадов, приводящих к гиперфосфорилированию и постепенной агрегации тау, которая вызывает нарушение аксонального транспорта с последующим разрушением синапсов и гибелью нервных клеток.

Альтернативная гипотеза постулирует прионные свойства некоторых форм Aβ (преимущественно $Aβ_{42}$, с определенными особенностями третичной структуры) и тау-белка с нарушенной трехмерной структурой, которые таким образом могут индуцировать патологическое сворачивание и агрегацию как других молекул Aβ, так и тау-белка и некоторых других белков (в частности PrP^C) [53, 54]. Наибольшей склонностью к индукции отложения амилоида обладает пептид $Aβ_{42}$, изомеризованный по остатку аспарагиновой кислоты (Asp7) [55]. Показано, что некоторое количество Aβ может проникать через мембраны либо захватываться нейронами по механизму эндоцитоза и, по-видимому, таким образом прямо взаимодействовать с тау. В опытах *in vitro* показано взаимодействие Aβ и тау, сопровождающееся олигомеризацией тау [56–58]. Инъекции Aβ в гиппокамп или правое полушарие мозга самцов трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный APP человека, ускоряли агрегацию Aβ трансгенного происхождения. При этом агрегация Aβ наблюдается сначала в непосредственной близости от места введения, а затем отложения Aβ распространяются вдоль аксонов на области мозга, связанные с гиппокампом. Введение в мозг мутантного тау-белка, имеющего повышенную склонность к агрегации, вызывает распространение образования NFT в коре мозга мышей, экспрессирующих человеческий тау-белок дикого типа, не образующий спонтанно агрегаты [59–61]. Имеются убедительные доказательства того, что β-амилоид и микроагрегаты тау-белка способны индуцировать развитие энцефалопатий в результате ятрогенной передачи в ходе хирургических операций на головном мозге, при использовании загрязненных инструментов, либо донорских материалов с примесями β-амилоида и агрегатов тау [62–67]. Следует отметить, что, хотя в описанных случаях гипотетической ятрогенной передачи β-амилоида в мозгу пациентов наблюдалась агрегация Aβ, а в некоторых случаях тау, это приводило к развитию болезни Крейтцфельда–Якоба либо ангиоэнцефалопатии (Cerebral amyloid angiopathy, CAA, при

которой β-амилоид откладывается в стенках мелких сосудов мозга), а не классической БА [62, 64]. Таким образом, первоначальное повышение уровня Aβ может играть роль триггера, запускающего каскад взаимодействий, приводящих к массированному накоплению агрегатов сначала самого β-амилоида, а затем тау-белка, что, в свою очередь, ведет к гибели нейронов и потере функций высших отделов центральной нервной системы. Изучение механизмов взаимодействия β-амилоида и тау-белка, включая идентификацию их рецепторов в нейрональных клетках, открывает новые возможности для поиска фармацевтических препаратов, препятствующих накоплению этих токсичных продуктов в клетках и в межклеточном пространстве [62].

β-АМИЛОИДНАЯ ГИПОТЕЗА – АРГУМЕНТЫ "ЗА" И "ПРОТИВ"

Приведенные выше данные достаточно убедительно свидетельствуют о важной роли различных форм Aβ в развитии БА. При этом сама амилоидная гипотеза не объясняет причин повышения продукции Aβ при спорадической форме БА, не связанной с генетической предрасположенностью. Ясно, однако, что основным фактором, способствующим развитию БА, является преклонный возраст. Возможно, повышенное содержание различных форм β-амилоида в мозгу пожилых людей связано не столько с их гиперпродукцией, сколько с возрастным снижением эффективности различных систем, обеспечивающих утилизацию Aβ. В качестве факторов, способствующих повышению концентрации $A\beta_{42}$, называют возрастные нарушения систем фолдинга белков (в частности, снижение экспрессии белков-шаперонов семейства Hsp70) [69], уменьшение эффективности утилизации Aβ-пептидов с участием микроглии [70], а также снижение содержания в мозгу неприлизина – металлопротеазы, обеспечивающей расщепление Aβ [71, 72]. Есть данные о том, что развитие спорадической БА может провоцироваться накоплением токсичного изомера $A\beta_{42}$, содержащего изоаспарагин-7, количество которого увеличивается за счет возрастного снижения каталитической активности *L*-изоаспартил-(*D*-аспартил)-метилтрансферазы (PIMT), ответственной за репарацию остатков изоаспарагина [73, 74]. Рассматриваются также гипотезы о ведущей роли именно повышения продукции Aβ в развитии БА вследствие воспалительных процессов в тканях мозга либо накопления с возрастом мутаций мтДНК, что приводит к нарушению транспорта электронов по дыхательной цепи, повышению продукции активных форм кислорода (АФК) и окислительному стрессу, который запускает множество сигнальных каскадов, приводящих в том числе к повышению процессинга APP по амилоидному пути [18]. Однако, хотя важная роль β-амилоида в патогенезе БА не подлежит сомнению, в настоящее время получены многочисленные результаты, ставящие под сомнение тезис о повышении уровня Aβ как о первопричине спорадической БА [75]. Во-первых, наиболее склонную к агрегации форму β-амилоида ($A\beta_{42}$) находят не только при БА, но и у здоровых индивидов. Так, ткани головного мозга до 40% престарелых, не страдающих БА индивидов, содержат β-амилоидные бляшки, количество которых не уступает количеству бляшек у лиц с клиническими проявлениями БА [76, 77]. Во-вторых, β-амилоидные включения могут обнаруживаться во всех отделах мозга, но дегенерации при БА подвергаются только строго определенные структуры, в частности, определенные участки коры и гиппокампа. В-третьих, амилоидная гипотеза не рассматривает первопричины гиперпродукции Aβ при спорадической форме БА у лиц, не имеющих мутаций в генах, участвующих в продукции Aβ. Между началом образования β-амилоидных агрегатов и появлением первых симптомов болезни проходит длительное время (годы и десятки лет) [8, 78]. Прямое токсическое действие Aβ на нейроны показано в опытах *in vitro* на нейрональных культурах и *in vivo* путем инъекций в мозг подопытных животных. Однако токсический эффект наблюдали только при использовании Aβ в концентрации порядка 1 мкМ, т.е. в 1000 раз превышающей нормальное содержание β-амилоида в мозгу больных [75]. Наконец, ряд терапевтических подходов, направленных на β-амилоид в качестве мишени, например, иммунизация больных $A\beta_{42}$, а также использование моноклональных антител к различным формам Aβ, потерпели неудачу на стадии клинических испытаний. В некоторых клинических исследованиях показано снижение уровня Aβ в мозгу пациентов, но при этом не наблюдали восстановления когнитивных функций и улучшения состояния больных. Также потерпело неудачу применение ингибиторов β- и γ-секретаз, направленное на уменьшение продукции Aβ. В ряде случаев клинические испытания были прекращены досрочно в силу обнаружения серьезных побочных эффектов. Неэффективными оказались и прямые ингибиторы олигомеризации и агрегации Aβ [14, 76, 77, 79, 80]. С другой стороны, неудачи применения "анти-β-амилоидной" стратегии при БА могут объясняться тем, что, как правило, терапия начинается не раньше развития клинических признаков, когда нейродегенерация зашла уже достаточно далеко, и изменения необратимы. Данные за и против классической β-амилоидной гипотезы суммированы в табл. 1.

Таблица 1. Аргументы в поддержку β-амилоидной гипотезы и основные возражения

ЗА	ПРОТИВ
Мутации в APP, β- и γ-секретазах увеличивают риск развития БА	Остаются под вопросом исходные причины повышения уровня Aβ при сенильной (спорадической) форме БА при отсутствии мутаций в генах *APP* и секретаз
Повышен риск раннего развития БА при трисомии по хромосоме 21 (болезнь Дауна)	$Aβ_{42}$ и β-амилоидные агрегаты обнаруживаются в мозгу клинически здоровых индивидов
Известны мутации APP, снижающие риск развития БА	Между началом накопления и агрегации Aβ и последующими изменениями в мозгу проходят годы и десятки лет
Имеются данные о прионной природе β-амилоида	У пациентов, получавших терапию препаратами донорского гормона роста, загрязненного β-амилоидом, развиваются болезнь Крейтцфельда–Якоба или энцефалоангиопатии, а не классическая БА
Введение Aβ *in vitro* и *in vivo* приводит к развитию цитотоксичности, накоплению амилоида и развитию клинических признаков у лабораторных животных	Концентрация вводимого Aβ на порядки превышает значения, выявляемые в мозгу при естественном развитии БА
Максимальной токсичностью обладают не Aβ-фибриллы, а олигомерные формы	Поражаются только отдельные участки мозга, хотя агрегацию Aβ находят во всех отделах
Существуют изоформы Aβ с повышенной токсичностью	Попытки лечения БА, направленные на снижение продукции Aβ или блокирующие его олигомеризацию, терпят неудачу

РОЛЬ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА – ВОЗМОЖНАЯ ПЕРВОПРИЧИНА НАКОПЛЕНИЯ β-АМИЛОИДА

В течение двух последних десятилетий большое внимание привлекают воспалительные процессы в ЦНС, развитие которых, как показано независимо многими авторами, связано с патогенезом БА. Оказалось, что для БА характерно хроническое воспаление тканей головного мозга в виде активации микроглии и астроцитов, секреции ряда провоспалительных цитокинов, оксида азота (NO) и повышения уровня АФК, оказывающих цитотоксический эффект на нейроны. Также в мозгу при БА повышается уровень экспрессии рецепторов, участвующих в развитии воспалительного ответа. У пациентов с БА происходит повышение продукции TNF-α, IL-1, IL-6 и компонентов системы комплемента как в мозгу, так и на периферии (в составе плазмы крови), а также возрастает количество мРНК и рецепторов TLR4, активность NF-κB и уровень АФК [17, 81–85]. Сходные данные получены на трансгенных мышах, экспрессирующих мутантные формы APP и пресенилинов, и склонных к накоплению Aβ-агрегатов и развитию когнитивных нарушений, соответствующих симптомам БА у человека [86]. Кроме того, стало известно, что вероятность развития спорадической формы БА коррелирует с некоторыми аллельными вариантами генов, участвующих в иммунном ответе – TLR4, CD14 (корецептор TLR4), CD33, TREM2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2), CR1 (рецептор комплемента) и IL-6 [83, 84, 87, 88]. Подавление синтеза TNF-α с помощью ингибитора 3,6'-дитиоталидомида или лентивирусных RNAi-конструкций замедляет нейродегенеративные процессы и восстанавливает когнитивные функции (в первую очередь, способность к запоминанию и обучению) у модельных животных [82, 89]. У мышей с генетически детерминированной гиперпродукцией IL-6 астроцитами, начиная с 6-месячного возраста развивается прогрессирующая нейродегенерация [90], что доказывает цитотоксическое действие на нейроны в ходе воспаления. Кроме того, ряд работ (ретроспективные исследования и прямые клинические испытания) показывает, что длительное применение нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) замедляет развитие БА у пациентов и оказывает положительный эффект на модельных животных [91–94]. Воспаление в ЦНС способно вызывать многие эффекты, приписываемые β-амилоиду: активацию протеинкиназных каскадов, приводящих к гиперфосфорилированию тау-белка, повышенную активность NMDA-рецепторов, окислительный стресс и др. [95].

Имеются убедительные данные о взаимосвязях между развитием нейровоспаления и накоплением β-амилоида. Показано, что олигомеры и фибриллярные агрегаты Aβ способны индуцировать нейровоспаление посредством активации

микроглии с последующей секрецией провоспалительных цитокинов и простагландинов [96]. Таким образом, накопление Aβ может способствовать апоптозу нейронов не только через каскады с участием тау-белка, но также путем инициации хронического воспаления в тканях головного мозга. Показано, что за узнавание мономерной формы Aβ отвечают рецепторы TLR2/4, способные выступать индукторами экспрессии провоспалительных цитокинов [84, 97]. Многочисленные экспериментальные и эпидемиологические работы заставляют предположить, что воспалительные реакции не только обусловлены накоплением Aβ, но и могут действовать как первичный пусковой механизм в случае спорадической формы БА. Показано, что БА с высокой вероятностью может развиваться как отдаленное последствие травмы головного мозга, в том числе хирургических операций [98–100]. В некоторых случаях речь может идти не только о первичном нейровоспалении, но и о хронических воспалительных процессах на периферии вследствие персистирующих инфекций или метаболических расстройств. Положительные данные в этом направлении получены в экспериментах на мышах. Например, регулярные интраперитонеальные инъекции липополисахаридов (ЛПС) или поли(I:C) (в качестве аналога вирусных РНК) вызывали накопление $Aβ_{42}$ в гиппокампе и коре головного мозга мышей, активацию астроцитов и снижение когнитивных способностей [101–103]. Эпидемиологические исследования обнаруживают корреляцию между БА и предшествующими инфекциями, вызывающими хронические воспалительные реакции [8]. Показано, что существенным фактором риска развития БА является герпесвирусная инфекция (особенно вызванная герпесвирусами типа 1 и 2). Герпесвирусная ДНК с высокой частотой обнаруживается в составе β-амилоидных бляшек, а размножение вируса в нейрональной культуре индуцирует накопление Aβ [104–106]. Развитие ВИЧ-инфекции часто сопровождается так называемым ВИЧ-ассоциированным нейрокогнитивным расстройством (HIV-associated neurocognitive disorder, HAND). При этом в мозгу пациентов повышается синтез Aβ и образуются β-амилоидные бляшки. ВИЧ персистирует в микроглии и астроцитах головного мозга и вызывает повышение продукции провоспалительных цитокинов: IL-6, IL-1, TNF-α и IL-8 [107]. Опубликованы также сообщения о возможной связи цитомегаловируса и вируса гепатита С с развитием БА [108]. Кроме того, описана ассоциация БА с парадонтитом, хламидийными инфекциями и некоторыми другими воспалительными заболеваниями, вызываемыми *Chlamydia pneumoniae*, *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola* [16, 109–112]. Наконец, метаболические нарушения, приводящие к развитию воспалительных реакций (классический пример – сахарный диабет), существенно повышают риск БА [45, 113]. В настоящее время накапливаются данные о том, что при хронических воспалительных процессах на периферии возможна реакция головного мозга в виде активации клеток микроглии и астроцитов и секреции провоспалительных цитокинов. С одной стороны, известно, что головной мозг, отделенный от кровеносной системы гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ), относится к иммунопривилегированным органам. С другой стороны, ГЭБ проницаем для периферических моноцитов и простагландинов. Кроме того, в мозгу существуют участки (циркумвентрикулярные органы, например, эпифиз), в которых ГЭБ отличается повышенной проницаемостью [114]. Таким образом, хроническое воспаление на периферии или персистирование медленных инфекций в ЦНС (как в случае герпесвирусов и ВИЧ) может индуцировать в тканях головного мозга воспалительную реакцию как первопричину гиперпродукции Aβ, развитие патологического каскада в виде таупатии и нейродегенерации и, в конечном итоге, спорадической БА. Показано, что воспаление способствует пролиферации и активации астроглии, после чего активированные астроциты начинают секретировать повышенные количества как $Aβ_{40}$, так и $Aβ_{42}$ [101–103, 107]. Воспаление также ускоряет олигомеризацию Aβ за счет образования и секреции комплексов, выступающих в качестве центров олигомеризации, например, инфламмасомы, содержащей белок NLRP3 (криопирин) [8]. Повышенная концентрация олигомеров Aβ в дальнейшем может служить дополнительным индуктором нейровоспаления. В результате воспаление и накопление Aβ образуют порочный круг, способствуя прогрессии заболевания [115]. При этом отложения фибриллярных агрегатов β-амилоида (в том числе у здоровых людей) могут рассматриваться не как патологический процесс, а как один из способов утилизации Aβ-пептидов. В случае наследственной формы БА к воспалению приводят не хронические инфекции или нарушение регуляции активности микроглии, а перегрузка тканей нервной системы олигомерами Aβ, гиперпродукция которых вызвана мутациями в генах *APP* и/или пресенилинов.

Aβ-ПЕПТИД КАК ЗВЕНО ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

В течение длительного времени Aβ-пептиды рассматривали исключительно как побочные продукты процессинга APP. Последние данные позволяют предположить, что выработка Aβ может относиться к неспецифичным защитным механизмам, предохраняющим мозг от проникновения инфекционных агентов. Показано, что добавление в культуральную среду различных форм Aβ-пептидов подавляет размножение многих бактерий,

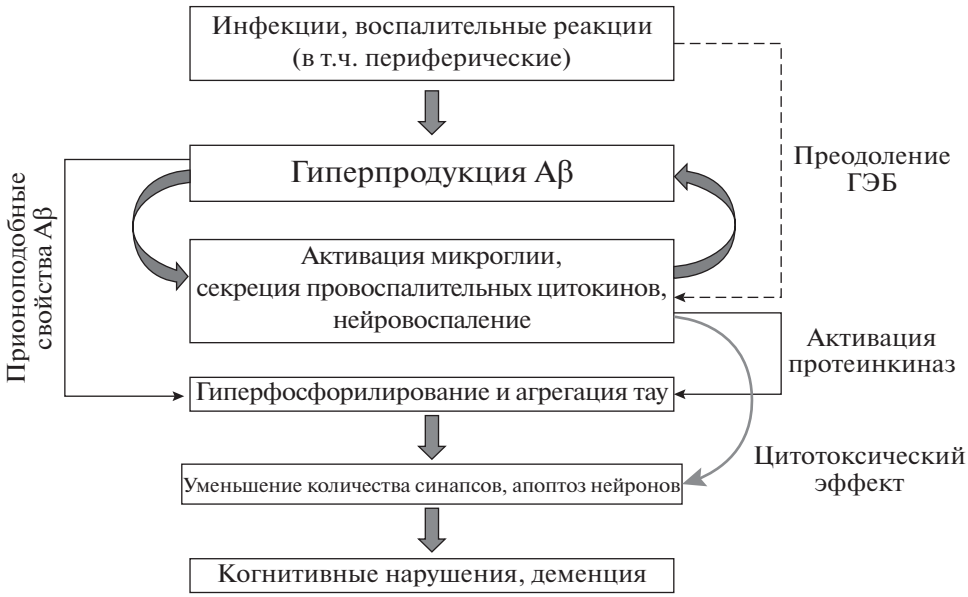

Рис. 1. Гипотетический механизм развития болезни Альцгеймера с учетом эффектов, обусловливаемых нейровоспалением. Гиперпродукция Aβ может индуцироваться воспалительными реакциями при спорадической форме или быть следствием мутаций в генах, участвующих в процессинге APP, при сенильной форме БА. Образование большого количества олигомеров Aβ, в свою очередь, индуцирует воспалительную реакцию в мозгу, формируя порочный круг. Воспаление приводит к гибели нейронов как напрямую (например, путем окислительного стресса), так и опосредованно через гиперфосфорилирование тау и другие эффекты.

включая *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria* и др. [22]. В работе D.K. Kumar и соавт. [25] показано, что трансгенные мыши, экспрессирующие Aβ человека, менее восприимчивы к менингиту, вызываемому *Salmonella enterica*, введенной непосредственно в мозг, по сравнению с мышами дикого типа. Сравнили также выживаемость трансгенных нематод *Caenorhabditis elegans* и культуры клеток нейроглиомы, экспрессирующих Aβ-пептид, с выживаемостью нематод и культуры нейроглиомы дикого типа, инфицированных *Candida albicans*. Оказалось, что трансгенные культуры и нематоды были более устойчивыми. Обнаружилось, что Aβ-пептиды образуют фибриллы на поверхности клеток возбудителя, препятствуя его размножению. В этом плане активность Aβ-пептида напоминает “классические” антибактериальные пептиды млекопитающих, например, LL-37 [22]. Описаны также антивирусные свойства β-амилоида. Так, в культуре клеток глиомы, экспрессирующих Aβ-пептид, подавляется репликация вируса простого герпеса человека типа 1 (HSV-1) [116]. На трансгенных мышах 5XFAD, экспрессирующих мутантный Aβ-пептид человека, и в 3D-культуре нейронов человека показано, что олигомеры Aβ прямо взаимодействуют с поверхностным гликопротеином HSV-1, замедляя инфекционный процесс. С другой стороны, герпесвирусная инфекция индуцировала гиперпродукцию Aβ у мышей 5XFAD и в 3D-культурах [117]. Таким образом, Aβ-пептид оказывается не “молекулярным мусором”, а компонентом врожденного (неспецифичного) иммунитета [118]. Мозг, как “иммунопривилегированный” орган, в котором отсутствует или ограничена работа адаптивного звена иммунитета, нуждается в высокой активности механизмов врожденного иммунитета для защиты от инфекций. Соответственно, воспалительные реакции в центральной нервной системе могут запускать сверхэкспрессию Aβ в качестве защитного механизма. В результате, спорадическую БА можно рассматривать как следствие сложного выбора между возможным инфекционным поражением мозга “сейчас” и нейродегенерацией “через 20 лет”. При этом способность Aβ при чрезмерном накоплении приводить (согласно амилоидной гипотезе) к нейродегенерации в виде отдаленных последствий не могла оказаться под влиянием естественного отбора, поскольку клиническое развитие БА начинается уже после выхода человека из репродуктивного возраста. Схема возможного развития БА с участием нейровоспалительных процессов показана на рис. 1.

Гипотеза о ведущей роли воспалительных реакций в патогенезе БА открывает новые возможности в плане поиска стратегий терапии и/или профилактики БА. Здесь обращает на себя внимание большое количество мета-анализов, показывающих, что длительное применение НПВП снижает риск возникновения БА и замедляет развитие симптомов [91–94, 119, 120]. Согласно некоторым данным, применение НПВП после по-

явления симптомов БА не имело положительного эффекта, но у людей, не имеющих симптомов БА, статистически значимо снижало риск их развития в течение 2–3 лет [121–123]. Положительный эффект НПВП показан также в экспериментах на моделях БА (грызунах) [94]. Полученные данные позволяют говорить о перспективности подхода к профилактике БА путем своевременной терапии или предотвращения воспалительных заболеваний.

Один из ключевых рецепторов, играющий роль как в развитии воспалительных реакций, так и в утилизации Aβ – это TLR4. Известно, что TLR4 наряду с некоторыми другими рецепторами узнает ЛПС (эндотоксины грамотрицательных бактерий), запуская при этом сигнальные каскады Akt–GSK-3β и NF-kB, приводящие к гиперпродукции провоспалительных цитокинов и АФК макрофагами и нейтрофилами [124]. TLR4 способен узнавать не только ЛПС, но и множество других лигандов, однако лишь некоторые из них вызывают гиперактивацию сигнального пути, ведущего к провоспалительной реакции [125]. В нервной системе TLR4 экспрессируется глиальными макрофагами (микроглией) и астроцитами [126]. Помимо прочих лигандов, TLR4 узнает олигомерную форму Aβ. При этом реакция на взаимодействие TLR4 с Aβ может осуществляться двумя путями. В норме TLR4 играет важную роль в утилизации Aβ путем фагоцитоза [70], тогда как при развитии БА активация TLR4 β-амилоидом приводит к гиперпродукции провоспалительных цитокинов [127, 128]. В связи с этим TLR4 можно рассматривать как возможную терапевтическую мишень при БА.

Один из естественных лигандов TLR4 – секретируемая форма Hsp70, ключевого белка-шаперона. Подобно некоторым цитокинам Hsp70 способен секретироваться из клеток по неклассическому механизму [129–131]. Рекомбинантный Hsp70 обладает противовоспалительным действием и ингибирует некоторые провоспалительные регуляторные каскады. Введение рекомбинантного Hsp70 блокирует продукцию TNF-α и АФК нейтрофилами и макрофагами в ответ на ЛПС [132–138]. Взаимодействие Hsp70 с TLR4 приводит к быстрому фагоцитозу образовавшегося комплекса [139].

В последнее время появляются данные об эффективности экзогенного (внеклеточного) Hsp70 как нейропротективного фактора. В наших работах [139–141] показано, что рекомбинантный Hsp70, меченный Alexa-fluor или радиоактивным йодом, легко проникает в мозг при интраназальном введении. Субхроническое интраназальное введение рекомбинантного Hsp70 приводило к снижению концентрации Aβ, активации нейрогенеза и восстановлению когнитивных функций у мышей, моделирующих БА: бульбэктомированных мышей и трансгенных мышей 5XFAD [140, 141]. При этом анализ транскриптома гиппокампа трансгенных мышей 5XFAD, получавших рекомбинантный Hsp70, выявил существенное снижение экспрессии генов, ответственных за развитие нейровоспаления [141], и повышение экспрессии генов, отвечающих за презентацию антигенов, в частности, MHC классов I и II [142]. Изменения транскриптома также показывают повышение уровня маркеров нейрорепарации и активности систем синтеза нейромедиаторов после введения экзогенного Hsp70 [142]. В независимых работах получены трансгенные мыши и дрозофилы, секретирующие Hsp70 в межклеточную среду. Выраженный нейропротективный эффект внеклеточного Hsp70 наблюдали в линиях, полученных путем скрещивания продуцентов внеклеточного Hsp70 с трансгенами, экспрессирующими $Aβ_{42}$ и склонными к развитию нейродегенеративных процессов [143]. Возможно, Hsp70, будучи лигандом TLR4, “переключает” его с провоспалительной активности на фагоцитоз Aβ. Таким образом, при разработке новых средств терапии или профилактики БА Hsp70 и другие белки, обладающие противовоспалительной активностью, могут рассматриваться как перспективные нейропротекторы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сегодня можно с уверенностью говорить о том, что Aβ-пептид – необходимый, но недостаточный участник процесса, в конечном итоге приводящего к развитию БА [144]. Накопление Aβ во многих случаях наблюдается и у клинически здоровых индивидов и не может считаться единственной причиной болезни. Не менее важную роль в патогенезе БА играют гиперфосфорилирование и агрегация тау, окислительный стресс и нейровоспаление. Более того, согласно последним данным, именно нейровоспаление различного генеза может быть исходным стимулом, ведущим к накоплению Aβ и развитию спорадической БА. Кроме того, возможно, именно регуляторные каскады, запускаемые воспалением, а не накопление Aβ, приводят к гиперфосфорилированию тау и индукции других механизмов нейродегенерации. Идентификация нейровоспаления в качестве важного фактора патогенеза БА открывает новые направления поиска средств терапии и/или профилактики этого заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 19-14-00167, ДГ).

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. Ganguly G., Chakrabarti S., Chatterjeет U., Saso L. (2017) Proteinopathy, oxidative stress and mitochondrial dysfunction: cross talk in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Drug Design, Dev. Therapy*. **11**, 797–810.
2. Briston T., Hicks A.R. (2018) Mitochondrial dysfunction and neurodegenerative proteinopathies: mechanisms and prospects for therapeutic intervention. *Biochem. Soc. Transact*. **46**(4), 829–842.
3. Ciccocioppo F., Bologna G., Ercolino E., Pierdomenico L., Simeone P., Lanuti P., Pieragostino D., Del Boccio P., Marchisio M., Miscia S. (2020) Neurodegenerative diseases as proteinopathies-driven immune disorders. *Neural. Regen. Res*. **15**(5), 850–856.
4. Bayer T.A. (2015) Proteinopathies, a core concept for understanding and ultimately treating degenerative disorders? *Eur. Neuropsychopharmacol*. **25**(5), 713–724.
5. Шелковникова Т.А., Куликова А.А., Цветков Ф.О., Peters O., Бачурин С.О., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. (2012) Протеинопатии – формы нейродегенеративных заболеваний, в основе которых лежит патологическая агрегация белков. *Молекуляр. биология*. **46**(3), 402–415.
6. Dubois B., Feldman H.H., Jacova C., Hampel H., Molinuevo J.L., Blennow K., Dekosky S.T., Gauthier S., Selkoe D., Bateman R., Cappa S., Crutch S., Engelborghs S., Frisoni G.B., Fox N.C., Galasko D., Habert M.O., Jicha G.A., Nordberg A., Pasquier F., Rabinovici G., Robert P., Rowe C., Salloway S., Sarazin M., Epelbaum S., de Souza L.C., Vellas B., Visser P.J., Schneider L., Stern Y., Scheltens P., Cummings J.L. (2014) Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol*. **13**(6), 614–629.
7. Kochanek D.K., Murphy S.L., Xu J., Arias E. (2019) Deaths: final data for 2017. *Nat. Vital Statistics Repts*. **68**(9), 1–15.
8. Leng F., Edison P. (2020) Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat. Rev. Neurol*. **17**(3), 157–172.
9. Haass C. (1996) Presenile because of presenilin: the presenilin genes and early onset Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurol*. **9**(4), 254–259.
10. Reisberg B., Saeed M.U. (2004) Alzheimer's disease. In: *Comprehensive Textbook of Geriatric Psychiatry*, 3rd ed. Eds Sadavoy J., Jarvik L.F., Grossberg G.T., Meyers B.S. New York: Norton Professional Books, 449–509.
11. Waring S.C., Rosenberg R.N. (2008) Genome-wide association studies in Alzheimer disease. *Arch. Neurol*. **65**(3), 329–334.
12. Wong T.H., Seelaar H., Melhem S., Rozemuller A.J.M., van Swieten J.C. (2019) Genetic screening in early-onset Alzheimer's disease identified three novel presenilin mutations. *Neurobiol. Aging*. **86**, 201.e9–201.e14.
13. Meek P.D., McKeithan K., Schumock G.T. (1998) Economic considerations in Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy*. **18**(2 Pt 2), 68–73. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9543467/
14. Hung S.Y., Fu W.M. (2017) Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J. Biomed. Sci*. **24**(1), 47.
15. Weller J., Budson A. (2018) Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res*. **7**, 1161.
16. Panza F., Lozupone M., Solfrizzi V., Watling M., Imbimbo B.P. (2019) Time to test antibacterial therapy in Alzheimer's disease. *Brain: J. Neurol*. **142**(10), 2905–2929.
17. Heppner F.L., Ransohoff R.M., Becher B. (2015) Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci*. **16**(6), 358–372.
18. Swerdlow R.H., Burns J.M., Khan S.M. (2010) The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. *J. Alzheimer's Dis*. **20**, 265–279.
19. Müller U.C., Deller T., Korte M. (2017) Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat. Rev. Neurosci*. **18**(5), 281–298.
20. Sulistio Y.A., Heese K. (2016) The ubiquitin-proteasome system and molecular chaperone deregulation in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol*. **53**(2), 905–931.
21. Bibl M., Gallus M., Welge V., Esselmann H., Wolf S., Rüther E., Wiltfang J. (2012) Cerebrospinal fluid amyloid-β 2–42 is decreased in Alzheimer's, but not in frontotemporal dementia. *J. Neural. Transm*. **119**(7), 805–813.
22. Soscia S.J., Kirby J.E., Washicosky K.J., Tucker S.M., Ingelsson M., Hyman B., Burton M.A., Goldstein L.E., Duong S., Tanzi R.E., Moir R.D. (2010) Alzheimer's disease-associated amyloid b-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One*. **5**(3), e9505.
23. Kumar D.K., Choi S.H., Washicosky K.J., Eimer W.A., Tucker S., Ghofrani J., Lefkowitz A., McColl G., Goldstein L.E., Tanzi R.E., Moir R.D. (2016) Amyloid-β peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Sci. Transl. Med*. **8**, 340ra72.
24. Puzzo D., Arancio O. (2013) Amyloid-β peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *J. Alzheimer's Dis*. **33**(s1), S111–S120.
25. Walsh D.M., Selkoe D.J. (2007) A beta oligomers – a decade of discovery. *J. Neurochem*. **101**(5), 1172–1184.
26. Musiek E.S., Holtzman D.M. (2015) Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and "wingmen". *Nat. Neurosci*. **18**(6), 800–806.
27. Haass C., Selkoe D.J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. **8**, 101–112.
28. He Y., Zheng M.M., Ma Y., Han X.J., Ma X.Q., Qu C.Q., Du Y.F. (2012) Soluble oligomers and fibrillar species of amyloid β-peptide differentially affect cognitive functions and hippocampal inflammatory response. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **429**(3–4), 125–130.
29. St George-Hyslop P.H. (2000) Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry*. **47**(3), 183–199.

30. Brouwers N., Sleegers K., Van Broeckhoven C. (2008) Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update. *Ann. Med*. **40**(8), 562–583.

31. Scheltens P., Blennow K., Breteler M.M., de Strooper B., Frisoni G.B., Salloway S., Van der Flier W.M. (2016) Alzheimer's disease. *Lancet*. **388**, 505–517.

32. Pimenova A.A., Raj T., Goate A.M. (2017) Untangling genetic risk for Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry*. **83**(4), 300–310.

33. Hartley D., Blumenthal T., Carrillo M., DiPaolo G., Esralew L., Gardiner K., Granholm AC., Iqbal K., Krams M., Lemere C., Lott I., Mobley W., Ness S., Nixon R., Potter H., Reeves R., Sabbagh M., Silverman W., Tycko B., Whitten M., Wisniewski T. (2015) Down syndrome and Alzheimer's disease: common pathways, common goals. *Alzheimers Dement*. **11**(6), 700–709.

34. Jonsson T., Atwal J.K., Steinberg S., Snaedal J., Jonsson P.V., Bjornsson S., Stefansson H., Sulem P., Gudbjartsson D., Maloney J., Hoyte K., Gustafson A., Liu Y., Lu Y., Bhangale T., Graham R.R., Huttenlocher J., Bjornsdottir G., Andreassen O.A., Jönsson E.G., Palotie A., Behrens T.W., Magnusson O.T., Kong A., Thorsteinsdottir U., Watts R.J., Stefansson K. (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. **488**, 96–99.

35. West R.L., Lee J.M., Maroun L.E. (1995) Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient. *J. Mol. Neurosci*. **6**(2), 141–146.

36. Stoccoro A., Coppedè F. (2018) Role of epigenetics in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurodegenerative Dis. Management*. **8**(3), 181–193.

37. Hardy J.A., Higgins G.A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. **256**(5054), 184–185.

38. Armstrong R.A. (2011) The pathogenesis of Alzheimer's disease: a reevaluation of the "amyloid cascade hypothesis". *Internat. J. Alzheimer's Dis*. **2011**, 630865.

39. Козин С.А., Макаров А.А. (2019) Конвергенция концепций патогенеза болезни Альцгеймера. *Молекуляр. биология*. **53**(6), 1020–1028.

40. Selkoe D.J. (2008) Soluble oligomers of the amyloid β-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav. Brain Res*. **192**(1), 106–113.

41. Petrushanko I.Y., Mitkevich V.A., Anashkina A.A., Adzhubei A.A., Burnysheva K.M., Lakunina V.A., Kamanina Y.V., Dergousova E.A., Lopina O.D., Ogunshola O.O., Bogdanova A.Y., Makarov A.A. (2016) Direct interaction of beta-amyloid with Na,K-ATPase as a putative regulator of the enzyme function. *Sci. Repts*. **6**, 27738.

42. DiChiara T., DiNunno N., Clark J., Bu R.L., Cline E.N., Rollins M.G., Gong Y., Brody D.L., Sligar S.G., Velasco P.T., Viola K.L., Klein W.L. (2017) Alzheimer's toxic amyloid beta oligomers: unwelcome visitors to the Na/K ATPase alpha3 docking station. *Yale J. Biol. Med*. **90**(1), 45–61.

43. Zhang F., Gannon M., Chen Y., Yan S., Zhang S., Feng W., Tao J., Sha B., Liu Z., Saito T., Saido T., Keene C.D., Jiao K., Roberson E.D., Xu H., Wang Q. (2020) β-amyloid redirects norepinephrine signaling to activate the pathogenic GSK3β/tau cascade. *Sci. Translat. Med*. **12**(526), 6931.

44. Yamin G. (2009) NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid β protein disruption of LTP in the hippocampus. *J. Neurosci. Res*. **87**(8), 1729–1736.

45. Mroczko B., Groblewska M., Litman-Zawadzka A., Kornhuber J., Lewczuk P. (2018) Cellular receptors of amyloid β oligomers (AβOs) in Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci*. **19**(7), 1884.

46. Iqbal Kh., del Alonso C.A., Chen S., Chohan M.O., El-Akkad E., Gong C.-X., Khatoon S., Li B., Liu F., Rahman A., Tanimukai H., Grundke-Iqbal I. (2005) Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta*. **1739**(2–3), 198–210.

47. Gao Y., Tan L., Yu J.T., Tan L. (2018) Tau in Alzheimer's disease: mechanisms and therapeutic strategies. *Curr. Alzheimer Res*. **15**(3), 283–300.

48. Neumann K., Farias G., Slachevsky A., Perez P., Maccioni R.B. (2011) Human platelets tau: a potential peripheral marker for Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis*. **25**(1), 103–109.

49. Avila J. (2006) Tau phosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease pathology. *FEBS Lett*. **580**(12), 2922–2927.

50. Domise M., Didier S., Marinangeli C., Zhao H., Chandakkar P., Buée L., Viollet B., Davies P., Marambaud P., Vingtdeux V. (2016) AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology *in vivo*. *Sci. Repts*. **6**, 26758.

51. Qi H., Prabakaran S., Cantrelle F.X., Chambraud B., Gunawardena J., Lippens G., Landrieu I. (2016) Characterization of neuronal tau protein as a target of extracellular signal-regulated kinase. *J. Biol. Chem*. **291**(14), 7742–7753.

52. Hamilton A., Zamponi G.W., Ferguson S.S. (2015) Glutamate receptors function as scaffolds for the regulation of β-amyloid and cellular prion protein signaling complexes. *Mol. Brain*. **8**, 18.

53. Kong C., Xie H., Gao Z., Shao M., Li H., Shi R., Cai L., Gao S., Sun T., Li C. (2019) Binding between prion protein and Aβ oligomers contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Virol. Sinica*. **34**(5), 475–488.

54. Шварцман А.Л., Саранцева С.В. (2017) Трансмиссия патогенного белка при болезни Альцгеймера. *Молекуляр. биология*. **51**(3), 418–422.

55. Kozin S.A., Cheglakov I.B., Ovsepyan A.A., Telegin G.B., Tsvetkov P.O., Lisitsa A.V., Makarov A.A. (2013) Peripherally applied synthetic peptide isoAsp7-Aβ(1–42) triggers cerebral β-amyloidosis. *Neurotox. Res*. **24**(3), 370–376.

56. Guo J., Arai T., Miklossy J., McGeer P. (2006) Abeta and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**(6), 1953–1958.

57. Lasagna-Reeves C., Castillo-Carranza D., Guerrero-Muoz M., Jackson G., Kayed R. (2010) Preparation and characterization of neurotoxic tau oligomers. *Biochemistry*. **49**(47), 10039–10041.

58. Zhao L.N., Long H.W., Mu Y., Chew L.Y. (2012) The toxicity of amyloid oligomers. *Int. J. Mol. Sci.* **13**(6), 7303–7327.

59. Eisele Y.S., Obermüller U., Heilbronner G., Baumann F., Kaeser S.A., Wolburg H., Walker L.C., Staufenbiel M., Heikenwalder M., Jucker M. (2010) Peripherally applied Aβ-containing inoculates induce cerebral β-amyloidosis. *Science*. **330**(6006), 980–982.

60. Meyer-Luehmann M., Coomaraswamy J., Bolmont T., Kaeser S., Schaefer C., Kilger E., Neuenschwander A., Abramowski D., Frey P., Jaton A.L., Vigouret J-M., Paganetti P., Walsh D.M., Mathews P.M., Ghiso J., Staufenbiel M., Walker L.C., Jucker M. (2006) Exogenous induction of cerebral β-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science*. **313**(5794), 1781–784.

61. Walker L.C., Callahan M.J., Bian F., Durham R.A., Roher A.E., Lipinski W.J. (2002) Exogenous induction of cerebral β-amyloidosis in βAPP-transgenic mice. *Peptides*. **23**(7), 1241–1247.

62. Jaunmuktane Z., Quaegebeur A., Taipa R., Viana-Baptista M., Barbosa R., Koriath C., Sciot R., Mead S., Brandner S. (2018) Evidence of amyloid-β cerebral amyloid angiopathy transmission through neurosurgery. *Acta Neuropathol*. **135**(5), 671–679.

63. Jaunmuktane Z., Mead S., Ellis M., Wadsworth J.D., Nicoll A.J., Kenny J., Launchbury F., Linehan J., Richard-Loendt A., Walker A.S., Rudge P., Collinge J., Brandner S. (2015) Evidence for human transmission of amyloid-β pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature*. **525**, 247–250.

64. Swerdlow A.J., Higgins C.D., Adlard P., Jones M.E., Preece M.A. (2003) Creutzfeldt-Jakob disease in United Kingdom patients treated with human pituitary growth hormone. *Neurology*. **61**(6), 783–791.

65. Purro S.A., Farrow M.A., Linehan J., Nazari T., Thomas D.X., Chen Z., Mengel D., Saito T., Saido T., Rudge P., Brandner S., Walsh D.M., Collinge J. (2018) Transmission of amyloid-β protein pathology from cadaveric pituitary growth hormone. *Nature*. **564**(7736), 415–419.

66. Lauwers E., Lalli G., Brandner S., Collinge J., Compernolle V., Duyckaerts C., Edgren G., Haik S., Hardy J., Helmy A., Ivinson A.J., Jaunmuktane Z., Jucker M., Knight R., Lemmens R., Lin I.C., Love S., Mead S., Perry V.H., Pickett J., Poppy G., Radford S.E., Rousseau F., Routledge C., Schiavo G., Schymkowitz J., Selkoe D.J., Smith C., Thal D.R., Theys T., Tiberghien P., van den Burg P., Vandekerckhove P., Walton C., Zaaijer H.L., Zetterberg H., De Strooper B. (2020) Potential human transmission of amyloid β pathology: surveillance and risks. *Lancet Neurol.* **19**(10), 872–878.

67. Cali I., Cohen M.L., Haïk S., Parchi P., Giaccone G., Collins S.J., Kofskey D., Wang H., McLean C.A., Brandel J., Privat N., Sazdovitch V., Duyckaerts C., Kitamoto T., Belay E.D., Maddox R.A., Tagliavini F., Pocchiari M., Leschek E., Appleby B.S., Safar J.G., Schonberger L.B., Pierluigi G. (2018) Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease with amyloid-β pathology: an international study. *Acta Neuropathol. Commun.* **6**(1), 5. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29310723/.

68. Татарникова О.Г., Орлов М.А., Бобкова Н.В. (2015) Бета-амилоид и Тау-белок: структура, взаимодействие и прионоподобные свойства. *Успехи биол. химии*. **55**, 351–390.

69. Leak R.K. (2014) Heat shock proteins in neurodegenerative disorders and aging. *J. Cell Commun. Signal*. **8**, 293–310.

70. Tahara K., Kim H.D., Jin J.J., Maxwell J.A., Li L., Fukuchi K. (2006) Role of toll-like receptor signalling in Aβ uptake and clearance. *Brain*. **129**(11), 3006–3019.

71. Nalivaeva N.N., Turner A.J. (2019) Targeting amyloid clearance in Alzheimer's disease as a therapeutic strategy. *Br. J. Pharmacol*. **176**(18), 3447–3463.

72. Nalivaeva N.N., Zhuravin I.A., Turner A.J. (2020) Neprilysin expression and functions in development, ageing and disease. *Mech. Ageing Dev*. **192**, 111363.

73. Desrosiers R.R., Fanélus I. (2011) Damaged proteins bearing *L*-isoaspartyl residues and aging: a dynamic equilibrium between generation of isomerized forms and repair by PIMT. *Curr. Aging Sci*. **4**(1), 8–18.

74. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Yegorov Y.E., Simonenko O.V., Vishnyakova K.S., Kulikova A.A., Tsvetkov P.O., Makarov A.A., Kozin S.A. (2013) Isomerization of Asp7 leads to increased toxic effect of amyloid-β42 on human neuronal cells. *Cell Death Dis*. **4**(11), e939.

75. Kepp K.P. (2017) Ten challenges of the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's. Dis*. **55**(2), 447–457.

76. Holmes C., Boche D., Wilkinson D., Yadegarfar G., Hopkins V., Bayer A., Jones R.W., Bullock R., Love S., Neal J.W., Zotova E., Nicoll J.A.R. (2008) Long-term effects of Aβ42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet.* **372**(9634), 216–223.

77. Aisen P.S., Gauthier S., Ferris S.H., Saumier D., Haine D., Garceau D., Duong A., Suhy J., Oh J., Lau W.C., Sampalis J. (2011) Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease – a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study (the Alphase Study). *Arch. Med. Sci*. **7**(1), 102–111.

78. Bateman R., Xiong C., Benzinger T., Fagan A., Goate A., Fox N., Marcus D., Cairns N., Xie X., Blazey T., Holtzman D., Santacruz A., Buckles V., Oliver A., Moulder K., Aisen P., Ghetti B., Klunk W., McDade E., Martins R., Masters C., Mayeux R., Ringman J., Rossor M., Schofield P., Sperling R., Salloway S., Morris J. (2012). Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med*. **367**, 795–804.

79. Li Y., Liu Y., Wang Z., Jiang Y. (2013) Clinical trials of amyloid-based immunotherapy for Alzheimer's disease: end of beginning or beginning of end? *Expert Opin. Biol. Therapy*. **13**(11), 1515–1522.

80. Herrup K. (2015) The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat. Neurosci.* **18**(6), 794–799.

81. Dursun E., Gezen-Ak D., Hanağası H., Bilgiç B., Lohmann E., Ertan S., Atasoy IL., Alaylıoğlu M., Araz ÖS., Önal B., Gündüz A., Apaydın H., Kızıltan G., Ulutin T., Gürvit H., Yılmazer S. (2015) The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6

and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *J. Neuroimmunol*. **283**, 50–57.

82. Zhang F., Jiang L. (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Dis. Treatment*. **11**, 243–256.

83. Heneka M.T., Carson M.J., Khoury J.E., Landreth G.E., Brosseron F., Feinstein D.L., Jacobs A.H., Wyss-Coray T., Vitorica J., Ransohoff R.M., Herrup K., Frautschy S.A., Finsen B., Brown G.C., Verkhratsky A., Yamanaka K., Koistinaho J., Latz E., Halle A., Petzold G.C., Town T., Morgan D., Shinohara M.L., Perry V.H., Holmes C., Bazan N.G., Brooks D.J., Hunot S., Joseph B., Deigendesch N., Garaschuk O., Boddeke E., Dinarello C.A., Breitner J.C., Cole G.M., Golenbock D.T., Kummer M.P. (2015) Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **14**(4), 388–405.

84. Heneka M.T., Golenbock D.T., Latz E. (2015) Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat. Immunol.* **16**(3), 229–236.

85. Bolós M., Perea J.R., Avila J. (2017) Alzheimer's disease as an inflammatory disease. *Biomol. Concepts*. **8**(1), 37–43.

86. Nazem A., Sankowski R., Bacher M., Al-Abed Y. (2015) Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation*. **12**, 74.

87. Balistreri C.R., Grimaldi M.P., Chiappelli M., Licastro F, Castiglia L., Listì F., Vasto S., Lio D., Caruso C., Candore G. (2008) Association between the polymorphisms of *TLR4* and *CD14* genes and Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des*. **14**(26), 2672–2677.

88. Chen Y., Yip P., Huang Y., Sun Y., Wen L., Chu Y., Chen T. (2012) Sequence variants of Toll like receptor 4 and late-onset Alzheimer's disease. *PLoS One*. **7**(2), e50771.

89. McAlpine F.E., Lee J.K., Harms A.S., Ruhn K.A., Blurton-Jones M., Hong J., Das P., Golde T.E., LaFerla F.M., Oddo S., Blesch A., Tansey M.G. (2009) Inhibition of soluble TNF signaling in a mouse model of Alzheimer's disease prevents pre-plaque amyloid-associated neuropathology. *Neurobiol. Dis*. **34**(1), 163–177.

90. Millington C., Sonego S., Karunaweera N., Rangel A., Aldrich-Wright J.R., Campbell I.L., Gyengesi E., Münch G. (2014) Chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease: new perspectives on animal models and promising candidate drugs. *Biomed. Res. Int*. **2014**, 309129.

91. Cakala M., Malik A.R., Strosznajder J.B. (2007) Inhibitor of cyclooxygenase-2 protects against amyloid peptide-evoked memory impairment in mice. *Pharmacol. Repts*. **59**(2), 164–172.

92. Moore A.H., Bigbee M.J., Boynton G.E., Wakeham C.M., Rosenheim H.M., Staral C.J., Morrissey J.L., Hund A.K. (2010) Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: reconsidering the role of neuroinflammation. *Pharmaceuticals*. **3**(6), 1812–1841.

93. Rubio-Perez M.J., Morillas-Ruiz J.M. (2012) A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *Sci. World J*. **2012**, 756357.

94. Daniels M.J., Rivers-Auty J., Schilling T., Spencer N.G., Watremez W., Fasolino V., Booth S.J., White C.S., Baldwin A.G., Freeman S., Wong R., Latta C., Yu S., Jackson J., Fischer N., Koziel V., Pillot T., Bagnall J., Allan S.M., Paszek P., Galea J., Harte M.K., Eder C., Lawrence C.B., Brough D. (2016) Fenamate NSAIDs inhibit the NLRP3 inflammasome and protect against Alzheimer's disease in rodent models. *Nat. Commun*. **7**, 12504–12504.

95. Wenk G.L. (2006) Neuropathologic changes in Alzheimer's disease: potential targets for treatment. *J. Clin. Psychiatry*. **67**(suppl 3), 3–7.

96. Carrero I., Gonzalo M.R., Martin B., Sanz-Anquela J.M., Arévalo-Serrano J., Gonzalo-Ruiz A. (2012) Oligomers of beta-amyloid protein (Aβ1–42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. *Exp. Neurol*. **236**(2), 215–227.

97. Go M., Kou J., Lim J., Yang J., Fukuchi K. (2016) Microglial response to LPS increases in wild-type mice during aging but diminishes in an Alzheimer's mouse model: implication of TLR4 signaling in disease progression. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **479**(2), 331–337.

98. Lye T.C., Shores E.A. (2000) Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer's disease: a review. *Neuropsychol. Rev*. **10**(2), 115–129.

99. Szczygielski J., Mautes A., Steudel W.I., Falkai P., Bayer T.A., Wirths O. (2005) Traumatic brain injury: cause or risk of Alzheimer's disease? A review of experimental studies. *J. Neural. Transm*. (Vienna). **112**(11), 1547–1564.

100. Van Den Heuvel C., Thornton E., Vink R. (2007) Traumatic brain injury and Alzheimer's disease: a review. *Prog. Brain Res*. **161**, 303–316.

101. Lee J.W., Lee Y.K., Yuk D.Y., Choi D.Y., Ban S.B., Oh K.W., Hong J.T. (2014) Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *J. Neuroinflammation*. **5**, 37.

102. Weintraub M.K., Kranjac D., Eimerbrink M.J., Pearson S.J., Vinson B.T. (2014) Peripheral administration of polyI:C leads to increased hippocampal amyloid-beta and cognitive deficits in a non-transgenic mouse. *Behav. Brain Res*. **266**, 183–187.

103. Catorce M.N., Gevorkian G. (2016) LPS-induced murine neuroinflammation model: main features and suitability for pre-clinical assessment of nutraceuticals. *Curr. Neuropharmacol*. **14**(2), 155–164.

104. Lin W.R., Wozniak M.A., Cooper R.J., Wilcock G.K., Itzhaki R.F. (2002) Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *J. Pathol*. **197**(3), 395–402.

105. Harris S.A., Harris E.A. (2015) Herpes simplex virus type 1 and other pathogens are key causative factors in sporadic Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis*. **48**(2), 319–353.

106. Piacentini R., Li Puma D.D., Ripoli C., Marcocci M.E., De Chiara G., Garaci E., Palamara A.T., Grassi C.

(2015) Herpes Simplex Virus type-1 infection induces synaptic dysfunction in cultured cortical neurons via GSK-3 activation and intraneuronal amyloid-β protein accumulation. *Sci. Rep*. **5**, 15444.

107. Fulop T., Witkowski J.M., Larbi A., Khalil A., Herbein G., Frost E.H. (2019) Does HIV infection contribute to increased beta-amyloid synthesis and plaque formation leading to neurodegeneration and Alzheimer's disease? *J. Neurovirol*. **25**(5), 634–647.
108. Sochocka M., Zwolinska K., Leszek J. (2017) The infectious etiology of Alzheimer's disease. *Curr. Neuropharmacol*. **15**(7), 996–1009.
109. Olsen I., Singhrao S.K. (2015) Can oral infection be a risk factor for Alzheimer's disease? *J. Oral Microbiol*. **7**, 29143.
110. Gaur S., Agnihotri R. (2015) Alzheimer's disease and chronic periodontitis: is there an association? *Geriatr. Gerontol. Int*. **15**(4), 391–404.
111. Kamer A.R., Pirraglia E., Tsui W., Rusinek H., Vallabhajosula S., Mosconi L., Yi L., McHugh P., Craig R.G., Svetcov S., Linker R., Shi C., Glodzik L., Williams S., Corby P., Saxena D., de Leon M.J. (2015) Periodontal disease associates with higher brain amyloid load in normal elderly. *Neurobiol. Aging*. **36**, 627–633.
112. Abbott A. (2020) Are infections seeding some cases of Alzheimer's disease? *Nature*. **587**, 22–25.
113. Rad S.K., Arya A., Karimian H., Madhavan P., Rizwan F., Koshy S., Prabhu G. (2018) Mechanism involved in insulin resistance via accumulation of β-amyloid and neurofibrillary tangles: link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Drug Design, Dev. Therapy*. **12**, 3999–4021.
114. Duvernoy H.M., Risold P.Y. (2007) The circumventricular organs: An atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res. Rev*. **56**(1), 119–147.
115. Frost G.R., Li Y.M. (2017) The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open Biol*. **7**(12), 170228.
116. Bourgade K., Le Page A., Bocti C., Witkowski J.M., Dupuis G., Frost E.H., Fulop Jr.T. (2016) Protective effect of amyloid-β peptides against herpes simplex virus-1 infection in a neuronal cell culture model. *J. Alzheimer's Dis*. **50**(4), 1227–1241.
117. Eimer W.A., Vijaya Kumar D.K., Navalpur Shanmugam N.K., Rodriguez A.S., Mitchell T., Washicosky K.J., György B., Breakefield X.O., Tanzi R.E., Moir R.D. (2018) Alzheimer's disease-associated β-amyloid is rapidly seeded by herpesviridae to protect against brain infection. *Neuron*. **99**(1), 56–63.
118. Moir R.D., Lathe R., Tanzi R.E. (2018). The antimicrobial protection hypothesis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dementia*. **14**(12), 1602–1614.
119. Schneider L.S., Mangialasche F., Andreasen N., Feldman H., Giacobini E., Jones R., Mantua V., Mecocci P., Pani L., Winblad B., Kivipelto M. (2014) Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. *J. Intern. Med*. **275**(3), 251–283.
120. Benito-León J., Contador I., Vega S., Villarejo-Galende A., Bermejo-Pareja F. (2019) Non-steroidal anti-inflammatory drugs use in older adults decreases risk of Alzheimer's disease mortality. *PLoS One*. **14**(9), e0222505.
121. Szekely C.A., Town T., Zandi P.P. (2007) NSAIDs for the chemoprevention of Alzheimer's disease. *Subcell. Biochem*. **42**, 229–248.
122. Breitner J.C., Baker L.D., Montine T.J., Meinert C.L., Lyketsos C.G., Ashe K.H., Brandt J., Craft S., Evans D.E., Green R.C., Ismail M.S., Martin B.K., Mullan M.J., Sabbagh M., Tariot P.N. (2011) Extended results of the Alzheimer's disease anti-inflammatory prevention trial. *Alzheimer's Dementia*. **7**(4), 402–411.
123. Hoozemans J.J., Veerhuis R., Rozemuller J.M., Eikelenboom P. (2011). Soothing the inflamed brain: effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on Alzheimer's disease pathology. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. **10**(1), 57–67.
124. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. **388**(6640), 394–397.
125. Peri F., Calabrese V. (2014) Toll-like receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds: an update. *J. Med. Chem*. **57**(9), 3612–3622.
126. Fellner L., Irschick R., Schanda K., Reindl M., Klimaschewski L., Poewe W., Wenning G.K., Stefanova N. (2013) Toll-like receptor 4 is required for α-synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia*. **61**(3), 349–360.
127. Jin J.J., Kim H.D., Maxwell J.A., Li L., Fukuchi K. (2008) Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation*. **5**, 23.
128. Tang S.C., Lathia J.D., Selvaraj P.K., Jo D.G., Mughal M.R., Cheng A., Siler D.A., Markesbery W.R., Arumugam T.V., Mattson M.P. (2008) Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid β-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Exp. Neurol*. **213**(1), 114–121.
129. Prudovsky I., Mandinova A., Soldi R., Bagala C., Graziani I., Landriscina M., Tarantini F., Duarte M., Bellum S., Doherty H., Maciag T. (2003) The non-classical export routes: FGF1 and IL-1alpha point the way. *J. Cell. Sci*. **116**(Pt 24), 4871–4881.
130. Ferrari D., Pizzirani C., Adinolfi E., Lemoli R.M., Curti A., Idzko M., Panther E., Di Virgilio F. (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol*. **176**(7), 3877–3883.
131. Mambula S.S., Stevenson M.A., Ogawa K., Calderwood S.K. (2007) Mechanisms for Hsp70 secretion: crossing membranes without a leader. *Methods*. **43**(3), 168–175.
132. Aneja R., Odoms K., Dunsmore K., Shanley T.P., Wong H.R. (2006) Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. *J. Immunol*. **177**(10), 7184–7192.
133. Kustanova G., Murashev A., Karpov V., Margulis B., Guzhova I.V., Prokhorenko I.R., Grachev S.V., Evgen'ev M.B. (2006) Exogenous heat shock protein 70 mediates sepsis manifestations and decreases the mortality rate in rats. *Cell Stress Chaperones*. **11**(3), 276–286.

134. Rozhkova E., Yurinskaya M., Zatsepina O., Garbuz D., Murashev A., Ostrov V., Margulis B., Evgenev M., Vinokurov M. (2010) Exogenous mammalian extracellular HSP70 reduces endotoxin manifestations at the cellular and organism levels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1197**, 94–107.

135. Vinokurov M., Ostrov V., Yurinskaya M., Garbuz D., Murashev A., Antonova O., Evgen'ev M. (2012) Recombinant human Hsp70 protects against lipoteichoic acid-induced inflammation manifestations at the cellular and organismal levels. *Cell Stress Chaperones.* **17**(1), 89–101.

136. Borges T.J., Lopes R.L., Pinho N.G., Machado F.D., Souza A.P., Bonorino C. (2013) Extracellular Hsp70 inhibits pro-inflammatory cytokine production by IL-10 driven down-regulation of C/EBPβ and C/EBPδ. *Int. J. Hyperthermia*. **29**(5), 455–463.

137. Hsu J.H., Yang R.C., Lin S.J., Liou S.F., Dai Z.K., Yeh J.L., Wu J.R. (2014) Exogenous heat shock cognate protein 70 pretreatment attenuates cardiac and hepatic dysfunction with associated anti-inflammatory responses in experimental septic shock. *Shock*. **42**(6), 540–547.

138. Ghosh A.K., Sinha D., Mukherjee S., Biswas R., Biswas T. (2015) LPS stimulates and Hsp70 downregulates TLR4 to orchestrate differential cytokine response of culture-differentiated innate memory $CD8^+$ T cells. *Cytokine*. **73**(1), 44–52.

139. Yurinskaya M., Zatsepina O.G., Vinokurov M.G., Bobkova N.V., Garbuz D.G., Morozov A.V., Kulikova D.A., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Funikov S.Y., Evgen'ev M.B. (2015) The fate of exogenous human HSP70 introduced into animal cells by different means. *Curr. Drug. Deliv*. **12**(5), 524–532.

140. Bobkova N.V., Garbuz D.G., Nesterova I., Medvinskaya N., Samokhin A., Alexandrova I., Yashin V., Karpov V., Kukharsky M.S., Ninkina N.N., Smirnov A.A., Nudler E., Evgen'ev M. (2014) Therapeutic effect of exogenous hsp70 in mouse models of Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis*. **38**, 425–435.

141. Evgen'ev M.B., Krasnov G.S., Nesterova I.V., Garbuz D.G., Karpov V.L., Morozov A.V., Snezhkina A.V., Samokhin A.N., Sergeev A., Kulikov A.M., Bobkova N.V. (2017) Molecular mechanisms underlying neuroprotective effect of intranasal administration of human Hsp70 in mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis*. **59**(4), 1415–1426.

142. Evgen'ev M., Bobkova N., Krasnov G., Garbuz D., Funikov S., Kudryavtseva A., Kulikov A., Samokhin A., Maltsev A., Nesterova I. (2019) The effect of human Hsp70 administration on a mouse model of Alzheimer's disease strongly depends on transgenicity and age. *J. Alzheimer's Dis*. **67**(4), 1391–1404.

143. de Mena L., Chhangani D., Fernandez-Funez P., Rincon-Limas D.E. (2017) secHsp70 as a tool to approach amyloid-β42 and other extracellular amyloids. *Fly*. **11**(3), 179–184.

144. Емелин А.Ю. (2011) Новые критерии диагностики болезни Альцгеймера. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. **4**, 5–8.

BETA-AMYLOID, TAU PROTEIN AND NEUROINFLAMMATION: AN ATTEMPT TO COMBINE DIFFERENT HYPOTHESES OF THE PATHOGENESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE

D. G. Garbuz[1,*], O. G. Zatsepina[1], and M. B. Evgen'ev[1]

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

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

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that leads to dementia and death of patients. There are no pathogenetically relevant methods for the prevention and therapy of AD; all current treatments are purely symptomatic and not able to significantly delay the onset of dementia. The main cause of neurodegeneration in AD has long been thought to be the accumulation in brain tissues, primarily in the hippocampus and the frontal cortex, of β-amyloid peptide (Aβ), which is prone to spontaneous aggregation and has neurotoxic properties in high concentration. Aβ is a product of the signaling protein APP (Amyloid Precursor Protein) processing. Nevertheless, attempts to treat AD based on the methods of decreasing the production and aggregation of Aβ have not yielded significant clinical results. Currently, there are more and more arguments in favor of the fact that the overproduction of Aβ in most cases of AD is not the root cause, but a concomitant event of pathological processes associated with old age. The concept of neuroinflammation comes to the fore, suggesting that inflammatory reactions play a leading role in the initiation and development of AD, both in the brain tissues and in the periphery. The hypothesis about the key role of neuroinflammation in the pathogenesis of AD opens up new possibilities for finding ways to treat and prevent this socially significant disease.

Keywords: Alzheimer's disease, neurodegeneration, β-amyloid, tau protein, neuroinflammation

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 5, с. 748–771

ОБЗОРЫ

УДК 577.322

СТРУКТУРНЫЕ, ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БЕЛКОВ С ПОВТОРАМИ

© 2021 г. Е. И. Дерюшева[a, *], А. В. Мачулин[b], О. В. Галзитская[c, d, **]

[a] Институт биологического приборостроения Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", Пущино, 142290 Россия

[b] Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", Пущино, 142290 Россия

[c] Институт белка Российской академии наук, Пущино, 142290 Россия

[d] Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Пущино, 142290 Россия

*e-mail: evgenia.deryusheva@gmail.com

**e-mail: ogalzit@vega.protres.ru

Поступила в редакцию 16.03.2021 г.
После доработки 29.03.2021 г.
Принята к публикации 29.03.2021 г.

В обзоре обобщены и систематизированы данные по классификации, таксономическому распределению, особенностям структуры и функционирования белков со структурными повторами. Рассмотрены современные подходы к идентификации структурных повторов в белках, в том числе особенности специализированных баз данных белковых доменов. Обсуждается роль белков со структурными повторами в патогенезе различных заболеваний, а также перспективы их использования в качестве каркасов для создания лекарственных препаратов. Проанализированы современные подходы к пониманию механизмов эволюционного развития белков со структурными повторами.

Ключевые слова: структурные домены, структурные повторы, молекулярные функции, эволюция

DOI: 10.31857/S0026898421050037

ВВЕДЕНИЕ

За последние 20 лет интерес к белкам со структурными повторами заметно увеличился в связи с их распространенностью, уникальностью функционирования и взаимосвязью с патогенезом различных заболеваний. Структурные повторы очень разнообразны как по длине (от нескольких аминокислот до структурных доменов из 100 и более остатков), так и по аминокислотному составу [1]. Предполагается, что до 25% всех белков содержат какой-либо повтор [1–3], при этом такие повторы находят почти в каждом третьем белке человека [1, 4].

Белки со структурными повторами участвуют, как правило, в выполнении различных функций, например, в регуляции функционирования клеточных органелл [5], связывании нуклеотидов [6], формировании антивирусного ответа [7], в механизмах клеточной вирулентности [8], передаче сигналов [9] и многих других.

Современные исследования указывают на существование связи между структурными повторами в белках и различными заболеваниями [10–12]. Например, патогенез таких заболеваний, как рак предстательной железы, доброкачественная гиперплазия предстательной железы и ревматоидный артрит связывают с полиморфизмом длины глутаминовых и глициновых повторов андрогенного рецептора [13, 14].

Кроме того, белки с повторами интересны для специалистов в области белковой инженерии и дизайна синтетических белков. Они рассматриваются в качестве перспективных стабильных каркасов для конструирования белков, которые способны распознавать мишени со сродством и

Сокращения: ТПП – тетратрикопептидный повтор (tetratricopeptide repeat, TPR); ЛБП – лейцин-богатый повтор (leucine-rich repeat, LRR); АнкП – анкириновый повтор (ankyrin repeat, AR); АрмП – армадилловый повтор (armadillo repeat, ArmR); HEAT (Huntingtin-EF3-PP2A-TOR1) – хантингтин, фактор элонгации 3, фосфатаза 2А, киназа; ТИМ – триозофосфатизомераза (triosephosphate isomerase, TIM); WD40 – β-трансдуцин; AFP (antifreeze proteins) – белки антифризы; СММ – скрытая марковская модель (hidden Markov model); DARPins (designed ankyrin repeat proteins) – искусственные белки с АнкП; dArmRP (designed armadillo repeat protein) – искусственные белки с АрмП; CTPR (consensus tetratricopeptide repeat protein) – консенсусный белок с ТПП.

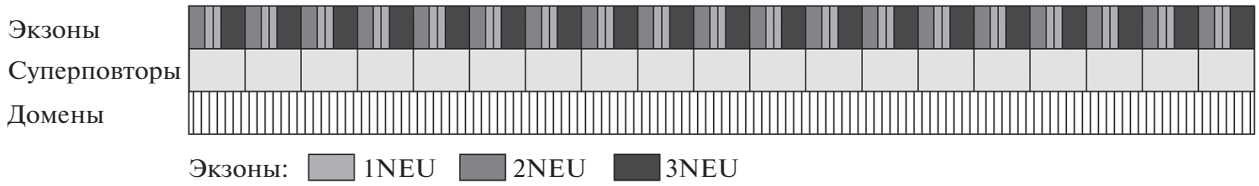

Рис. 1. Кодирование структурных повторов в небулине человека.

специфичностью в ряде случаев большими, чем у антител [15, 16].

Такие белки используют и для проверки теорий эволюционной молекулярной биологии. Повторы принято рассматривать как удачную эволюционную стратегию, поскольку регулярность вторичной структуры и разнообразие трехмерной сборки приводят к существованию молекул разного размера со множеством значимых функций [17]. Как правило, структурные повторы (структурные домены, мотивы) имеют высокую степень идентичности, что свидетельствует в пользу гипотезы об общем предке, содержащем один структурный повтор или мотив [17]. При этом предполагается, что на ранних этапах эволюции эффективность функциональной активности достигалась путем олигомеризации одиночных повторов [18]. Однако есть примеры белковых комплексов с повторами, которые образуются как из олигомеров с единичными повторами, так и из одной цепи с множественными структурными повторами. К тому же процесс кооперативного сворачивания белка с множественными повторами термодинамически более выгоден, чем сворачивание гомоолигомерного белка из мономеров [18].

В нашем обзоре обобщены современные взгляды на структурные характеристики белков с повторами, механизмы их функционирования, особенности эволюционного развития, взаимосвязь с патогенезом заболеваний, а также оценены перспективы их использования в качестве каркасов для создания высокоэффективных лекарственных препаратов.

МЕХАНИЗМ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ПОВТОРОВ

Структурные повторы представляют собой множественные копии участков различной длины белковой цепи. Повторы часто формируют домены или структурные мотивы, определяющие функционирование всего белка. Многочисленные исследования изменений в расположении концевых доменов (т.е. перестановки N- и C-концевых доменов в белках) показали, что основная роль в таких перестановках отводится механизму дублирования генов, кодирующих белки, слиянию и потере концевых доменов, а не появлению новых структурных доменов [19–30].

Поскольку предполагается, что повторы структурных доменов образуются за счет внутреннего дублирования, то при тандемном дублировании в гене копия встраивается рядом с ее источником [17, 31]. При этом сходство аминокислотных последовательностей может отражать информацию о недавних дублированиях [32].

Формирование коротких белковых повторов может быть обусловлено образованием ДНК-шпилек при гипермутабильности минисателлитных локусов (повторяющихся единиц длиной более 10 нуклеотидов) в процессе рекомбинации [1, 33]. При этом число доменов может увеличиваться способом, аналогичным дублированию минисателлитных локусов, т.е. существуют “горячие точки”, которые фланкируют повторяющиеся регионы [34]. Если такие рекомбинационные мотивы расположены в интронах, то дупликацию можно рассматривать как перетасовку экзонов. Однако перетасовка экзонов не может объяснить эволюцию всех доменных повторов, так как в некоторых случаях перестановки повторов обнаруживаются и в отдельных экзонах. Следовательно, если такие мотивы существуют, то некоторые специфичные структурные повторы кодируются экзонами, в то время как другие повторы закодированы в основном в интронах [32]. Различие в размерах повторяющихся белковых структурных единиц соотносят с размером дублирующейся области ДНК. При этом принято различать микросателлитные [35, 36], минисателлитные [1, 33] и сателлитные повторы ДНК [31]. Пример кодирования структурных повторов в белке небулине [32, 37] показан на рис. 1.

Анализ 24 эукариотических протеомов [32] позволил утверждать, что формирование повторяющихся областей обусловлено одновременным дублированием сразу нескольких доменов: при этом дублирование одного домена встречается реже. Кроме того, дублирование встречается в основном в середине белковой цепи между другими повторами [32]. Количество доменов, участвующих в каждом дублировании, может значительно различаться в пределах семейств доменов [32, 38, 39]. Дублирование определенного количества доменов в некоторых семействах обусловлено функциональными или структурными ограничениями, как это показано для небулина [32, 37]. Тенденция к дублированию определенного числа

доменов найдена в некоторых семействах доменов [32]. Также утверждается [32], что отсутствует корреляция между размером домена и количеством повторов, т.е. более крупные структурные повторы дублируются с той же частотой, что и малые. Следовательно, можно предположить, что механизм, лежащий в основе дупликации повторов, не зависит от размера дублированной области. Дублирование внеклеточных доменов частично объясняется перетасовкой экзонов [32].

Опираясь на результаты сопоставления белковых повторов с кодирующей последовательностью ДНК, изучили распределение шаблонов интронов/экзонов у нескольких видов организмов и предложили разделить эти гены на два класса [40]. Гены первого класса имеют случайную длину экзона, который формируется за счет накопления интронов через случайные вставки внутри повторяющихся единиц. Гены второго класса состоят исключительно из экзонов, соответствующих повторяющимся единицам, за счет чего образуются локальные повторы интронов/экзонов [40].

Однако несмотря на активный поиск принципов возникновения структурных повторов в белках, единый механизм этого явления до сих пор не установлен.

КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ С ПОВТОРАМИ

Большое количество белков, содержащих повторяющиеся элементы, привело к необходимости их классификации с целью понимания взаимосвязи между аминокислотной последовательностью, структурой и функцией, а также их эволюционного развития.

В основе одной из первых классификаций белков с повторами лежали структурные различия таких повторов, при этом выделяли β-пропеллеры, β-трилистники, анкириновые повторы (АнкП), лейцин-богатые повторы (ЛБП), тетратрикопептидные (ТПП) и армадилловые повторы (АрмП) [17].

В настоящее время выделяют пять основных классов белков со структурными повторами, которые различаются длиной повторяющихся единиц и общей структурной организацией. Часть классов делят на подклассы на основе структурных и функциональных особенностей молекул белков [41] (рис. 2).

К классу I относятся белки и пептиды, образованные повторами из одного или двух аминокислотных остатков, которые могут формировать кристаллиты (мелкие кристаллы, не имеющие ясно выраженной ограненной формы), в большинстве случаев вредоносные для живых организмов. Структуры класса I соответствуют микросателлитным повторам ДНК [35, 36]. Неограниченный размер и высокая стабильность кристаллитов препятствуют применению к ним существующих методов деградации. Именно эти свойства принято рассматривать как основу цитотоксичности таких повторов [42], что подтверждено многочисленными экспериментами по влиянию таких агрегатов на живые организмы [43–47]. Участки с такого рода повторами преимущественно гидрофильны и имеют высокую степень неупорядоченности [48, 49]. Примером структуры класса I является кристаллит, образованный глутаминовым полипептидом [13, 50, 51], для которого характерна ассоциация с рядом нейродегенеративных заболеваний, в том числе с болезнью Хантингтона [45, 52]. В настоящее время примеры таких структур отсутствуют в PDB, доступны только смоделированные структуры некоторых представителей этого класса [50, 53].

К классу II относятся фибриллярные структуры с повторами из трех–семи аминокислотных остатков, стабилизированные межцепочечными взаимодействиями. К основным представителям этого класса относятся коллаген [54] и спиральные (двух- и более) структуры полипептидов [55]. Первичная структура коллагена состоит из трипептидного повтора GlyXY, где X и Y – любые остатки (в основном, пролин или его гидроксилированная форма, гидроксипролин). Трехмерные структуры коллагена представляют собой протяженные полипролиновые тройные спирали [54, 56, 57]. На сегодняшний день выделяют 29 различных типов коллагенов [58].

Спиральные (двух- и более) структуры полипептидов различаются гептадными повторами, представленными консенсусной последовательностью $(abcdefg)_n$, обычно с гидрофобными остатками в положениях a и d и полярными остатками в других положениях [59, 60]. При этом структуры более высоких порядков, образованные такими спиралями, могут сильно отличаться по периодичности [55]. В отличие от класса I, структуры класса II имеют определенный размер и стабильность. Структуры класса II соответствуют минисателлитным повторам ДНК [33, 36].

К классу III принято относить белки с повторами из 5–40 остатков [61], в которых один повторяющийся элемент определяет формирование конечной складчатой структуры. В составе этого класса выделяют два подкласса белков – с соленоидными и несоленоидными структурами. Соленоидные структуры представляют собой особым образом свернутые полипептидные цепи, из которых формируются белки с массивными удлиненными структурами, отличающиеся от большинства глобулярных белков [61]. Повторяющейся структурной единицей соленоидных белков является специфический сегмент, состоящий обычно из 12–45 а.о. При этом структура белка формируется из одной, двух, трех или даже четырех сегментных конструкций, соединенных петлями. Сегментные конструкции в таких белках

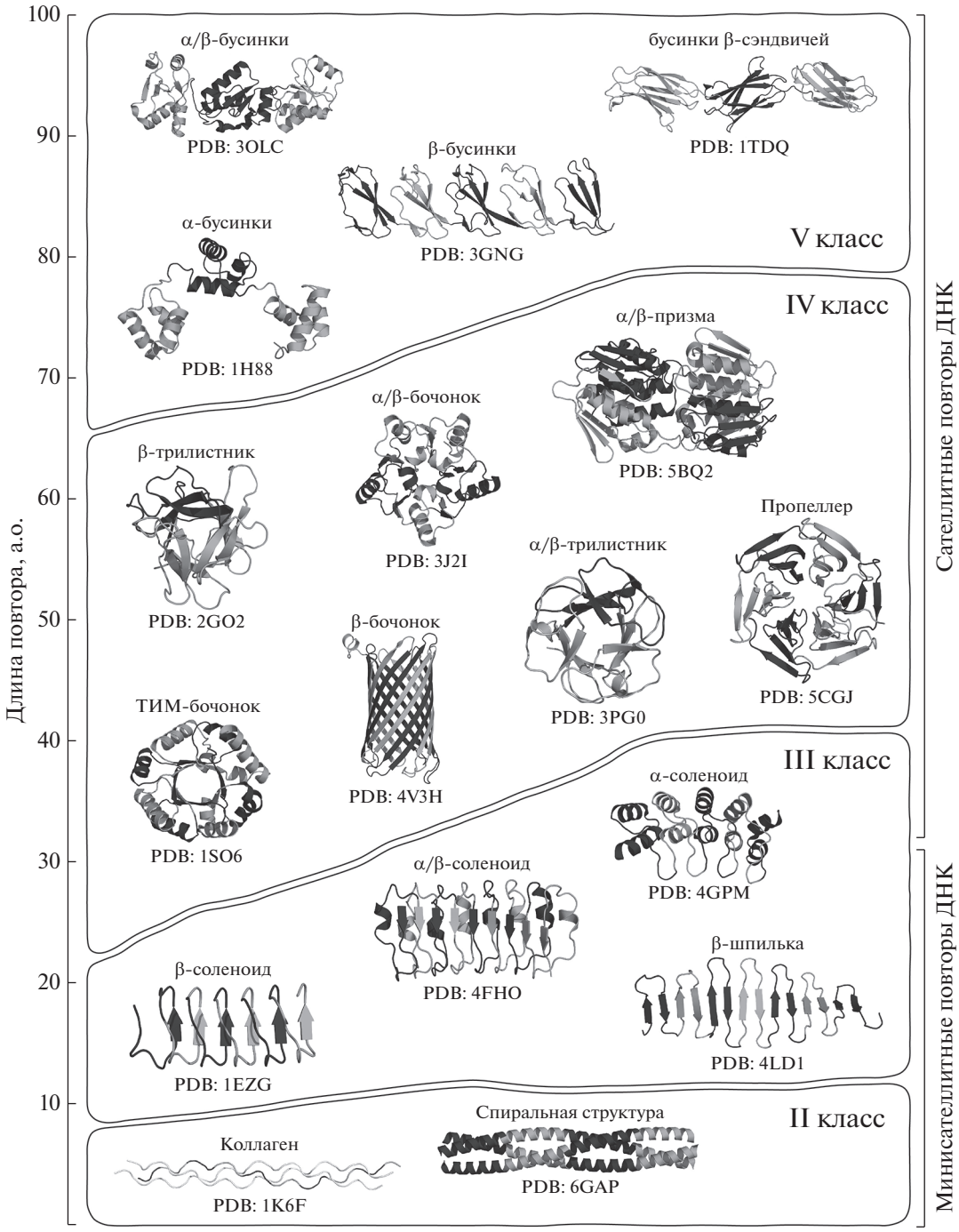

Рис. 2. Структурная классификация белков с повторами, основанная на различиях в длине повторяющихся единиц и общей структурной организации. Приведены примеры типичных белков каждого класса с указанием PDB-кодов их структур.

могут быть представлены α-спиралями, β-листами, полипролиновыми спиралями. По специфичности сегментных конструкций различают α-спиральные или β-структурные соленоиды, α/β-соленоиды [61–64]. К соленоидным белкам класса III относят группу белков с ЛБП (α/β-соленоид) [65–67], белки-антифризы (antifreeze proteins, AFP) (β-структурные соленоиды) [68], белки с АнкП-, АрмП-, ТПП- и HEAT-повторами (HEAT repeats) (α-спиральные соленоиды) [69–72]. К несоленоидным структурам класса III относятся молекулы, имеющие сложную укладку, в центре которой находятся протяженные β-листы, формирующиеся за счет межцепочечных водо-

родных связей и взаимодействия неполярных боковых цепей структуры с повторяющимися элементами [73]. В качестве примера таких белков можно привести, например, люминальный домен кальнексина [74], P-домен кальретикулина [75], поверхностный белок A *Borrelia burgdorferi* [76]. Как и структуры класса II, структуры класса III соответствуют минисателлитным повторам ДНК [33, 36].

К белкам класса IV относятся белки с "закрытыми" (не удлиненными) структурами с повторами из 30–60 аминокислотных остатков [77, 78]. Отдельные подклассы этого класса представлены белками со структурами α/β-бочонков (α/β barrel), ТИМ-бочонков (triosephosphate isomerase barrel, TIM barrel), пропеллеров (propeller), β-трилистников (β-trefoil) и α/β-трилистников (α/β-trefoil), α/β-призм (α/β-prism) и трансмембранных β-бочонков (transmembrane β-barrels). ТИМ-бочонки являются самой распространенной структурной повторяющейся единицей каталитических доменов, они присутствуют примерно в 10% всех известных ферментов [79, 80]. β-Пропеллеры представляют собой структуру, сформированную 4–8 высокосимметричными β-листами в форме лопастей, расположенных тороидально вокруг центральной оси. При этом образуется активный сайт белка, похожий на воронку [81]. Так, например, нейраминидаза вируса гриппа представляет собой шестилопастный β-пропеллерный белок, активный в форме тетрамера. Этот белок катализирует отщепление фрагментов сиаловой кислоты от белков клеточной мембраны, что способствует нацеливанию вновь продуцируемых вирионов на неинфицированные клетки [82]. Повторы β-трансдуцина (WD40) представляют собой β-пропеллерные структуры с 4–16 лопастями. Такие белки выполняют множество функций, включая передачу сигналов, регуляцию транскрипции и регуляцию клеточного цикла [83, 84]. β-Пропеллерные фитазы, содержащие шестилопастный β-винт, способны гидролизовать сложноэфирные связи в молекуле фитата, основной форме накопления фосфатов в растениях [85]. β-Трилистники представляют собой структуру, состоящую из шести β-шпилек, каждая из которых образована двумя β-листами. Вместе они образуют β-бочонок с треугольной "шапочкой", состоящей из трех β-шпилек [86, 87]. Как структурная единица β-трилистник был идентифицирован в ингибиторе трипсина Кунитца (Kunitz STI protease inhibitor) некоторых растений [88, 89], в интерлейкинах-1α и -1β [90, 91], в факторах роста фибробластов 1 и 2 [18]. Структуры α/β-трилистников образованы β-шпильками, в структуре которых есть периферические α-спирали. В качестве примера белков с такими повторами можно привести белки семейства лектинов [92].

Структура α/β-призмы представляет собой, как следует из ее названия, треугольную призму, каждая сторона которой содержит повторы из пары α-спиралей и антипараллельного β-листа, состоящего из трех β-участков. При этом α-спирали расположены внутри структуры, а β-листы – преимущественно снаружи. В качестве примера белков с α/β-призмами можно привести семейство карбоксивинилтрансфераз [93].

Белки с трансмембранными β-бочонками встречаются только во внешних мембранах грамотрицательных бактерий, в клеточных стенках грамположительных бактерий и наружных мембранах митохондрий и хлоропластов [78]. В число этих белков входят белки внешней мембраны OmpA и OmpX [94, 95], порины OmpF и PhoE [96], субстрат-специфичные порины LamB (Laminin subunit beta-1) и ScrY (Sucrose porin) [97], TonB-зависимые транспортеры сидерофоров железа FhuA и FepA [98]. Структуры класса IV соответствуют сателлитным повторам ДНК [31].

Белки класса V – это белки с большими повторяющимися единицами, способными независимо сворачиваться в стабильные домены. Размер отдельных структурных единиц составляет 50–60 а.о. Структуру молекулы белков с такими повторами можно представить как "бусинки на нити" ("beads on a string"), в которой отдельные бусинки соответствуют глобулярным доменам. Классическим примером таких доменов служит домен "цинковый палец" (Zn-finger) [99, 100] – наиболее распространенный ДНК-связывающий мотив, стабилизированный одним или двумя ионами цинка. В отдельный подкласс этого класса принято выделять молекулы, имеющие протяженную и полужесткую структуру за счет плотного соединения между повторяющимися модулями. Такие конструкции представляют собой спектриноподобные повторы (spectrin-like repeats), образованные 100–130 а.о. Каждый повтор при этом сформирован пучком из трех–пяти α-спиралей, расположенных вдоль оси молекулы. Некоторые α-спирали этих связок длиннее других, что позволяет соседним повторяющимся модулям взаимодействовать друг с другом вдоль оси в стержневой конструкции [101]. К белкам с такими структурами относятся спектрины [101], белок клеточной адгезии Ebh (cell-wall-associated adhesion protein Ebh) [102], семейство куллинов (cullin) [103]. В отдельный подкласс выделяют полужесткие конструкции, образованные β-структурными доменами длиной около 60 а.о., например, белки системы комплемента (Sushi repeats or complement control protein (CCP)), такие как селектины [104] и кадгерины [105]. Структуры класса V, как и структуры класса IV соответствуют сателлитным повторам ДНК [31].

Таким образом, существующая классификация белков со структурными повторами позволяет утверждать, что длина 20–50 а.о. соответствует "горячей точке" структурного разнообразия. Повторы именно такой длины могут укладываться в соленоиды, спирали, "бусинки на нитке" или в разные типы закрытых конструкций. Кроме того, повторы, в основе которых лежат β-листы, фор-

мируют более разнообразные структуры, чем структуры, содержащие α-спирали. Так, на основе β-листов в качестве повторяющихся структур могут формироваться β-соленоиды, β-спиральные складки, однослойные антипараллельные β-структуры, β-трилистники или β-пропеллеры. При этом α-спиральные структуры в основном ограничиваются α-спиральными катушками и α-соленоидами [41].

В дополнение отметим, что в ряде работ повторы делят на идеальные, почти идеальные и неидеальные. За основу такого деления приняты значении расстояния Хэмминга (число позиций, в которых соответствующие символы двух последовательностей одинаковой длины различны) между консенсусной последовательностью и выровненными последовательностями областей с повторами [49, 106, 107]. Среди белков с известной трехмерной структурой практически отсутствуют белки с идеальными повторами, поскольку они приобретают “неидеальность” из-за мутаций (вставки, делеции) в процессе эволюции. При этом идеальные повторы занимают особое место среди белковых повторов, поскольку каждый остаток в повторе обладает высокой структурной и функциональной значимостью, как, например, в структуре коллагена или некоторых структурах, содержащих повторы, сформированные β-листами [54, 56, 57, 108].

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ БЕЛКОВ С ПОВТОРАМИ

Структурные повторы в белках встречаются во всех царствах живых организмов. Количество структурных повторов в различных семействах белков может сильно варьировать. В среднем, у эукариотических организмов оно выше, чем у прокариотических, что связано с их полифункциональностью [32, 109, 110]. Высказываются также предположения, что такие повторы служат дополнительным источником изменчивости эукариотических организмов для компенсации низких скоростей их генерации (биологической продуктивности) [1]. Считается, что не менее 25% всех белков и треть всех белков из протеома человека содержат структурные повторы [1, 2].

Разбивка структурных повторов по длине на четыре группы: гомоповторы (длина 1 а.о.), микроповторы (1–3 а.о.), маленькие повторы (4–15 а.о.), доменные повторы (>15 а.о.) позволила проанализировать распределение содержания повторов различной длины во всех белках базы UniProt [111] (табл. 1).

Аналогичный анализ по выявлению различий в длине структурных повторов у эволюционно различных групп организмов, включая вирусы, проведен в [113] (табл. 2).

В целом утверждается [111], что чуть более 50% белков содержат хотя бы один структурный повтор, при этом, как правило, в белках эукариот число повторов больше, чем у архей и бактерий. Отмечена также положительная корреляция [111] между длиной аминокислотной последовательности и количеством структурных повторов в молекуле белка. Эукариотические белки содержат, как правило, более одного конкретного повтора. Это согласуется с данными об участии структурных повторов в регуляции экспрессии генов и пе-

Таблица 1. Распределение количества записей в базе UniProt, содержащих гомоповторы, микроповторы, короткие повторы и доменные повторы*

Доля и характеристика повтора	Археи	Бактерии	Эукариоты
	Все белки		
Количество записей в UniProt	19370	332327	181814
Средняя длина	288	313	436
Число повторов	6420	103842	92472
Доля всех повторов	0.331	0.312	0.509
Доля гомоповторов	0.006	0.006	0.086
Доля микроповторов	0.117	0.109	0.245
Доля коротких повторов	0.217	0.208	0.328
Доля доменных повторов	0.051	0.049	0.143
	Белки с повторами		
Средняя длина	355	404	572
Доля гомоповторов	0.019	0.019	0.169
Доля микроповторов	0.354	0.350	0.482
Доля коротких повторов	0.654	0.667	0.644
Доля доменных повторов	0.154	0.157	0.281

* Данные из [111].
Примечание. Анализ повторов проводили с помощью библиотеки TRAL [112].

Таблица 2. Различия длины структурных повторов у организмов разных эволюционных групп*

Таксономическая группа	Число последовательностей	Число последовательностей с повторами	Белки, содержащие повторы, %	Средняя длина повтора
Всего	554241	28003	5	15
Археи	19525	351	2	11
Бактерии	333691	6794	2	17
Эукариоты				
Грибы	33613	3996	12	14
Растения	42101	3601	12	13
Позвоночные	18292	1461	8	14
Беспозвоночные	27607	3372	12	19
Вирусы	16852	889	5	14

* Данные из [113].

редаче сигналов [114, 115], т.е. более сложным организмам для выполнения большего числа функций требуется больше повторов. Отметим также, что короткие структурные повторы встречаются чаще, чем длинные [111, 116, 117]. Согласно [113], структурные повторы у эукариот встречаются чаще по сравнению с бактериями и археями.

Проведен анализ появления 11780 мотивов из шести аминокислотных остатков, состоящих из двух случайно расположенных аминокислот (повторы вида ASSSSS, RGGRGG, PAPAPA), в 97 эукариотических и 25 бактериальных протеомах [118]. Сравнение частоты встречаемости таких мотивов в разных протеомах позволило оценить возможное филогенетическое родство различных таксономических царств. Так, отряд протистов Diplomonadida филогенетически более близок к бактериям, чем к эукариотам, а таксономические группы Stramenopiles и Amoebozoa ближе друг к другу, чем к другим царствам эукариот [118]. Кроме того, неупорядоченные гомоповторы (повторы, состоящие из аминокислотных остатков, способствующих неупорядоченности) чаще встречаются в эукариотических, чем в бактериальных протеомах [119, 120].

И хотя структурные повторы более представлены у эукариот, чем у прокариот [121], изучение специфичных повторов в белках позволяет выявить особенности их таксономического распределения. Так, масштабные исследования различных таксонов показали, что 98% протеомов бактерий и 78% протеомов архей содержат хотя бы один белок с ТПП [122]. Специфическая функция отдельного ТПП-содержащего белка, вероятно, определяет уровень вирулентности микроорганизма [8, 123]. Белки хотя бы с одним АнкП идентифицированы в 57% бактериальных и 9% архейных протеомах, при этом АрмП найден в 77% случаев [122]. Кроме того, как показано недавно, почти 85.6% видов бактерий (набор данных из [122]) содержат не менее двух повторов, а три повтора найдены более чем у половины (52%) из них [122].

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОВТОРОВ В БЕЛКАХ: АЛГОРИТМЫ И БАЗЫ ДАННЫХ

Алгоритмы идентификации повторов в белках

Учитывая распространенность, уникальность функционирования и связь повторов с патогенезом различных заболеваний, распознавание структурных повторов в белках представляет актуальную задачу. Структурные повторы часто “не идеальны”, содержат ряд эволюционных мутаций (замены, вставки, делеции), поэтому некоторые из них трудны для идентификации. Разработаны специальные алгоритмы и программы поиска структурных повторов в белках. По алгоритму, лежащему в основе работы существующих программ поиска и идентификации повторов в белках, их можно разделить на пять основных групп (табл. 3).

Использование Фурье-анализа для поиска структурной периодичности в белках не требует предварительных данных о наличии самих повторов. Такой способ подходит для идентификации длинных повторов без вставок (в фибриллярных белках, таких как коллаген или спиральные (двух- и более) структуры полипептидов, класс II) и инделей, и является *ab initio* методом [124, 125]. Методы кластеризации, включающие алгоритмы расширения коротких строк, позволяют идентифицировать тандемные повторы с инделями и дают хорошие результаты при идентификации коротких (менее 15–20 а.о.) повторов [126, 127]. Алгоритмы выравнивания последовательностей самих на себя эффективны для обнаружения длинных повторов (более ~ 10 а.о.), однако они часто не идентифицируют короткие повторы и не различают тандемные и чередующиеся повторы [128, 129]. Подходы, основанные на профилях скрытых мар-

Таблица 3. Алгоритмы идентификации повторов в белках

Алгоритм	Характеристика повтора	Пример ресурса *
Фурье-анализ (Fourier transform analysis)	Длинные повторы без инделей	REPPER (https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/repper)
Выравнивание последовательностей самих на себя (sequence self-alignment (SSA))	Более 15 а.о., без инделей	RADAR (https://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/radar/) TRUST (https://www.ibi.vu.nl/programs/trustwww/) REPRO (https://www.ibi.vu.nl/programs/reprowww/)
Профиль скрытых марковских моделей (СММ) (Hidden Markov Models, HHMs))	Длинные “неидеальные” повторы	PFAM (http://pfam.xfam.org/) SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/) PROSITE (https://prosite.expasy.org/) TPRPRED (https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/tprpred)
Сравнение профилей СММ-СММ (HMM-HMM or profile-profile comparisons)	Длинные “неидеальные” повторы	HHREPID (https://toolkit.tuebingen.mpg.de/) TRAL (https://www.vital-it.ch/software/tral)
Кластеризация коротких строк (Short string extension algorithms)	Менее 15–20 а.о., с инделями	T-REKS (https://bioinfo.crbm.cnrs.fr/index.php?route=tools&tool=3) XSTREAM (https://amnewmanlab.stanford.edu/xstream/)

* Серверы, действующие на дату написания.

ковских моделей (СММ и сравнение профилей СММ–СММ), идеальны для обнаружения длинных “неидеальных” повторов [130, 131]. Однако они требуют заранее сформированного выравнивания предполагаемых повторов и, следовательно, не подходят для автоматизированного крупномасштабного анализа *ab initio*. Кроме того, результативность этих методов зависит от качества выравнивания последовательностей, используемых в качестве основы и полноты СММ-профилей.

В настоящее время для поиска некоторых специфичных повторов применяют также комбинированные и специализированные методы идентификации периодичности в белках. Так, метод поиска внутренней симметрии в белках (detection of internal symmetry) реализован в программе CE-Symm (https://github.com/rcsb/symmetry/releaseshttps://github.com/rcsb/symmetry) для поиска ТИМ-бочонков и β-пропеллеров [132]. Программа AnkPred (http://bioinf.iiit.ac.in/AnkPred/) использует подход на основе применения графов, правила на основе вторичной структуры для идентификации АнкП в белках [133]. Программы ProSTRIP (http://cluster.physics.iisc.ernet.in/prostrip/https://bio.tools/prostrip) [134] и Swelfe (https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/Swelfehttps://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/Swelfe) [135] используют комбинированные алгоритмы специализированного конформационного алфавита (conformational alphabet analysis) и динамического машинного обучения для поиска повторов на всех уровнях белковой организации молекул. Метод TAPO (https://bioinfo.crbm.cnrs.fr/index.php?route=tools&tool=2) для поиска повторов в трехмерных структурах белков в дополнение к атомным координатам анализа использует периодичность в конформационном алфавите, распределении вторичной структуры, картах контактов аминокислотных остатков и расположении направления элементов вторичной структуры [136]. Сервер Reptile (http://reptile.unibe.ch) позволяет производить протеомно-вероятностный поиск идеальных повторов в белках паразитических и других организмов на основе сравнительной геномики [137]. Для поиска структурных повторов в белках также можно использовать метод разбиения структурного пространства с последующим анализом энергетического ландшафта [138]. Отметим, что на сегодняшний день наиболее правильным для выявления повторов в белках считается использование комбинации доступных программных продуктов.

Базы данных структурных повторов в белках

На основе протеомных данных можно проводить систематический масштабный анализ аминокислотных последовательностей белков с целью идентификации в них специфических мотивов и повторов и проведения дальнейшего анализа их изменчивости, структуры, функции и эволюционного развития. Необходимо с высокой точностью на уровне аминокислотной последовательности установить границы доменов для последующего множественного выравнивания. Данных о третичной структуре для визуального определения границ доменов и наличия повторов во многих белковых семействах не существует. Для решения таких за-

дач с помощью различных биоинформатических подходов созданы специализированные базы данных структурных мотивов. Сведения о структурных повторах, их количестве и границах отдельных доменов можно найти также в базах данных белковых доменов и семейств, представляющих интегрированные и хорошо аннотированные ресурсы (табл. 4).

В основе каждой базы данных, содержащей информацию о структуре белков, их укладке, доменной организации, лежат определенные алгоритмы работы. Поскольку эти алгоритмы в ряде случаев различаются, а в базы данных, имеющих один и тот же алгоритм, обычно введены дополнительные условия или ограничения (например, набор правил ProRule в PROSITE; дополнительный анализ отсутствия схожих участков, вставок и делеций в Pfam), выходные данные для одного и того же объекта могут сильно различаться [113, 150].

Тем не менее, описанные базы данных содержат сведения и подходы к проведению биоинформатического анализа структурных повторов с целью оценки их распределения в протеомах, специфичности длин и аминокислотного состава, изучения функциональных и структурных данных. Так, например, база данных PRDB включает инструменты для оценки тенденции белков со структурными повторами быть неструктурированными и позволяет анализировать консервативные неповторяющиеся домены, примыкающие по аминокислотной последовательности к таким повторам [145]. В базе данных RepeatsDB приведена аннотированная иерархическая классификация, кластеризующая уровни по структурному сходству (класс > топология > укладка), дополненная классификацией

Таблица 4. Базы данных белковых семейств, доменов и структурных повторов

Тип структурного повтора	База данных	Основные характеристики**	Адрес сервера*
Белковые семейства и домены	Pfam [139]	18259 белковых семейств	http://pfam.xfam.org/
	SMART [140]	1300 белковых доменов	http://smart.embl-heidelberg.de/
	InterPro [141]	Интеграция профилей и характеристик из баз данных CATH, CDD, HAMAP, MobiDB Lite, Panther, Pfam, PIRSF, PRINTS, Prosite, SFLD, SMART, SUPERFAMILY и TIGRfams	https://www.ebi.ac.uk/interpro/
	PROSITE [142]	311 моделей; 1296 профилей	https://prosite.expasy.org/
	SUPFAM [143]	Аннотации 63244 последовательностей из UniProt	http://supfam.org/
	UniProt [144]	563972 аннотированных последовательностей; интеграция профилей и характеристик других баз данных	https://www.uniprot.org/
Структурные повторы	Protein Repeat DataBase (PRDB) [145]	2380528 повторов в 836670 белках	https://bioinfo.crbm.cnrs.fr/index.php?route=databases&tool=17
	RepeatsDB [146]	Аннотация и классификация 100941 повторов в 14072 отдельных белковых цепях, доступных в банке данных трехмерных структур белков PDB (https://www.rcsb.org/) [147]	https://repeatsdb.org/
	LRRfinder [148]	Поиск и анализ ЛБП; более 4000 уникальных природных ЛБП	http://www.lrrfinder.com/lrrfinder.php
	HRaP [149]	Поиск гомоповторов и повторяющихся неструктурированных мотивов в эукариотических и бактериальных протеомах	http://bioinfo.protres.ru/hrap/

* Серверы, действующие на дату написания.
** На 02.2021 г.

род (clan) > семейство на основе гомологии последовательностей и присутствии специфичных мотивов (на основе данных базы Pfam) [146]. Некоторые репрезентативные базы данных содержат структурно-функциональную информацию о подробно охарактеризованных семействах белков со структурными повторами, например таких, как ЛБП [148]. База HRaP [149] позволяет идентифицировать гомоповторы и повторяющиеся неструктурированные мотивы в эукариотических и бактериальных протеомах.

Имеющиеся данные, несмотря на большое разнообразие подходов к идентификации структурных повторов в белках и доступных баз данных, охватывают только некоторые типы повторов и/или исследуются на отдельных геномах/протеомах. Таким образом, создание всеобъемлющего ресурса данных по-прежнему представляет собой перспективное направление для улучшения понимания значимости структурных повторов в белках.

СТРУКТУРНЫЕ ПОВТОРЫ И ПАТОГЕНЕЗ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Многочисленные исследования доказывают существование связи между белками со структурными повторами и различными заболеваниями (табл. 5).

Так, например, нейродегенерация, связанная с β-пропеллерным белком BPAN (β-propeller protein-associated neurodegeneration), характеризуется ранним началом судорог, задержкой развития и умственной отсталостью [156]. Полиморфизм гена *WDR45* идентифицирован как у мужчин, так и у женщин с этим заболеванием [155, 156]. Наследственные мутации в гене рецептора липопротеинов низкой плотности – белка, в структуре которого содержится по крайней мере один β-пропеллер, приводят к развитию семейной гиперхолестеринемии. При этом заболевании повышается концентрация липопротеинов низкой плотности и холестерина, что приводит к развитию коронарного

Таблица 5. Заболевания, ассоциированные с некоторыми специфичными структурными повторами

Структурный повтор	Характеристика нарушения	Ассоциированное заболевание	Ссылка
Полиглутаминовый и полиглициновый повторы	Полиморфизм длины повторов андрогенного рецептора	Рак предстательной железы, доброкачественная гиперплазия предстательной железы, ревматоидный артрит, болезнь Хантингтона	[151–153], [45, 52]
β-Пропеллеры	Гетерозиготные или гомозиготные мутации гена X-хромосомы, кодирующего повтор WD40	Нейродегенерация, связанная с β-пропеллерными белками (β-propeller protein-associated neurodegeneration, BPAN) рассеянность, миоклония, эпилептические спазмы, эпилептические синдромы (синдром Веста и синдром Леннокса–Гасто)	[154–156]
ЛБП	Мутации гена, кодирующего белки, содержащие ЛБП	Миопия (близорукость), митохондриальная энцефаломиопатия, болезнь Крона	[157–159]
ТИМ-повторы	Мутации белка β-*D*-галактозидазы, содержащего ТИМ-повторы	GM1-ганглиозидозы, мукополисахаридоз типа IV или синдром Моркио	[160, 161]
АнкП	Низкая экспрессия мышечных белков, содержащих АнкП	Мышечные заболевания, рабдомиосаркома	[162–164]
АрмП	Мутации гена, кодирующего белок с АрмП	Опухоли кишечника, прогрессия	[165, 166]
β-Трилистники	Мутации генов, кодирующих белки, содержащие β-трилистник	Врожденные нарушения гликозилирования (опухолевый кальциноз) (FTC) и синдром гиперфосфатемии–гиперостоза (HHS)	[167–170]
Спектриноподобные повторы	Низкий уровень дистрофина, содержащего спектриноподобные повторы	Атрофия мышц мышечная дистрофия Дюшенна	[171, 172]

атеросклероза и ишемической болезни сердца [156, 173]. При наследственных формах болезни Паркинсона часто обнаруживаются мутации в гене *LRRK2*, кодирующем протеинкиназу 2, которая содержит ЛБП, однако механизм возникновения заболевания у носителей мутаций в этом гене не установлен [174]. Одной из возможных причин болезни Крона – аутоиммунного воспалительного заболевания желудочно-кишечного тракта, считаются мутации в гене *CARD15*, влияющие на аминокислотные последовательности в ЛБП домена активации белка каспазы (caspase recruitment domain-containing protein 15) [159]. Болезнь Хантингтона – аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, обусловленное увеличением числа копий тринуклеотидных повторов CAG в гене белка хантингтина [175, 176]. Ряд заболеваний, включая рак предстательной железы, доброкачественную гиперплазию предстательной железы, мужское бесплодие и ревматоидный артрит также связывают с полиморфизмом длины глутаминовых и глициновых повторов в молекулах рецепторов андрогенов [153]. К наследственным заболеваниям из группы лизосомных болезней накопления (lysosomal storage diseases) относится мукополисахаридоз типа IV, или синдром Моркио, который характеризуется значительными деформациями скелета, особенно грудной клетки [177], а также GM1-ганглиозидозы. Эти заболевания связывают с мутациями в β-*D*-галактозидазе, содержащей в своей структуре ТИМ-повторы [160, 161]. GM1-ганглиозидозы обусловлены дефектом или недостатком β-галактозидазы, что приводят к нарушению метаболизма человека и накоплению субстратов (ганглиозида GM1, гликопротеинов и кератансульфата) главным образом в центральной и периферической нервной системе [178]. Функциональная недостаточность АнкП-содержащих белков в скелетных мышцах приводит к развитию различных заболеваний [162, 164]. Мутации гена *APC* (adenomatous polyposis coli), кодирующего большой белок с множеством функциональных АрмП, приводят к развитию опухолей кишечника [165]. Мутации генов, кодирующих GalNAc-трансферазу, содержащую в своей структуре повторы β-трилистника, приводят к врожденным дефектам гликозилирования, при которых нарушается синтез гликанов, их присоединение к гликопротеинам и гликолипидам, а также синтез гликозилфосфатидилинозита [167–170]. Низкая экспрессия белка дистрофина, содержащего 24 спектриноподобных повтора, приводит к развитию мышечной дистрофии Дюшенна [171, 172].

Отметим также, что многие белки, содержащие структурные повторы, характеризуются высокими уровнями внутренней неупорядоченности [12, 107, 179–181], что приводит к их структурно-функциональной гетерогенности. Подобная неупорядоченность считается одним из факторов вовлеченности таких белков в патогенез различных заболеваний человека [12, 49, 106]. Так, показано [182, 183], что доля неупорядоченных остатков увеличивается в белках, содержащих гомоповторы, состоящие из заряженных и полярных аминокислотных остатков, и уменьшается в повторах из гидрофобных остатков. Анализ 122 различных протеомов показал, что максимальная доля неупорядоченных остатков характерна для белков, содержащих гомоповторы лизина и аргинина, минимальная – для гомоповторов из валина и лейцина [182–184]. При этом гомоповторы, состоящие из аминокислотных остатков E, S, Q, G, L, P, D, A и H, ассоциированы с патогенезом ряда болезней человека. На основе проведенного анализа создан ресурс HRaDis (HomoRepeats and human Diseases http://bioinfo.protres.ru/hradis/) для изучения взаимосвязи гомоповторов с патологиями человека [183]. Приведенные примеры показывают, что различные структурные повторы, обнаруженные во множестве белков в различных количествах, играют важную роль в патогенезе ряда серьезных заболеваний.

БЕЛКИ С ПОВТОРАМИ В КАЧЕСТВЕ КАРКАСОВ ДЛЯ ПРОЕКТИРОВАНИЯ НОВЫХ МОЛЕКУЛ

Топологическая сложность и кооперативность, возникающая из особенностей типичных глобулярных белковых структур, часто представляет проблему при работе в области белкового дизайна. Белки с повторами, такими как АнкП, ТПП и ЛБП, в отличие от глобулярных белков имеют регулярные, линейно расположенные структурные блоки, что делает их идеальными объектами для анализа и дальнейшего модулирования свойств [185–189].

Так, предложен список уникальных повторов с указанием их основных структурных характеристик [190]. При этом одновременно с общими принципами проектирования белков на основе специфичных структурных повторов выделены определенные классы повторов, наиболее перспективных в качестве белковых каркасов, основ новых связывающих реагентов или биоматериалов для биомедицинских и нанотехнологических приложений [190].

На начальных этапах разработки новых искусственных белков на основе структурных повторов в каждом повторе идентифицируют остатки, определяющие специфичность укладки. Обычно с этой целью, используя базы данных белковых структур (PDB (https://www.rcsb.org/), PDBe-KB (https://www.ebi.ac.uk/pdbe/node/1)), проводят поиск консенсусной аминокислотной последовательности. При этом, чем более консервативен аминокислотный остаток в данном положении, тем более вероятно, что в конечной синтезируемой молекуле укладка сохранится [187, 191]. Предложено применять “модульный” подход при использовании белков с повторами в качестве каркасов для проектирования новых молекул [192].

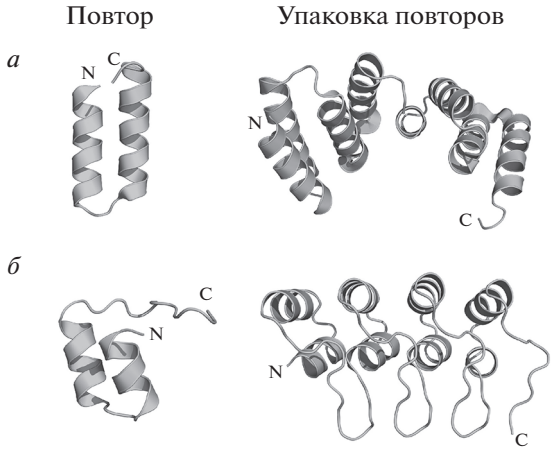

Рис. 3. Представление использования ТПП и АнкП в качестве белковых каркасов. *а* – Структура одного ТПП-повтора, и кристаллическая структура искусственного белка с четырьмя ТПП-повторами (PDB: 2AVP) [195]. *б* – Структура одного АнкП, и кристаллическая структура искусственного белка, содержащего четыре АнкП (PDB: 6MOG) [196].

В этом случае модули, состоящие из повторяющихся структурных единиц, выравниваются для идентификации специфических особенностей, которые впоследствии предполагается закладывать в шаблоны проектируемых белков. Реализация предлагаемого подхода показана на примере белков, содержащих ТПП и АрмП [192]. Разработан вычислительный подход [193], который объединяет информацию о специфичности аминокислотной последовательности белка и структурные особенности белков с повторами (на основе Rosetta *de novo* [194]), для создания “идеальных” искусственных стабильных модулей. Данный подход реализован для шести специфичных повторов (АнкП, АрмП, ТПП, HEAT, ЛБП и WD40).

Примеры использования ТПП и АнкП в качестве белковых каркасов показаны на рис. 3.

В настоящее время на основе некоторых повторов разработано несколько библиотек белковых семейств, активно использующихся в дизайне новых лекарственных препаратов и бионанотехнологических продуктов (табл. 6).

Белок DARPins (Designed Ankyrin Repeat Proteins) – один из примеров белка, сконструированного на основе АнкП-повтора (рис. 3*б*) [197, 198]. DARPins считается перспективным стабильным каркасом для конструирования белков, распознающих мишени со сродством и специфичностью (способностью связываться только с определенным антигеном) большей, чем у антител [197–200]. На основе белка DARPins разрабатывается также новое поколение белков LoopDARPins с расширенными эпитопными характеристиками [199]. DARPins также рассматривают как микробициды (антисептические лекарственные средства) против ВИЧ [201]. Кроме того, специфичный для опухолевых клеток антиген DARPins, слитый с белковым токсином, используют для диагностики онкологических заболеваний [202].

Аналогичные исследования проводятся также на белках, содержащих АрмП [203–206], и белках с ЛБП [207–209]. Так, белки dArmRP (Designed armadillo repeat proteins [206]) в настоящее время рассматриваются в качестве каркасов, связывающих пептиды модульным способом [210, 211].

На основе белков, содержащих ЛБП, предложена библиотека каркасов [209], с помощью которой можно осуществить дизайн молекул и ре-

Таблица 6. Примеры использования некоторых повторов в качестве каркасов семейств искусственных белков

Повтор	Семейство белков	Характеристика/применение
АнкП	DARPins	Повышенные эпитопные характеристики, микробициды против ВИЧ, диагностика рака
	LoopDARPins	
АрмП	dArmRP	Связывание пептидов модульным способом
β-Пропеллерные повторы	Pizza Tako Cake	Строительные блоки для бионанотехнологичных продуктов
ЛБП		Хорошая растворимость при физиологических значениях pH, продуктивность, протеолитическая стабильность
HEAT-повторы	αRep	Термостабильность, хорошая экспрессия
ТПП	CTPR	Термостабильность, противоопухолевые агенты, нановолокна, монослои и наноструктурированные тонкие пленки, подложка для синтеза наночастиц и нанокластеров
Двухспиральные повторы	TALE	Редактирование генома

шить проблемы их низкой растворимости при физиологических значениях pH, низкой продуктивности и протеолитической нестабильности [212]. На основе ТПП-повторов разработаны библиотеки консенсусных белков CTPR (consensus tetratricopeptide repeat proteins) для специфического связывания с белками, взаимодействующими с супрессорами различных опухолевых образований [213–215] (рис. 3*а*). Модульные свойства CTPR и особенности их самосборки позволяют разрабатывать различные надмолекулярные архитектуры, такие как нановолокна, упорядоченные монослои, наноструктурированные тонкие пленки [216–218]. Кроме того, особенности поверхностей CTPR позволяют использовать их в качестве подложки для синтеза металлических наночастиц и формирования металлических нанокластеров [216, 219, 220].

Белки, содержащие β-пропеллерные структуры, также часто применяют в белковой инженерии [156]. Так, глюкозодегидрогеназу (GDH), содержащую шестилопастную β-пропеллерную структуру, использовали для создания биодатчика глюкозы [221]. В результате получен химерный белок GDH, имеющий более высокую термостабильность, более высокую стабильность связывания кофакторов и повышенную специфичность к субстрату [221]. Эти свойства были приписаны усилению гидрофобных взаимодействий из-за мутаций на С-конце β-пропеллерного домена. β-Пропеллерный домен нейраминидазы вируса гриппа часто используется при разработке лекарственных средств [222–224]. Получены эффективные ингибиторы нейраминидазы гриппа, которые замедляют или останавливают прогрессирование гриппозной инфекции [224].

На основе β-пропеллерных повторов реконструированы идеально симметричные 6- и 8-лопастные белки – Pizza6 [225] и Tako8 [226] соответственно. Искусственные белки предлагается использовать в качестве строительных блоков в бионанотехнологических разработках [226, 227].

Обсуждается также перспектива использования белков с HEAT-повторами в качестве каркаса для искусственных белков [228–230]. Описано новое семейство искусственных белков αRep, созданных на основе термостабильных HEAT-подобных повторов, которые хорошо экспрессируются и обладают стабильностью [228–230].

Архитектура эффекторных белков, подобных активатору транскрипции (transcription activator-like effector, TALE), основана на канонических двухспиральных повторах, каждый из которых участвует в распознавании одной конкретной цепочки ДНК [231, 232]. Спирали, расположенные вокруг центральной оси, формируют общую сверхспиральную структуру белка для связывания дуплекса ДНК [232, 233]. Сконструированные таким образом молекулы, нацеленные на определенные последовательности ДНК, предлагается использовать в редактировании генома [234, 235].

Таким образом, белки со структурными повторами представляют интерес в качестве строительных блоков для инженерии новых лекарственных препаратов, белковых наноструктур и наноматериалов, а также для разработки новых биоматериалов и функциональных гибридных материалов.

ЭВОЛЮЦИОННОЕ РАЗВИТИЕ БЕЛКОВ С ПОВТОРАМИ

Возникновение структурных повторов в белках считается удачной эволюционной стратегией, так как регулярность вторичной структуры и разнообразие трехмерной сборки приводят к существованию молекул разного размера с множеством значимых функций [17].

Эволюционный анализ белков человека с повторами, проведенный на 61 эукариотическом протеоме [116], показал, что большинство повторов являются древними, при этом их число и порядок копирования сохраняются в процессе видоизменений организма. Эволюция повторов в белках (не *H. sapiens*) отражает процессы дублирования и появления делеций в ходе эволюции организмов. Сходные результаты получены и при изучении протеомов растений [236].

Анализ идентичности аминокислотных последовательностей в белках со структурными повторами различных видов показал, что число повторов увеличивается за счет одновременной дупликации сразу нескольких доменов [32, 237]. Кроме того, такие повторяющиеся единицы часто дублируются в центр региона с повторами. Такой механизм противоречит эволюционному развитию других белков, увеличение структуры которых происходит за счет добавления доменов к концевым участкам.

Предложена гипотеза, согласно которой повторы с высокой степенью гомологичности имеют общего предка, содержащего один повтор [17]. На ранних этапах эволюции эффективность функциональной активности может достигаться путем олигомеризации одиночных повторов [18]. Однако есть примеры белковых комплексов с повторами, которые образуются как из олигомеров с единичными повторами, так и из одной цепи с множественными повторами. При этом процесс кооперативного сворачивания белка с множественными повторами термодинамически более выгоден, чем сворачивание гомоолигомерного белка из мономеров [17].

Некоторые повторы в белках гипервариабельны, т.е. количество повторяющихся модулей внутри повторяющейся области сильно изменяется в пределах эволюционно короткого времени за счет вставок (расширения) или удаления (сокращения) структурных единиц. В некоторых белках эти изменения происходят так быстро, что

их можно наблюдать не только у разных видов, но и в одной популяции при адаптивных [238] и нейтральных условиях [239].

Эволюционный анализ набора данных для 109 полностью секвенированных геномов многоклеточных животных [240] показал, что белки с независимо сворачивающимися повторами имеют меньше ограничений на изменение числа повторов по сравнению с белками, повторяющиеся единицы которых сворачиваются кооперативно. Это показывает, что вставки и делеции, влияющие на структуры повторяющихся единиц, обычно негативно влияют на взаимосвязь белок–функция. Кроме того, предполагается, что согласованная эволюция, т.е. эволюционное развитие, при котором паралогичные гены внутри одного вида более тесно связаны друг с другом, чем с членами одного и того же семейства генов близкородственных видов, является одной из положительных эволюционных стратегий для ряда белковых семейств с повторами [240]. Повторы в таких белковых семействах содержат больше инделей, что приводит к появлению дополнительных функций, связанных с совместной эволюцией паразита и хозяина, реакцией на стресс и развитием нервной системы [240]. Адаптация организмов при этом ускоряет изменение числа повторов, уменьшая вариабельность последовательностей между отдельными единицами. Если же вид начинает участвовать в эволюционной гонке с паразитом, то согласованная эволюция обеспечивает более высокую частоту повторений инделей с целью увеличения генетической изменчивости, направленной против паразитирующего организма [240].

Исследование и реконструкция изменений некоторых белковых семейств позволяет судить об особенностях эволюционного развития специфических повторов в белках. Так, например, предполагается, что специфичная архитектура ТИМ-повтора могла возникнуть на ранних этапах эволюции биосинтеза белка в качестве идеального каркаса для метаболического перехода от рибозимов, пептидов и геохимических катализаторов к современным белкам-ферментам [80]. Предполагаемая функция мышечного белка небулина, содержащего до 20 суперповторов (один такой суперповтор содержит семь повторяющихся доменов небулина), – регуляция длины миофибрилл [241]. Следовательно, можно предположить, что увеличение длины небулина за счет большего числа структурных повторов связано с увеличением длины миофибрилл в некоторых тканях [37]. Несмотря на широкий диапазон размеров пропеллерных повторов в белках, их лопасти часто имеют сходные последовательности, что указывает на общее происхождение [242]. Анализ работ [227, 242, 243] позволяет предположить, что большинство β-пропеллерных повторов возникло в результате дивергентной эволюции за счет разнообразия лопастей у более древних организмов.

Однако, несмотря на большое количество исследований, посвященных эволюции белков, содержащих специфические структурные повторы, однозначного понимания механизма формирования таких белков на сегодняшний день не существует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем обзоре систематизированы данные по классификации белков со структурными повторами, их таксономическому распределению, а также особенностям структуры и функционирования. Объяснены механизмы возникновения структурных повторов. Рассмотрены подходы к идентификации повторов (биоинформатические алгоритмы поиска и специализированные базы данных), а также основные проблемы данной задачи и способы ее решения. Систематизированы данные о связи белков с повторами с патогенезом различных заболеваний, описано использование белков с повторами в качестве объектов исследований в области белковой инженерии и дизайна синтетических белков.

За последние два десятилетия идентифицировано множество глобулярных и неглобулярных белков, содержащих структурные повторы [17, 41]. Традиционные биоинформатические подходы, разработанные для анализа глобулярных доменов, не всегда могут применяться к белкам с повторами. И хотя наблюдается устойчивый прогресс в разработке новых инструментов прогнозирования и исследования как последовательностей, так и структур таких белков, лишь небольшая доля таких исследований посвящена сравнительным или комплексным интегрированным данным. Структурные повторы обнаруживаются в белках с разнообразными функциями. На сегодняшний день предпринято только несколько попыток классифицировать биологические роли таких белков с целью поиска взаимосвязи повтор–функция [1, 4, 244]. Отметим, что большинство исследований посвящено отдельно взятым протеомам или только нескольким специфическим повторам.

Таким образом, исследование структурных повторов в белках, понимание взаимосвязи между особенностями их последовательности и структурно-функциональными свойствами, выявление механизмов их эволюции представляется перспективным направлением современной молекулярной, структурной и эволюционной биологии. Полученные при этом результаты будут способствовать успешному конструированию новых молекул для применения в медицине, нанотехнологиях и создания новых биоматериалов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-14-50211.

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. Marcotte E.M., Pellegrini M., Yeates T.O., Eisenberg D. (1999) A census of protein repeats. *J. Mol. Biol.* **293**, 151–160. https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3136
2. Pellegrini M., Renda M.E., Vecchio A. (2012) *Ab initio* detection of fuzzy amino acid tandem repeats in protein sequences. *BMC Bioinformatics*. **13**, S8. https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-S3-S8
3. Pellegrini M., Marcotte E.M., Yeates T.O. (1999) A fast algorithm for genome-wide analysis of proteins with repeated sequences. *Proteins*. **35**, 440–446. PMID:10382671
4. Jorda J., Kajava A.V. (2010) Protein homorepeats sequences, structures, evolution, and functions. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **79**, 59–88. https://doi.org/10.1016/S1876-1623(10)79002-7
5. Schmitz-Linneweber C., Small I. (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci.* **13**, 663–670. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.001
6. Renault L., Nassar N., Vetter I., Becker J., Klebe C., Roth M., Wittinghofer A. (1998) The 1.7 A crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. *Nature*. **392**, 97–101. https://doi.org/10.1038/32204
7. Varela M., Diaz-Rosales P., Pereiro P., Forn-Cuní G., Costa M.M., Dios S., Romero A., Figueras A., Novoa B. (2014) Interferon-induced genes of the expanded IFIT family show conserved antiviral activities in non-mammalian species. *PLoS One*. **9**, e100015. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100015
8. Cerveny L., Straskova A., Dankova V., Hartlova A., Ceckova M., Staud F., Stulik J. (2013) Tetratricopeptide repeat motifs in the world of bacterial pathogens: role in virulence mechanisms. *Infect. Immun.* **81**, 629–635. https://doi.org/10.1128/IAI.01035-12
9. Jacobsen S.E., Binkowski K.A., Olszewski N.E. (1996) SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 9292–9296. https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9292
10. Baxa U., Cassese T., Kajava A.V., Steven A.C. (2006) Structure, function, and amyloidogenesis of fungal prions: filament polymorphism and prion variants. *Adv. Protein Chem.* **73**, 125–180. https://doi.org/10.1016/S0065-3233(06)73005-4
11. Kajava A.V, Squire J.M., Parry D.A.D. (2006) Beta-structures in fibrous proteins. *Adv. Protein Chem.* **73**, 1–15. https://doi.org/10.1016/S0065-3233(06)73001-7
12. Darling A.L., Uversky V.N. (2017) Intrinsic disorder in proteins with pathogenic repeat expansions. *Molecules*. **22**, 2027. https://doi.org/10.3390/molecules22122027
13. Sikorski P., Atkins E. (2005) New model for crystalline polyglutamine assemblies and their connection with amyloid fibrils. *Biomacromolecules*. **6**, 425–432. https://doi.org/10.1021/bm0494388
14. Den Dunnen W.F.A. (2017) Trinucleotide repeat disorders. *Handb. Clin. Neurol.* **145**, 383–391. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00027-4
15. Шилова О.Н., Деев С.М. (2019) Дарпины – перспективные адресные белки для тераностики. *Acta Naturae*. **11**, 42–53.
16. Mittl P.R., Ernst P., Plückthun A. (2020) Chaperone-assisted structure elucidation with DARPins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **60**, 93–100. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.12.009
17. Andrade M.A., Perez-Iratxeta C., Ponting C.P. (2001) Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J. Struct. Biol.* **134**, 117–131. https://doi.org/10.1006/jsbi.2001.4392
18. Ponting C.P., Russell R.B. (2000) Identification of distant homologues of fibroblast growth factors suggests a common ancestor for all beta-trefoil proteins. *J. Mol. Biol.* **302**, 1041–1047. https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4087
19. Apic G., Huber W., Teichmann S.A. (2003) Multi-domain protein families and domain pairs: comparison with known structures and a random model of domain recombination. *J. Struct. Funct. Genomics*. **4**, 67–78. https://doi.org/10.1023/a:1026113408773
20. Ye Y., Godzik A. (2004) Comparative analysis of protein domain organization. *Genome Res.* **14**, 343–353. https://doi.org/10.1101/gr.1610504
21. Moore A.D., Bornberg-Bauer E. (2012) The dynamics and evolutionary potential of domain loss and emergence. *Mol. Biol. Evol.* **29**, 787–796. https://doi.org/10.1093/molbev/msr250
22. Kersting A.R., Bornberg-Bauer E., Moore A.D., Grath S. (2012) Dynamics and adaptive benefits of protein domain emergence and arrangements during plant genome evolution. *Genome Biol. Evol.* **4**, 316–329. https://doi.org/10.1093/gbe/evs004
23. Kummerfeld S.K., Teichmann S.A. (2005) Relative rates of gene fusion and fission in multi-domain proteins. *Trends Genet.* **21**, 25–30. https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.11.007
24. Weiner J., Bornberg-Bauer E. (2006) Evolution of circular permutations in multidomain proteins. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 734–743. https://doi.org/10.1093/molbev/msj091
25. Weiner J., Beaussart F., Bornberg-Bauer E. (2006) Domain deletions and substitutions in the modular protein evolution. *FEBS J.* **273**, 2037–2047. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05220.x
26. Wang M., Caetano-Anollés G. (2009) The evolutionary mechanics of domain organization in proteomes and the rise of modularity in the protein world. *Structure*. **17**, 66–78. https://doi.org/10.1016/j.str.2008.11.008
27. Zmasek C.M., Godzik A. (2011) Strong functional patterns in the evolution of eukaryotic genomes revealed by the reconstruction of ancestral protein domain repertoires. *Genome Biol.* **12**, R4. https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-1-r4
28. Zmasek C.M., Godzik A. (2012) This Déjà vu feeling – analysis of multidomain protein evolution in eukaryotic genomes. *PLoS Comput. Biol.* **8**, e1002701. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002701
29. Forslund S.K., Kaduk M., Sonnhammer E.L.L. (2019) Evolution of protein domain architectures.

Methods Mol. Biol. **1910**, 469–504.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9074-0_15

30. Moore A.D., Grath S., Schüler A., Huylmans A.K., Bornberg-Bauer E. (2013) Quantification and functional analysis of modular protein evolution in a dense phylogenetic tree. *Biochim. Biophys. Acta.* **1834**, 898–907.
https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.01.007
31. Garrido-Ramos M.A. (2017) Satellite DNA: an evolving topic. *Genes* (Basel). **8**, 230.
https://doi.org/10.3390/genes8090230
32. Björklund A.K., Ekman D., Elofsson A. (2006) Expansion of protein domain repeats. *PLoS Comput. Biol.* **2**, e114.
https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020114
33. Buard J., Vergnaud G. (1994) Complex recombination events at the hypermutable minisatellite CEB1 (D2S90). *EMBO J.* **13**, 3203–3210.
https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06619.x
34. Djian P. (1998) Evolution of simple repeats in DNA and their relation to human disease. *Cell.* **94**, 155–160.
https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81415-4
35. Ellegren H. (2000) Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet.* **16**, 551–558.
https://doi.org/10.1016/s0168-9525(00)02139-9
36. Kruglyak S., Durrett R.T., Schug M.D., Aquadro C.F. (1998) Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 10774–10778.
https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10774
37. Björklund A.K., Light S., Sagit R., Elofsson A. (2010) Nebulin: a study of protein repeat evolution. *J. Mol. Biol.* **402**, 38–51.
https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.07.011
38. Deryusheva E.I., Machulin A. V., Selivanova O.M., Galzitskaya O.V. (2017) Taxonomic distribution, repeats, and functions of the S1 domain-containing proteins as members of the OB-fold family. *Proteins.* **85**, 602–613.
https://doi.org/10.1002/prot.25237
39. Machulin A. V, Deryusheva E.I., Selivanova O.M., Galzitskaya O.V. (2019) The number of domains in the ribosomal protein S1 as a hallmark of the phylogenetic grouping of bacteria. *PLoS One.* **14**, e0221370.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221370
40. Sokol D., Benson G., Tojeira J. (2007) Tandem repeats over the edit distance. *Bioinformatics.* **23**, e30-35.
https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl309
41. Kajava A.V. (2012) Tandem repeats in proteins: from sequence to structure. *J. Struct. Biol.* **179**, 279–288.
https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.08.009
42. Perutz M.F. (1999) Glutamine repeats and neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 58–63.
https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01350-4
43. Fan X. (2001) Oligomerization of polyalanine expanded PABPN1 facilitates nuclear protein aggregation that is associated with cell death. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2341–2351.
https://doi.org/10.1093/hmg/10.21.2341
44. Strømme P., Mangelsdorf M.E., Shaw M.A., Lower K.M., Lewis S.M.E., Bruyere H., Lütcherath V., Gedeon A.K., Wallace R.H., Scheffer I.E., Turner G., Partington M., Frints S.G.M., Fryns J.-P., Sutherland G.R., Mulley J.C., Gécz J. (2002) Mutations in the human ortholog of Aristaless cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nat. Genet.* **30**, 441–445.
https://doi.org/10.1038/ng862
45. Orr H.T., Zoghbi H.Y. (2007) Trinucleotide repeat disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* **30**, 575–621.
https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113042
46. Mosbach V., Poggi L., Richard G.-F. (2019) Trinucleotide repeat instability during double-strand break repair: from mechanisms to gene therapy. *Curr. Genet.* **65**, 17–28.
https://doi.org/10.1007/s00294-018-0865-1
47. Mosbach V., Poggi L., Viterbo D., Charpentier M., Richard G.-F. (2018) TALEN-induced double-strand break repair of CTG trinucleotide repeats. *Cell Rep.* **22**, 2146–2159.
https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.083
48. Faux N.G., Bottomley S.P., Lesk A.M., Irving J.A., Morrison J.R., de la Banda M.G., Whisstock J.C. (2005) Functional insights from the distribution and role of homopeptide repeat-containing proteins. *Genome Res.* **15**, 537–551.
https://doi.org/10.1101/gr.3096505
49. Jorda J., Xue B., Uversky V.N., Kajava A.V. (2010) Protein tandem repeats – the more perfect, the less structured. *FEBS J.* **277**, 2673–2682.
https://doi.org/10.1111/j.1742-464X.2010.07684.x
50. Healy E.F., Little C., King P.J. (2014) A model for small heat shock protein inhibition of polyglutamine aggregation. *Cell Biochem. Biophys.* **69**, 275–281.
https://doi.org/10.1007/s12013-013-9795-1
51. Gruber A., Hornburg D., Antonin M., Krahmer N., Collado J., Schaffer M., Zubaite G., Lüchtenborg C., Sachsenheimer T., Brügger B., Mann M., Baumeister W., Hartl F.U., Hipp M.S., Fernández-Busnadiego R. (2018) Molecular and structural architecture of polyQ aggregates in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **115**, E3446–E3453.
https://doi.org/10.1073/pnas.1717978115
52. Lyubchenko Y.L., Krasnoslobodtsev A. V, Luca S. (2012) Fibrillogenesis of huntingtin and other glutamine containing proteins. *Subcell. Biochem.* **65**, 225–251.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-5416-4_10
53. Christie N.T.M., Lee A.L., Fay H.G., Gray A.A., Kikis E.A. (2014) Novel polyglutamine model uncouples proteotoxicity from aging. *PLoS One.* **9**, e96835.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096835
54. Sorushanova A., Delgado L.M., Wu Z., Shologu N., Kshirsagar A., Raghunath R., Mullen A.M., Bayon Y., Pandit A., Raghunath M., Zeugolis D.I. (2019) The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. *Adv. Mater.* **31**, e1801651.
https://doi.org/10.1002/adma.201801651
55. Lupas A.N., Bassler J., Dunin-Horkawicz S. (2017) The structure and topology of α-helical coiled coils. *Subcell. Biochem.* **82**, 95–129.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0_4
56. Hennet T. (2019) Collagen glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **56**, 131–138.
https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.01.015
57. Berisio R., Vitagliano L., Mazzarella L., Zagari A. (2009) Crystal structure of the collagen triple helix model $[(\text{Pro-Pro-Gly})_{10}]_3$. *Protein Sci.* **11**, 262–270.
https://doi.org/10.1110/ps.32602

58. Gordon M.K., Hahn R.A. (2010) Collagens. *Cell Tissue Res.* **339**, 247–257.
https://doi.org/10.1007/s00441-009-0844-4
59. Lupas A.N., Gruber M. (2005) The structure of alpha-helical coiled coils. *Adv. Protein Chem.* **70**, 37–78.
https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70003-6
60. Gromiha M.M., Parry D.A. (2004) Characteristic features of amino acid residues in coiled-coil protein structures. *Biophys. Chem.* **111**, 95–103.
https://doi.org/10.1016/j.bpc.2004.05.001
61. Kobe B., Kajava A.V. (2000) When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 509–515.
https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)01667-4
62. Groves M.R., Barford D. (1999) Topological characteristics of helical repeat proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 383–389.
https://doi.org/10.1016/s0959-440x(99)80052-9
63. Kajava A.V., Steven A.C. (2006) Beta-rolls, beta-helices, and other beta-solenoid proteins. *Adv. Protein Chem.* **73**, 55–96.
https://doi.org/10.1016/S0065-3233(06)73003-0
64. Hennetin J., Jullian B., Steven A.C., Kajava A.V. (2006) Standard conformations of beta-arches in beta-solenoid proteins. *J. Mol. Biol.* **358**, 1094–1105.
https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.02.039
65. Kobe B., Deisenhofer J. (1996) Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A. *J. Mol. Biol.* **264**, 1028–1043.
https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0694
66. Peters J.W., Stowell M.H., Rees D.C. (1996) A leucine-rich repeat variant with a novel repetitive protein structural motif. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 991–994.
https://doi.org/10.1038/nsb1296-991
67. Huizinga E.G., Tsuji S., Romijn R.A.P., Schiphorst M.E., de Groot P.G., Sixma J.J., Gros P. (2002) Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain. *Science*. **297**, 1176–1179.
https://doi.org/10.1126/science.107355
68. Liou Y.C., Tocilj A., Davies P.L., Jia Z. (2000) Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a beta-helix antifreeze protein. *Nature*. **406**, 322–324.
https://doi.org/10.1038/35018604
69. Fournier D., Palidwor G.A., Shcherbinin S., Szengel A., Schaefer M.H., Perez-Iratxeta C., Andrade-Navarro M.A. (2013) Functional and genomic analyses of alpha-solenoid proteins. *PLoS One*. **8**, e79894.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079894
70. Cho U.S., Xu W. (2007) Crystal structure of a protein phosphatase 2A heterotrimeric holoenzyme. *Nature*. **445**, 53–57.
https://doi.org/10.1038/nature05351
71. Xing Y., Takemaru K.-I., Liu J., Berndt J.D., Zheng J.J., Moon R.T., Xu W. (2008) Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure*. **16**, 478–487.
https://doi.org/10.1016/j.str.2007.12.021
72. Hast M.A., Beese L.S. (2008) Structure of protein geranylgeranyltransferase-I from the human pathogen *Candida albicans* complexed with a lipid substrate. *J. Biol. Chem.* **283**, 31933–31940.
https://doi.org/10.1074/jbc.M805330200
73. Mitraki A., Papanikolopoulou K., Van Raaij M.J. (2006) Natural triple beta-stranded fibrous folds. *Adv. Protein Chem.* **73**, 97–124.
https://doi.org/10.1016/S0065-3233(06)73004-2
74. Schrag J.D., Bergeron J.J.M., Li Y., Borisova S., Hahn M., Thomas D.Y., Cygler M. (2001) The structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol. Cell.* **8**, 633–644.
https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00318-5
75. Ellgaard L., Riek R., Herrmann T., Güntert P., Braun D., Helenius A., Wüthrich K. (2001) NMR structure of the calreticulin P-domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 3133–3138.
https://doi.org/10.1073/pnas.051630098
76. Makabe K., Biancalana M., Yan S., Tereshko V., Gawlak G., Miller-Auer H., Meredith S.C., Koide S. (2008) High-resolution structure of a self-assembly-competent form of a hydrophobic peptide captured in a soluble beta-sheet scaffold. *J. Mol. Biol.* **378**, 459–467.
https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.02.051
77. Alvarez M., Zeelen J.P., Mainfroid V., Rentier-Delrue F., Martial J.A., Wyns L., Wierenga R.K., Maes D. (1998) Triose-phosphate isomerase (TIM) of the psychrophilic bacterium *Vibrio marinus*. Kinetic and structural properties. *J. Biol. Chem.* **273**, 2199–2206.
https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2199
78. Koebnik R., Locher K.P., Van Gelder P. (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **37**, 239–253.
https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01983.x
79. Wierenga R.K. (2001) The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Lett.* **492**, 193–198.
https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02236-0
80. Goldman A.D., Beatty J.T., Landweber L.F. (2016) The TIM barrel architecture facilitated the early evolution of protein-mediated metabolism. *J. Mol. Evol.* **82**, 17–26.
https://doi.org/10.1007/s00239-015-9722-8
81. Chen C.K.-M., Chan N.-L., Wang A.H.-J. (2011) The many blades of the β-propeller proteins: conserved but versatile. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 553–561.
https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.07.004
82. Pitt J.J., Da Silva E., Gorman J.J. (2000) Determination of the disulfide bond arrangement of Newcastle Disease virus hemagglutinin neuraminidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 6469–6478.
https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6469
83. Schapira M., Tyers M., Torrent M., Arrowsmith C.H. (2017) WD40 repeat domain proteins: a novel target class? *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 773–786.
https://doi.org/10.1038/nrd.2017.179
84. Jain B.P., Pandey S. (2018) WD40 repeat proteins: signalling scaffold with diverse functions. *Protein J.* **37**, 391–406.
https://doi.org/10.1007/s10930-018-9785-7
85. Kumar V., Yadav A.N., Verma P., Sangwan P., Saxena A., Kumar K., Singh B. (2017) β-Propeller phytases: diversity, catalytic attributes, current developments and potential biotechnological applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **98**, 595–609.
https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.134
86. Murzin A.G., Lesk A.M., Chothia C. (1992) beta-Trefoil fold. Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors interleukins-1 beta and 1 alpha and

fibroblast growth factors. *J. Mol. Biol.* **223**, 531–543. https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90668-a

87. Gosavi S., Whitford P.C., Jennings P.A., Onuchic J.N. (2008) Extracting function from a beta-trefoil folding motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 10384–19389. https://doi.org/10.1073/pnas.0801343105
88. Bendre A.D., Ramasamy S., Suresh C.G. (2018) Analysis of Kunitz inhibitors from plants for comprehensive structural and functional insights. *Int. J. Biol. Macromol.* **113**, 933–943. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.148
89. Zhou J., Li C., Chen A., Zhu J., Zou M., Liao H., Yu Y. (2020) Structural and functional relationship of *Cassia obtusifolia* trypsin inhibitor to understand its digestive resistance against *Pieris rapae. Int. J. Biol. Macromol.* **148**, 908–920. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.193
90. Giri Rao V.V.H., Gosavi S. (2015) Structural perturbations present in the folding cores of interleukin-33 and interleukin-1β correlate to differences in their function. *J. Phys. Chem. B.* **119**, 11203–11214. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.5b03111
91. Hailey K.L., Capraro D.T., Barkho S., Jennings P.A. (2013) Allosteric switching of agonist/antagonist activity by a single point mutation in the interluekin-1 receptor antagonist, IL-1Ra. *J. Mol. Biol.* **425**, 2382–2392. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.03.016
92. Liao J.-H., Chien C.-T.H., Wu H.-Y., Huang K.-F., Wang I., Ho M.-R., Tu I.-F., Lee I.-M., Li W., Shih Y.-L., Wu C.-Y., Lukyanov P.A., Hsu S.-T.D., Wu S.-H. (2016) A multivalent marine lectin from *Crenomytilus grayanus* possesses anti-cancer activity through recognizing globotriose Gb3. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 4787–4795. https://doi.org/10.1021/jacs.6b00111
93. Bensen D.C., Rodriguez S., Nix J., Cunningham M.L., Tari L.W. (2012) Structure of MurA (UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase) from *Vibrio fischeri* in complex with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomycin. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **68**, 382–385. https://doi.org/10.1107/S1744309112006720
94. Pautsch A., Schulz G.E. (1998) Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 1013–1017. https://doi.org/10.1038/2983
95. Kim K., Kim K.-P., Choi J., Lim J.-A., Lee J., Hwang S., Ryu S. (2010) Outer membrane proteins A (OmpA) and X (OmpX) are essential for basolateral invasion of *Cronobacter sakazakii. Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5188–5198. https://doi.org/10.1128/AEM.02498-09
96. Balasubramaniam D., Arockiasamy A., Kumar P.D., Sharma A., Krishnaswamy S. (2012) Asymmetric pore occupancy in crystal structure of OmpF porin from *Salmonella typhi. J. Struct. Biol.* **178**, 233–244. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2012.04.005
97. Kim B.-H., Andersen C., Kreth J., Ulmke C., Schmid K., Benz R. (2002) Site-directed mutagenesis within the central constriction site of ScrY (sucroseporin): effect on ion transport and comparison of maltooligosaccharide binding to LamB of *Escherichia coli. J. Membr. Biol.* **187**, 239–253. https://doi.org/10.1007/s00232-001-0167-1
98. Ferguson A.D., Deisenhofer J. (2002) TonB-dependent receptors – structural perspectives. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **1565**, 318–332. https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00578-3
99. Oteiza P.I., Mackenzie G.G. (2005) Zinc, oxidant-triggered cell signaling, and human health. *Mol. Aspects Med.* **26**, 245–255. https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.012
100. García C.C., Damonte E.B. (2007) Zn finger containing proteins as targets for the control of viral infections. *Infect. Disord. Drug Targets.* **7**, 204–212. https://doi.org/10.2174/187152607782110004
101. Kusunoki H., Minasov G., Macdonald R.I., Mondragón A. (2004) Independent movement, dimerization and stability of tandem repeats of chicken brain alpha-spectrin. *J. Mol. Biol.* **344**, 495–511. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.019
102. Tanaka Y., Sakamoto S., Kuroda M., Goda S., Gao Y.-G., Tsumoto K., Hiragi Y., Yao M., Watanabe N., Ohta T., Tanaka I. (2008) A helical string of alternately connected three-helix bundles for the cell wall-associated adhesion protein Ebh from *Staphylococcus aureus. Structure.* **16**, 488–496. https://doi.org/10.1016/j.str.2007.12.018
103. Zheng N., Schulman B.A., Song L., Miller J.J., Jeffrey P.D., Wang P., Chu C., Koepp D.M., Elledge S.J., Pagano M., Conaway R.C., Conaway J.W., Harper J.W., Pavletich N.P. (2002) Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature.* **416**, 703–709. https://doi.org/10.1038/416703a
104. Lukacik P., Roversi P., White J., Esser D., Smith G.P., Billington J., Williams P.A., Rudd P.M., Wormald M.R., Harvey D.J., Crispin M.D.M., Radcliffe C.M., Dwek R.A., Evans D.J., Morgan B.P., Smith R.A.G., Lea S.M. (2004) Complement regulation at the molecular level: the structure of decay-accelerating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 1279–1284. https://doi.org/10.1073/pnas.0307200101
105. Harrison O.J., Jin X., Hong S., Bahna F., Ahlsen G., Brasch J., Wu Y., Vendome J., Felsovalyi K., Hampton C.M., Troyanovsky R.B., Ben-Shaul A., Frank J., Troyanovsky S.M., Shapiro L., Honig B. (2011) The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins. *Structure.* **19**, 244–256. https://doi.org/10.1016/j.str.2010.11.016
106. Van Bibber N.W., Haerle C., Khalife R., Xue B., Uversky V.N. (2020) Intrinsic disorder in tetratricopeptide repeat proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 3709. https://doi.org/10.3390/ijms21103709
107. Machulin A., Deryusheva E., Lobanov M., Galzitskaya O. (2019) Repeats in S1 proteins: flexibility and tendency for intrinsic disorder. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2377. https://doi.org/10.3390/ijms20102377
108. Aachmann F.L., Svanem B.I.G., Güntert P., Petersen S.B., Valla S., Wimmer R. (2006) NMR structure of the R-module: a parallel beta-roll subunit from an *Azotobacter vinelandii* mannuronan C-5 epimerase. *J. Biol. Chem.* **281**, 7350–7356. https://doi.org/10.1074/jbc.M510069200
109. Apic G., Gough J., Teichmann S.A. (2001) Domain combinations in archaeal, eubacterial and eukaryotic proteomes. *J. Mol. Biol.* **310**, 311–325. https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4776

110. Ekman D., Björklund A.K., Frey-Skött J., Elofsson A. (2005) Multi-domain proteins in the three kingdoms of life: orphan domains and other unassigned regions. *J. Mol. Biol.* **348**, 231–243. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.007
111. Delucchi M., Schaper E., Sachenkova O., Elofsson A., Anisimova M. (2020) A new census of protein tandem repeats and their relationship with intrinsic disorder. *Genes* (Basel). **11**, 407. https://doi.org/10.3390/genes11040407
112. Schaper E., Korsunsky A., Pečerska J., Messina A., Murri R., Stockinger H., Zoller S., Xenarios I., Anisimova M. (2015) TRAL: tandem repeat annotation library. *Bioinformatics*. **31**, 3051–3053. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv306
113. Tørresen O.K., Star B., Mier P., Andrade-Navarro M.A., Bateman A., Jarnot P., Gruca A., Grynberg M., Kajava A.V., Promponas V.J., Anisimova M., Jakobsen K.S., Linke D. (2019) Tandem repeats lead to sequence assembly errors and impose multi-level challenges for genome and protein databases. *Nucl. Acids Res.* **47**, 10994–11006. https://doi.org/10.1093/nar/gkz841
114. Bilgin Sonay T., Koletou M., Wagner A. (2015) A survey of tandem repeat instabilities and associated gene expression changes in 35 colorectal cancers. *BMC Genomics*. **16**, 702. https://doi.org/10.1186/s12864-015-1902-9
115. Theriot J.A. (2013) Why are bacteria different from eukaryotes? *BMC Biol.* **11**, 119. https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-119
116. Schaper E., Gascuel O., Anisimova M. (2014) Deep conservation of human protein tandem repeats within the eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 1132–1148. https://doi.org/10.1093/molbev/msu062
117. Schaper E., Kajava A.V., Hauser A., Anisimova M. (2012) Repeat or not repeat? – Statistical validation of tandem repeat prediction in genomic sequences. *Nucl. Acids Res.* **40**, 10005–10017. https://doi.org/10.1093/nar/gks726
118. Galzitskaya O.V., Lobanov M.Y. (2015) Phyloproteomic analysis of 11780 six-residue-long motifs occurrences. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 208346. https://doi.org/10.1155/2015/208346
119. Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V. (2011) Disordered patterns in clustered Protein Data Bank and in eukaryotic and bacterial proteomes. *PLoS One*. **6**, e27142. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027142
120. Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V. (2012) Occurrence of disordered patterns and homorepeats in eukaryotic and bacterial proteomes. *Mol. Biosyst.* **8**, 327–337. https://doi.org/10.1039/c1mb05318c
121. Kajava A.V. (2001) Review: proteins with repeated sequence–structural prediction and modeling. *J. Struct. Biol.* **134**, 132–144. https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4328
122. Jernigan K.K., Bordenstein S.R. (2015) Tandem-repeat protein domains across the tree of life. *Peer. J.* **3**, e732. https://doi.org/10.7717/peerj.732
123. D'Andrea L.D., Regan L. (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 655–662. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.10.007
124. Gruber M., Söding J., Lupas A.N. (2005) REPPER-repeats and their periodicities in fibrous proteins. *Nucl. Acids Res.* **33**, W239–W243. https://doi.org/10.1093/nar/gki405
125. Taylor W.R., Heringa J., Baud F., Flores T.P. (2002) A Fourier analysis of symmetry in protein structure. *Protein Eng.* **15**, 79–89. https://doi.org/10.1093/protein/15.2.79
126. Newman A.M., Cooper J.B. (2007) XSTREAM: a practical algorithm for identification and architecture modeling of tandem repeats in protein sequences. *BMC Bioinformatics*. **8**, 382. https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-382
127. Jorda J., Kajava A.V. (2009) T-REKS: identification of tandem REpeats in sequences with a K-meanS based algorithm. *Bioinformatics*. **25**, 2632–2638. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp482
128. Heger A., Holm L. (2000) Rapid automatic detection and alignment of repeats in protein sequences. *Proteins*. **41**, 224–237. https://doi.org/10.1002/1097-0134(20001101)41:2<224::aid-prot70>3.0.co;2-z
129. Szklarczyk R., Heringa J. (2004) Tracking repeats using significance and transitivity. *Bioinformatics*. **20** (Suppl 1), i311–i317. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth911
130. Bucher P., Karplus K., Moeri N., Hofmann K. (1996) A flexible motif search technique based on generalized profiles. *Comput. Chem.* **20**, 3–23. https://doi.org/10.1016/s0097-8485(96)80003-9
131. Biegert A., Söding J. (2008) *De novo* identification of highly diverged protein repeats by probabilistic consistency. *Bioinformatics*. **24**, 807–814. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn039
132. Bliven S.E., Lafita A., Rose P.W., Capitani G., Prlić A., Bourne P.E. (2019) Analyzing the symmetrical arrangement of structural repeats in proteins with CE-Symm. *PLoS Comput. Biol.* **15**, e1006842. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006842
133. Chakrabarty B., Parekh N. (2014) Identifying tandem ankyrin repeats in protein structures. *BMC Bioinformatics*. **15**, 6599. https://doi.org/10.1186/s12859-014-0440-9
134. Sabarinathan R., Basu R., Sekar K. (2010) ProSTRIP: a method to find similar structural repeats in three-dimensional protein structures. *Comput. Biol. Chem.* **34**, 126–130. https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2010.03.006
135. Abraham A.-L., Rocha E.P.C., Pothier J. (2008) Swelfe: a detector of internal repeats in sequences and structures. *Bioinformatics*. **24**, 1536–1537. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn234
136. Do Viet P., Roche D.B., Kajava A.V. (2015) TAPO: A combined method for the identification of tandem repeats in protein structures. *FEBS Lett.* **589**, 2611–2619. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.025
137. Fankhauser N., Nguyen-Ha T.-M., Adler J., Mäser P. (2007) Surface antigens and potential virulence factors from parasites detected by comparative genomics of perfect amino acid repeats. *Proteome Sci.* **5**, 20. https://doi.org/10.1186/1477-5956-5-20
138. Parra R.G., Espada R., Sánchez I.E., Sippl M.J., Ferreiro D.U. (2013) Detecting repetitions and periodicities in proteins by tiling the structural space. *J. Phys. Chem. B.* **117**, 12887–12897. https://doi.org/10.1021/jp402105j

139. Mistry J., Chuguransky S., Williams L., Qureshi M., Salazar G.A., Sonnhammer E.L.L., Tosatto S.C.E., Paladin L., Raj S., Richardson L.J., Finn R.D., Bateman A. (2021) Pfam: the protein families database in 2021. *Nucl. Acids Res.* **49**, D412–D419. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913
140. Letunic I., Khedkar S., Bork P. (2021) SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucl. Acids Res.* **49**, D458–D460. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937
141. Blum M., Chang H.-Y., Chuguransky S., Grego T., Kandasaamy S., Mitchell A., Nuka G., Paysan-Lafosse T., Qureshi M., Raj S., Richardson L., Salazar G.A., Williams L., Bork P. Bridge A., Gough J., Haft D.H., Letunic I., Marchler-Bauer A., Mi H., Natale D.A., Necci M., Orengo C.A., Pandurangan A.P., Rivoire C., Sigrist C.J.A., Sillitoe I., Thanki N., Thomas P.D., Tosatto S.C.E., Wu C.H., Bateman A., Finn R.D. (2021) The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucl. Acids Res.* **49**, D344–D354. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa977
142. Sigrist C.J.A., De Castro E., Cerutti L., Cuche B.A., Hulo N., Bridge A., Bougueleret L., Xenarios I. (2013) New and continuing developments at PROSITE. *Nucl. Acids Res.* **41**, D344–D347. https://doi.org/10.1093/nar/gks1067
143. Pandurangan A.P., Stahlhacke J., Oates M.E., Smithers B., Gough J. (2019) The SUPERFAMILY 2.0 database: a significant proteome update and a new webserver. *Nucl. Acids Res.* **47**, D490–D494. https://doi.org/10.1093/nar/gky1130
144. UniProt Consortium (2021) UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucl. Acids Res.* **49**, D480–D489. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100
145. Jorda J., Baudrand T., Kajava A.V. (2012) PRDB: Protein Repeat DataBase. *Proteomics*. **12**, 1333–1336. https://doi.org/10.1002/pmic.201100534
146. Paladin L., Bevilacqua M., Errigo S., Piovesan D., Mičetić I., Necci M., Monzon A.M., Fabre M.L., Lopez J.L., Nilsson J.F., Rios J., Menna P.L., Cabrera M., Buitron M.G., Kulik M.G., Fernandez-Alberti S., Fornasari M.S., Parisi G., Lagares A., Hirsh L., Andrade-Navarro M.A., Kajava A.V., Tosatto S.C.E. (2021) RepeatsDB in 2021: improved data and extended classification for protein tandem repeat structures. *Nucl. Acids Res.* **49**, D452–D457. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1097
147. Burley S.K., Bhikadiya C., Bi C., Bittrich S., Chen L., Crichlow G. V, Christie C.H., Dalenberg K., Di Costanzo L., Duarte J.M., Dutta S., Feng Z., Ganesan S., Goodsell D.S., Ghosh S., Green R.K., Guranović V., Guzenko D., Hudson B.P., Lawson C.L., Liang Y., Lowe R., Namkoong H., Peisach E., Persikova I., Randle C., Rose A., Rose Y., Sali A., Segura J., Sekharan M., Shao C., Tao Y.P., Voigt M., Westbrook J.D., Young J.Y., Zardecki C., Zhuravleva M. (2021) RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucl. Acids Res.* **49**, D437–D451. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1038
148. Offord V., Werling D. (2013) LRRfinder2.0: a webserver for the prediction of leucine-rich repeats. *Innate Immun.* **19**, 398–402. https://doi.org/10.1177/1753425912465661
149. Lobanov M.Y., Sokolovskiy I.V, Galzitskaya O.V. (2014) HRaP: database of occurrence of HomoRepeats and patterns in proteomes. *Nucl. Acids Res.* **42**, D273–D278. https://doi.org/10.1093/nar/gkt927
150. Дерюшева Е.И., Мачулин А.В., Селиванова О.М., Сердюк И.Н. (2010) Семейство рибосомных белков S1 содержит уникальный консервативный домен. *Молекуляр. биология*. **44**, 728–734.
151. Orafidiya F.A., McEwan I.J. (2015) Trinucleotide repeats and protein folding and disease: the perspective from studies with the androgen receptor. *Futur. Sci. OA.* **1**, FSO47. https://doi.org/10.4155/fso.15.47
152. Walcott J.L., Merry D.E. (2002) Trinucleotide repeat disease. The androgen receptor in spinal and bulbar muscular atrophy. *Vitam. Horm.* **65**, 127–147. https://doi.org/10.1016/s0083-6729(02)65062-9
153. McEwan I.J. (2001) Structural and functional alterations in the androgen receptor in spinal bulbar muscular atrophy. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 222–227. https://doi.org/10.1042/0300-5127:0290222
154. Hor C.H.H., Tang B.L. (2019) Beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN) as a genetically simple model of multifaceted neuropathology resulting from defects in autophagy. *Rev. Neurosci.* **30**, 261–277. https://doi.org/10.1515/revneuro-2018-0045
155. Mollereau B., Walter L. (2019) Is WDR45 the missing link for ER stress-induced autophagy in beta-propeller associated neurodegeneration?. *Autophagy*. **15**, 2163–2164. https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1668229
156. Pons T., Gómez R., Chinea G., Valencia A. (2003) Beta-propellers: associated functions and their role in human diseases. *Curr. Med. Chem.* **10**, 505–524. https://doi.org/10.2174/0929867033368204
157. Matsushima N., Takatsuka S., Miyashita H., Kretsinger R.H. (2019) Leucine rich repeat proteins: sequences, mutations, structures and diseases. *Protein Pept. Lett.* **26**, 108–131. https://doi.org/10.2174/0929866526666181208170027
158. Matsushima N., Tachi N., Kuroki Y., Enkhbayar P., Osaki M., Kamiya M., Kretsinger R.H. (2005) Structural analysis of leucine-rich-repeat variants in proteins associated with human diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2771–2791. https://doi.org/10.1007/s00018-005-5187-z
159. Hugot J.P., Chamaillard M., Zouali H., Lesage S., Cézard J.P., Belaiche J., Almer S., Tysk C., O'Morain C.A., Gassull M., Binder V., Finkel Y., Cortot A., Modigliani R., Laurent-Puig P., Gower-Rousseau C., Macry J., Colombel J.F., Sahbatou M., Thomas G. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. **411**, 599–603. https://doi.org/10.1038/35079107
160. Shimizu T. (2013) Structural basis for β-galactosidase associated with lysosomal disease. *Yakugaku Zasshi*. **133**, 509–517. https://doi.org/10.1248/yakushi.13-00001-1
161. Ohto U., Usui K., Ochi T., Yuki K., Satow Y., Shimizu T. (2012) Crystal structure of human β-galactosidase: structural basis of Gm1 gangliosidosis and morquio B

diseases. *J. Biol. Chem.* **287**, 1801–1812.
https://doi.org/10.1074/jbc.M111.293795

162. Ishiguro N., Motoi T., Osaki M., Araki N., Minamizaki T., Moriyama M., Ito H., Yoshida H. (2005) Immunohistochemical analysis of a muscle ankyrin-repeat protein, Arpp, in paraffin-embedded tumors: evaluation of Arpp as a tumor marker for rhabdomyosarcoma. *Hum. Pathol.* **36**, 620–625.
https://doi.org/10.1016/j.humpath.2005.04.014
163. Ishiguro N., Baba T., Ishida T., Takeuchi K., Osaki M., Araki N., Okada E., Takahashi S., Saito M., Watanabe M., Nakada C., Tsukamoto Y., Sato K., Ito K., Fukayama M., Mori S., Ito H., Moriyama M. (2002) Carp, a cardiac ankyrin-repeated protein, and its new homologue, Arpp, are differentially expressed in heart, skeletal muscle, and rhabdomyosarcomas. *Am. J. Pathol.* **160**, 1767–1778.
https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61123-6
164. Tee J.-M., Peppelenbosch M.P. (2010) Anchoring skeletal muscle development and disease: the role of ankyrin repeat domain containing proteins in muscle physiology. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **45**, 318–330.
https://doi.org/10.3109/10409238.2010.488217
165. Crist R.C., Roth J.J., Baran A.A., McEntee B.J., Siracusa L.D., Buchberg A.M. (2010) The armadillo repeat domain of Apc suppresses intestinal tumorigenesis. *Mamm. Genome.* **21**, 450–457.
https://doi.org/10.1007/s00335-010-9288-0
166. Li D., Song H., Mei H., Fang E., Wang X., Yang F., Li H., Chen Y., Huang K., Zheng L., Tong Q. (2018) Armadillo repeat containing 12 promotes neuroblastoma progression through interaction with retinoblastoma binding protein 4. *Nat. Commun.* **9**, 2829.
https://doi.org/10.1038/s41467-018-05286-2
167. Topaz O., Shurman D.L., Bergman R., Indelman M., Ratajczak P., Mizrachi M., Khamaysi Z., Behar D., Petronius D., Friedman V., Zelikovic I., Raimer S., Metzker A., Richard G., Sprecher E. (2004) Mutations in GALNT3, encoding a protein involved in O-linked glycosylation, cause familial tumoral calcinosis. *Nat. Genet.* **36**, 579–581.
https://doi.org/10.1038/ng1358
168. Duncan E.L., Danoy P., Kemp J.P., Leo P.J., McCloskey E., Nicholson G.C., Eastell R., Prince R.L., Eisman J.A., Jones G., Sambrook P.N., Reid I.R., Dennison E.M., Wark J., Richards J.B., Uitterlinden A.G., Spector T.D., Esapa C., Cox R.D., Brown S.D., Thakker R.V., Addison K.A., Bradbury L.A., Center J.R., Cooper C., Cremin C., Estrada K., Felsenberg D., Glüer C.C., Hadler J., Henry M.J., Hofman A., Kotowicz M.A., Makovey J., Nguyen S.C., Nguyen T.V., Pasco J.A., Pryce K., Reid D.M., Rivadeneira F., Roux C., Stefansson K., Styrkarsdottir U., Thorleifsson G., Tichawangana R., Evans D.M., Brown M.A. (2011) Genome-wide association study using extreme truncate selection identifies novel genes affecting bone mineral density and fracture risk. *PLoS Genet.* **7**, e1001372.
https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001372
169. Esapa C.T., Head R.A., Jeyabalan J., Evans H., Hough T.A., Cheeseman M.T., McNally E.G., Carr A.J., Thomas G.P., Brown M.A., Croucher P.I., Brown S.D.M., Cox R.D., Thakker R.V. (2012) A mouse with an N-Ethyl-N-nitrosourea (ENU) Induced Trp589Arg Galnt3 mutation represents a model for hyperphosphataemic familial tumoural calcinosis. *PLoS One.* **7**, e43205.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043205
170. Lorenz V., Cejas R.B., Bennett E.P., Nores G.A., Irazoqui F.J. (2017) Functional control of polypeptide GalNAc-transferase 3 through an acetylation site in the C-terminal lectin domain. *Biol. Chem.* **398**, 1237–1246.
https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0130
171. Percival J.M. (2018) Perspective: spectrin-like repeats in dystrophin have unique binding preferences for syntrophin adaptors that explain the mystery of how nNOSμ localizes to the sarcolemma. *Front. Physiol.* **9**, 1369.
https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01369
172. Thomas G.D. (2013) Functional muscle ischemia in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Front. Physiol.* **4**, 381.
https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00381
173. Dušková L., Nohelová L., Loja T., Fialová J., Zapletalová P., Réblová K., Tichý L., Freiberger T., Fajkusová L. (2020) Low density lipoprotein receptor variants in the beta-propeller subdomain and their functional impact. *Front. Genet.* **11**, 691.
https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00691
174. Cogo S., Manzoni C., Lewis P.A., Greggio E. (2020) Leucine-rich repeat kinase 2 and lysosomal dyshomeostasis in Parkinson disease. *J. Neurochem.* **152**, 273–283.
https://doi.org/10.1111/jnc.14908
175. Lee J.-M., Correia K., Loupe J., Kim K.-H., Barker D., Hong E.P., Chao M.J., Long J.D., Lucente D., Vonsattel J.P.G., Pinto R.M., Abu Elneel K., Ramos E.M., Mysore J.S., Gillis T., Wheeler V.C., MacDonald M.E., Gusella J.F., McAllister B., Massey T., Medway C., Stone T.C., Hall L., Jones L., Holmans P., Kwak S., Ehrhardt A.G., Sampaio C., Ciosi M., Maxwell A., Chatzi A., Monckton D.G., Orth M., Landwehrmeyer G.B., Paulsen J.S., Dorsey E.R., Shoulson I., Myers R.H. (2019) CAG repeat not polyglutamine length determines timing of Huntington's disease onset. *Cell.* **178**, 887–900, e14.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.036
176. Bates G.P., Dorsey R., Gusella J.F., Hayden M.R., Kay C., Leavitt B.R., Nance M., Ross C.A., Scahill R.I., Wetzel R., Wild E.J., Tabrizi S.J. (2015) Huntington disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, 15005.
https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5
177. Prat C., Lemaire O., Bret J., Zabraniecki L., Fournié B. (2008) Morquio syndrome: diagnosis in an adult. *Joint. Bone Spine.* **75**, 495–498.
https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2007.07.021
178. Bley A.E., Giannikopoulos O.A., Hayden D., Kubilus K., Tifft C.J., Eichler F.S. (2011) Natural history of infantile G(M2) gangliosidosis. *Pediatrics.* **128**, e1233–1241.
https://doi.org/10.1542/peds.2011-0078
179. Saravanan K.M., Ponnuraj K. (2019) Sequence and structural analysis of fibronectin-binding protein reveals importance of multiple intrinsic disordered tandem repeats. *J. Mol. Recognit.* **32**, e2768.
https://doi.org/10.1002/jmr.2768
180. Li X., Tao Y., Murphy J.W., Scherer A.N., Lam T.T., Marshall A.G., Koleske A.J., Boggon T.J. (2017) The repeat region of cortactin is intrinsically disordered in solution. *Sci. Rep.* **7**, 16696.
https://doi.org/10.1038/s41598-017-16959-1

181. Roberts S., Dzuricky M., Chilkoti A. (2015) Elastin-like polypeptides as models of intrinsically disordered proteins. *FEBS Lett.* **589**, 2477–2486. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.029
182. Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V. (2015) How common is disorder? Occurrence of disordered residues in four domains of life. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 19490–19507. https://doi.org/10.3390/ijms160819490
183. Lobanov M.Y., Klus P., Sokolovsky I.V., Tartaglia G.G., Galzitskaya O.V. (2016) Non-random distribution of homo-repeats: links with biological functions and human diseases. *Sci. Rep.* **6**, 26941. https://doi.org/10.1038/srep26941
184. Lobanov M.Y., Furletova E.I., Bogatyreva N.S., Roytberg M.A., Galzitskaya O.V (2010) Library of disordered patterns in 3D protein structures. *PLoS Comput. Biol.* **6**, e1000958. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000958
185. Forrer P., Binz H.K., Stumpp M.T., Plückthun A. (2004) Consensus design of repeat proteins. *ChemBioChem.* **5**, 183–189. https://doi.org/10.1002/cbic.200300762
186. Forrer P., Stumpp M.T., Binz H.K., Plückthun A. (2003) A novel strategy to design binding molecules harnessing the modular nature of repeat proteins. *FEBS Lett.* **539**, 2–6. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00177-7
187. Main E.R.G., Jackson S.E., Regan L. (2003) The folding and design of repeat proteins: reaching a consensus. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 482–489. https://doi.org/10.1016/s0959-440x(03)00105-2
188. Main E.R.G., Lowe A.R., Mochrie S.G.J., Jackson S.E., Regan L. (2005) A recurring theme in protein engineering: the design, stability and folding of repeat proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 464–471. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.07.003
189. Javadi Y., Itzhaki L.S. (2013) Tandem-repeat proteins: regularity plus modularity equals design-ability. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 622–631. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.06.011
190. Stumpp M.T., Forrer P., Binz H.K., Pluckthun A. (2015) Repeat protein from collection of repeat proteins comprising repeat modules. US Patent 9,006,389. https://patents.google.com/patent/US9006389B2/en
191. Glasgow A.A., Huang Y.-M., Mandell D.J., Thompson M., Ritterson R., Loshbaugh A.L., Pellegrino J., Krivacic C., Pache R.A., Barlow K.A., Ollikainen N., Jeon D., Kelly M.J.S., Fraser J.S., Kortemme T. (2019) Computational design of a modular protein sense-response system. *Science.* **366**, 1024–1028. https://doi.org/10.1126/science.aax8780
192. Sawyer N., Chen J., Regan L. (2013) All repeats are not equal: a module-based approach to guide repeat protein design. *J. Mol. Biol.* **425**, 1826–1838. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.02.013
193. Parmeggiani F., Huang P.-S., Vorobiev S., Xiao R., Park K., Caprari S., Su M., Seetharaman J., Mao L., Janjua H., Montelione G.T., Hunt J., Baker D. (2015) A general computational approach for repeat protein design. *J. Mol. Biol.* **427**, 563–575. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.11.005
194. Leaver-Fay A., Tyka M., Lewis S.M., Lange O.F., Thompson J., Jacak R., Kaufman K., Renfrew P.D., Smith C.A., Sheffler W., Davis I.W., Cooper S., Treuille A., Mandell D.J., Richter F., Ban Y.E., Fleishman S.J., Corn J.E., Kim D.E., Lyskov S., Berrondo M., Mentzer S., Popović Z., Havranek J.J., Karanicolas J., Das R., Meiler J., Kortemme T., Gray J.J., Kuhlman B., Baker D., Bradley P. (2011) ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. *Methods Enzymol.* **487**, 545–574. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381270-4.00019-6
195. Kajander T., Cortajarena A.L., Mochrie S., Regan L. (2007) Structure and stability of designed TPR protein superhelices: unusual crystal packing and implications for natural TPR proteins. *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* **63**, 800–811. https://doi.org/10.1107/S0907444907024353
196. Mohan K., Ueda G., Kim A.R., Jude K.M., Fallas J.A., Guo Y., Hafer M., Miao Y., Saxton R.A., Piehler J., Sankaran V.G., Baker D., Garcia K.C. (2019) Topological control of cytokine receptor signaling induces differential effects in hematopoiesis. *Science.* **364**, eaav7532. https://doi.org/10.1126/science.aav7532
197. Plückthun A. (2015) Designed ankyrin repeat proteins (DARPins): binding proteins for research, diagnostics, and therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **55**, 489–511. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654
198. Boersma Y.L. (2018) Advances in the application of designed ankyrin repeat proteins (DARPins) as research tools and protein therapeutics. *Methods Mol. Biol.* **1798**, 307–327. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7893-9_23
199. Schilling J., Schöppe J., Plückthun A. (2014) From DARPins to LoopDARPins: novel LoopDARPin design allows the selection of low picomolar binders in a single round of ribosome display. *J. Mol. Biol.* **426**, 691–721. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.026
200. Stumpp M.T., Amstutz P. (2007) DARPins: a true alternative to antibodies. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* **10**, 153–159. PMID:17436550
201. Schweizer A., Rusert P., Berlinger L., Ruprecht C.R., Mann A., Corthésy S., Turville S.G., Aravantinou M., Fischer M., Robbiani M., Amstutz P., Trkola A. (2008) CD4-specific designed ankyrin repeat proteins are novel potent HIV entry inhibitors with unique characteristics. *PLoS Pathog.* **4**, e1000109. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000109
202. Zahnd C., Kawe M., Stumpp M.T., de Pasquale C., Tamaskovic R., Nagy-Davidescu G., Dreier B., Schibli R., Binz H.K., Waibel R., Plückthun A. (2010) Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size. *Cancer Res.* **70**, 1595–1605. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2724
203. Reichen C., Madhurantakam C., Plückthun A., Mittl P.R.E. (2014) Crystal structures of designed armadillo repeat proteins: implications of construct design and crystallization conditions on overall structure. *Protein Sci.* **23**, 1572–1583. https://doi.org/10.1002/pro.2535
204. Madhurantakam C., Varadamsetty G., Grütter M.G., Plückthun A., Mittl P.R.E. (2012) Structure-based optimization of designed Armadillo-repeat proteins. *Protein Sci.* **21**, 1015–1028. https://doi.org/10.1002/pro.2085
205. Reichen C., Madhurantakam C., Hansen S., Grütter M.G., Plückthun A., Mittl P.R.E. (2016) Struc-

tures of designed armadillo-repeat proteins show propagation of inter-repeat interface effects. *Acta Crystallogr. Sect. D. Struct. Biol.* **72**, 168–175. https://doi.org/10.1107/S2059798315023116

206. Ernst P., Honegger A., van der Valk F., Ewald C., Mittl P.R.E., Plückthun A. (2019) Rigid fusions of designed helical repeat binding proteins efficiently protect a binding surface from crystal contacts. *Sci. Rep.* **9**, 16162. https://doi.org/10.1038/s41598-019-52121-9
207. Park K., Shen B.W., Parmeggiani F., Huang P.-S., Stoddard B.L., Baker D. (2015) Control of repeat-protein curvature by computational protein design. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 167–174. https://doi.org/10.1038/nsmb.2938
208. Rämisch S., Weininger U., Martinsson J., Akke M., André I. (2014) Computational design of a leucine-rich repeat protein with a predefined geometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 17875–17880. https://doi.org/10.1073/pnas.1413638111
209. Stumpp M.T., Forrer P., Binz H.K., Plückthun A. (2003) Designing repeat proteins: modular leucine-rich repeat protein libraries based on the mammalian ribonuclease inhibitor family. *J. Mol. Biol.* **332**, 471–487. https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00897-0
210. Ernst P., Plückthun A. (2017) Advances in the design and engineering of peptide-binding repeat proteins. *Biol. Chem.* **398**, 23–29. https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0233
211. Reichen C., Hansen S., Plückthun A. (2014) Modular peptide binding: from a comparison of natural binders to designed armadillo repeat proteins. *J. Struct. Biol.* **185**, 147–162. https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.07.012
212. Schlehuber S., Skerra A. (2002) Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant – a so-called "anticalin" – using a molecular random approach. *Biophys. Chem.* **96**, 213–228. https://doi.org/10.1016/s0301-4622(02)00026-1
213. Horibe T., Kohno M., Haramoto M., Ohara K., Kawakami K. (2011) Designed hybrid TPR peptide targeting Hsp90 as a novel anticancer agent. *J. Transl. Med.* **9**, 8. https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-8
214. Cortajarena A.L., Yi F., Regan L. (2008) Designed TPR modules as novel anticancer agents. *ACS Chem. Biol.* **3**, 161–166. https://doi.org/10.1021/cb700260z
215. Horibe T., Torisawa A., Kohno M., Kawakami K. (2012) Molecular mechanism of cytotoxicity induced by Hsp90-targeted Antp-TPR hybrid peptide in glioblastoma cells. *Mol. Cancer.* **11**, 59. https://doi.org/10.1186/1476-4598-11-59
216. Mejias S.H., Aires A., Couleaud P., Cortajarena A.L. (2016) Designed repeat proteins as building blocks for nanofabrication. *Adv. Exp. Med. Biol.* **940**, 61–81. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39196-0_4
217. Grove T.Z., Regan L., Cortajarena A.L. (2013) Nanostructured functional films from engineered repeat proteins. *J. R. Soc. Interface.* **10**, 20130051. https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0051
218. Carter N.A., Grove T.Z. (2015) Repeat-proteins films exhibit hierarchical anisotropic mechanical properties. *Biomacromolecules.* **16**, 706–714. https://doi.org/10.1021/bm501578j
219. Mejías S.H., López-Andarias J., Sakurai T., Yoneda S., Erazo K.P., Seki S., Atienza C., Martín N., Cortajarena A.L. (2016) Repeat protein scaffolds: ordering photo- and electroactive molecules in solution and solid state. *Chem. Sci.* **7**, 4842–4847. https://doi.org/10.1039/c6sc01306f
220. Couleaud P., Adan-Bermudez S., Aires A., Mejías S.H., Sot B., Somoza A., Cortajarena A.L. (2015) Designed modular proteins as scaffolds to stabilize fluorescent nanoclusters. *Biomacromolecules.* **16**, 3836–3844. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01147
221. Masakari Y., Hara C., Araki Y., Gomi K., Ito K. (2020) Improvement in the thermal stability of *Mucor prainii*-derived FAD-dependent glucose dehydrogenase via protein chimerization. *Enzyme Microb. Technol.* **132**, 109387. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109387
222. Crennell S.J., Garman E.F., Laver W.G., Vimr E.R., Taylor G.L. (1993) Crystal structure of a bacterial sialidase (from *Salmonella typhimurium* LT2) shows the same fold as an influenza virus neuraminidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 9852–9856. https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.9852
223. Glanz V.Y., Myasoedova V.A., Grechko A.V., Orekhov A.N. (2018) Inhibition of sialidase activity as a therapeutic approach. *Drug Des. Devel. Ther.* **12**, 3431–3437. https://doi.org/10.2147/DDDT.S176220
224. Sacramento C.Q., Jordão A.K., Abrantes J.L., Alves C.M., Marttorelli A., Fintelman-Rodrigues N., de Freitas C.S., de Melo G.R., Cunha A.C., Ferreira V.F., Souza T.M.L. (2020) Neuraminidase from influenza A and B viruses is susceptible to the compound 4-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl. *Curr. Top. Med. Chem.* **20**, 132–139. https://doi.org/10.2174/1568026620666191227142433
225. Voet A.R.D., Noguchi H., Addy C., Simoncini D., Terada D., Unzai S., Park S.-Y., Zhang K.Y.J., Tame J.R.H. (2014) Computational design of a self-assembling symmetrical β-propeller protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 15102–15107. https://doi.org/10.1073/pnas.1412768111
226. Noguchi H., Addy C., Simoncini D., Wouters S., Mylemans B., Van Meervelt L., Schiex T., Zhang K.Y.J., Tame J.R.H., Voet A.R.D. (2019) Computational design of symmetrical eight-bladed β-propeller proteins. *IUCrJ.* **6**, 46–55. https://doi.org/10.1107/S205225251801480X
227. Mylemans B., Laier I., Kamata K., Akashi S., Noguchi H., Tame J.R.H., Voet A.R.D. (2021) Structural plasticity of a designer protein sheds light on β-propeller protein evolution. *FEBS J.* **288**, 530–545. https://doi.org/10.1111/febs.15347
228. Urvoas A., Guellouz A., Valerio-Lepiniec M., Graille M., Durand D., Desravines D.C., van Tilbeurgh H., Desmadril M., Minard P. (2010) Design, production and molecular structure of a new family of artificial alpha-helicoidal repeat proteins (αRep) based on thermostable HEAT-like repeats. *J. Mol. Biol.* **404**, 307–327. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.048
229. Guellouz A., Valerio-Lepiniec M., Urvoas A., Chevrel A., Graille M., Fourati-Kammoun Z., Desmadril M., van Tilbeurgh H., Minard P. (2013) Selection of specific protein binders for pre-defined targets from an optimized library of artificial helicoidal repeat

proteins (alphaRep). *PLoS One*. **8**, e71512. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071512

230. Valerio-Lepiniec M., Urvoas A., Chevrel A., Guellouz A., Ferrandez Y., Mesneau A., de la Sierra-Gallay I.L., Aumont-Nicaise M., Desmadril M., van Tilbeurgh H., Minard P. (2015) The αRep artificial repeat protein scaffold: a new tool for crystallization and live cell applications. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 819–824. https://doi.org/10.1042/BST20150075
231. Deng D., Yan C., Pan X., Mahfouz M., Wang J., Zhu J.-K., Shi Y., Yan N. (2012) Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*. **335**, 720–723. https://doi.org/10.1126/science.1215670
232. Mak A.N.-S., Bradley P., Cernadas R.A., Bogdanove A.J., Stoddard B.L. (2012) The crystal structure of TAL effector PthXo1 bound to its DNA target. *Science*. **335**, 716–719. https://doi.org/10.1126/science.1216211
233. Flechsig H. (2014) TALEs from a spring–superelasticity of Tal effector protein structures. *PLoS One*. **9**, e109919. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109919
234. Bogdanove A.J., Voytas D.F. (2011) TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science*. **333**, 1843–1846. https://doi.org/10.1126/science.1204094
235. Scholze H., Boch J. (2011) TAL effectors are remote controls for gene activation. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 47–53. https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.12.001
236. Schaper E., Anisimova M. (2015) The evolution and function of protein tandem repeats in plants. *New Phytol.* **206**, 397–410. https://doi.org/10.1111/nph.13184
237. Moore A.D., Björklund A.K., Ekman D., Bornberg-Bauer E., Elofsson A. (2008) Arrangements in the modular evolution of proteins. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 444–451. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.05.008
238. Verstrepen K.J., Jansen A., Lewitter F., Fink G.R. (2005) Intragenic tandem repeats generate functional variability. *Nat. Genet.* **37**, 986–990. https://doi.org/10.1038/ng1618
239. Chevanne D., Saupe S.J., Clavé C., Paoletti M. (2010) WD-repeat instability and diversification of the *Podospora anserina* hnwd non-self recognition gene family. *BMC Evol. Biol.* **10**, 134. https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-134
240. Schüler A., Bornberg-Bauer E. (2016) Evolution of protein domain repeats in metazoa. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 3170–3182. https://doi.org/10.1093/molbev/msw194
241. McElhinny A.S., Kazmierski S.T., Labeit S., Gregorio C.C. (2003) Nebulin: the nebulous, multifunctional giant of striated muscle. *Trends Cardiovasc. Med.* **13**, 195–201. https://doi.org/10.1016/s1050-1738(03)00076-8
242. Chaudhuri I., Söding J., Lupas A.N. (2008) Evolution of the beta-propeller fold. *Proteins*. **71**, 795–803. https://doi.org/10.1002/prot.21764
243. Kopec K.O., Lupas A.N. (2013) β-Propeller blades as ancestral peptides in protein evolution. *PLoS One*. **8**, e77074. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077074
244. Tompa P. (2003) Intrinsically unstructured proteins evolve by repeat expansion. *Bioessays*. **25**, 847–855. https://doi.org/10.1002/bies.10324

STRUCTURAL, FUNCTIONAL AND EVOLUTIONARY CHARACTERISTICS OF PROTEINS WITH REPEATS

E. I. Deryusheva[1, *], A. V. Machulin[2], and O. V. Galzitskaya[3, 4, **]

[1]*Institute for Biological Instrumentation, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

[2]*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

[3]*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

[4]*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

**e-mail: evgenia.deryusheva@gmail.com*

***e-mail: ogalzit@vega.protres.ru*

The review summarizes and systematizes data on the classification, taxonomic distribution, structural features and functioning of proteins with structural repeats. Modern approaches to the identification of structural repeats in proteins are considered. The features of specialized databases of protein domains are described. This review discusses the prospects for using proteins with repeats as scaffolds for drug design. The role of proteins with structural repeats in the pathogenesis of various diseases is considered. Various modern approaches to understanding the mechanisms of the evolutionary development of proteins with repeats are described and analyzed.

Keywords: structural domains, structural repeats, molecular functions, evolution

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 5, с. 772–795

ОБЗОРЫ

УДК 577.218:577.22

ГУАНИНОВЫЕ КВАДРУПЛЕКСЫ В МЕТАБОЛИЗМЕ КЛЕТОЧНОГО ЯДРА

© 2021 г. Е. В. Мариловцева[a, b, *], В. М. Студитский[a, c]

[a] Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

[b] Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

[c] Cancer Epigenetics Program, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA 19111 USA

*e-mail: ekaterina.marilovtseva@hotmail.com

Поступила в редакцию 09.02.2021 г.
После доработки 29.03.2021 г.
Принята к публикации 31.03.2021 г.

Жизнедеятельность клетки в значительной степени зависит от точной регуляции экспрессии генов. Одним из механизмов такой регуляции является формирование нуклеиновыми кислотами вторичных структур, среди которых особое место занимают гуаниновые квадруплексы (G-квадруплексы, или G4). G-квадруплексы – динамические структуры, стабильность которых определяется их размером, ионным составом и природой образующих их нуклеиновых кислот, и регулируется разнообразными белковыми факторами. Гуаниновые квадруплексы играют важную роль в регуляции многих процессов, происходящих на ДНК и РНК, – от поддержания гомеостаза теломер до определения сайта посадки рибосомы на мРНК. Благодаря этому G-квадруплексы считаются перспективной мишенью для противоопухолевой терапии, а их детальное изучение представляет важную задачу современной биологии. В обзоре рассмотрена структура и термодинамические свойства G-квадруплексов, их биологические функции, а также их взаимодействие с некоторым ядерными белками.

Ключевые слова: гуаниновые квадруплексы, G4, ДНК, РНК, вторичные структуры нуклеиновых кислот, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0026898421050074

ВВЕДЕНИЕ

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) – полимерная молекула спиральной структуры, состоящая из двух закрученных друг вокруг друга антипараллельных комплементарных полинуклеотидных цепей. Удержание цепей осуществляется за счет водородных связей, образуемых, в основном, комплементарными пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями с формированием пар аденин–тимин и гуанин–цитозин [1]. Этот тип взаимодействия, названный уотсон–криковским, лежит в основе большинства конформаций ДНК, в частности, правозакрученных B-ДНК и A-ДНК [2–4] и левозакрученной Z-ДНК [5]. Кроме того, уотсон–криковские взаимодействия обеспечивают около 60% взаимодействий внутри вторичных структур РНК [6].

В то же время, азотистые основания могут вступать не только в уотсон-криковские, но и в другие взаимодействия, формируя ряд неканонических структур, в том числе гуаниновые (G) структуры, среди которых главное место занимают G-квадруплексы [7]. В настоящее время известно, что квадруплексы, способные формироваться как на ДНК, так и на РНК, выполняют в клетке ряд функций: поддерживают структуру теломер, вносят вклад в компартментализацию хроматина, координируют работу транскрипционных факторов и модификаторов ДНК и гистонов, а также принимают участие в регуляции трансляции. Таким образом, G-квадруплексы играют важную роль в поддержании гомеостаза, регуляции метаболизма и пролиферации клетки, что делает их привлекательными мишенями для противоопухолевых, противовирусных и антибактериальных препаратов и, в перспективе, медикаментов, нацеленных на лечение некоторых генетических заболеваний. Стоит отметить, что за последние десятилетия синтезировано множество лигандов, специфически связывающих гуаниновые квадруплексы и снижающих пролиферативную активность клеток [8]; некоторые лиганды уже проходят клинические испытания в качестве противоопухолевых средств [9]. Гуаниновые квадруплексы применяют также в клини-

ческой диагностике [10, 11]. Интересной представляется возможность использования гуаниновых структур на ДНК в молекулярной электронике и проектировании нанопроводов и наносенсоров. Показано, что гуаниновые квадруплексы, абсорбированные на слюдяном субстрате, переносят заряд на расстояния до нескольких сотен нанометров, причем регистрируемая сила тока составляет от десятков до сотен пикоампер [12]. Наконец, недавно обнаружили, что гуаниновые квадруплексы можно использовать в качестве компонента молекулярной системы выявления патогенной кишечной палочки *Escherichia coli* K88 в продуктах питания [13].

Учитывая многообразие вариантов применения гуаниновых квадруплексов, более детальное изучение особенностей их динамики и функций крайне важно не только для более полного понимания механизмов регуляции экспрессии генов и молекулярных основ патогенеза различных заболеваний, но и для разработки новых подходов к их лечению, а также для развития нанотехнологий.

В нашем обзоре рассмотрены особенности структуры G-квадруплексов, их разновидности, биологические функции и факторы, влияющие на стабильность этих структур *in vitro*, *in cellulo* и *in vivo*.

СТРУКТУРЫ ГУАНИНСОДЕРЖАЩИХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нуклеотидные последовательности типа $G_{x1}N_{L1}G_{x2}N_{L2}G_{x3}N_{L3}G_{x4}$ (где $x > 3$) (табл. 1) могут образовывать гуаниновые тетрады (гуаниновые квартеты) за счет Хугстиновского спаривания четырех входящих в их состав гуанинов [14–16]. Гуаниновая тетрада стабилизирована восемью водородными связями – четырьмя N2–H···N7 (2.87 Å) и четырьмя N1–H···O6 (2.84 Å) [17] (рис. 1*а*). Три и более G-тетрады могут собираться в “стопки”, образуя правозакрученные или, реже, левозакрученные спиральные структуры – G-квадруплексы, или G4, стабилизированные одновалентными катионами [18, 19] (рис. 1*б*). Расстояние между двумя соседними гуаниновыми тетрадами в G4 составляет (в зависимости от конформации входящих в их состав гуанинов) 3.39–3.55 Å, что близко по значению к расстоянию между двумя парами оснований в B-ДНК (3.4 Å) [20]. Молекулярно-динамические расчеты показывают, что катионы, стабилизирующие гуаниновые квадруплексы, участвуют в самых ранних этапах их формирования [21].

Несколько молекул ДНК, содержащих гуаниновые треки, могут образовывать так называемые гуаниновые нанопроволоки (G-wires) с параллельной укладкой (рис. 1*б*), что впервые показали в 1994 году для теломерной последовательности d(G4T2G4) тетрахимены [22]. Согласно данным атомно-силовой микроскопии и кристаллографического анализа, на всем своем протяжении G-нанопроволока имеет единообразную высоту и ширину, близкую к диаметру G-тетрады, и может изгибаться и перекручиваться [23]. Позднее с использованием атомно-силовой микроскопии высокого разрешения выявили необычные свойства нанопроволок, образованных последовательностью d(G4T2G4) в водном растворе. Оказалось, что данные структуры могут отличаться периодичностью расположения входящих в их состав квадруплексов (4.3, 2.2 и 0.9 нм) и способом их укладки – левозакрученной (4.3 и 2.2 нм), зигзагообразной (4.3 нм) и, в редких случаях, правозакрученной (0.9 нм). Также показано, что гуаниновые нанопроволоки обладают повышенной жесткостью по сравнению с ДНК-дуплексами [24].

Гуаниновые квадруплексы могут включать одну, две или четыре молекулы нуклеиновой кислоты. В соответствии с этим выделяют две основные группы квадруплексов – внутримолекулярные или межмолекулярные. Поскольку в последовательностях нуклеиновых кислот, образующих G-квадруплексы, гуаниновые треки чередуются с другими

Таблица 1. Некоторые последовательности, формирующие гуаниновый квадруплекс, в геноме человека

Ген	Последовательности	Нуклеотидная последовательность
	hTELO	$(TTAGGG)_3$
CMYC	Pu27	TTAT**GGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGG**AAGG
CKIT	ckit1	CAGA**GGGAGGG**CGCT**GGG**AGGA**GGG**GCTG
	ckit2	CCCC**GGGCGGG**CGCGA**GGGGAGGGG**AGGC
VEGF		CCCG**GGGCGGG**CC**GGGGGCGGGG**TCCCGGC**GGGG**CGGAG
HIF-1α		GCGA**GGGCGGGGG**AGA**GGGGAGGGG**CGCG
BCL2	Pu39	GTC**GGGG**CGA**GGGCGGGGG**AAGGA**GGG**CGC**GGGCGGGG**A
KRAS		**GGGAGGGAGGG**AAGGA**GGGAGGGAGGG**A

Примечание: полужирным обозначены гуаниновые треки, непосредственно вовлеченные в формирование G-квадруплексов.

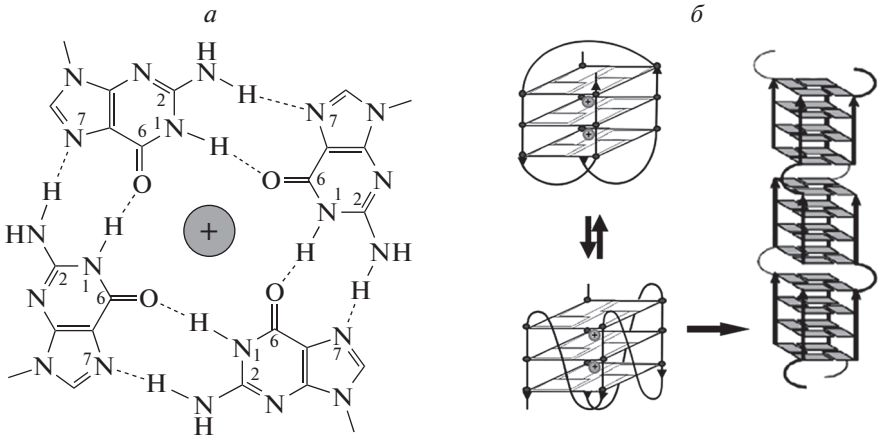

Рис. 1. Неканонические гуаниновые структуры ДНК. *а* – Строение гуаниновой тетрады: четыре гуанина образуют квартет, стабилизированный Хугстиновскими взаимодействиями. *б* – Три гуаниновых тетрады образуют стабилизированный ионами щелочного или щелочноземельного металла гуаниновый квадруплекс с антипараллельной (слева вверху) или параллельной (слева внизу) топологией, причем эти два вида топологии могут переходить друг в друга в зависимости от условий среды.

нуклеотидами, последние формируют петли – латеральные, диагональные и пропеллерные (двойные возвратные) – в соответствии с их расположением внутри квадруплекса. В основе разнообразия структур гуаниновых квадруплексов лежит их способность комбинировать петли разного типа [25].

В зависимости от топологии – укладки молекул нуклеиновой кислоты – гуаниновые квадруплексы подразделяются на параллельные, антипараллельные и гибридные; топология же прямо зависит от гуанин-гликозидного торсионного угла, определяющего конформацию (*син*- или *анти*-) гуаниновых оснований, образующих G-квадруплекс (рис. 2*а*). Например, тетрамолекулярный квадруплекс может иметь только параллельную топологию, так как все составляющие его гуанины имеют *анти*-конформацию. В то же время, до 50% гуанинов, входящих в состав моно- и бимолекулярных G-квадруплексов, могут иметь *син*-конформацию, поэтому такие G4 могут быть как параллельными, так и антипараллельными (содержащими комбинацию гуанинов с *син*- и *анти*-конформацией) (рис. 2*б*) [17].

Богатые гуанином последовательности полиморфны и, как правило, могут образовывать несколько структурно различающихся квадруплексов. Например, теломерная ДНК человека, состоящая из пяти (TTAGGG) повторов, способна образовывать, как минимум, два разных внутримолекулярных G4 с разной длиной петель [26]. Стоит отметить, что длина петель является важной характеристикой G-квадруплекса, влияющей на его стабильность. Эксперименты по УФ-плавлению, проведенные для 21 библиотеки G-квадруплексов на ДНК, имеющих одинаковую параллельную топологию типа “двойная возвратная петля”, но петли разной длины (1–3 н.), показали, что увеличение общей длины петель на один нуклеотид вызывает падение температуры плавления (T_m) и изменение свободной энергии при температуре 37°C (ΔG_{VH}) [27]. Наглядным примером формирования различных структур на одной нуклеотидной последовательности могут служить два гуаниновых квадруплекса, формируемых последовательностью Pu27 (5'-TGGGGAGGGTGGGGAGGGT-GGGGAAGG-3') гена *CMYC* – myc-1245 и myc-2345 (рис. 3). Показано, что квадруплекс myc-1245 типа L161 (длины петель (L) составляют 1, 6 и 1 н. соответственно) имеет температуру плавления на 15°C ниже, чем myc-2345 типа L121 [28].

Изучено также влияние длины петель на термодинамические свойства и топологию гуаниновых квадруплексов, образованных РНК-последовательностями. С помощью библиотеки гуаниновых квадруплексов, формируемых на 18 РНК-последовательностях генома человека, проведен сравнительный анализ стабильности G4 на РНК с длинами петель от 1 до 15 н. в растворе с концентрацией KCl от 1 до 100 мМ. Оказалось, что, как и в случае с G4 на ДНК, стабильность гуаниновых квадруплексов РНК обратно пропорциональна длине петель [29].

ЯМР-анализ и спектрометрия кругового дихроизма (КД-спектрометрия) гуаниновых квадруплексов myc-2345 (GGG-**T**-GGG-**GA**-GGG-**T**-GGG) и myc-1234 (GGG-**A**-GGG-**TG**-GGG-**A**-GGG), имеющих идентичную топологию и длины петель, показали, что на стабильность и термодинамические характеристики G4 влияет не только длина петель, но и их нуклеотидный состав. Оказалось,

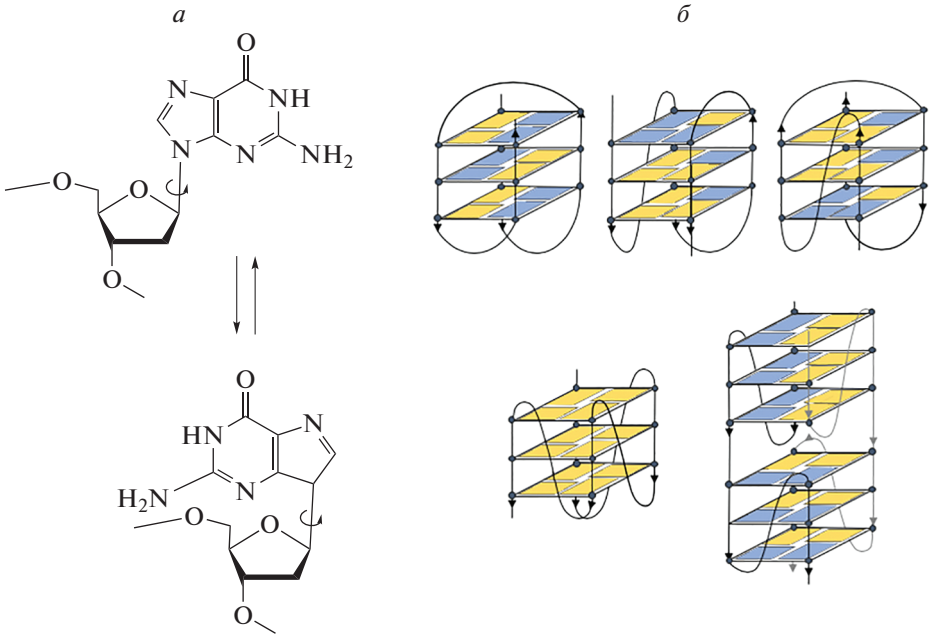

Рис. 2. Зависимость особенностей топологии гуаниновых квадруплексов от конформации входящих в их состав гуаниновых оснований. *а* – *Анти*- и *син*-конформация гуанинового основания. *б* – Некоторые типы топологии гуаниновых квадруплексов, образованных комбинациями гуаниновых оснований, имеющих разную конформацию: внутримолекулярный G-квадруплекс с антипараллельной топологией “корзина” (basket) с диагональной петлей (верхний ряд, слева); внутримолекулярный G-квадруплекс с гибридной топологией (верхний ряд, центр); внутримолекулярный G-квадруплекс с топологией смешанного типа “3+1” (верхний ряд, справа); внутримолекулярный G-квадруплекс с параллельной топологией и пропеллерными петлями (нижний ряд, слева); межмолекулярный G-квадруплекс с параллельной топологией и пропеллерными петлями, образованный двумя цепями нуклеиновой кислоты (нижний ряд, справа). Желтые элементы соответствуют *анти*-конформации, голубые – *син*-конформации гуанинового основания.

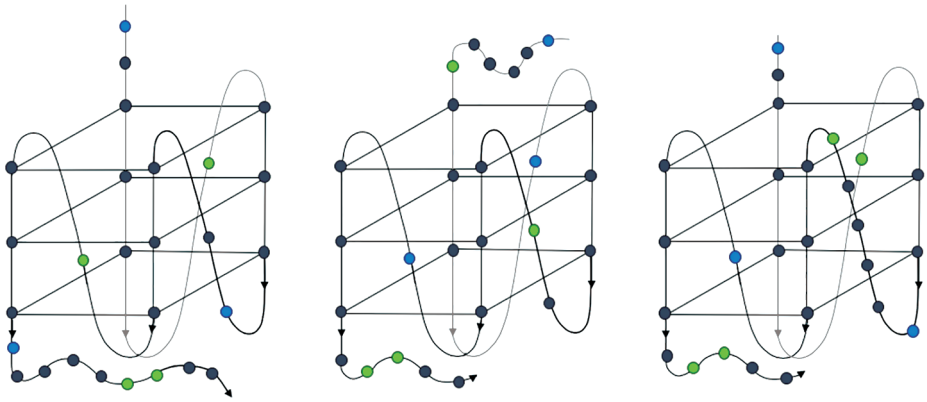

Рис. 3. Некоторые варианты укладки последовательности Pu27 (5'-TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG-3'), расположенной в промоторе $NHEIII_1$ гена *CMYC*, в гуаниновый квадруплекс. Слева направо: myc-1234 (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG), myc-2345 (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG), myc-1245 (TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG); кружками на схеме отмечены гуаниновые (серые), адениновые (зеленые) и тиминовые (синие) основания.

что аденины внешних мононуклеотидных петель myc-1234 выталкиваются из бороздки и повышают степень обводненности G4, снижая его стабильность, в то время, как более компактные тимины тех же петель myc-2345, напротив, располагаются в плоскости бороздки, что делает этот вариант myc-G4 энергетически более выгодным и, следовательно, повышает его стабильность. Поэтому в 20 мМ растворе K^+ T_m myc-2345 на 14°C выше, чем у myc-1234 [30].

ТИПЫ ГУАНИНОВЫХ КВАДРУПЛЕКСОВ

В геноме человека методами секвенирования нового поколения детектируется более 700000 гуаниновых квадруплексов [31]. *In cellulo* (и, по-видимому, *in vivo*) G-квадруплексы имеют преимущественно параллельную топологию, что отчасти обусловлено особенностями ионного состава клетки (139 мМ K^+, 12 мМ Na^+, 0.8 мМ Mg^{2+} и т.д) [32].

Гуаниновые квадруплексы на ДНК

Согласно результатам ChIP-секвенирования (проведенного с использованием клеточной линии HaCaTa), гуаниновые квадруплексы на ДНК в клетках человека преимущественно образуются в районах, свободных от нуклеосом [33]. Кроме того, ряд исследований показал, что в геноме человека мотивы, потенциально способные образовывать гуаниновые квадруплексы, располагаются в G/C-богатых, сверхчувствительных к нуклеазам участках промоторов >40% генов [34], большинство из которых являются протоонкогенами [35]. Кроме того, гуаниновые квадруплексы могут формироваться на ДНК в области теломерных повторов [36].

В лабораторных условиях *in vitro* G-квадруплексы на молекуле ДНК получают в основном путем термической денатурации богатой гуанином последовательности с ее последующим медленным охлаждением в присутствии соли калия или другого щелочного металла. В клетке G4 в ДНК формируются в ходе транскрипции богатых гуанином последовательностей (РНК-полимеразный комплекс разрывает водородные связи между цепями ДНК, позволяя “распаренным” гуанинам вступать во взаимодействие друг с другом и образовывать неканонические структуры). Эта гипотеза подтверждена данными транскрипции *in vitro* в комплексе с атомной силовой микроскопией [37] и *in cellulo* (в В-лимфоцитах мыши) – результатами полногеномного футпринтинга нуклеазой S1, узнающей одноцепочечные неканонические области ДНК [38].

Также показано, что G-квадруплексы могут формироваться в процессе репликации. Окрашивание синхронизированных культур раковых клеток человека антителами BG4 к гуаниновым квадруплексам показало, что в наименьшей степени эти структуры образуются в G0/G1-фазе, когда репликация не происходит. В контрольной точке G1/S количество G-квадруплексов возрастает примерно в 2.5 раза, а в S-фазе достигает максимальных значений, увеличиваясь примерно в 4.8 раза. Блокирование репликации афидиколином – ингибитором ДНК-полимеразы α – приводит к двукратному снижению количества сигналов от BG4, что подтверждает важность репликации для формирования гуаниновых квадруплексов *in cellulo* [39]. Формирование G4 на ДНК после прохождении ДНК-полимеразного комплекса обеспечивает дополнительный уровень защиты ДНК от повторного раунда репликации и способствует постепенному подавлению транскрипции и переходу клетки к делению.

Диаметр гуаниновых квадруплексов на ДНК составляет 24.3–28.7 Å. Благодаря этому, такие G4 обладают достаточно высоким дестабилизирующим потенциалом в отношении ДНК-дуплексов. Биофизический анализ G4-образующей последовательности регуляторной области гена *BCL2* показывает, что формирование квадруплекса дестабилизирует участки дцДНК, расположенные в пределах 5 п.н. от него [40].

Гуаниновые квадруплексы на РНК

Как сказано выше, гуаниновые квадруплексы могут формироваться не только на ДНК, но и на РНК; структура G4 на РНК расшифрована с разрешением 0.61 Å [41]. В основе формирования гуаниновых квадруплексов на ДНК и РНК лежат одни и те же процессы, однако, в силу особенностей состава и структуры дезоксирибонуклеиновой и рибонуклеиновой кислот стабильность и структура этих двух типов квадруплексов неодинаковы.

Во-первых, согласно данным КД-спектрометрии и калийзависимого нативного электрофореза, полученных для РНК-последовательности $(GGAA)_{10}$, для формирования G4 на РНК достаточно всего двух G-тетрад [42]. Во-вторых, благодаря тому, что тимин в РНК замещен урацилом, у которого отсутствует метильная группа в положении C5, степень обводненности петель в G4 на РНК ниже, чем в G4 на ДНК, поэтому первые отличаются более высокой T_m и большей стабильностью [43]. Кроме того, наличие в бороздках РНК упорядоченных 2'-гидроксогрупп остатков рибозы обеспечивает образование дополнительных водородных связей внутри квадруплексов. Наконец, 2'-OH-группы ограничивают торсионный угол остатка рибозы, что препятствует формированию *син*-конформации (и, соответственно, способствует формированию *анти*-конформации) азотистых оснований, образующих G4, поэтому РНК (кроме искусственно созданного РНК-аптамера Spinach) может формировать только параллельные G-квадруплексы в отличие от ДНК, способной образовывать G4 с различной топологией [44].

Межмолекулярные гуаниновые квадруплексы, образованные цепями ДНК и РНК

В процессе транскрипции синтезируемая РНК может комплементарно связывать ДНК-матрицу, образуя гибридную структуру ДНК:РНК – R-петлю. Если обе нуклеиновые кислоты, вовлеченные в

формирование R-петли, содержат по два близлежащих G-трека, то возможно формирование межмолекулярного гуанинового квадруплекса ДНК:РНК, поэтому соответствующие пары G-треков на ДНК называют мнимыми G4-формирующими последовательностями (PHQS). Биоинформатический анализ показал, что в геномах эукариотических организмов, начиная с амфибий, PHQS сконцентрированы в пределах 1000 н. ниже сайта начала транскрипции [45]. Интересно, что транскрибируемые области генома содержат больше PHQS, чем классических G4-формирующих последовательностей: >97% генов человека содержат PHQS и могут формировать G4 на гибридных молекулах ДНК:РНК ниже точки начала транскрипции в приблизительном соотношении 73 G4 на один ген [46]. Благодаря отрицательному суперскручиванию, создаваемому РНК-полимеразой II и частично распространяющемуся вверх по цепи ДНК, в присутствии РНК-транскриптов, несущих необходимое число G-треков, гуаниновые квадруплексы ДНК:РНК могут также образовываться выше точки начала транскрипции. Этот феномен был открыт в результате анализа ДНК, состоящей из T7-промотора, фланкированного парой идентичных олигонуклеотидов (G_4TG_4 или $G_4TG_4TG_4$), с помощью *in vitro* транскрипции [47].

Кроме того, *in cellulo* в клетках HeLa показано формирование теломерных G-квадруплексов на молекулах ДНК:РНК с параллельной топологией, обладающих достаточно высокой стабильностью (T_m = 51.7°C) [48]; такие ДНК:РНК G4 повышают устойчивость теломер к экзонуклеазам [49].

ВЛИЯНИЕ ИОННОГО СОСТАВА НА ФОРМИРОВАНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ ГУАНИНОВЫХ КВАДРУПЛЕКСОВ

В силу особенностей строения гуаниновых квадруплексов, их стабильность во многом определяется природой входящих в их состав одновалентных катионов и уменьшается в следующем порядке: $K^+ \gg Rb^+ \geq Na^+ > Cs^+ \geq Li^+$. Таким образом, наиболее выгодными для формирования гуаниновых квадруплексов являются ионы калия, что хорошо соотносится с их высокой (по сравнению с другими ионами) концентрацией в клетке. Разный эффект различных катионов на стабильность G4 может объясняться их диаметром и энергией обводнения [50]. Так, ион K^+ имеет относительно большой радиус (1.52 Å) и потому располагается между двумя тетрадами, что снижает степень его обводненности и позволяет образовывать координационные связи со всеми восемью O6-атомами гуанинов обеих тетрад, в то время как ион Na^+ в силу меньших размеров (1.16 Å) умещается внутри одной тетрады, образуя связи только с четырьмя O6 [51, 52]. Ионы лития имеют еще меньший радиус, чем ионы натрия, и сильно обводнены, в связи с чем гуаниновые квадруплексы на основе Li^+ практически не образуются. В то же время, присутствие ионов лития влияет на общий выход гуаниновых квадруплексов, образующихся в растворе ионов K^+ или Na^+. В первом случае образуется больше квадруплексов, т.е. ионы Li^+ потенцируют эффект ионов K^+. Во втором случае наблюдается противоположный эффект [53].

Ионы двухвалентных металлов также могут участвовать в регуляции формирования и динамики неканонических гуаниновых структур. В частности, ионы металлов подгруппы IIa, как и одновалентные катионы, могут выступать в роли стабилизаторов гуаниновых тетрад, составляющих квадруплекс, взаимодействуя с O6-атомами гуанинов. При этом, как и в ситуации с одновалентными ионами, стабильность квадруплексов коррелирует с диаметром иона и падает в ряду $Sr^{2+} \gg Ba^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ [54, 55]. Интересно также отметить, что G-квадруплексы на ДНК, образованные при участии ионов Sr^{2+} в концентрациях, не превышающих 30 мМ, обладают гораздо большей стабильностью и прочностью, чем, например, G4(K^+) [56]. Достаточно сильным стабилизирующим эффектом по отношению к гуаниновым квадруплексам обладают (даже в небольших концентрациях) ионы бария [57], которые также могут индуцировать формирование G4 из ДНК-декамеров, содержащих гуанин, что подтверждено с помощью кристаллографического анализа [58].

Некоторые двухвалентные катионы способны вызывать структурные переходы внутри гуаниновых квадруплексов. Например, ионы Sr^{2+} [59] и Mg^{2+} (в комплексе со спермидином) [22] способны индуцировать формирование G-нанопроволок на последовательности типа d($(G4T2)_3$G4). Открыт также интересный эффект кальция. На примере гуанинового квадруплекса, сформированного на последовательности d(G4T4G4), показано, что ионы Ca^{2+} в концентрации 1 мМ вызывают дестабилизацию антипараллельных G4, а постепенное повышение концентрации кальция индуцирует изменение топологии – переход антипараллельных квадруплексов в параллельные с дальнейшим формированием G-нанопроволок [60, 61]. Аналогичные структурные переходы вызывают ионы никеля; при этом эффект Ni^{2+} можно отменить добавлением EDTA [62]. Однако поскольку ионы никеля способны образовывать координационные связи с N7-атомами гуанинов, их присутствие препятствует образованию водородных связей между гуанинами и ингибирует формирование G4 *de novo* [63].

В 2011 году, исследуя G-квадруплекс PS2.M, Liu и соавт. показали, что ионы свинца способны вытеснять K^+ и Na^+ из гуаниновых квадруплексов, не вызывая их структурных переходов. Каждый образовавшийся таким образом квадруплекс стабилизируется двумя ионами Pb^{2+}, расположенными между парами соседних тетрад, что делает G4(Pb^{2+}) компактным и очень стабильным – температура плавления такого квадруплекса достигает 72°C. Дальнейший анализ показал, что ионы свинца эффективнее замещают ионы натрия, чем ионы калия, что легко объясняется разницей в уровне стабильности G4(K^+) и G4(Na^+) [64]. Интересно также отметить влияние ртути на гуаниновые квадруплексы: ионы этого токсичного элемента с высокой аффинностью связывают тимин [65], образуют связи (T–Hg^{2+}–T), препятствуют сгибанию ДНК и, следовательно, образованию G4. Кроме того, Hg^{2+}, как и Ni^{2+}, способны изменять топологию гуаниновых квадруплексов [66]. В то же время, согласно некоторым данным, ионы ртути могут оказывать стабилизирующий эффект на уже сформированные гуаниновые квадруплексы и триплексы [67, 68].

Многие двухвалентные и трехвалентные катионы дестабилизируют гуаниновые квадруплексы либо ингибируют их формирование. Это, в частности, касается ионов Al^{3+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+} и Fe^{3+}. Так, к примеру, ионы меди и кобальта, подобно ионам никеля и ртути, взаимодействуют с атомами N7 гуанинов, препятствуя образованию G-квадруплексов, хотя присутствие высоких концентраций K^+ до определенной степени ослабляет этот эффект и делает возможным образование гуаниновых триплексов [63]. Кроме того, добавление ионов меди дестабилизирует уже сформированные гуаниновые квадруплексы, причем этот эффект нивелируется добавлением EDTA. Это наблюдение справедливо и в отношении других перечисленных двух- и трехвалентных катионов, дестабилизирующих G4, включая, как сказано выше, ионы Ni^{2+}. Интересно отметить, что дестабилизирующий эффект ионов меди полностью ингибируется не только EDTA, но и ионами бария в молярном соотношении 1 : 10 (Ba^{2+} : Cu^{2+}), так как в отличие от многих других двухвалентных катионов ионы меди не влияют на топологию G-квадруплексов [57].

Рассматривая влияние различных ионов на стабильность и топологию гуаниновых квадруплексов, стоит отметить, что G4 на РНК преимущественно схожи с G4 на ДНК. Тем не менее, на примере мРНК NRAS и теломерной РНК TERRA показано, что только ионы K^+, Sr^{2+} и, до некоторой степени, Ba^{2+}, способны эффективно стабилизировать РНК-квадруплексы; в то же время, ионы Na^+, Ca^{2+} и Mg^{2+} не оказывают подобного эффекта [69]. Двухвалентные ионы тяжелых металлов (Pb^{2+}, Cd^{2+} и Hg^{2+}) связывают G4 на РНК и нарушают их структуру [70].

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ФУНКЦИИ ГУАНИНОВЫХ КВАДРУПЛЕКСОВ НА ДНК

Подобно посттрансляционным модификациям гистонов [71, 72], гуаниновые квадруплексы, формирующиеся на ДНК, выполняют роль регуляторов репликации, транскрипции и рекомбинации, а образование G4 в молекулах РНК влияет на синтез белка. Поэтому, а также благодаря высокой частоте встречаемости GC-богатых последовательностей в геноме эукариот, гуаниновые квадруплексы имеют важное значение для поддержания нормального метаболизма клетки, а нарушение регуляции их образования может приводить к развитию различных заболеваний, нарушению эмбрионального развития или преждевременному старению.

В этом разделе обзора рассмотрены биологические функции гуаниновых квадруплексов и их роль в регуляции экспрессии генов.

Регуляция репликации

Известно, что повышение концентрации ионов K^+, стимулирующее формирование G-квадруплексов, ингибирует репликацию ДНК *in vitro* [73], указывая на антагонизм между этими двумя процессами. Показано также, что и сами гуаниновые квадруплексы оказывают влияние на активность репликации. Так, используя FISH-гибридизацию и иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к фосфорилированному γH2AX, показали, что обработка культуры иммортализованных фибробластов человека G4-стабилизирующим лигандом RHPS4 вызывает образование разрывов теломерной ДНК, причем практически исключительно в S-фазе, в которой имеет место репликация [74]. Аналогичные данные получены и для G4-стабилизирующих лигандов 360A [75] и PhenDC3 [76].

“Выключение” одной или нескольких хеликаз, обладающих G4-резольвазной (т.е., разворачивающей) активностью, как и использование G4-стабилизирующих лигандов, приводит к торможению процесса репликации и образованию соответствующих повреждений ДНК. FISH-анализ отдельных молекул реплицируемой ДНК показал, что *in cellulo* в фибробластах мышей, гомозиготных по нулевому аллелю гена, кодирующего ДНК-хеликазу BLM (*Blm*$^{m3/m3}$), скорость движения репликационной вилки через теломеры существенно ниже, чем в контрольных фибробластах мышей дикого типа [76]. Этот эффект описан и для ДНК-хеликазы FANCJ в культуре клеток DT40 курицы [77] и ДНК-хеликазы WRN в клет-

ках HeLa и культуре первичных фибробластов IMR90 [78].

Таким образом, G-квадруплексы могут, выступая в качестве естественных препятствий на пути движения ДНК-полимеразного комплекса, тормозить репликативную вилку. Это приводит к возникновению делеций в одной из цепей теломерной ДНК и образованию так называемых хрупких теломер. Для предотвращения этого в клетках существует механизм высвобождения ДНК-полимеразных комплексов, блокированных G-квадруплексами, с помощью экзонуклеазы 1 (EXO1): EXO1, обладающая 5' → 3'-экзонуклеазной и РНКазной (РНКаза H) активностями, удаляет несколько нуклеотидов из дочерней ДНК вблизи G4, высвобождая ДНК-полимеразный комплекс [79].

В то же время, согласно полногеномному картированию, у многоклеточных организмов некоторые ориджины репликации (от 67% у *Drosophila melanogaster* до 90% у *Homo sapiens*) предваряются элементами OGRE (Origin G-rich Repeated Element), представляющие собой G/C-богатые последовательности, способные формировать G-квадруплексы [80]. Ориджины этого класса располагаются в некодирующих областях генома [81] и, как следствие, в отличие от ориджинов, локализованных вблизи точек начала транскрипции генов, их активация не ассоциирована с транскрипцией и осуществляется по иному механизму. Показано, что в геноме курицы гуаниновые квадруплексы, формирующиеся в элементах OGRE, участвуют в поддержании оптимальной активности двух ассоциированных с ними ориджинов (med14 и β^A) [82]. Оказалось, что *in cellulo* в эмбриональных стволовых клетках мыши (линия CGR8) формирование гуаниновых квадруплексов в OGRE также необходимо для включения ассоциированных с ними ориджинов репликации, чья активность не зависит от транскрипции. Более того, введение с помощью системы CRISPR-Cas9 OGRE одного из ориджинов репликации в репликационно и транскрипционно неактивный участок генома, не содержащий G4-формирующих последовательностей, приводит к образованию нового функционального ориджина репликации на модифицированном участке генома. Вместе с тем, удаление элемента OGRE из ориджина в значительной степени снижает его активность, не влияя, однако, на активность транскрипции ассоциированного с ним гена. Обработка клеток G4-стабилизирующим лигандом PhenDC3 способна вызывать активацию OGRE-ассоциированных ориджинов репликации и инактивацию ориджинов, не содержащих G4 в регуляторном элементе и активируемых транскрипцией близлежащих генов (что логично следует из того факта, что G4, расположенные в промоторной области гена, преимущественно ингибируют транскрипцию (см. ниже)) [81] Поскольку OGRE расположены на расстоянии 160–280 п.н от ассоциированных с ними ориджинов [80], можно предположить, что роль G-квадруплексов в их активации обусловлена тем обстоятельством, что данные структуры служат мишенями, с которыми связывается множество белков, включая некоторые факторы репликации, например ORC [83].

Гуаниновые квадруплексы принимают участие в патогенезе заболеваний, связанных с нарушением репликации митохондриального генома и дефектами дыхательной функции клетки. Известно, что тяжелая цепь мтДНК обогащена последовательностями, формирующими G4. При этом образование гуаниновых квадруплексов на мтДНК можно рассматривать как одно из следствий малигнизации клетки [84]. В исследовании Falabella и соавт., опубликованном в 2019 году, показано, что *in vitro* низкие дозы G4-стабилизирующего лиганда RHPS4 не оказывают влияния на G-квадруплексы ядерной ДНК, но вызывают резкое ингибирование элонгации митохондриального репликона и транскрипта и делетирование области генома, кодирующей белки дыхательного комплекса. Роль G4 в данном процессе подтверждена введением в мтДНК мутации, способствующей образованию антипараллельного G-квадруплекса повышенной стабильности, что вызывало серьезные дефекты в дыхательной системе клетки [85].

Кроме того, известно, что потенциальные G4-формирующие последовательности содержатся в ориджинах репликации некоторых вирусов, например, вируса саркомы Капоши, где данные последовательности ассоциированы с комплексами репликации ORC и MCM и необходимы для стабильного поддержания вирусной эписомы в клетке хозяина [86]. Поэтому предполагается, что гуаниновые квадруплексы на ДНК принимают участие в регуляции репликации вирусных геномов.

Поддержание структуры и функции теломер

Теломеры играют важнейшую роль в поддержании стабильности генома, процессах старения и в развитии опухолей. По своей природе теломеры представляют собой ДНК-белковые комплексы, защищающие концы хромосом от слипания и деградации. Теломеры человека состоят из многократных тандемных TTAGGG-повторов общей длиной 5000–20000 п.н., оканчивающихся так называемой Т-петлей – структурой, образованной 3'-концевыми участками оцДНК длиной 30–500 н. В ряду клеточных делений в силу особенностей репликации некодирующей цепи происходит постепенное укорочение теломерной ДНК. По достижении теломерами критической длины пролиферация прекращается, однако в активно делящихся эмбриональных клетках длина теломер поддерживается за счет активности теломе-

разы – РНК-зависимой обратной транскриптазы TERT. Дифференцировка клеток характеризуется, помимо прочего, подавлением экспрессии генов плюрипотентности, в том числе теломеразы, но в процессе малигнизации клеток и дальнейшего образования стволовых опухолевых клеток ген теломеразы реактивируется [87].

Благодаря своему нуклеотидному составу, терминирующая оцДНК теломер формирует гуаниновые квадруплексы Htel. С помощью КД-спектрометрии и ЯМР показано, что теломерные гуаниновые квадруплексы, образованные *in vitro*, представляют собой смесь параллельных и антипараллельных структур с короткими (>3 н.) петлями [88], а данные иммунопреципитации хроматина с антителами D1, полученными методом фагового дисплея, указывают на параллельную топологию теломерных G4, формирующихся *in cellulo* в клетках SiHa [89]. Методами рентгеноструктурного анализа и молекулярного моделирования показали, что в теломере в области перехода 3'-концевого G4 в ДНК-дуплекс второй (считая от G4) атом тимина в дцДНК выступает наружу, что делает возможным образование триады TAT, защищающей область между квадруплексом и дуплексом от связывания низкомолекулярными лигандами, потенциально способными нарушить структуру теломер [90].

Теломерные гуаниновые квадруплексы Htel на ДНК в целом очень стабильны (T_m = 65°C) [91]. Однако данные ИК-спектроскопии *in vitro* выявили обратно пропорциональную зависимость между стабильностью теломерных G4 и их концентрацией: в присутствии переизбытка Htel, обычно стабильных, степень их разворачивания изменяется с −19 на 7 мл/моль. Этот эффект может быть объяснен тем обстоятельством, что немногие развернувшиеся G4 в системе с переизбытком ДНК повышают общую обводненность системы, приводя к разворачиванию еще большего числа квадруплексов и так далее. Поскольку концентрация ДНК в ядре клетки крайне высока, описанный эффект может играть важную роль в регуляции теломерных гуаниновых квадруплексов *in vivo* [92]. Кроме того, G-квадруплексы Htel могут связываться и разворачиваться RecQ-подобной хеликазой StyRecQL [93], РНК-хеликазой DHX36 [94] и другими белками, обладающими G4-резольвазной активностью, что необходимо для репликации теломерной ДНК.

Теломерная последовательность человека дает начало двум некодирующим РНК-транскриптам – TERC, длиной 11 н. (5'-CUAACCCUAAC-3'), служащему матрицей для синтеза теломерной последовательности теломеразой [95], и TERRA, содержащему 96 UUAGGG-повторов. Изучение молекулярной динамики и устойчивости TERRA к РНКазе T1 показало, что ее зрелая структура включает три уникальных элемента – гуаниновые квадруплексы, образованные группами повторов ((UUAGGG)4U) и ((UUAGGG)8U), и оцРНК длиной 25 н. [96]. G4-квадруплексы TERRA могут связываться РНК-хеликазами [97], а также комплексами белков, содержащих домены RGG (FMRP) [98] или GAR (TRF2) [99]. Кроме того, TERRA связывается с теломеразой независимо от TERC, выступая, таким образом, в качестве конкурентного ингибитора активности теломеразы [100].

Свободные радикалы кислорода могут повреждать азотистые основания, составляющие гуаниновый квадруплекс, в результате чего образуются 8-оксогуанин (8oxoG) и 5,6-дигидрокси-5,6-дигидротимин (тимингликоль (Tg)) (рис. 4), которые в норме становятся мишенями для системы эксцизионной репарации оснований (base excision repair (BER)) [101, 102]. Поскольку теломеры расположены на концах хромосом и содержат одноцепочечные участки ДНК и большое количество остатков гуанина, они особенно уязвимы для свободных радикалов кислорода. Из-за того, что активность 8-оксогуанингликозилазы (OGG1) в контексте гуаниновых квадруплексов и оцДНК крайне низка, BER-репарация на теломерах протекает очень медленно, ввиду чего со временем в теломерах происходит накопление продуктов окисления азотистых оснований, что пагубно сказывается на их структуре и функции [103]. С помощью smFRET-микроскопии Lee и соавт. детально изучили механизм воздействия азотистых оснований, поврежденных свободными радикалами кислорода, на структуру гуаниновых квадруплексов теломер человека. Оказалось, что окисление центральных гуанинов теломерного G-квадруплекса приводит к его разворачиванию, а также препятствует формированию G4 *de novo*. Нарушение структуры G4 делает теломерную ДНК более доступной для взаимодействия с теломеразой и POT1 [104, 105]. Как следствие, происходит активация теломеразы [106] и POT1-опосредованная инициация формирования комплекса шелтеринов, который (как показано *in vivo* в культуре *Schizosaccharomyces pombe*) препятствует посадке на теломеру ферментов системы репарации [107]. Как результат, происходит удлинение теломеры и накопление в ней продуктов окисления свободными радикалами. Кроме того, полноразмерный POT1 связывается *in vitro* и *in cellulo* с хеликазой BLM и, в еще большей степени, с хеликазой WRN [108], разворачивающими гуаниновые квадруплексы, что приводит к усилению разрушительного эффекта окисления гуанина на гомеостаз теломер.

Образование Tg в петле гуанинового квадруплекса поблизости от образующих его G-тетрад также нарушает структуру G4. Это происходит из-за того, что в теломерном G-квадруплексе ти-

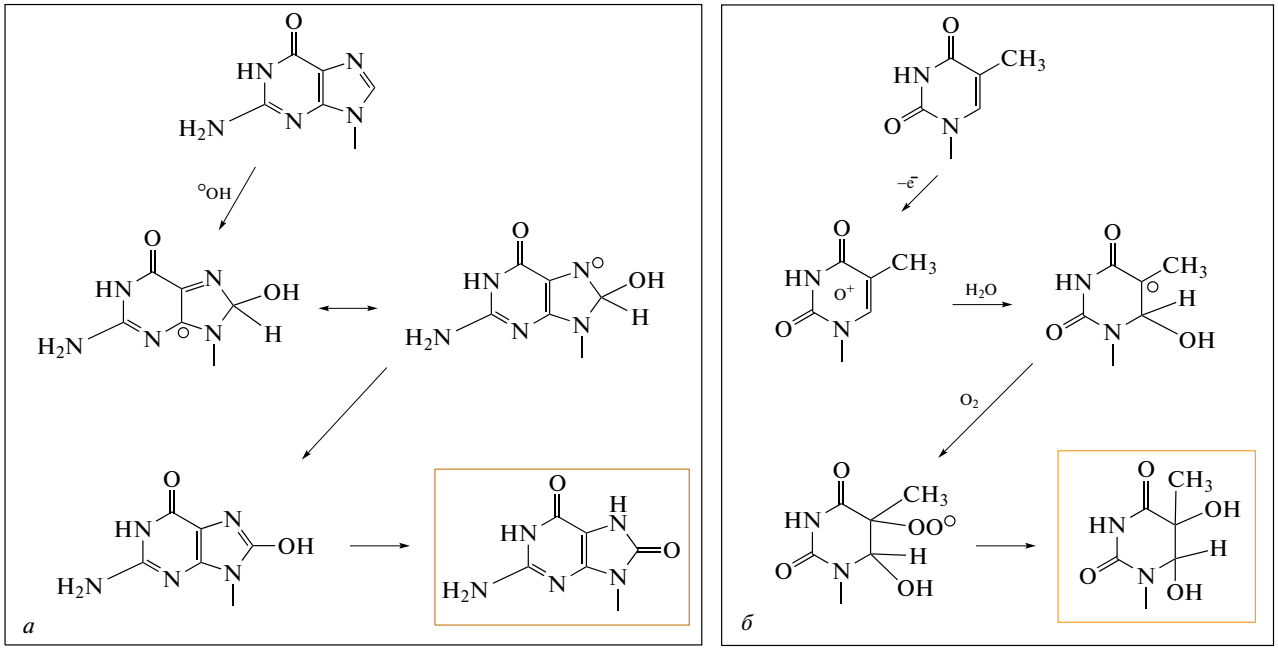

Рис. 4. Повреждение азотистых оснований в ДНК под воздействием активных форм кислорода. *а* – Образование 8-оксогуанина (8oxoG): гидроксильный радикал атакует связь N7=C8 с образованием интермедиата, который в процессе дальнейшего окисления может трансформироваться в 8-гидроксогуанин (8-OHGua); способный, в свою очередь, переходить в 8-оксогуанин. *б* – Образование тимингликоля (Tg): гидроксильный радикал атакует связь C5=C6, при этом образуется гидроксигидропироксид тимина, который далее восстанавливается до тимингликоля.

мин принимает участие в укладке петель ДНК, а неплоская конформация Tg нарушает укладку соседних оснований. Две дополнительные OH-группы в положениях C5 и C6 в молекуле Tg не только создают дополнительное стерическое препятствие для образования тесных контактов внутри петли, но и повышают гидрофильность основания и степень обводнения квадруплекса, что вызывает его дестабилизацию. Поскольку Tg в меньшей степени, чем 8-оксогуанин, дестабилизирует G-квадруплекс, то и связывание Tg-модифицированной теломеры белком POT1 менее выражено, чем в случае 8oxoG-модифицированных теломер. Противоположная картина наблюдается в случае теломеразы, по-видимому, из-за того, что РНК-компонент теломеразы связывается с ДНК эффективнее, чем с POT1 [104].

Показано, что синтетические последовательности $(TTAGGG)_5$, содержащие 8oxoG, в растворе K^+/Na^+ образуют гибридные G-квадруплексы с выпетливанием области поврежденного гуанина [105]. Теоретически это должно нивелировать эффект мутации. Однако поскольку теломеры человека содержат огромное количество (TTAGGG)-повторов [109], окисление содержащихся в них гуанинов и тиминов на глобальном уровне рано или поздно приводит к дестабилизации гуаниновых квадруплексов и вызывает вышеозначенные эффекты. Кроме того, продукты окисления азотистых оснований больше подвержены дальнейшему окислению, чем нативные пурины и пиримидины, поэтому повышение концентрации 8-оксогуанина в теломерах приводит со временем к накоплению в них гидантоина, а постоянная репарация гликозилазами NEIL (которые активно колокализуются с G-квадруплексами) с течением времени приводит к истощению теломер и нарушению регуляции их функции [105].

Регуляция рекомбинации

В клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* G-богатая последовательность 5'-GAGGGGAGG-GGAAGGGGAGGGGAA-3' хромосомы IV, ассоциированная с введением двухцепочечных разрывов в ДНК в процессе мейоза, образует G-квадруплекс. Согласно данным, полученным с помощью КД-спектрометрии, атомно-силовой микроскопии и анализа сдвига электрофоретической подвижности, этот и другие G4 узнаются и связываются с C-концевым доменом компонента синаптонемного комплекса *in vitro* и *in vivo* [110, 111], поэтому предполагается, что формирование G-квадруплексов необходимо для нормального формирования синаптонемного комплекса и успешного кроссинговера в процессе мейоза.

In silico анализ генома человека позволил выявить 32996 “горячих точек” рекомбинации, содержащих G4-формирующие последовательности, что косвенно указывает на участие гуанино-

вых квадруплексов в регуляции мейотической рекомбинации у высших эукариот [112]. Также показано, что *Blm*$^{-/-}$ эмбриональные стволовые клетки человека и мыши характеризуются большим количеством спонтанных обменов между сестринскими хроматидами (SCE) в районе G4-формирующих последовательностей. Это наблюдение подтверждает роль гуаниновых квадруплексов в активации рекомбинации у высших эукариот [113], поскольку, как сказано выше, хеликаза BLM обладает G4-резольвазной активностью [114].

Формирование 3D-структуры хроматина

Относительно недавно продемонстрировали роль гуаниновых квадруплексов в формировании 3D-структуры хроматина. Так, Hou и соавт. [115] показали, что расположенные на границах топологически ассоциированных доменов (ТАДов) генома последовательности ДНК, обогащенные G4-образующими мотивами, перекрываются с большим количеством сайтов посадки архитектурных белков CTCF и SMC3, а образуемые этими мотивами гуаниновые квадруплексы могут (подобно сайтам связывания CTCF) выполнять функцию инсуляторов, способствуя разделению и выпетливанию соседних ТАДов, связанных комплексом когезинов. Кроме того, с помощью атласа ReMap выявлен высокий уровень перекрывания последовательностей, образующих гуаниновые квадруплексы, с сайтами связывания регуляторов хроматина, в частности, гистоновой деметилазы PHF8 [115]. Это наблюдение свидетельствует о том, что формирование гуаниновых квадруплексов ассоциировано с локальной декомпактизацией хроматина. Об этом же свидетельствуют и другие данные. Так, показано, что *in cellulo* в геноме человека гуаниновые квадруплексы, образующиеся в области островков CpG (CGI) активного хроматина, колокализованы с ДНК-(цитозин-5)-метилтрансферазой DNMT1 и окружены гипометилированными участками ДНК [116]. Эти наблюдения позволили сделать вывод, что образование гуаниновых квадруплексов в районе CpG-островков приводит к связыванию и ингибированию цитозин-5-метилтрансферазы DNMT1 и способствует потере метильной метки на C5 в регуляторной области генов [116]. G4 на РНК также принимают участие в регуляции структуры хроматина. В частности, теломерная РНК TERRA взаимодействует с гистоновой деметилазой LSD1, удаляющей метильные группы с молекул гистонов H3, моно- и диметилированных по остаткам Lys4 и Lys9 [117], причем TERRA может выполнять роль аллостерического регулятора деметилирующей активности LSD1 [118]. LSD1 предпочтительно связывает гуаниновые квадруплексы, образованные элементом GG(UUAGGG)$_8$UUA РНК TERRA. Сайт связывания LSD1 с гуаниновыми квадруплексами в TERRA отличается от сайта связывания гистона H3, но перекрывается с сайтом связывания нуклеосомной ДНК, располагаясь между аминокислотными остатками 227 и 251 SWIRM/аминооксидазного домена белка [96].

Оказалось также, что области образования гуаниновых квадруплексов перекрываются с сайтами посадки факторов транскрипции, таких как E2F4 и регулятор экспрессии инсулина NEUROD1. Иными слова, многие энхансерные области генома способны формировать эти вторичные структуры [115]. Более того, в экспериментах *in silico* и *in cellulo* показано, что одноцепочечные петли соседних квадруплексов, формирующихся на ассоциированных с энхансерами длинных (500–1500 п.н.) G4-образующих последовательностях (Long G4-capable regions – LG4), часто комплементарны друг другу, благодаря чему LG4 могут формировать особую третичную структуру – G4K (“G4 Kiss”) [119]. Наличие же G4-образующих последовательностей в промоторах предполагает возможность образования гибридных энхансер-промоторных гуаниновых квадруплексов, т.е. гуаниновые квадруплексы потенциально способны регулировать активность экспрессии генов на уровне формирования и поддержания контакта между его регуляторными областями [119, 120].

Таким образом, гуаниновые квадруплексы могут играть важную роль в регуляции формирования хроматинового ландшафта на разных его уровнях, начиная с образования контактов между энхансерами и промоторами и заканчивая компартментализацией хроматид. В то же время, попрежнему малоизученным остается влияние гуаниновых квадруплексов (и других вторичных структур ДНК) на динамику формирования нуклеосом и наоборот.

Регуляция транскрипции

Как сказано выше, гуаниновые квадруплексы обнаружены в промоторных областях протоонкогенов, где они, как правило, формируются на кодирующей цепи после первого раунда транскрипции и создают препятствие для связывания транскрипционных факторов и продвижения РНК-полимеразы II [121]. Наиболее хорошо изучена роль гуаниновых квадруплексов в регуляции транскрипции протоонкогена *CMYC*, играющего важнейшую роль в эмбриогенезе, генерировании плюрипотентных стволовых клеток и патогенезе онкологических заболеваний. В промоторной области гена *CMYC*, в положении –142...–115 п.н. (выше промотора P1) (рис. 5) расположена регуляторная область NHEIII$_1$, содержащая на 5'-конце богатую гуанином последовательность Pu27 (5'-TGGG-GAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG-3'). Эта область чувствительна к ДНКазе I и S1-нуклеазам и регулирует до 80% активности гена *in cellulo*

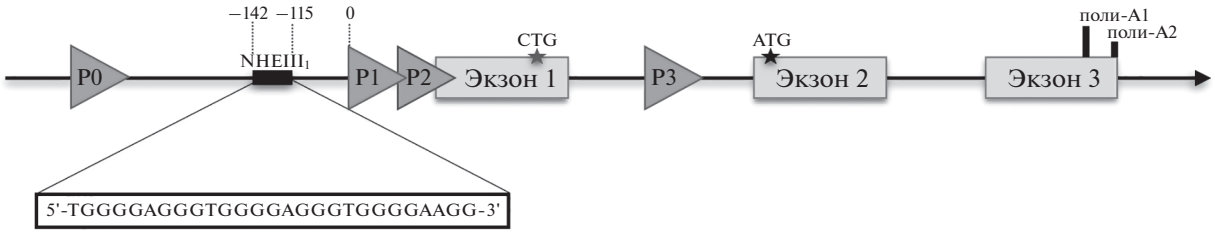

Рис. 5. Схема строения гена *CMYC*. Ген *CMYC* человека содержит несколько промоторов (P0, P1, P2, P3). Перед промотором P1 (в положении −142...−115) расположен элемент $NHEIII_1$, включающий последовательность Pu27 (в рамке), способную образовывать гуаниновые квадруплексы с параллельной топологией, отличающиеся длиной, нуклеотидной последовательностью петель и термодинамическими характеристиками [126].

[122]. Согласно данным ЯМР, эта последовательность может образовывать несколько внутримолекулярных гуаниновых квадруплексов с параллельной топологией и разной длиной петель, наиболее стабильный из которых – myc-2345 (GGG-**T**-GGG-**GA**-GGG-**T**-GGG) [28, 30]. В состоянии дуплекса $NHEIII_1$ поддерживает активное состояние *CMYC*, сворачивание же указанного участка ДНК в гуаниновый квадруплекс приводит к подавлению экспрессии гена *in cellulo*. G4 блокирует связывание с регуляторной областью *CMYC* факторов транскрипции, например, Sp1, инициирующего сборку CMYC-активирующего комплекса FUSE/FBP/FIR/TFIIH [123]. Структура G4, расположенного в *CMYC*-$NHEIII_1$, термодинамически очень стабильна и при физиологических концентрациях ионов калия их температура плавления может достигать 90°C [124].

Последовательности, гомологичные Pu27 промоторной области гена *CMYC*, найдены также в регуляторных областях *SOX2*, *CDH4*, *BRD7* и еще 13 генов [125].

Другой ген, регуляция активности которого во многом определяется присутствием в его промоторной области гуанинового квадруплекса, – протоонкоген *BCL2*, неконтролируемое повышение экспрессии которого приводит к дерегуляции системы апоптоза и малигнизации клеток [127]. G-богатая область Pu39, расположенная в положении −58...−19 п.н. (выше промотора P1) регуляторной области гена *BCL2*, может формировать 15 разных гуаниновых квадруплексов, однако только три из них обладают достаточно высокой стабильностью [128]. Стабилизация гуаниновых квадруплексов в *BCL2*-Pu39 лигандами, например PDF, приводит к подавлению транскрипции гена [129]. Среди других генов, в промоторах которых могут формироваться гуаниновые квадруплексы, подавляющие их транскрипцию, – гены рецепторной тирозинкиназы CKIT [130, 131], эндотелиального фактора роста VEGF [132], гомеобокса HOXC10 [133], индуцируемого гипоксией фактора HIF1 [134] и других.

Интересно, что формирование гуаниновых квадруплексов в промоторе гена не всегда приводит к снижению уровня его экспрессии. Примером этого является *OCT4*, кодирующий фактор транскрипции, поддерживающий плюрипотентность эмбриональных стволовых клеток и участвующий в дедифференцировке опухолевых клеток. С использованием эмбриональных клеток человека (CCTL14) и клеток остеосаркомы (U2OS) показано, что *in cellulo* богатая гуанином последовательность, расположенная вблизи сайта начала транскрипции *OCT4*, образует параллельный G-квадруплекс, необходимый для поддержания высокого уровня экспрессии гена. Введение точечной мутации G18A в указанную область дестабилизирует G4 и приводит к заметному снижению активности гена, которая восстанавливается до исходного уровня при обработке клеток N-мезопорфирином IX (NMM) – стабилизирующим лигандом гуаниновых квадруплексов [135]. Гуаниновые квадруплексы в промоторе положительно влияют на транскрипцию генов релаксина [136], инсулина [137, 138], а также тирозингидроксилазы [139].

Наконец, известно, что на активность транскрипции влияет формирование на ее начальных этапах межмолекулярных гуаниновых квадруплексов ДНК : РНК. Так, изучение гена *NRAS* с использованием *in vitro* транскрипции РНК-полимеразой T7, сайт-специфического мутагенеза и люциферазного анализа в клетках HEK293, показало, что формирование таких G4 подавляет транскрипцию гена *in vitro* и *in cellulo* [46]. Считается, что квадруплексы ДНК : РНК участвуют также в регуляции терминации транскрипции, поскольку могут формироваться сразу после прохождения РНК-полимеразой II обогащенных гуанином участков, расположенных после сайта полиаденилирования. Эти 3'-концевые G4, образованные ДНК и РНК, привлекают хеликазу сенатаксин (SETX), которая разворачивает R-петли, открывая доступ 5' → 3'-экзонуклеазе Xrn2 к 3'-терминирующему сайту транскрипции, что приводит к высвобождению синтезированной РНК [140].

Роль в патогенезе при экспансии нуклеотидных повторов

В основе патогенеза ряда неврологических заболеваний лежит неконтролируемое увеличение (экспансия) числа идентичных олигонуклеотидных повторов в регуляторных областях генов. К примеру, при боковом амиотрофическом склерозе (ALS) и лобно-височной деменции (FTD) наблюдается экспансия гексануклеотидного повтора HRE (GGGGCC) в некодирующей области гена *C9ORF72*. В норме *C9ORF72* содержит не более 25 HRE; симптомы заболевания начинают проявляться, когда количество HRE достигает нескольких сотен [141]. Тандемы повторов $(G4C2)_n$ могут образовывать гуаниновые квадруплексы. Топология G-квадруплексов, сформированных последовательностью $(G4C2)_n$, зависит от количества повторов (G4C2): G-квадруплексы $d(G4C2)_4$ в 100% случаев антипараллельны; $d(G4C2)_2$, $d(G4C2)_3$ и $d(G4C2)_5$ образуют как параллельные, так и антипараллельные G-квадруплексы; G4, образованные d(G4C2)n другой длины, имеют в основном параллельную топологию. С помощью КД-спектроскопии и ЯМР показано, что G-квадруплексы $d(G4C2)_2$ с параллельной топологией представляют собой симметричный тетрамер, а с антипараллельной – асимметричный димер [142]. Формирование $(G4C2)_n$-G4 в некодирующей области *C9ORF72* приводит к обрыву транскрипции, а на его транскрипте – к некорректной инициации трансляции. В результате в клетке накапливаются укороченные РНК-продукты и дипептиды, оказывающие цитотоксический эффект и усугубляющие патологический процесс.

Гуаниновые квадруплексы, образуемые в области экспансии олигонуклеотидов, участвуют в патогенезе и других заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера [143] и синдром ломкой Х-хромосомы [144].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГУАНИНОВЫХ КВАДРУПЛЕКСОВ С ЯДЕРНЫМИ БЕЛКАМИ

В связи с многообразием функций гуаниновых квадруплексов, точная регуляция их формирования необходима для поддержания гомеостаза клетки. Важную роль в этом процессе играют особенности белкового состава клетки, зависящего, например, от стадии клеточного цикла [145].

Ниже рассмотрены ядерные белки, участвующие в регуляции формирования и разрушения гуаниновых квадруплексов в ДНК.

Хеликазы нуклеиновых кислот

Выявлено более 20 ДНК- и РНК-хеликаз, обладающих G4-резольвазной активностью *in vitro*, *in cellulo* и *in vivo*. Среди них упомянутые выше эукариотические ДНК-хеликазы суперсемейства RecQ (Pif1, BLM, WRN), содержащие железосерный кластер (XPD, FANCJ, DDX11, RTEL1), DEAH-box-содержащие РНК-хеликазы DHX9 и DHX36 (RHAU) и другие [146].

Хеликазы XPB и XPD, элементы комплекса TFIIH эукариот, необходимого для инициации транскрипции РНК-полимеразой II и репарации ДНК [147], связывают гуаниновые квадруплексы в промоторных областях активно транскрибируемых генов: С использованием ChIP-seq показано, что около 40% пиков XPB и XPD соответствуют нуклеотидным последовательностям, образующим G-квадруплексы. Биохимический анализ подтвердил взаимодействие XPB и XPD с квадруплексами, а также способность XPD разворачивать G4 на ДНК. Предполагается, что гуаниновые квадруплексы связываются XPB, для чего необходима АТРазная активность белка, после чего к образовавшемуся комплексу присоединяется XPD, вызывающая дестабилизацию и разворачивание G4 [148]. XPB и XPD связывают преимущественно межмолекулярные гуаниновые квадруплексы на ДНК, которые могут образовываться в ориджинах репликации [149].

Хеликаза FANCJ (Fanconi anemia complementation group J protein) принимает участие в репарации межцепочечных сшивок ДНК в клетках человека, а ее мутации ассоциированы с анемией Фанкони, характеризующейся прогрессирующим нарушением функции костного мозга и предрасположенностью к онкологическим заболеваниям [150]. Хеликаза FANCJ может также связывать и разворачивать G-квадруплексы [151], благодаря чему играет важную роль в репликации формирующих их последовательностей [152]. Согласно результатам анализа мутаций K141A/K142A хеликазы FANCJ, за связывание с гуаниновыми квадруплексами ответственен ее N-концевой пептид AKKQ [153]. FANCJ-AKKA связывает также TTA-петли гуаниновых квадруплексов теломер, содержащих 8-оксогуанин, и укорочение этих петель до длины в один тимин приводит к снижению аффинности FANCJ к теломерным G4 [154]. По-видимому, взаимодействие FANCJ с 8oxoG играет роль в разворачивании поврежденных гуаниновых квадруплексов, расположенных на теломерной ДНК, необходимой для их дальнейшей репарации. Поскольку, благодаря домену PIP-box, хеликаза FANCJ может связываться с PCNA и REV-1, в настоящее время изучается вовлеченность указанных белков в процесс FANCJ-опосредованного разворачивания гуаниновых квадруплексов [154]. В связывании G-квадруплексов FANCJ важную роль играет железосерный кластер белка: варианты хеликазы, несущие мутации C283R, C283S и A349P, и, следовательно, лишенные способности координировать FeS-кластер, обладают пониженным сродством к G4 в реплисоме [155].

РНК-хеликазы DEAH-box могут разворачивать как G4 на ДНК, так и G4 на РНК в направлении 3' → 5'. Это касается, в частности, хеликаз DHX9 и DHX36. *In silico* показано, что DHX9 и DHX36 связывают и разворачивают гуаниновые квадруплексы, формирующиеся в 5'-НТО мРНК транскрипционных факторов и эпигенетических регуляторов вблизи старт-кодонов. Разворачивание G4 способствует сборке 80S рибосомы на канонических кодонах и активации трансляции основной изоформы белка [156]. DDX36 преимущественно разворачивает G-квадруплексы с параллельной топологией [157], причем этот процесс происходит быстрее, если одноцепочечная последовательность богата аденином (показано для одномолекулярных G4 на ДНК и тетрамолекулярных G4 на РНК) [158]. N-концевой домен DDX36 участвует в связывании данного белка с гуаниновым квадруплексом, образованным на ДНК [159].

DEAD-box-содержащая РНК-хеликаза DDX5, играющая важную роль в патогенезе онкологических заболеваний (повышение уровня ее экспрессии характерно для большинства видов опухолей человека [160–162]), также обладает G4-резольвазной активностью в отношении внутримолекулярных гуаниновых квадруплексов, сформированных как на РНК, так и на ДНК. Так, показано, что *in cellulo* DDX5 узнает и разворачивает G-квадруплексы в $NHEIII_1$-области промотора *CMYC*, а также G-квадруплексы в мРНК CMYC. Несмотря на то что DDX5, как и другие хеликазы, обладает АТРазной активностью, DDX5-опосредованное разворачивание гуаниновых квадруплексов не требует гидролиза АТР [163].

Поли(ADP-рибоза)-полимеразы

Поли(ADP-рибоза)-полимеразы (PARP) – семейство ДНК-связывающих белков, содержащих два мотива типа цинковых пальцев и катализирующих реакцию переноса ADP-рибозы на белки-мишени (поли(ADP)рибозилирование). Семейство PARP насчитывает, как минимум, 18 белков, содержащих консервативный каталитический домен. Основная функция белков PARP (в частности, PARP1, PARP2 и PARP3) – узнавание и связывание одноцепочечных разрывов ДНК, что является первым этапом сборки системы эксцизионной репарации. Большинство субстратов PARP – это белки систем репарации, ферменты синтеза ДНК, регуляторы хроматина и гистоны; кроме того, в присутствии разрывов ДНК PARP подвергаются авто-поли(ADP)рибозилированию *in vitro, in cellulo* и *in vivo* [164].

PARP1 может связывать гуаниновые квадруплексы, формируемые теломерной ДНК и последовательностью промотора гена *CKIT* человека *in vitro* [165]. *In cellulo* показано, что PARP1 связывает гуаниновые квадруплексы, образующиеся в процессе транскрипции богатой гуанином последовательности в соотношении две–три молекулы к одному G4. При этом происходит активация и авто-поли(ADP)рибозилирование PARP1 [37]. В присутствии 100 мМ KCl PARP1 человека связывает гуаниновые квадруплексы на промоторе *CMYC in vitro*, а также *in cellulo*. Это связывание повышает ферментативную активность PARP1 (хотя и в меньшей степени, чем разрывы ДНК) и, в конечном итоге, приводит к разворачиванию G4; важнейшую роль в данном процессе играет первый цинковый палец PARP1, а G4-стабилизирующий лиганд TMPyP4 снижает PARP1-опосредованное связывание и разворачивание G-квадруплексов промотора *CMYC* [166]. В то же время, стабилизация G-квадруплексов в клетках лигандом RHPS4, вызывающая ингибирование теломеразы [167] и остановку репликации теломер [74], способствует рекрутированию PARP1 (но не PARP2) в область теломер, где данный белок, активируясь, катализирует поли(ADP)рибозилирование POT1, что приводит к диссоциации комплекса шелтеринов. Для связывания PARP1 с теломерой необходимо присутствие белка TRF2 и гуаниновых квадруплексов [168]. В промоторе *PARP1* также присутствует богатая гуанином последовательность, образующая внутримолекулярный (3+1) гибридный гуаниновый квадруплекс длиной 23 н., благодаря чему данная последовательность может обеспечивать саморегуляцию PARP1 на уровне экспрессии его гена [169].

PARP3, как и PARP1, способен узнавать и связывать гуаниновые квадруплексы, образующиеся в области двухцепочечных разрывов ДНК, причем это взаимодействие приводит к разворачиванию G4. Этот процесс важен для инициации репарации ДНК как путем негомологичного соединения концов, так и с помощью гомологической рекомбинации, и значимость его подтверждается тем, что обработка клеток *PARP3*$^{-/-}$ G4-стабилизирующими лигандами PhenDC3 и пиридостатином останавливает репарацию и вызывает гибель клеток [170].

Нуклеолин

Нуклеолин (NCL) – фосфопротеин, выполняющий в клетке множество функций. Во-первых, NCL может играть роль шаперона гистонов и коремоделера хроматина так как, стимулируя диссоциацию гистонового димера H2A–H2B и дестабилизируя тем самым гистоновый октамер, данный белок способствует смещению нуклеосом ремоделерами SWI/SNF и ACF [171]. Также нуклеолин может выступать в роли транскрипционного фактора [172]. Кроме того, сайты связывания нуклеолина содержатся в пре-рРНК, а также

в 18S и 28S РНК, что подразумевает участие данного белка в биогенезе рибосом [173].

Нуклеолин индуцирует формирование G-квадруплекса *in vitro* на одноцепочечной последовательности промотора *CMYC*; *in cellulo* нуклеолин с высокой аффинностью и селективностью связывает и стабилизирует параллельные гуаниновые квадруплексы, формирующиеся в области $NHEIII_1$ промотора *CMYC*. В свою очередь, стабилизация гуаниновых квадруплексов в промоторе *CMYC* ингибирует транскрипцию его мРНК. Таким образом, нуклеолин, экспрессия которого контролируется фактором CMYC, может действовать в петле отрицательной обратной связи, подавляя экспрессию *CMYC* [174]. Нуклеолин связывает и стабилизирует гуаниновые квадруплексы, расположенные в промоторе рецептора андрогена (AR) [175]. Наконец, нуклеолин связывает эндогенный элемент HRE, расположенный в некодирующей области гена *C9ORF72*, стабилизируя сформировавшиеся там гуаниновые квадруплексы и инициируя тем самым молекулярные процессы, которые приводят к развитию нейродегенеративного заболевания ALS/FTD [176].

Узнавание нуклеолином гуанинового квадруплекса не зависит от его топологии или особенностей состава G4-образующей последовательности и со стороны квадруплекса определяется исключительно длиной его петель; NCL человека предпочтительно связывает G4 с длиной петель ≥3 н. [177].

Нуклеолин в основном локализуется в ядре клетки, но выявляется также на клеточных мембранах и в цитоплазме [178], где принимает участие в регуляции G4 на РНК, что играет особую роль в репликации генома РНК-содержащих вирусов, о чем будет рассказано ниже.

Вирус Эпштейна–Барр (EBV) инфицирует клетки иммунной системы. Ядерный антиген 1 (Ebna1), играющий важную роль в репликации этого вируса и поддержании его генома, является сильным антигеном, поэтому для успешного размножения вируса экспрессия гена *Ebna1* должна поддерживаться на низком уровне. В этом процессе важную роль играет богатая гуанином последовательность мРНК Ebna1, кодирующая функциональные глицин-аланиновые повторы (GAr) и образующая G-квадруплекс, снижающий активность ее трансляции. Стабилизация G4 обеспечивается нуклеолином клетки хозяина, поэтому *in cellulo* эктопическая экспрессия *NCL* ингибирует синтез Ebna1. Снижение же экспрессии нуклеолина, равно как и обработка клеток лигандом гуаниновых квадруплексов PhenDC3, который препятствует связыванию нуклеолина с G4 на мРНК Ebna1, вызывает противоположный эффект [179].

Коровая РНК вируса гепатита С (HCV) образует гуаниновый квадруплекс, преимущественно параллельной топологии, в положении между нуклеотидами 267 и 285, соответствующем области, кодирующей домен D1 корового белка [180], который, обладая положительным зарядом (благодаря большому количеству основных аминокислот), связывает вирусную РНК и индуцирует формирование нуклеокапсида [181]. В клетке хозяина указанный гуаниновый квадруплекс стабилизируется нуклеолином, чья экспрессия повышается в ответ на инфицирование вирусом. Стабилизация же G-квадруплекса приводит, в свою очередь, к ингибированию транскрипции РНК и репликации генома HCV [182].

Промотор LTR HIV-1 содержит несколько G-треков, которые могут формировать разные варианты гуаниновых квадруплексов. Нуклеолин клетки хозяина связывает и стабилизирует большинство (хотя и не все) вариантов этих G-квадруплексов, что вызывает снижение эффективности экспрессии генома HIV-1 [183].

Опухолевый супрессор P53

Опухолевый супрессор P53 играет ключевую роль в регуляции пролиферации клетки. Одним из основных генов-мишеней P53 является протоонкоген *CMYC*: известно, что связывание P53 с областью $NHEIII_1$ промотора *CMYC* приводит к снижению уровня экспрессии гена [184]. В то же время, связывание P53 с промотором *CMYC* нарушается в отсутствие С-концевого домена белка, а также при дестабилизации гуаниновых квадруплексов, в норме формируемых последовательностью $NHEIII_1$. Таким образом, G4 играют ключевую роль в P53-опосредованной регуляции экспрессии *CMYC* и, вероятно, других протоонкогенов [185].

Эксперименты *in vitro* показали, что связывание P53 человека с теломерной последовательностью $G3(TTAG3)_n$, участвующее в защите теломер, также как и в случае промотора *CMYC*, требует присутствия в ДНК гуаниновых квадруплексов, что может косвенно свидетельствовать о стабилизирующем эффекте P53 в отношении гуаниновых квадруплексов. Увеличение длины теломерной последовательности (и, как следствие, числа гуаниновых квадруплексов в системе), а также введение G4-стабилизирующего лиганда N-метилмезопорфирина IX (NMM) усиливают взаимодействие P53 с теломерой. Аффинность P53 к гуаниновым квадруплексам теломер значительно выше, если в качестве стабилизирующих катионов выступают ионы K^+, а не Na^+ [186].

Комплексы Polycomb

Репрессирующие комплексы Polycomb – PRC2, триметилирующий гистон H3 по остатку Lys27, и PRC1, моноубиквитинирующий гистон

H2A по остатку Lys119 в клетках млекопитающих (и Lys118 в клетках *D. melanogaster*) – необходимы для подавления транскрипции и формирования гетерохроматина, потому они играют важную роль в эмбриогенезе, клеточной дифференцировке и онкогенезе [187].

Недавно Hanna и соавт. показали, что BMI1, белок PRC1-подобного комплекса группы Polycomb, ассоциированный с ранней спорадической формой болезни Альцгеймера, сконцентрирован в участках гетерохроматина, обогащенных мнимыми G4-формирующими последовательностями PHQS, а клетки с пониженной экспрессией *BMI1* и релаксированным хроматином характеризуются накоплением гуаниновых квадруплексов. Таким образом, сделан вывод, что формирование гетерохроматина, обеспечиваемое прежде всего комплексами Polycomb, препятствует формированию G-квадруплексов. По-видимому, белки комплексов PRC узнают и связывают PHQS, ассоциированные с активными генами, создавая, тем самым, “центры” гетерохроматинизации и ингибируя процесс формирования гуаниновых квадруплексов [188].

Помимо ДНК, комплексы Polycomb млекопитающих – прежде всего PRC2 – неспецифически связывают различные РНК [189]. *In vitro* очищенный PRC2 человека узнает моноосновные одноцепочечные РНК в следующем порядке убывания сродства к ним: G > C, U ≫ A. *In cellulo* SUZ12, субъединица PRC2, преимущественно связывает РНК-мотивы, состоящие из коротких повторов последовательно расположенных гуанинов, причем формирование этими повторами гуаниновых квадруплексов существенно повышает сродство SUZ12 к РНК. В то же время, дцРНК не являются мишенями для PRC2 [42].

Важно отметить, что *in vivo* G-треки, потенциально способные формировать гуаниновые квадруплексы, в большом количестве представлены на участках генома, содержащих гистон H3, триметилированный по остатку Lys27 (H3K27me3), т.е. присутствуют на генах-мишенях PRC2. мРНК этих генов также содержат G-треки и способны образовывать G4, что делает их мишенями для PRC2. Так, в эмбриональных клетках мыши PRC2 присутствует в промоторных областях большого количества активных генов. При этом в процессе транскрипции синтезируемая мРНК связывает PRC2, который перераспределяется с промотора [190] в соответствии со следующей закономерностью в отношении эффективности связывания комплекса PRC2 с нуклеиновыми кислотами и белками: РНК ≫ нуклеосомы с длинным ДНК-линкером ≈ ДНК ≫ гистоновые хвосты [191]. Таким образом, РНК-транскрипты генов-мишеней PRC2 конкурируют за комплекс с хроматином, препятствуя триметилированию H3K27 отдельных областей генома и осуществляя положительную обратную связь в отношении регуляции уровня экспрессии кодирующих их генов. При этом в процессе клеточной дифференцировки пул РНК-транскриптов, связывающих Polycomb, постепенно уменьшается вслед за изменением соотношения транскрипционных факторов, активирующих и ингибирующих кодирующие их гены [192].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многообразие механизмов регуляции экспрессии генов обеспечивает тонкую настройку клеточных процессов и поддержание гомеостаза, а их детальное изучение необходимо не только для понимания функционирования организма и отдельных его элементов, но и для разработки новых методов диагностики и лечения онкологических и других заболеваний. Один из таких регуляторных механизмов – формирование нуклеиновыми кислотами вторичных структур, к которым, в частности, относятся гуаниновые квадруплексы (G4).

Благодаря быстрому развитию методической базы, за последние десятилетия детально описаны строение и термодинамические характеристики различных G-квадруплексов [193], определена их роль в регуляции экспрессии генов на разных ее этапах, выявлены эндогенные клеточные факторы [194] и синтезированы лиганды [195], влияющие на динамику данных структур. Кроме того, благодаря своей термодинамической и химической стабильности, а также низкой иммуногенности, гуаниновые квадруплексы могут быть использованы в диагностических целях [10]. Так, G4-содержащий тромбиновый аптамер TBA может использоваться для связывания и визуализации наномолярных концентраций тромбина. Образованный РНК G4-аптамер Spinach применяется для детекции 3,5-дифторо-4-гидроксибензилиден имидазолина (DFHBI) и некоторых других соединений. G4-аптамер PS2.M при связывании с гемином проявляет каталитические свойства, идентичные свойствам пероксидазы хрена, окисляя в присутствии пероксида водорода колориметрические субстраты 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновую) кислоту, и благодаря этому может использоваться для детекции катионов, органических молекул, белков и нуклеиновых кислот [11]. Кроме того, на основе лигандов гуаниновых квадруплексов разрабатываются новые противоопухолевые средства; например, кварфлоксин (CX-3543) прошел фазу I клинических испытаний и показал эффективность в терапии солидных опухолей и лимфом, и фазу II в случае нейроэндокринной карциномы [9]. Помимо этого, поскольку гуаниновые квадруплексы участвуют в регуляции жизнедеятельности и размножения бактерий, простейших и вирусов, связывающие

их лиганды показали себя как потенциальные препараты для борьбы с *Salmonella enterica* [196], лечения малярии [197], герпеса [198] и других инфекционных заболеваний. Наконец, в 2020 году предложен метод выявления патогенной кишечной палочки *E. coli* K88 в продуктах питания, в основе которого лежит молекулярная система, одним из основных компонентов которой является гуаниновый квадруплекс [13].

Стоит также отметить, что благодаря своей электропроводности гуаниновые квадруплексы и образуемые ими гуаниновые нанопроволоки представляют собой перспективный материал для создания нанопроводов и наноприборов с новыми характеристиками [12].

Несмотря на обилие данных, касающихся свойств гуаниновых квадруплексов и применения G4-содержащих молекул и G4-лигандов в медицине, наши знания об этих структурах все еще остаются неполными. Во-первых, по-прежнему малоизученными остаются межмолекулярные гуаниновые квадруплексы, хотя биоинформатические исследования показывают, что именно этот тип G4 наиболее широко представлен в клетках эукариот [46]. В контексте межмолекулярных G-квадруплексов особый интерес представляет изучение динамики их конформационного перехода во внутримолекулярные G4, а также другие канонические и неканонические структуры ДНК и РНК. Не менее интересен вопрос о существовании белков, селективно узнающих и связывающих только межмолекулярные или только внутримолекулярные G-квадруплексы. Наконец, остается открытым вопрос о возможности существования межмолекулярных гуаниновых квадруплексов РНК:РНК. Помимо этого, достаточно мало известно о взаимной регуляции нуклеосом и G-квадруплексов. Основная масса исследований гуаниновых квадруплексов проводится *in vitro* и *in cellulo* или с использованием методов *in silico*, поэтому данные о специфике их структуры, пространственно-временных особенностях формирования, динамике и регуляции *in vivo* практически отсутствуют. Причем это касается как межмолекулярных, так и более хорошо изученных внутримолекулярных гуаниновых квадруплексов. Прежде всего, это обусловлено техническими трудностями, такими как невозможность селективного маркирования и инициации формирования и разворачивания единичных гуаниновых квадруплексов в заданном месте генома, поэтому дизайн и синтез лигандов, распознающих не только структуру, но и последовательность, формирующую G4, абсолютно необходимы для дальнейшего развития данного направления.

Таким образом, изучение гуаниновых квадруплексов по-прежнему остается важной задачей не только молекулярной биологии, биофизики и химии, но и медицины, и в перспективе может внести существенный вклад в решение проблемы лечения многих заболеваний, а также в развитие нанотехнологий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-30003).

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. Watson J.D., Crick F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. **171**, 737–738.
2. Barone G., Fonseca Guerra C., Bickelhaupt F.M. (2013) B-DNA structure and stability as function of nucleic acid composition: dispersion-corrected DFT study of dinucleoside monophosphate single and double strands. *Chem. Open*. **2**, 186–193.
3. Franklin R.E., Gosling R.G. (1953) The structure of sodium thymonucleate fibres. I. The influence of water content. *Acta Crystallogr.* **6**, 673–677.
4. Dickerson R.E. (1992) DNA structure from A to Z. *Methods Enzymol*. **211**, 67–111.
5. Wang A.H.J., Quigley G.J., Kolpak F.J., Crawford J.L., Vanboom J.H., Vandermarel G., Rich A. (1979) Molecular-structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature*. **282**, 680–686.
6. Leontis N.B., Westhof E. (2001) Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *RNA*. **7**, 499–512.
7. Gellert M., Lipsett M.N., Davies D.R. (1962) Helix formation by guanylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **48**, 2013–2018.
8. Duarte A.R., Cadoni E., Ressurreicao A.S., Moreira R., Paulo A. (2018) Design of modular G-quadruplex ligands. *Chem. Med. Chem.* **13**, 869–893.
9. Information N.C.f.B. (2020) National Center for Biotechnology Information. https://go.drugbank.com/drugs/DB06638.
10. Viglasky V., Hianik T. (2013) Potential uses of G-quadruplex-forming aptamers. *Gen. Physiol. Biophys.* **32**, 149–172.
11. Kwok C.K., Merrick C.J. (2017) G-quadruplexes: prediction, characterization, and biological application. *Trends Biotechnol.* **35**, 997–1013.
12. Livshits G.I., Stern A., Rotem D., Borovok N., Eidelshtein G., Migliore A., Penzo E., Wind S.J., Di Felice R., Skourtis S.S., Cuevas J.C., Gurevich L., Kotlyar A.B., Porath D. (2014) Long-range charge transport in single G-quadruplex DNA molecules. *Nat. Nanotechnol.* **9**, 1040–1046.
13. Wang Z., Lu Q., Xu T., Wang F., Huang F., Peng Y., Deng L. (2020) G-quadruplex-based assay combined with aptamer and gold nanoparticles for *Escherichia coli* K88 determination. *Mikrochim. Acta*. **187**, 308.

14. Burge S., Parkinson G.N., Hazel P., Todd A.K., Neidle S. (2006) Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucl. Acids Res.* **34**, 5402–5415.
15. Lane A.N., Chaires J.B., Gray R.D., Trent J.O. (2008) Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucl. Acids Res.* **36**, 5482–5515.
16. Puig Lombardi E., Londono-Vallejo A. (2020) A guide to computational methods for G-quadruplex prediction. *Nucl. Acids Res.* **48**, 1–15.
17. Haider S.M., Parkinson G.N., Neidle S. (2003) Structure of a G-quadruplex–ligand complex. *J. Mol. Biol.* **326**, 117–125.
18. Chung W.J., Heddi B., Schmitt E., Lim K.W., Mechulam Y., Phan A.T. (2015) Structure of a left-handed DNA G-quadruplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**, 2729–2733.
19. Fu B., Huang J., Chen Y., Wang Y., Xue T., Xu G., Wang S., Zhou X. (2016) Right-handed and left-handed G-quadruplexes have the same DNA sequence: distinct conformations induced by an organic small molecule and potassium. *Chem. Commun.* (Camb.). **52**, 10052–10055.
20. Lech C.J., Heddi B., Phan A.T. (2013) Guanine base stacking in G-quadruplex nucleic acids. *Nucl. Acids Res.* **41**, 2034–2046.
21. Štefl R., Cheatham T.E., Špačková N.A., Fadrná E., Berger I., Koča J., Šponer J. (2003) Formation pathways of a guanine-quadruplex DNA revealed by molecular dynamics and thermodynamic analysis of the substates. *Biophys. J.* **85**, 1787–1804.
22. Marsh T.C., Henderson E. (1994) G-wires: self-assembly of a telomeric oligonucleotide, d(GGGGTTGGGG), into large superstructures. *Biochemistry.* **33**, 10718–10724.
23. Marsh T.C., Vesenka J., Henderson E. (1995) A new DNA nanostructure, the G-wire, imaged by scanning probe microscopy. *Nucl. Acids Res.* **23**, 696–700.
24. Bose K., Lech C.J., Heddi B., Phan A.T. (2018) High-resolution AFM structure of DNA G-wires in aqueous solution. *Nat. Commun.* **9**, 1959.
25. Williamson J.R. (1994) G-quartet structures in telomeric DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 703–730.
26. Parkinson G.N., Lee M.P., Neidle S. (2002) Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature.* **417**, 876–880.
27. Bugaut A., Balasubramanian S. (2008) A sequence-independent study of the influence of short loop lengths on the stability and topology of intramolecular DNA G-quadruplexes. *Biochemistry.* **47**, 689–697.
28. Phan A.T., Modi Y.S., Patel D.J. (2004) Propeller-type parallel-stranded G-quadruplexes in the human c-myc promoter. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 8710–8716.
29. Pandey S., Agarwala P., Maiti S. (2013) Effect of loops and G-quartets on the stability of RNA G-quadruplexes. *J. Phys. Chem. B.* **117**, 6896–6905.
30. Mathad R.I., Hatzakis E., Dai J., Yang D. (2011) c-MYC promoter G-quadruplex formed at the 5'-end of NHE III1 element: insights into biological relevance and parallel-stranded G-quadruplex stability. *Nucl. Acids Res.* **39**, 9023–9033.
31. Chambers V.S., Marsico G., Boutell J.M., Di Antonio M., Smith G.P., Balasubramanian S. (2015) High-throughput sequencing of DNA G-quadruplex structures in the human genome. *Nat. Biotechnol.* **33**, 877–881.
32. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2000) *Molecular Cell Biology*, 4 Ed. New York: W.H. Freeman and Company, p. 1184.
33. Hansel-Hertsch R., Beraldi D., Lensing S.V., Marsico G., Zyner K., Parry A., Di Antonio M., Pike J., Kimura H., Narita M., Tannahill D., Balasubramanian S. (2016) G-quadruplex structures mark human regulatory chromatin. *Nat. Genet.* **48**, 1267–1272.
34. Huppert J.L., Balasubramanian S. (2007) G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucl. Acids Res.* **35**, 406–413.
35. Eddy J., Maizels N. (2006) Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome. *Nucl. Acids Res.* **34**, 3887–3896.
36. Zhang X.Y., Cao E.H., Zhang Y., Chou C., Bai C. (2003) K^+ and Na^+-induced self-assembly of telomeric oligonucleotide d(TTAGGG)n. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **20**, 693–702.
37. Mela I., Kranaster R., Henderson R.M., Balasubramanian S., Edwardson J.M. (2012) Demonstration of ligand decoration, and ligand-induced perturbation, of G-quadruplexes in a plasmid using atomic force microscopy. *Biochemistry.* **51**, 578–585.
38. Kouzine F., Wojtowicz D., Baranello L., Yamane A., Nelson S., Resch W., Kieffer-Kwon K.R., Benham C.J., Casellas R., Przytycka T.M., Levens D. (2017) Permanganate/S1 nuclease footprinting reveals non-B DNA structures with regulatory potential across a mammalian genome. *Cell Syst.* **4**, 344–356. e7.
39. Biffi G., Tannahill D., McCafferty J., Balasubramanian S. (2013) Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nat. Chem.* **5**, 182–186.
40. Konig S.L., Huppert J.L., Sigel R.K., Evans A.C. (2013) Distance-dependent duplex DNA destabilization proximal to G-quadruplex/i-motif sequences. *Nucl. Acids Res.* **41**, 7453–7461.
41. Deng J., Xiong Y., Sundaralingam M. (2001) X-ray analysis of an RNA tetraplex (UGGGGU)(4) with divalent Sr(2+) ions at subatomic resolution (0.61 A). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 13665–13670.
42. Wang X., Goodrich K.J., Gooding A.R., Naeem H., Archer S., Paucek R.D., Youmans D.T., Cech T.R., Davidovich C. (2017) Targeting of Polycomb repressive complex 2 to RNA by short repeats of consecutive guanines. *Mol. Cell.* **65**, 1056–1067. e5.
43. Olsen C.M., Marky L.A. (2009) Energetic and hydration contributions of the removal of methyl groups from thymine to form uracil in G-quadruplexes. *J. Phys. Chem. B.* **113**, 9–11.
44. Zhang D.H., Fujimoto T., Saxena S., Yu H.Q., Miyoshi D., Sugimoto N. (2010) Monomorphic RNA G-quadruplex and polymorphic DNA G-quadruplex structures responding to cellular environmental factors. *Biochemistry.* **49**, 4554–4563.
45. Xiao S., Zhang J.Y., Zheng K.W., Hao Y.H., Tan Z. (2013) Bioinformatic analysis reveals an evolutional

selection for DNA:RNA hybrid G-quadruplex structures as putative transcription regulatory elements in warm-blooded animals. *Nucl. Acids Res.* **41**, 10379–10390.

46. Zheng K.W., Xiao S., Liu J.Q., Zhang J.Y., Hao Y.H., Tan Z. (2013) Co-transcriptional formation of DNA:RNA hybrid G-quadruplex and potential function as constitutional cis element for transcription control. *Nucl. Acids Res.* **41**, 5533–5541.
47. Zhang J.Y., Xia Y., Hao Y.H., Tan Z. (2020) DNA:RNA hybrid G-quadruplex formation upstream of transcription start site. *Sci. Rep.* **10**, 7429.
48. Bao H.L., Xu Y. (2020) Telomeric DNA-RNA-hybrid G-quadruplex exists in environmental conditions of HeLa cells. *Chem. Commun. (Camb).* **56**, 6547–6550.
49. Xu Y., Suzuki Y., Ishizuka T., Xiao C.D., Liu X., Hayashi T., Komiyama M. (2014) Finding a human telomere DNA-RNA hybrid G-quadruplex formed by human telomeric 6-mer RNA and 16-mer DNA using click chemistry: a protective structure for telomere end. *Bioorg. Med. Chem.* **22**, 4419–4421.
50. Hud N.V., Smith F.W., Anet F.A., Feigon J. (1996) The selectivity for K^+ versus Na^+ in DNA quadruplexes is dominated by relative free energies of hydration: a thermodynamic analysis by 1H NMR. *Biochemistry.* **35**, 15383–15390.
51. Shannon R.D. (1976) Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallogr. A.* **32**, 751–767.
52. Phillips K., Dauter Z., Murchie A.I., Lilley D.M., Luisi B. (1997) The crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex at 0.95 A resolution. *J. Mol. Biol.* **273**, 171–182.
53. You J., Li H., Lu X.M., Li W., Wang P.Y., Dou S.X., Xi X.G. (2017) Effects of monovalent cations on folding kinetics of G-quadruplexes. *Biosci. Rep.* **37**, BSR20170771
54. Venczel E.A., Sen D. (1993) Parallel and antiparallel G-DNA structures from a complex telomeric sequence. *Biochemistry.* **32**, 6220–6228.
55. Halder K., Hartig J.S. (2011) RNA quadruplexes. *Met. Ions Life Sci.* **9**, 125–139.
56. Wlodarczyk A., Grzybowski P., Patkowski A., Dobek A. (2005) Effect of ions on the polymorphism, effective charge, and stability of human telomeric DNA. Photon correlation spectroscopy and circular dichroism studies. *J. Phys. Chem. B.* **109**, 3594–3605.
57. Lu H., Li S., Chen J., Xia J., Zhang J., Huang Y., Liu X., Wu H.C., Zhao Y., Chai Z., Hu Y. (2015) Metal ions modulate the conformation and stability of a G-quadruplex with or without a small-molecule ligand. *Metallomics.* **7**, 1508–1514.
58. Zhang D., Huang T., Lukeman P.S., Paukstelis P.J. (2014) Crystal structure of a DNA/Ba^{2+} G-quadruplex containing a water-mediated C-tetrad. *Nucl. Acids Res.* **42**, 13422–13429.
59. Chen F.M. (1992) Sr^{2+} facilitates intermolecular G-quadruplex formation of telomeric sequences. *Biochemistry.* **31**, 3769–3776.
60. Miyoshi D., Nakao A., Toda T., Sugimoto N. (2001) Effect of divalent cations on antiparallel G-quartet structure of d(G4T4G4). *FEBS Lett.* **496**, 128–133.
61. Miyoshi D., Nakao A., Sugimoto N. (2003) Structural transition from antiparallel to parallel G-quadruplex of d(G4T4G4) induced by Ca^{2+}. *Nucl. Acids Res.* **31**, 1156–1163.
62. Doluca O., Withers J.M., Filichev V.V. (2013) Molecular engineering of guanine-rich sequences: Z-DNA, DNA triplexes, and G-quadruplexes. *Chem. Rev.* **113**, 3044–3083.
63. Blume S.W., Guarcello V., Zacharias W., Miller D.M. (1997) Divalent transition metal cations counteract potassium-induced quadruplex assembly of oligo(dG) sequences. *Nucl. Acids Res.* **25**, 617–625.
64. Liu W., Zhu H., Zheng B., Cheng S., Fu Y., Li W., Lau T.C., Liang H. (2012) Kinetics and mechanism of G-quadruplex formation and conformational switch in a G-quadruplex of PS2.M induced by Pb^{2+}. *Nucl. Acids Res.* **40**, 4229–4236.
65. Sheng Z., Han J., Zhang J., Zhao H., Jiang L. (2011) Method for detection of Hg^{2+} based on the specific thymine-Hg^{2+}-thymine interaction in the DNA hybridization on the surface of quartz crystal microbalance. *Colloids Surf. B.* **87**, 289–292.
66. Karimata H., Miyoshi D., Fujimoto T., Koumoto K., Wang Z.M., Sugimoto N. (2007) Conformational switch of a functional nanowire based on the DNA G-quadruplex. *Nucleic Acids Symp. Ser.* (Oxf.). (51), 251–252.
67. Kong R.M., Ma L., Han X., Ma C., Qu F., Xia L. (2020) Hg^{2+}-mediated stabilization of G-triplex based molecular beacon for label-free fluorescence detection of Hg^{2+}, reduced glutathione, and glutathione reductase activity. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **228**, 117855.
68. Guo L., Nie D., Qiu C., Zheng Q., Wu H., Ye P., Hao Y., Fu F., Chen G. (2012) A G-quadruplex based label-free fluorescent biosensor for lead ion. *Biosens. Bioelectron.* **35**, 123–127.
69. Guiset Miserachs H., Donghi D., Borner R., Johannsen S., Sigel R.K. (2016) Distinct differences in metal ion specificity of RNA and DNA G-quadruplexes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **21**, 975–986.
70. Fay M.M., Lyons S.M., Ivanov P. (2017) RNA G-quadruplexes in biology: principles and molecular mechanisms. *J. Mol. Biol.* **429**, 2127–2147.
71. Bannister A.J., Kouzarides T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381–395.
72. Maleki S., Keeney S. (2004) Modifying histones and initiating meiotic recombination; new answers to an old question. *Cell.* **118**, 404–406.
73. Weitzmann M.N., Woodford K.J., Usdin K. (1996) The development and use of a DNA polymerase arrest assay for the evaluation of parameters affecting intrastrand tetraplex formation. *J. Biol. Chem.* **271**, 20958–20964.
74. Rizzo A., Salvati E., Porru M., D'Angelo C., Stevens M.F., D'Incalci M., Leonetti C., Gilson E., Zupi G., Biroccio A. (2009) Stabilization of quadruplex DNA perturbs telomere replication leading to the activation of an ATR-dependent ATM signaling pathway. *Nucl. Acids Res.* **37**, 5353–5364.

75. Gauthier L.R., Granotier C., Hoffschir F., Etienne O., Ayouaz A., Desmaze C., Mailliet P., Biard D.S., Boussin F.D. (2012) Rad51 and DNA-PKcs are involved in the generation of specific telomere aberrations induced by the quadruplex ligand 360A that impair mitotic cell progression and lead to cell death. *Cell Mol. Life Sci.* **69**, 629–640.

76. Drosopoulos W.C., Kosiyatrakul S.T., Schildkraut C.L. (2015) BLM helicase facilitates telomere replication during leading strand synthesis of telomeres. *J. Cell Biol.* **210**, 191–208.

77. Schwab R.A., Nieminuszczy J., Shin-ya K., Niedzwiedz W. (2013) FANCJ couples replication past natural fork barriers with maintenance of chromatin structure. *J. Cell Biol.* **201**, 33–48.

78. Crabbe L., Verdun R.E., Haggblom C.I., Karlseder J. (2004) Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science.* **306**, 1951–1953.

79. Stroik S., Kurtz K., Lin K., Karachenets S., Myers C.L., Bielinsky A.K., Hendrickson E.A. (2020) EXO1 resection at G-quadruplex structures facilitates resolution and replication. *Nucl. Acids Res.* **48**, 4960–4975.

80. Cayrou C., Coulombe P., Puy A., Rialle S., Kaplan N., Segal E., Mechali M. (2012) New insights into replication origin characteristics in metazoans. *Cell Cycle.* **11**, 658–667.

81. Prorok P., Artufel M., Aze A., Coulombe P., Peiffer I., Lacroix L., Guedin A., Mergny J.L., Damaschke J., Schepers A., Cayrou C., Teulade-Fichou M.P., Ballester B., Mechali M. (2019) Involvement of G-quadruplex regions in mammalian replication origin activity. *Nat. Commun.* **10**, 3274.

82. Valton A.L., Hassan-Zadeh V., Lema I., Boggetto N., Alberti P., Saintome C., Riou J.F., Prioleau M.N. (2014) G4 motifs affect origin positioning and efficiency in two vertebrate replicators. *EMBO J.* **33**, 732–746.

83. Hoshina S., Yura K., Teranishi H., Kiyasu N., Tominaga A., Kadoma H., Nakatsuka A., Kunichika T., Obuse C., Waga S. (2013) Human origin recognition complex binds preferentially to G-quadruplex-preferable RNA and single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* **288**, 30161–30171.

84. Bharti S.K., Sommers J.A., Zhou J., Kaplan D.L., Spelbrink J.N., Mergny J.L., Brosh R.M., Jr. (2014) DNA sequences proximal to human mitochondrial DNA deletion breakpoints prevalent in human disease form G-quadruplexes, a class of DNA structures inefficiently unwound by the mitochondrial replicative Twinkle helicase. *J. Biol. Chem.* **289**, 29975–29993.

85. Falabella M., Kolesar J.E., Wallace C., de Jesus D., Sun L., Taguchi Y.V., Wang C., Wang T., Xiang I.M., Alder J.K., Maheshan R., Horne W., Turek-Herman J., Pagano P.J., St Croix C.M., Sondheimer N., Yatsunyk L.A., Johnson F.B., Kaufman B.A. (2019) G-quadruplex dynamics contribute to regulation of mitochondrial gene expression. *Sci. Rep.* **9**, 5605.

86. Madireddy A., Purushothaman P., Loosbroock C.P., Robertson E.S., Schildkraut C.L., Verma S.C. (2016) G-quadruplex-interacting compounds alter latent DNA replication and episomal persistence of KSHV. *Nucl. Acids Res.* **44**, 3675–3694.

87. O'Sullivan R.J., Karlseder J. (2010) Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 171–181.

88. Ambrus A., Chen D., Dai J., Bialis T., Jones R.A., Yang D. (2006) Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucl. Acids Res.* **34**, 2723–2735.

89. Liu H.Y., Zhao Q., Zhang T.P., Wu Y., Xiong Y.X., Wang S.K., Ge Y.L., He J.H., Lv P., Ou T.M., Tan J.H., Li D., Gu L.Q., Ren J., Zhao Y., Huang Z.S. (2016) Conformation selective antibody enables genome profiling and leads to discovery of parallel G-quadruplex in human telomeres. *Cell Chem. Biol.* **23**, 1261–1270.

90. Russo Krauss I., Ramaswamy S., Neidle S., Haider S., Parkinson G.N. (2016) Structural insights into the quadruplex-duplex 3' interface formed from a telomeric repeat: a potential molecular target. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 1226–1233.

91. Bielskute S., Plavec J., Podbevsek P. (2019) Impact of oxidative lesions on the human telomeric G-quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 2594–2603.

92. Somkuti J., Adanyi M., Smeller L. (2019) Self-crowding influences the temperature - pressure stability of the human telomere G-quadruplex. *Biophys. Chem.* **254**, 106248.

93. McRae E.K.S., Davidson D.E., Dupas S.J., McKenna S.A. (2018) Insights into the RNA quadruplex binding specificity of DDX21. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1862**, 1973–1979.

94. Smaldino P.J., Routh E.D., Kim J.H., Giri B., Creacy S.D., Hantgan R.R., Akman S.A., Vaughn J.P. (2015) Mutational dissection of telomeric DNA binding requirements of G4 resolvase 1 shows that G4-structure and certain 3'-tail sequences are sufficient for tight and complete binding. *PLoS One.* **10**, e0132668.

95. Feng J., Funk W.D., Wang S.S., Weinrich S.L., Avilion A.A., Chiu C.P., Adams R.R., Chang E., Allsopp R.C., Yu J., Le S., West M.D., Harley C.B., Andrews W.H., Greider C.W., Villeponteau B. (1995) The RNA component of human telomerase. *Science.* **269**, 1236–1241.

96. Hirschi A., Martin W.J., Luka Z., Loukachevitch L.V., Reiter N.J. (2016) G-quadruplex RNA binding and recognition by the lysine-specific histone demethylase-1 enzyme. *RNA.* **22**, 1250–1260.

97. Tippana R., Hwang H., Opresko P.L., Bohr V.A., Myong S. (2016) Single-molecule imaging reveals a common mechanism shared by G-quadruplex-resolving helicases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**, 8448–8453.

98. Majumder M., House R., Palanisamy N., Qie S., Day T.A., Neskey D., Diehl J.A., Palanisamy V. (2016) RNA-binding protein FXR1 regulates p21 and TERC RNA to bypass p53-mediated cellular senescence in OSCC. *PLoS Genet.* **12**, e1006306.

99. Deng Z., Norseen J., Wiedmer A., Riethman H., Lieberman P.M. (2009) TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Mol. Cell.* **35**, 403–413.

100. Redon S., Reichenbach P., Lingner J. (2010) The noncoding RNA TERRA is a natural ligand and direct in-

hibitor of human telomerase. *Nucl. Acids Res.* **38**, 5797–5806.

101. Ravanat J.L., Douki T., Cadet J. (2001) Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol. B.* **63**, 88–102.
102. Starikov E., Lewis J., Tanaka S. (2006) Enzymatic recognition of radiation-produced oxidative DNA lesion. In: *Modern Methods for Theoretical Physical Chemistry of Biopolymers*, 1 Ed. Elsevier Science, pp. 604.
103. Dou H., Mitra S., Hazra T.K. (2003) Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2. *J. Biol. Chem.* **278**, 49679–49684.
104. Lee H.T., Bose A., Lee C.Y., Opresko P.L., Myong S. (2017) Molecular mechanisms by which oxidative DNA damage promotes telomerase activity. *Nucl. Acids Res.* **45**, 11752–11765.
105. An N., Fleming A.M., Burrows C.J. (2016) Human telomere G-quadruplexes with five repeats accommodate 8-oxo-7,8-dihydroguanine by looping out the DNA damage. *ACS Chem. Biol.* **11**, 500–507.
106. Fouquerel E., Lormand J., Bose A., Lee H.T., Kim G.S., Li J., Sobol R.W., Freudenthal B.D., Myong S., Opresko P.L. (2016) Oxidative guanine base damage regulates human telomerase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 1092–1100.
107. Theruvathu J.A., Darwanto A., Hsu C.W., Sowers L.C. (2014) The effect of Pot1 binding on the repair of thymine analogs in a telomeric DNA sequence. *Nucl. Acids Res.* **42**, 9063–9073.
108. Opresko P.L., Mason P.A., Podell E.R., Lei M., Hickson I.D., Cech T.R., Bohr V.A. (2005) POT1 stimulates RecQ helicases WRN and BLM to unwind telomeric DNA substrates. *J. Biol. Chem.* **280**, 32069–32080.
109. Sadava D., Hills D., Heller, C., Berenbaum M. (2009) *Life: The science of biology*, 9 Ed. Sunderland, MA: Sinauer Associated Inc., pp. 389.
110. Khan K., Madhavan T.P., Kshirsagar R., Boosi K.N., Sadhale P., Muniyappa K. (2013) N-terminal disordered domain of *Saccharomyces cerevisiae* Hop1 protein is dispensable for DNA binding, bridging, and synapsis of double-stranded DNA molecules but is necessary for spore formation. *Biochemistry.* **52**, 5265–5279.
111. Kshirsagar R., Khan K., Joshi M.V., Hosur R.V., Muniyappa K. (2017) Probing the potential role of non-B DNA structures at yeast meiosis-specific DNA double-strand breaks. *Biophys. J.* **112**, 2056–2074.
112. Mani P., Yadav V.K., Das S.K., Chowdhury S. (2009) Genome-wide analyses of recombination prone regions predict role of DNA structural motif in recombination. *PLoS One.* **4**, e4399.
113. van Wietmarschen N., Merzouk S., Halsema N., Spierings D.C.J., Guryev V., Lansdorp P.M. (2018) BLM helicase suppresses recombination at G-quadruplex motifs in transcribed genes. *Nat. Commun.* **9**, 271.
114. Wu W.Q., Hou X.M., Li M., Dou S.X., Xi X.G. (2015) BLM unfolds G-quadruplexes in different structural environments through different mechanisms. *Nucl. Acids Res.* **43**, 4614–4626.
115. Hou Y., Li F., Zhang R., Li S., Liu H., Qin Z.S., Sun X. (2019) Integrative characterization of G-quadruplexes in the three-dimensional chromatin structure. *Epigenetics.* **14**, 894–911.
116. Mao S.Q., Ghanbarian A.T., Spiegel J., Martinez Cuesta S., Beraldi D., Di Antonio M., Marsico G., Hansel-Hertsch R., Tannahill D., Balasubramanian S. (2018) DNA G-quadruplex structures mold the DNA methylome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 951–957.
117. Rudolph T., Beuch S., Reuter G. (2013) Lysine-specific histone demethylase LSD1 and the dynamic control of chromatin. *Biol. Chem.* **394**, 1019–1028.
118. Porro A., Feuerhahn S., Lingner J. (2014) TERRA-reinforced association of LSD1 with MRE11 promotes processing of uncapped telomeres. *Cell Rep.* **6**, 765–776.
119. Williams J.D., Houserova D., Johnson B.R., Dyniewski B., Berroyer A., French H., Barchie A.A., Bilbrey D.D., Demeis J.D., Ghee K.R., Hughes A.G., Kreitz N.W., McInnis C.H., Pudner S.C., Reeves M.N., Stahly A.N., Turcu A., Watters B.C., Daly G.T., Langley R.J., Gillespie M.N., Prakash A., Larson E.D., Kasukurthi M.V., Huang J., Jinks-Robertson S., Borchert G.M. (2020) Characterization of long G4-rich enhancer-associated genomic regions engaging in a novel loop:loop 'G4 Kissing' interaction. *Nucl. Acids Res.* **48**, 5907–5925.
120. Hegyi H. (2015) Enhancer-promoter interaction facilitated by transiently forming G-quadruplexes. *Sci. Rep.* **5**, 9165.
121. Eddy J., Vallur A.C., Varma S., Liu H., Reinhold W.C., Pommier Y., Maizels N. (2011) G4 motifs correlate with promoter-proximal transcriptional pausing in human genes. *Nucl. Acids Res.* **39**, 4975–4983.
122. Siddiqui-Jain A., Grand C.L., Bearss D.J., Hurley L.H. (2002) Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 11593–11598.
123. Brooks T.A., Hurley L.H. (2009) The role of supercoiling in transcriptional control of MYC and its importance in molecular therapeutics. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 849–861.
124. Hatzakis E., Okamoto K., Yang D. (2010) Thermodynamic stability and folding kinetics of the major G-quadruplex and its loop isomers formed in the nuclease hypersensitive element in the human c-Myc Promoter: effect of loops and flanking segments on the stability of parallel-stranded intramolecular G-quadruplexes. *Biochemistry.* **49**, 9152–9160.
125. Rezzoug F., Thomas S.D., Rouchka E.C., Miller D.M. (2016) Discovery of a family of genomic sequences which interact specifically with the c-MYC promoter to regulate c-MYC expression. *PLoS One.* **11**, e0161588.
126. Dexheimer T.S., Carey S.S., Zuohe S., Gokhale V.M., Hu X., Murata L.B., Maes E.M., Weichsel A., Sun D., Meuillet E.J., Montfort W.R., Hurley L.H. (2009) NM23-H2 may play an indirect role in transcriptional activation of *c-myc* gene expression but does not cleave the nuclease hypersensitive element III(1). *Mol. Canc. Therapeut.* **8**, 1363–1377.

127. Hardwick J.M., Soane L. (2013) Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* **5**, a008722.

128. Dexheimer T.S., Sun D., Hurley L.H. (2006) Deconvoluting the structural and drug-recognition complexity of the G-quadruplex-forming region upstream of the bcl-2 P1 promoter. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 5404–5415.

129. Feng Y., Yang D., Chen H., Cheng W., Wang L., Sun H., Tang Y. (2016) Stabilization of G-quadruplex DNA and inhibition of Bcl-2 expression by a pyridostatin analog. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 1660–1663.

130. Gunaratnam M., Swank S., Haider S.M., Galesa K., Reszka A.P., Beltran M., Cuenca F., Fletcher J.A., Neidle S. (2009) Targeting human gastrointestinal stromal tumor cells with a quadruplex-binding small molecule. *J. Med. Chem.* **52**, 3774–3783.

131. Rankin S., Reszka A.P., Huppert J., Zloh M., Parkinson G.N., Todd A.K., Ladame S., Balasubramanian S., Neidle S. (2005) Putative DNA quadruplex formation within the human *c-kit* oncogene. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 10584–10589.

132. Sun D., Liu W.J., Guo K., Rusche J.J., Ebbinghaus S., Gokhale V., Hurley L.H. (2008) The proximal promoter region of the human vascular endothelial growth factor gene has a G-quadruplex structure that can be targeted by G-quadruplex-interactive agents. *Mol. Canc. Therapeut.* **7**, 880–889.

133. Zhang X., Zhao B., Yan T., Hao A., Gao Y., Li D., Sui G. (2018) G-quadruplex structures at the promoter of *HOXC10* regulate its expression. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Regul. Mech.* **1861**, 1018–1028.

134. De Armond R., Wood S., Sun D., Hurley L.H., Ebbinghaus S.W. (2005) Evidence for the presence of a guanine quadruplex forming region within a polypurine tract of the hypoxia inducible factor 1alpha promoter. *Biochemistry.* **44**, 16341–16350.

135. Renciuk D., Rynes J., Kejnovska I., Foldynova-Trantirkova S., Andang M., Trantirek L., Vorlickova M. (2017) G-quadruplex formation in the Oct4 promoter positively regulates Oct4 expression. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Regul. Mech.* **1860**, 175–183.

136. Gu H.P., Lin S., Xu M., Yu H.Y., Du X.J., Zhang Y.Y., Yuan G., Gao W. (2012) Up-regulating relaxin expression by G-quadruplex interactive ligand to achieve antifibrotic action. *Endocrinology.* **153**, 3692–3700.

137. Connor A.C., Frederick K.A., Morgan E.J., McGown L.B. (2006) Insulin capture by an insulin-linked polymorphic region G-quadruplex DNA oligonucleotide. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4986–4991.

138. Kennedy G.C., Rutter W.J. (1992) Pur-1, a zinc-finger protein that binds to purine-rich sequences, transactivates an insulin promoter in heterologous cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 11498–11502.

139. Farhath M.M., Thompson M., Ray S., Sewell A., Balci H., Basu S. (2015) G-quadruplex-enabling sequence within the human tyrosine hydroxylase promoter differentially regulates transcription. *Biochemistry.* **54**, 5533–5545.

140. Skourti-Stathaki K., Proudfoot N.J., Gromak N. (2011) Human senataxin resolves RNA/DNA hybrids formed at transcriptional pause sites to promote Xrn2-dependent termination. *Mol. Cell.* **42**, 794–805.

141. Babic Leko M., Zupunski V., Kirincich J., Smilovic D., Hortobagyi T., Hof P.R., Simic G. (2019) Molecular mechanisms of neurodegeneration related to C9orf72 hexanucleotide repeat expansion. *Behav. Neurol.* **2019**, 2909168.

142. Zhou B., Geng Y., Liu C., Miao H., Ren Y., Xu N., Shi X., You Y., Lee T., Zhu G. (2018) Characterizations of distinct parallel and antiparallel G-quadruplexes formed by two-repeat ALS and FTD related GGGGCC sequence. *Sci. Rep.* **8**, 2366.

143. Fisette J.F., Montagna D.R., Mihailescu M.R., Wolfe M.S. (2012) A G-rich element forms a G-quadruplex and regulates BACE1 mRNA alternative splicing. *J. Neurochem.* **121**, 763–773.

144. Fry M., Loeb L.A. (1994) The fragile X syndrome d(CGG)n nucleotide repeats form a stable tetrahelical structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 4950–4954.

145. Di Antonio M., Ponjavic A., Radzevicius A., Ranasinghe R.T., Catalano M., Zhang X., Shen J., Needham L.M., Lee S.F., Klenerman D., Balasubramanian S. (2020) Single-molecule visualization of DNA G-quadruplex formation in live cells. *Nat. Chem.* **12**, 832–837.

146. Mendoza O., Bourdoncle A., Boule J.B., Brosh R.M., Jr., Mergny J.L. (2016) G-quadruplexes and helicases. *Nucl. Acids Res.* **44**, 1989–2006.

147. Fuss J.O., Tainer J.A. (2011) XPB and XPD helicases in TFIIH orchestrate DNA duplex opening and damage verification to coordinate repair with transcription and cell cycle via CAK kinase. *DNA Repair* (Amst.). **10**, 697–713.

148. Gray L.T., Vallur A.C., Eddy J., Maizels N. (2014) G quadruplexes are genomewide targets of transcriptional helicases XPB and XPD. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 313–318.

149. Kudlicki A.S. (2016) G-quadruplexes involving both strands of genomic DNA are highly abundant and colocalize with functional sites in the human genome. *PLoS One.* **11**, e0146174.

150. Brosh R.M., Jr., Cantor S.B. (2014) Molecular and cellular functions of the FANCJ DNA helicase defective in cancer and in Fanconi anemia. *Front. Genet.* **5**, 372.

151. Wu Y., Shin-ya K., Brosh R.M., Jr. (2008) FANCJ helicase defective in Fanconi anemia and breast cancer unwinds G-quadruplex DNA to defend genomic stability. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 4116–4128.

152. Castillo Bosch P., Segura-Bayona S., Koole W., van Heteren J.T., Dewar J.M., Tijsterman M., Knipscheer P. (2014) FANCJ promotes DNA synthesis through G-quadruplex structures. *EMBO J.* **33**, 2521–2533.

153. Wu C.G., Spies M. (2016) G-quadruplex recognition and remodeling by the FANCJ helicase. *Nucl. Acids Res.* **44**, 8742–8753.

154. Lowran K., Campbell L., Popp P., Wu C.G. (2019) Assembly of a G-quadruplex repair complex by the FANCJ DNA helicase and the REV1 polymerase. *Genes* (Basel). **11**, 5.

155. Odermatt D.C., Lee W.T.C., Wild S., Jozwiakowski S.K., Rothenberg E., Gari K. (2020) Cancer-associated mutations in the iron-sulfur domain of FANCJ affect G-quadruplex metabolism. *PLoS Genet.* **16**, e1008740.

156. Murat P., Marsico G., Herdy B., Ghanbarian A.T., Portella G., Balasubramanian S. (2018) RNA G-quadruplexes at upstream open reading frames cause DHX36- and DHX9-dependent translation of human mRNAs. *Genome Biol.* **19**, 229.

157. Chen M.C., Tippana R., Demeshkina N.A., Murat P., Balasubramanian S., Myong S., Ferre-D'Amare A.R. (2018) Structural basis of G-quadruplex unfolding by the DEAH/RHA helicase DHX36. *Nature.* **558**, 465–469.

158. Yangyuoru P.M., Bradburn D.A., Liu Z., Xiao T.S., Russell R. (2018) The G-quadruplex (G4) resolvase DHX36 efficiently and specifically disrupts DNA G4s via a translocation-based helicase mechanism. *J. Biol. Chem.* **293**, 1924–1932.

159. Tippana R., Chen M.C., Demeshkina N.A., Ferre-D'Amare A.R., Myong S. (2019) RNA G-quadruplex is resolved by repetitive and ATP-dependent mechanism of DHX36. *Nat. Commun.* **10**, 1855.

160. Causevic M., Hislop R.G., Kernohan N.M., Carey F.A., Kay R.A., Steele R.J., Fuller-Pace F.V. (2001) Overexpression and poly-ubiquitylation of the DEAD-box RNA helicase p68 in colorectal tumours. *Oncogene.* **20**, 7734–7743.

161. Hashemi V., Masjedi A., Hazhir-Karzar B., Tanomand A., Shotorbani S.S., Hojjat-Farsangi M., Ghalamfarsa G., Azizi G., Anvari E., Baradaran B., Jadidi-Niaragh F. (2019) The role of DEAD-box RNA helicase p68 (DDX5) in the development and treatment of breast cancer. *J. Cell. Physiol.* **234**, 5478–5487.

162. Xing Z., Russon M.P., Utturkar S.M., Tran E.J. (2020) The RNA helicase DDX5 supports mitochondrial function in small cell lung cancer. *J. Biol. Chem.* **295**, 8988–8998.

163. Wu G., Xing Z., Tran E.J., Yang D. (2019) DDX5 helicase resolves G-quadruplex and is involved in *MYC* gene transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **116**, 20453–20461.

164. Morales J., Li L., Fattah F.J., Dong Y., Bey E.A., Patel M., Gao J., Boothman D.A. (2014) Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **24**, 15–28.

165. Soldatenkov V.A., Vetcher A.A., Duka T., Ladame S. (2008) First evidence of a functional interaction between DNA quadruplexes and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *ACS Chem. Biol.* **3**, 214–219.

166. Fekete A., Kenesi E., Hunyadi-Gulyas E., Durgo H., Berko B., Dunai Z.A., Bauer P.I. (2012) The guanine-quadruplex structure in the human c-myc gene's promoter is converted into B-DNA form by the human poly(ADP-ribose)polymerase-1. *PLoS One.* **7**, e42690.

167. Salvati E., Leonetti C., Rizzo A., Scarsella M., Mottolese M., Galati R., Sperduti I., Stevens M.F., D'Incalci M., Blasco M., Chiorino G., Bauwens S., Horard B., Gilson E., Stoppacciaro A., Zupi G., Biroccio A. (2007) Telomere damage induced by the G-quadruplex ligand RHPS4 has an antitumor effect. *J. Clin. Investig.* **117**, 3236–3247.

168. Salvati E., Botta L., Amato J., Di Leva F.S., Zizza P., Gioiello A., Pagano B., Graziani G., Tarsounas M., Randazzo A., Novellino E., Biroccio A., Cosconati S. (2017) Lead discovery of dual G-quadruplex stabilizers and poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) inhibitors: a new avenue in anticancer treatment. *J. Med. Chem.* **60**, 3626–3635.

169. Sengar A., Vandana J.J., Chambers V.S., Di Antonio M., Winnerdy F.R., Balasubramanian S., Phan A.T. (2019) Structure of a (3+1) hybrid G-quadruplex in the PARP1 promoter. *Nucl. Acids Res.* **47**, 1564–1572.

170. Day T.A., Layer J.V., Cleary J.P., Guha S., Stevenson K.E., Tivey T., Kim S., Schinzel A.C., Izzo F., Doench J., Root D.E., Hahn W.C., Price B.D., Weinstock D.M. (2017) PARP3 is a promoter of chromosomal rearrangements and limits G4 DNA. *Nat. Commun.* **8**, 15110.

171. Angelov D., Bondarenko V.A., Almagro S., Menoni H., Mongelard F., Hans F., Mietton F., Studitsky V.M., Hamiche A., Dimitrov S., Bouvet P. (2006) Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J.* **25**, 1669–1679.

172. Hanakahi L.A., Dempsey L.A., Li M.J., Maizels N. (1997) Nucleolin is one component of the B cell-specific transcription factor and switch region binding protein, LR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 3605–3610.

173. Serin G., Joseph G., Faucher C., Ghisolfi L., Bouche G., Amalric F., Bouvet P. (1996) Localization of nucleolin binding sites on human and mouse pre-ribosomal RNA. *Biochimie.* **78**, 530–538.

174. Gonzalez V., Guo K., Hurley L., Sun D. (2009) Identification and characterization of nucleolin as a c-myc G-quadruplex-binding protein. *J. Biol. Chem.* **284**, 23622–23635.

175. Miranti C.K., Moore S., Kim Y., Chappeta V.R., Wu K., De B., Gokhale V., Hurley L.H., Reyes-Reyes E.M. (2020) Nucleolin represses transcription of the androgen receptor gene through a G-quadruplex. *Oncotarget.* **11**, 1758–1776.

176. Haeusler A.R., Donnelly C.J., Periz G., Simko E.A., Shaw P.G., Kim M.S., Maragakis N.J., Troncoso J.C., Pandey A., Sattler R., Rothstein J.D., Wang J. (2014) C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature.* **507**, 195–200.

177. Lago S., Tosoni E., Nadai M., Palumbo M., Richter S.N. (2017) The cellular protein nucleolin preferentially binds long-looped G-quadruplex nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1861**, 1371–1381.

178. Berger C.M., Gaume X., Bouvet P. (2015) The roles of nucleolin subcellular localization in cancer. *Biochimie.* **113**, 78–85.

179. Lista M.J., Martins R.P., Billant O., Contesse M.A., Findakly S., Pochard P., Daskalogianni C., Beauvineau C., Guetta C., Jamin C., Teulade-Fichou M.P., Fahraeus R., Voisset C., Blondel M. (2017) Nucleolin directly mediates Epstein–Barr virus immune evasion through binding to G-quadruplexes of EBNA1 mRNA. *Nat. Commun.* **8**, 16043.

180. Wang S.R., Min Y.Q., Wang J.Q., Liu C.X., Fu B.S., Wu F., Wu L.Y., Qiao Z.X., Song Y.Y., Xu G.H., Wu Z.G., Huang G., Peng N.F., Huang R., Mao W.X., Peng S., Chen Y.Q., Zhu Y., Tian T., Zhang X.L., Zhou X. (2016) A highly conserved G-rich consensus sequence in hepatitis C virus core gene represents a new anti-hepatitis C target. *Sci. Adv.* **2**, e1501535.

181. Boulant S., Vanbelle C., Ebel C., Penin F., Lavergne J.P. (2005) Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membrane protein features. *J. Virol.* **79**, 11353–11365.
182. Bian W.X., Xie Y., Wang X.N., Xu G.H., Fu B.S., Li S., Long G., Zhou X., Zhang X.L. (2019) Binding of cellular nucleolin with the viral core RNA G-quadruplex structure suppresses HCV replication. *Nucl. Acids Res.* **47**, 56–68.
183. Tosoni E., Frasson I., Scalabrin M., Perrone R., Butovskaya E., Nadai M., Palu G., Fabris D., Richter S.N. (2015) Nucleolin stabilizes G-quadruplex structures folded by the LTR promoter and silences HIV-1 viral transcription. *Nucl. Acids Res.* **43**, 8884–8897.
184. Ho J.S., Ma W., Mao D.Y., Benchimol S. (2005) p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7423–7431.
185. Petr M., Helma R., Polaskova A., Krejci A., Dvorakova Z., Kejnovska I., Navratilova L., Adamik M., Vorlickova M., Brazdova M. (2016) Wild-type p53 binds to MYC promoter G-quadruplex. *Biosci. Rep.* **36**, e00397.
186. Adamik M., Kejnovska I., Bazantova P., Petr M., Renciuk D., Vorlickova M., Brazdova M. (2016) p53 binds human telomeric G-quadruplex *in vitro*. *Biochimie.* **128-129**, 83–91.
187. Chittock E.C., Latwiel S., Miller T.C.R., Müller C.W. (2017) Molecular architecture of polycomb repressive complexes. *Biochem. Soc. Trans.* **45**, 193–205.
188. Hanna R., Flamier A., Barabino A., Bernier G. (2021) G-quadruplexes originating from evolutionary conserved L1 elements interfere with neuronal gene expression in Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* **12**, 1828.
189. Deckard C.E., Sczepanski J.T. (2018) Polycomb repressive complex 2 binds RNA irrespective of stereochemistry. *Chem. Commun.* **54**, 12061–12064.
190. Kaneko S., Son J., Shen S.S., Reinberg D., Bonasio R. (2013) PRC2 binds active promoters and contacts nascent RNAs in embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 1258–1264.
191. Wang X., Paucek R.D., Gooding A.R., Brown Z.Z., Ge E.J., Muir T.W., Cech T.R. (2017) Molecular analysis of PRC2 recruitment to DNA in chromatin and its inhibition by RNA. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 1028–1038.
192. Kaneko S., Son J., Bonasio R., Shen S.S., Reinberg D. (2014) Nascent RNA interaction keeps PRC2 activity poised and in check. *Genes Dev.* **28**, 1983–1988.
193. Harkness R.W.T., Mittermaier A.K. (2017) G-quadruplex dynamics. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics.* **1865**, 1544–1554.
194. Rhodes D., Lipps H.J. (2015) G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucl. Acids Res.* **43**, 8627–8637.
195. Sun Z.Y., Wang X.N., Cheng S.Q., Su X.X., Ou T.M. (2019) Developing novel G-quadruplex ligands: from interaction with nucleic acids to interfering with nucleic acid-protein interaction. *Molecules.* **24**, 396.
196. Jain N., Mishra S.K., Shankar U., Jaiswal A., Sharma T.K., Kodgire P., Kumar A. (2020) G-quadruplex stabilization in the ions and maltose transporters gene inhibit *Salmonella enterica* growth and virulence. *Genomics.* **112**, 4863–4874.
197. Calvo E.P., Wasserman M. (2016) G-quadruplex ligands: potent inhibitors of telomerase activity and cell proliferation in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **207**, 33–38.
198. Artusi S., Nadai M., Perrone R., Biasolo M.A., Palu G., Flamand L., Calistri A., Richter S.N. (2015) The herpes simplex virus-1 genome contains multiple clusters of repeated G-quadruplex: implications for the antiviral activity of a G-quadruplex ligand. *Antiviral Res.* **118**, 123–131.

GUANINE QUADRUPLEXES IN CELL NUCLEUS METABOLISM

E. V. Marilovtseva[1, 2, *] and V. M. Studitsky[1, 3]

[1]*Bioengineering Department, Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*
[2]*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*
[3]*Cancer Epigenetics Program, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA 19111 USA*
**e-mail: ekaterina.marilovtseva@hotmail.com*

Cell metabolism depends, to a large extent, on correct regulation of gene expression. One of the mechanisms of such regulation is the formation of nucleic acids secondary structures, among which guanine quadruplexes (G-quadruplexes, or G4) occupy a special place. G-quadruplexes are dynamic structures whose stability is determined by their size, ionic composition and the nature of the nucleic acids forming them, and is regulated by various protein factors. Guanine quadruplexes play an important role in regulation of many processes occurring in DNA and RNA, from maintaining telomere homeostasis to determining the ribosome landing site on mRNA. Therefore, these structures are considered to be a promising target for antitumor therapy, and their detailed study is an important task of modern biology. The review is focused on the structure and thermodynamic properties of G-quadruplexes together with their interaction with some nuclear proteins.

Keywords: guanine quadruplexes, G4, DNA, RNA, secondary structures of nucleic acids, regulation of gene expression

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 5, с. 796–828

ОБЗОРЫ

УДК 577.12

АДРЕСАЦИЯ, ТРАНСПОРТ И ЛОКАЛЬНАЯ ТРАНСЛЯЦИЯ мРНК В КЛЕТКАХ ЭУКАРИОТ: ОТ КЛАССИЧЕСКОГО ВЗГЛЯДА К МНОГООБРАЗИЮ СОВРЕМЕННЫХ КОНЦЕПЦИЙ

© 2021 г. К. А. Лашкевич[a, b], С. Е. Дмитриев[a, b, c, *]

[a]Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

[b]Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

[c]Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: sergey.dmitriev@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 26.02.2021 г.
После доработки 26.02.2021 г.
Принята к публикации 12.03.2021 г.

Пространственная организация процесса биосинтеза белка в эукариотической клетке изучается вот уже более 50 лет, и многие факты успели войти в учебники. Так, согласно классическим представлениям, мРНК секретируемых и мембранных белков транслируются рибосомами, ассоциированными с мембранами эндоплазматического ретикулума, в то время как растворимые белки цитоплазмы синтезируются на свободных полисомах. Однако в последние годы появилось много новых данных об избирательной трансляции мРНК также на митохондриях и пластидах, вблизи пероксисом и эндосом, в различных гранулах и на элементах цитоскелета (актиновой сети, виментиновых промежуточных филаментах, микротрубочках и на центросомах); периодически возобновляются споры о возможности синтеза белка в ядре. Локализованная трансляция может определяться как сигналами адресации в синтезируемом белковом продукте, так и нуклеотидными последовательностями в самой мРНК, а иногда и тем, и другим. Благодаря РНК-связывающим белкам многие транскрипты объединяются в специфичные РНК-конденсаты и формируют РНП-частицы, которые могут транспортироваться по элементам цитоскелета к месту трансляции, образовывать гранулы и провоцировать фазовые переходы участков цитоплазмы – как в нормальных условиях, так и при клеточном стрессе. Трансляция некоторых мРНК происходит в специализированных “трансляционных фабриках”, ассемблисомах, трансперонах и других структурах, необходимых для правильного сворачивания белков, взаимодействия с функциональными партнерами и формирования олигомерных комплексов. Внутриклеточная локализация мРНК оказывает существенное влияние на эффективность синтеза белкового продукта и, возможно, определяет характер трансляционного ответа на стрессовые воздействия. Компартментализация мРНК и трансляционного аппарата играет большую роль также при вирусных инфекциях. Многие вирусы провоцируют формирование специальных внутриклеточных структур – “вирусных фабрик” – для продукции своих белков. В обзоре рассмотрены сложившиеся к настоящему моменту представления об избирательной субклеточной локализации клеточных и вирусных мРНК, о молекулярных механизмах локальной трансляции, ее влиянии на адресацию и топогенез белков и на особенности регуляции биосинтеза белка в разных компартментах эукариотической клетки. Особое внимание уделено современным методам системной биологии, появление которых дало новый импульс изучению локализованной трансляции.

Ключевые слова: локализованная трансляция, эндоплазматический ретикулум, митохондрии, ядерная трансляция, трансляционные фабрики, ассемблисомы, вирусные фабрики, стресс-гранулы, транспорт мРНК

DOI: 10.31857/S002689842104008X

ВВЕДЕНИЕ

Клетка эукариот имеет сложную ультраструктуру, включающую ядро, мембранные органеллы, элементы цитоскелета, белковые и нуклеопротеидные гранулы. Все это обеспечивает компартментализацию и пространственную регуляцию боль-

Сокращения: НТО – нетранслируемая область; ПТ – процессинговое тельце; РНП – рибонуклеопротеид; СГ – стресс-гранула; ТМД – трансмембранный домен; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; MTS (mitochondria targeting sequences) – сигнал адресации в митохондрии; NAC (nascent polypeptide-associated complex) – комплекс, ассоциированный с новосинтезированным пептидом; PTS (peroxisome targeting sequence) – сигнал адресации в пероксисомы; SP (signal peptide) – сигнальный пептид; SRP (signal recognition particle) – сигналраспознающая частица; SR (SRP-receptor) – рецептор сигналраспознающей частицы; UPR (unfolded protein response) – ответ на стресс несвернутых белков.

шинства внутриклеточных процессов. Биогенез и функционирование органелл требуют синтеза новых белков, каждому из которых необходимо занять правильную нишу для эффективной работы. Из-за огромного функционального и структурного многообразия полипептидов и большой энергозатратности их производства в клетке выработались диверсифицированные механизмы адресации белков в места их локализации и функционирования. Десятилетия исследований раскрыли фундаментальные основы этих процессов. В зависимости от того, на какой стадии происходит доставка полипептида в нужную органеллу, выделяют два способа локализации: посттрансляционный и котрансляционный. Первый путь, безусловно, очень важен, а иногда даже незаменим, как в случае ядерных белков – для их импорта из цитоплазмы в ядро. Однако в данном обзоре мы сосредоточимся на втором способе локализации – когда белок оказывается в нужном месте сразу по окончании его синтеза.

Классический пример такого пути – синтез секретируемых и мембранных белков, который в основном осуществляется на мембране эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Долгое время считалось, что это едва ли не единственный пример локализованной трансляции. Однако данные, полученные в последние годы, раскрывают куда более сложную пространственную организацию биосинтеза белка в эукариотической клетке. Обнаружено множество альтернативных механизмов, включающих избирательную трансляцию мРНК на поверхности других внутриклеточных структур: на внешних мембранах митохондрий, пластид и других мембранных органелл, в специализированных гранулах и на элементах цитоскелета. Все эти процессы изучены гораздо хуже, однако уже сейчас ясно, что в их основе лежит узнавание специальных сигналов либо в последовательности самой мРНК, либо в структуре синтезируемого с нее продукта. Нередко эти два механизма сочетаются. В редких случаях, возможно, определенную роль играют также особые свойства специализированных рибосом.

В многочисленных исследованиях выявлена широкая распространенность таких случаев, когда мРНК сначала транспортируются к нужному компартменту в виде неактивных рибонуклеопротеидных комплексов (РНП) и только потом наступает фаза ее активной трансляции, приводящая к синтезу белков в строго определенном участке клетки. Этот способ имеет ряд преимуществ перед доставкой зрелого белка, так как при его реализации снижаются энергетические затраты на транспортировку и конкуренцию с другими сортирующими механизмами, облегчается сборка мультикомпонентных систем и организация локальных регуляторных “хабов”.

Разнообразие и точность механизмов адресации белков и локализации процесса их синтеза обеспечивается эффективным кооперативным действием различных клеточных систем, включая цитоскелет, работу встроенных в мембраны транслокационных комплексов, а также сети специфичных РНК-белковых и белок-белковых взаимодействий. Нарушение нормального трафика белков может приводить к их неверной локализации и инактивации, а в худшем случае – к проявлению токсических эффектов, образованию агрегатов и другим пагубным для клетки и организма последствиям, включая тяжелые патологии.

В обзоре рассмотрены различные стратегии адресации белков в компартменты эукариотической клетки, связанные с локализацией мРНК и котрансляционными механизмами. Помимо широко известных классических моделей, обсуждаются альтернативные или дополнительные, менее изученные пути, которые позволяют значительно расширить наши представления о пространственной организации процесса биосинтеза белка в клетке.

ТРАНСЛЯЦИЯ, АССОЦИИРОВАННАЯ С МЕМБРАНАМИ ЭПР

Идеи разграниченной трансляции у эукариот были выдвинуты еще в 50-х годах прошлого века, когда Дж. Паладе (G. Palade), используя методы электронной микроскопии, обнаружил несколько популяций клеточных рибосом (тогда еще “гранул Паладе”) – они были либо связаны с мембраной ЭПР, либо свободно рассеяны в цитоплазме [1]. Различную функциональную роль этих рибосом подтвердили позднее в работах по изучению механизма синтеза секретируемых и цитоплазматических белков. Возник вопрос: если существует деление рибосом по типу производимого ими белка, то каким образом принимается решение, где будет происходить синтез: на мембране ЭПР или в цитоплазме? В результате последующих исследований обнаружили существование особой популяции ЭПР-ассоциированных мРНК [2–5], большая часть которых кодирует секретируемые или мембранные белки. Однако сейчас известно, что на ЭПР могут синтезироваться и растворимые белки цитозоля [6–11], а способов адресации мРНК на мембраны ЭПР может быть несколько [12–14]. Кроме того, недавно заявлено о существовании целого клеточного компартмента – TIGER-домена, ассоциированного с ЭПР и организующего специфические мРНК-белковые взаимодействия вблизи мембраны [15].

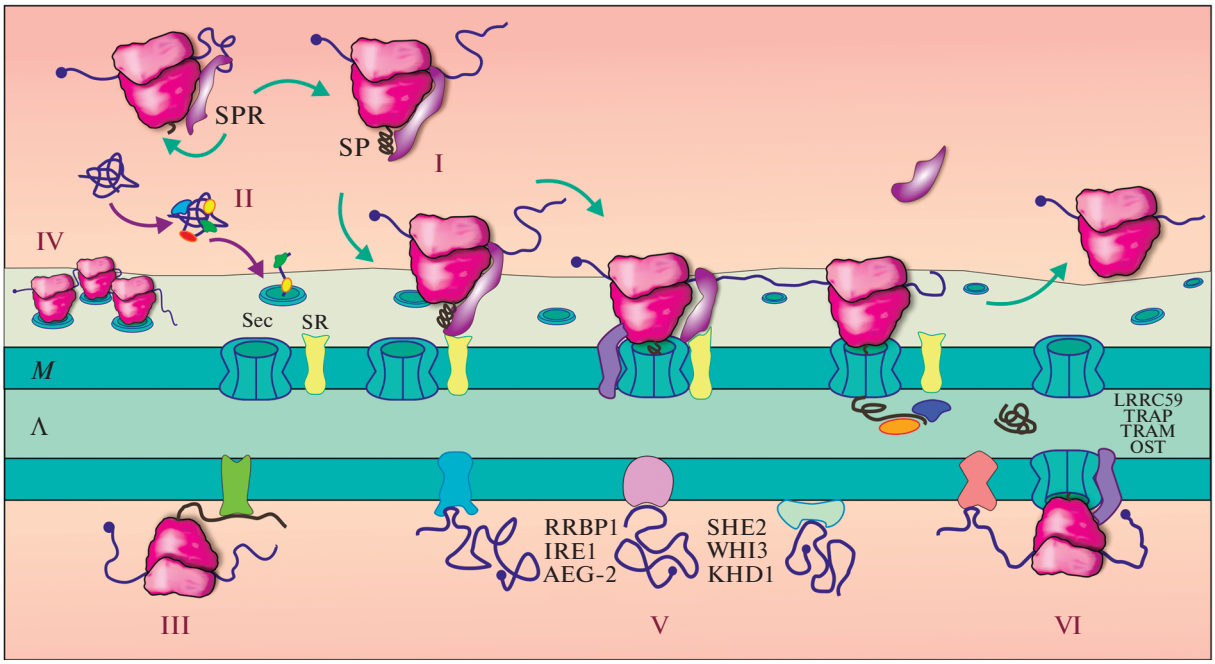

Рис. 1. Разнообразие механизмов адресации белков в ЭПР и локализации мРНК на мембране ЭПР. I – Классический SRP-зависимый путь: SRP-частица, преассоциированная с рибосомой, узнает появляющуюся из рибосомного тоннеля сигнальную последовательность (SP) или трансмембранный домен, останавливает элонгационный цикл, после чего происходит транспортировка комплекса мРНК/рибосома/новосинтезированный пептид/SRP на мембрану (М) ЭПР, где SRP связывается со своим мембранным рецептором, SR. Транслокон (Sec-комплекс) участвует в посадке рибосомы на ЭПР и транслокации пептида через мембрану в люмен (Л), в этом ему помогают ассоциированные с транслоконом белки (TRAP, TRAM, OST и др.). II – Посттрансляционный механизм импорта белков в ЭПР, опосредуемый шаперонами и другими белками. III – Локализация синтезируемого продукта на мембране ЭПР посредством его взаимодействия с резидентным белком ЭПР. IV – Удерживание мРНК на мембране ЭПР в комплексе с полисомой. V – Опосредованная 3'-нетранслируемой областью (3'-НТО) локализация мРНК, не зависящая от трансляции. Показаны некоторые из известных мРНК-связывающих белков, вовлеченных в различные пути локализации мРНК. VI – Ассоциация трансляционного комплекса с ЭПР посредством мембранных рецепторов рибосомы и мРНК-связывающих белков.

Продуктзависимые механизмы ЭПР-локализованной трансляции: классический SRP-зависимый путь и другие способы

Первой попыткой объяснить локализованный синтез секретируемых и мембранных белков стала “сигнальная гипотеза”, предложенная Blobel и соавт. [16, 17]. Согласно ей, специальная аминокислотная последовательность на N-конце растущего белка, сигнальный пептид (SP), несет информацию, благодаря которой и устанавливается связь между транслирующей рибосомой и мембраной ЭПР. Позднее, в начале 80-х годов, удалось идентифицировать растворимый посредник, узнающий SP, – им оказалась РНП-частица, названная SRP (signal recognition particle – сигналраспознающая частица) [18]. Также был найден второй компонент этой системы – рецептор SRP на мембране ЭПР, SR (SRP-receptor – рецептор сигналраспознающей частицы) [19]. В итоге появилась классическая модель SRP-зависимой мембранной локализации рибосом, синтезирующих мембранные и секретируемые белки (рис. 1, I).

Механизм избирательного узнавания SRP-частицей основан на особом аминокислотном “коде”, составляющем SP и включающем положительно заряженные N-концевые аминокислоты, гидрофобную коровую часть (которая играет главную роль в связывании) и следующие за ней полярные остатки [20]. Аналогичным образом узнаются трансмембранные домены (ТМД) мембранных белков [21]. Узнавание и связывание SP или ТМД происходит котрансляционно – по мере выхода синтезируемого пептида из рибосомного канала. Возможно, в этом процессе задействованы и другие белки (см. ниже) [22]. После того как произошло распознавание, один из доменов SRP блокирует элонгационный цикл, а комплекс мРНК/рибосома/новосинтезированный пептид/SRP транспортируется на мембрану ЭПР, где SRP связывается со своим мембранным рецептором, SR. Специальный мультисубъединичный белковый комплекс – транслокон (Sec61-комплекс), образующий канал в мембране ЭПР, участвует в посадке рибосомы на ЭПР и транслокации пептида через мембрану [23, 24]. После прикрепле-

ния рибосомы к транслокону SRP диссоциирует, возобновляется элонгация и происходит дальнейшая транслокация растущего пептида в люмен или встраивание в мембрану ЭПР [25, 26].

Интересной вариацией классического пути служит пример необычной мРНК, которая кодирует транскрипционный фактор XBP1 животных (а также его растительные и дрожжевые аналоги bZIP60 и HAC1 соответственно). Он является важным элементом стрессового ответа клетки на накопление в ЭПР несвернутых белков (UPR; unfolded protein response) [27]. Белок XBP1u, кодируемый несплайсированной формой этой мРНК, котрансляционно рекрутирует рибосомный комплекс на мембрану ЭПР по SRP-зависимому пути [28]. Однако окончанию синтеза и высвобождению XBP1u препятствует его С-концевой участок – он содержит особую последовательность аминокислот, вызывающую остановку рибосомы [29, 30]. Комплексы рибосом с пептидом и мРНК плотно удерживаются на мембране за счет высококонсервативного гидрофобного домена XBP1u, взаимодействующего с транслоконом, однако полноценной транслокации при этом не происходит [28, 31, 32]. Детали этого явления не до конца понятны и вызывают споры. Так, в некоторых работах показано высвобождение белка XBP1u и его активная роль в контроле стрессового ответа (см. дискуссию в статье [33]), в то время как в других – уничтожение XBP1u системой “рибосомного контроля качества” (RQC), распознающей остановившиеся трансляционные комплексы [34]. В случае UPR происходит неканонический сплайсинг мРНК *XBP1* специфичной нуклеазой IRE1, локализованной в мембране ЭПР вблизи транслокона и активирующейся при этом виде стресса. Вырезание 26-нуклеотидного интрона приводит к сдвигу открытой рамки считывания в мРНК и продукции с нее активного белка XBP1s, который проникает в ядро и активирует экспрессию генов, направленных на борьбу с последствиями UPR [27].

Последующие исследования внесли дополнения в классическую модель. Оказалось, что инактивация SRP и/или SR в дрожжах [35], трипаносомах [36] и клетках человека [37] не приводила к фатальным последствиям, при этом часть белков продолжала встраиваться в мембраны или транслоцироваться в люмен ЭПР, хотя и не так эффективно, как в норме. Это подтолкнуло к идее существования альтернативных, SRP-независимых механизмов доставки белков в ЭПР [38–40]. Большую роль в этом играют посттрансляционные механизмы (рис. 1, II): классический GET/TRC40-зависимый импорт и недавно открытый путь SND (SRP-independent targeting) [41], – описание которых выходит за рамки данного обзора. Однако, помимо них, описаны продуктнезависимые котрансляционные механизмы, основанные на локализации самих мРНК (они подробно рассмотрены в следующем разделе). Известны также случаи, когда локализованная трансляция на ЭПР все-таки обусловлена свойствами полипептида, но не зависит от SP и SRP. Например, мРНК цитозольного белка DIAPH1/Dia1 млекопитающих и птиц, не имеющего SP, при трансляции локализована на мембранах перинуклеарного ЭПР, однако это происходит не благодаря связыванию растущего белка с транслоконом, а посредством взаимодействия его N-концевой части с ассоциированным с мембраной белком семейства Rho GTPаз [42] (рис. 1, III).

В заключение следует обратить внимание на одно не совсем очевидное обстоятельство. Длинная мРНК, кодирующая большой мембранный или секретируемый белок, может транслироваться одновременно несколькими рибосомами. В этом случае она непрерывно удерживается вблизи мембраны благодаря тому, что в каждый конкретный момент времени находится как минимум одна рибосома, ассоциированная с транслоконом (рис. 1, IV), даже если остальные компоненты полисомы при этом не связаны с мембраной [8, 10]. Это довольно важное обстоятельство, поскольку оно рождает идею о существовании некого постоянного пула транскриптов, ассоциированных с мембранами. Более того, нельзя исключать, что и сами рибосомы также могут обладать “мембранной” специализацией. Полисомы на мембране ЭПР часто имеют кольцевую форму [43], что подразумевает повторяющиеся циклы трансляции конкретной мРНК одними и теми же рибосомами, переходящими со стоп-кодона на стартовый кодон посредством CLAR (closed-loop assisted reinitiation) [44]. Таким образом, уже на этом этапе появляется гипотеза о существовании специализированного трансляционного аппарата, занимающегося синтезом мембранных и секретируемых белков.

Продуктнезависимая локализация мРНК и рибосом на мембране ЭПР

Описанные выше механизмы локализованной трансляции мРНК связаны со структурой или функцией закодированных в них белковых продуктов. Однако во многих случаях в последовательностях полипептидов не обнаруживают ни SP, ни ТМД, иногда это просто растворимые цитозольные белки, никак не связанные по своей функции с ЭПР. И все же кодирующие их мРНК оказываются среди транскриптов, ассоциированных с ЭПР [3–14]. Связывание таких мРНК с мембраной может происходить независимо от их трансляции (рис. 1, V) и обусловлено наличием в их нуклеотидной последовательности собственных сигналов локализации (*цис*-элементов), чаще всего расположенных в 3'-нетранслируемой обла-

сти (3'-НТО) [14, 45]. В качестве примера можно привести мРНК *PMP1* дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, содержащую в 3'-НТО UG-богатый мотив, который способствует формированию характерной шпилечной структуры и обеспечивает взаимодействие с ЭПР [46]. Посредниками таких взаимодействий могут быть специальные РНК-связывающие белки (см. ниже). Дрожжевые мРНК *USE1* и *SUC2*, кодирующие соответственно заякоренный в мембране ЭПР и секретируемый белки, также продолжают пребывать на ЭПР при инактивации SRP и блокировании трансляции [12]. Недавно в мРНК, кодирующих секреторные и мембранные белки (в том числе в вышеупомянутой мРНК *SUC2*), обнаружен особый мотив SECReTE, способствующий удержанию и повышению стабильности мРНК на мембране ЭПР и усиливающий секрецию закодированных в них белков [47]. Многие мРНК, кодирующие ассоциированные с мембраной белки, содержат AU-богатые повторы (ARE) в 3'-НТО и при посредничестве белка TIS11B формируют на мембране ЭПР особые TIS-гранулы, объединенные в отдельный субклеточный компартмент – TIGER-домен (TIS granule-ER) [15, 48]. По некоторым данным, мРНК может также связываться с ЭПР неспецифически – за счет взаимодействия поли(A)-хвоста с мембранными рецепторами [9, 49].

Рецепторы мРНК на мембране ЭПР – предмет активных поисков. Так, большая роль в этом вопросе отводится многофункциональному мембранному белку RRBP1/p180, который участвует в поддержании целостности сети ЭПР внутри клетки, взаимодействует с микротрубочками, неспецифически связывает мРНК на поверхности ЭПР за счет наличия у него лизинбогатого домена, регулирует стабильность транскриптов, способствует сборке и удержанию полисом на мембране [49–51]. мРНК-связывающими свойствами обладает также онкобелок MTDH/AEG-1 – он взаимодействует с мРНК, кодирующими преимущественно трансмембранные и секретируемые белки [52]. Интересно, что сайты связывания AEG-1 находятся в основном в кодирующих частях мРНК, реже – в 5'-НТО, а в 3'-НТО они практически отсутствуют. Недавно способность связывать с высокой аффинностью ЭПР-ассоциированные мРНК, рибосомы и тРНК выявлена также у IRE1 [53]. В дрожжах ассоциацию мРНК с мембраной ЭПР, вероятно, обеспечивает целый ряд немембранных белков: SHE2, WHI3, KHD1 и другие [54–56]. Современные высокопроизводительные методы выявляют среди резидентов ЭПР десятки потенциальных РНК-связывающих белков [9, 57–59], однако их роль в локализации мРНК требует тщательной проверки. У многих из них отсутствуют канонические РНК-связывающие домены, поэтому механизмы их взаимодействия с РНК малопонятны. Другая сложность заключается в том, что зачастую эти белки оказываются полифункциональными, что затрудняет их изучение.

В работе, выполненной группой К. Ничитты (C. Nicchitta) [9], список потенциальных РНК-связывающих мембранных белков ЭПР расширен до двух десятков представителей. Более того, как показали авторы, связывание с ЭПР мРНК-рибосомных комплексов, синтезирующих мембранные и секретируемые белки, опосредовано разными белками. В другом исследовании [11] эта же группа проанализировала репертуар транскриптов, связанных с рибосомами, ассоциированными либо с SEC61B/Sec61β (субъединица транслокона), либо с LRRC59 (резидентный белок ЭПР). Авторы выявили как общие для них мРНК-мишени (в частности, мРНК растворимых белков цитозоля), так и специфичные: например, транскрипты, кодирующие белки ЭПР, оказались связаны преимущественно с SEC61B, а с мРНК интегральных белков плазматической мембраны – с LRRC59. Это подтверждает вышеприведенную гипотезу о различных механизмах связывания мРНК, кодирующих мембранные и секретируемые белки.

Отдельный крайне интригующий вопрос касается мембранных рецепторов самих рибосом. В вышеупомянутом исследовании [11] изучены четыре потенциальных рецептора рибосом на мембране ЭПР: LRRC59, RPN1/рибофорин I (субъединица олигосахарилтрансферазного комплекса ЭПР, OST) и два компонента транслокона, SEC61B и SEC62. Доказана способность SEC61B, LRRC59 и, в меньшей степени, рибофорина I связывать рибосомы в культивируемых клетках человека. Помимо транслокона и OST, другие белки ЭПР также могут быть кандидатами на эту роль. Например, гетеротетрамерный комплекс TRAP и связанный с транслоцируемой цепью мембранный белок TRAM взаимодействуют с рибосомой на этапах ее связывания с транслоконом и последующей транслокации полипептида в люмен (рис. 1, VI) [9, 11, 60–62]. Кроме того, вышеупомянутый мембранный РНК-связывающий белок RRBP1/p180 был первоначально идентифицирован именно как рецептор рибосомы на мембране ER [50].

Таким образом, в случае ЭПР реализуется оба основных способа обеспечить локализованную трансляцию мРНК: котрансляционное рекрутирование посредством узнавания продукта и независимая от трансляции локализация мРНК. Скорее всего, эти два механизма действуют кооперативно.

ТРАНСЛЯЦИЯ, АССОЦИИРОВАННАЯ С ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНОЙ МИТОХОНДРИЙ

Менее изучены процессы трансляции на мембранах другой важнейшей органеллы – митохон-

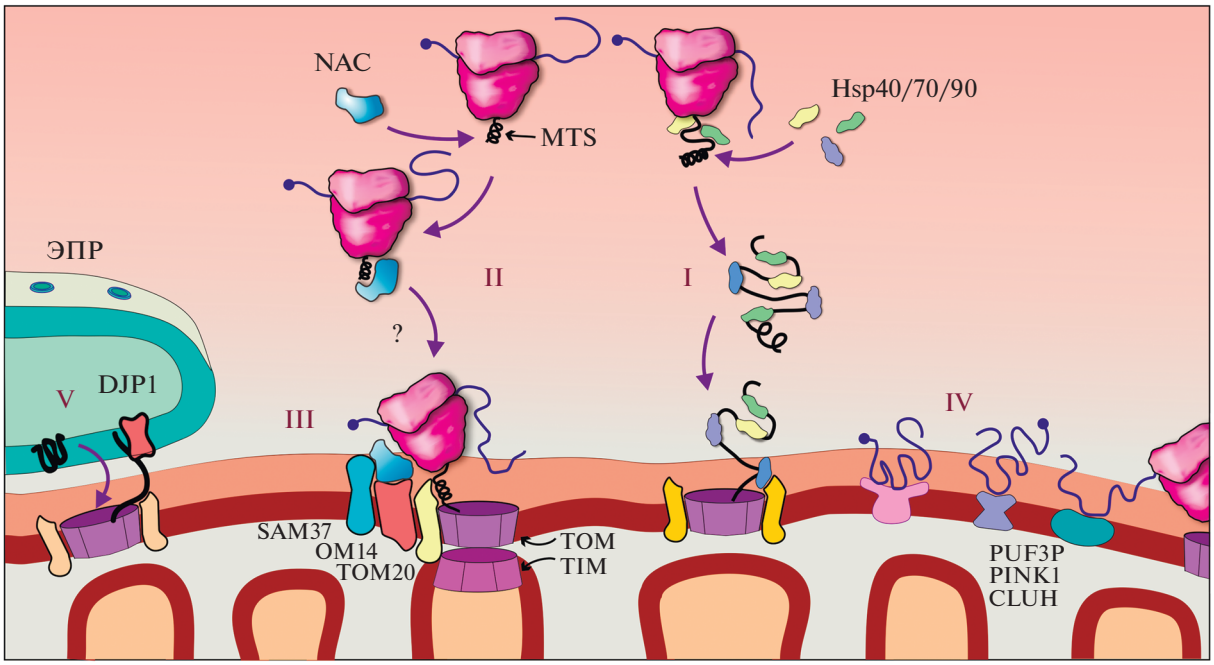

Рис. 2. Разнообразие механизмов адресации белков в митохондрии. I – Посттрансляционная адресация, опосредованная шаперонами. II – Котрансляционная адресация комплекса мРНК/рибосома/MTS-содержащий пептид на поровый комплекс TOM/TIM, опосредованная NAC (nascent polypeptide-associated complex). III – Непосредственное связывание NAC с белками внешней мембраны митохондрий. IV – Связывание транскриптов с внешней мембраной митохондрий с помощью мРНК-связывающих белков. V – Путь ER-SURF: DJP1-опосредованное встраивание белков, синтезированных на мембране ЭПР, в мембрану митохондрии. Подробности в тексте.

дрии. Как известно, митохондрия имеет две мембраны: внешнюю и внутреннюю. Трансляция может происходить в непосредственной близости или на поверхности обеих – в зависимости от того, где закодирован транскрипт: в ядерном или в митохондриальном геноме [63]. Митохондрии самостоятельно синтезируют лишь небольшой набор белков (компонентов дыхательной цепи), для чего используют митохондриальный трансляционный аппарат бактериального типа. Биосинтез и встраивание во внутреннюю мембрану таких белков, по всей видимости, происходит котрансляционно. Остальные митохондриальные белки, которых насчитывается более тысячи, закодированы в ядерном геноме, производятся цитозольными рибосомами и нуждаются в импорте в митохондрии [64]. Основным механизмом импорта митохондриальных белков принято считать посттрансляционную транслокацию (рис. 2, I), основанную на узнавании шаперонами специальных митохондриальных адресных пептидов на N-конце – MTS (mitochondrial targeting sequence) и транслокации через внешнюю и внутреннюю мембраны при участии митохондриальных поровых комплексов TOM/TIM [65]. Как и в случае ЭПР, рассмотрение посттрансляционного транспорта белков в митохондрию выходит за рамки нашего обзора, однако этот материал подробно изложен в нескольких работах [63–65].

Котрансляционный импорт белков в митохондрии

Связывание цитоплазматических рибосом и полисом с внешней мембраной митохондрий было обнаружено еще в 70-е годы прошлого века [66, 67]. Чуть позже было показано, что эти полисомы обогащены транскриптами, кодирующими митохондриальные белки [68], что они способны синтезировать эти белки и встраивать их в органеллу [69]. Существование котрансляционного импорта белков в митохондрии – процесса, в котором трансляция сопряжена с транслокацией синтезируемого продукта через мембрану (рис. 2, II), – было доказано в 90-е годы. В эксперименте с дрожжами ингибирование посттрансляционного импорта не приводило к полной блокировке транслокации белков в митохондрии, в то время как инактивация цитозольных рибосом незамедлительно блокировала импорт [70]. Со временем эта концепция стала подкрепляться новыми экспериментальными данными. В одной из работ [71] в культивируемых клетках человека экспрессировали искусственную конструкцию, кодирующую флуоресцентный белок EGFP с двумя разными адресными последовательностями: на

N-конце был сигнал локализации в митохондриях, на C-конце – в ЭПР. Продукт обнаруживали исключительно в митохондриях, из чего был сделан вывод о том, что локализация белка определяется еще до завершения трансляции. Тем не менее для большинства белков митохондрий два пути импорта, по-видимому, дополняют друг друга, хотя в некоторых случаях (например, для фермента фумаразы [72]) котрансляционный путь доминирует. Современные методы, включая рибосомный профайлинг, позволили выяснить, что транслокация около 30% митохондриальных белков происходит, скорее всего, в сопряжении с трансляцией [73]. Особенно это характерно для белков внутренней мембраны митохондрий [73].

Природу связывания рибосом с митохондриями изучали как биохимическими, так и микроскопическими методами. Выявлена важная роль взаимодействия белков внешней мембраны с компонентами рибосомы [74]. Позднее с помощью криоэлектронной томографии удалось визуализировать это связывание [75] и выявить решающую роль взаимодействия адресного пептида с транслоконом внешней мембраны TOM – по аналогии со взаимодействием SP или ТМД с Sec-комплексом транслокона ЭПР. Важность компонентов TOM для распознавания MTS при котрансляционном импорте показана и в другой работе [76]. Также обнаружено, что рибосомы на мембране митохондрий расположены особым образом – в виде кластеров в специальных областях, где внешняя и внутренняя мембраны сближены и образуют участки контактов транслоконов TOM и TIM [75].

Точный механизм рекрутирования цитозольных рибосом на внешнюю мембрану митохондрий пока не выяснен, хотя известно, что белковый комплекс NAC (nascent polypeptide-associated complex) взаимодействует с новосинтезированным пептидом на рибосоме, выполняя роль связующего звена в этом процессе [77, 78]. Удаление NAC у нематод *Caenorhabditis elegans* вызывает ошибочную релокализацию рибосом, синтезирующих митохондриальные белки, на мембрану ЭПР, что приводит к нарушению протеостаза обеих органелл и к сокращению продолжительности жизни животных [79]. На дрожжах показано и обратное явление: удаление SRP из клеток приводило к ошибочной адресации белков ЭПР в митохондрию [21]. Эти данные позволяют заключить, что NAC препятствует посадке рибосом на транслокон ЭПР. Такой вывод согласуется с ранними наблюдениями о конкуренции между NAC и SRP за связывание с растущей цепью синтезируемого полипептида и/или с самой рибосомой [80, 81]. В более поздних работах внесены дополнительные коррективы в эти представления. Согласно нынешней модели, оба комплекса могут находиться на рибосоме одновременно, при этом присутствие NAC вызывает структурные перестройки в SRP, которые влияют на активность частицы (см. обсуждение в работе [82]).

Хотя NAC обычно отводится всего лишь роль “конкурента” SRP, есть данные и о его активном участии в адресации синтезирующихся белков в митохондрии (рис. 2, III). Например, прямое участие дрожжевого NAC в котрансляционном импорте продемонстрировано в системе *in vitro* [83]. Также на дрожжах показано, что OM14 – белок внешней мембраны митохондрий – функционирует как рецептор NAC, а нокаут его гена приводит к снижению доли рибосом, ассоциированных с внешней мембраной митохондрий, и к нарушению импорта белков в органеллу [84]. В качестве партнера NAC охарактеризован еще один митохондриальный белок – SAM37, компонент дрожжевого мембранного комплекса сортировки и сборки белков (SAM-комплекса), динамически ассоциированный с транслоконом TOM [85].

Совсем недавно картина еще более усложнилась из-за появления нового игрока – белка HEL2/ZNF598, компонента системы RQC [22]. У дрожжей этот белок, вероятно, осуществляет дополнительный контроль узнавания SP частицей SRP и доставки соответствующих мРНК на транслокон.

Таким образом, полного понимания механизмов котрансляционного импорта белков в митохондрии, роли NAC и SRP в этом процессе пока нет – данные довольно ограниченны и по количеству, и по набору модельных организмов, – однако интерес к этой теме неуклонно растет [64, 86, 87].

Локализация мРНК на мембране митохондрий

С использованием различных методов и в разных модельных системах достоверно показано, что множество транскриптов ядерных генов, кодирующих митохондриальные белки, локализовано на внешней мембране митохондрий [4, 5, 73, 88–92]. Это указывает на большую роль локальной трансляции в адресации митохондриальных белков [93]. Как и в случае с ЭПР, за локализацию мРНК на митохондрии могут отвечать как детерминанты в составе самой мРНК, так и сигналы в синтезируемом полипептиде (рис. 2, IV). Примером первого способа может служить мРНК *OXA1*, которая как у человека, так и у дрожжей содержит в 3'-НТО функционально консервативный *цис*-действующий элемент, необходимый для локализации этой мРНК на митохондрии и правильной адресации соответствующего белка [94]. Второй способ, зависимый от трансляции, может быть опосредован взаимодействием MTS с компонентами транслокона TOM или другими сигналами в кодируемом полипептиде [95, 96]. Для мРНК дрож-

жевого белка ATM1, ABC-транспортера внутренней мембраны митохондрий, показан независимый вклад обоих механизмов [97].

Недавно Poulsen и соавт. [98] проанализировали общие свойства дрожжевых мРНК, ассоциированных с митохондриями, и пришли к неожиданному выводу, что такие транскрипты обычно имеют черты, препятствующие эффективной инициации трансляции, и связывают меньше рибосом. В результате авторы предложили модель, согласно которой митохондриальная локализация мРНК определяется медленной инициацией и большей подвижностью транскрипта, в то время как активно транслируемые мРНК менее подвижны и реже достигают поверхности митохондрий. Еще одна недавняя находка [99] увязывает особые трансляционные свойства мРНК, кодирующих митохондриальные и мембранные белки, с участием фактора инициации eIF3 в первых циклах элонгации полипептида. Недостаток eIF3 приводил к дефекту биогенеза митохондрий в мышцах мышей из-за сложности при синтезе митохондриальных белков на стадии включения первых нескольких десятков аминокислот [99].

Репертуар охарактеризованных РНК-связывающих белков внешней мембраны митохондрий пока весьма ограничен, но их роль в локализации и судьбе транскриптов митохондриальных белков, в биогенезе и поддержании функций органеллы прослеживается довольно четко [59, 100]. В пользу этого говорит, например, обнаружение определенных нуклеотидных мотивов в мРНК, кодирующих митохондриальные белки дрожжей [101]. Функцию рецепторов мРНК на внешней мембране митохондрий дрожжей могут, вероятно, выполнять некоторые представители семейства белков Puf (например PUF3), которые способствуют локализации таких мРНК на мембране органеллы, регулируют их стабильность и трансляцию [102–108]. Еще один РНК-связывающий белок, который может выполнять роль “митохондриального якоря” для некоторых мРНК в клетках человека, – это SYNJ2BP [109]. Нокаут гена *SYNJ2BP* показал, что этот белок необходим для быстрого возобновления трансляции этих мРНК после стресса.

У дрозофил белки PINK1 и Parkin распознают и связывают мРНК, кодирующие компоненты дыхательной цепи, на мембране митохондрий, обеспечивая их локальную трансляцию и импорт продуктов. Ассоциированная с митохондриями киназа PINK1 рекрутирует E3-убиквитинлигазу Parkin, которая смещает трансляционные репрессоры (в частности Dcp1, POP2, Pum-1, Glorund/hnRNP-F/H) с локализованных мРНК и способствует привлечению активаторов трансляции (eIF4A и eIF4G) [110]. В ооцитах же PINK1 преимущественно локализуется на дефектных митохондриях и путем локального фосфорилирования Larp обеспечивает их “блокаду”, прекращая синтез новых белков [111]. Это приводит к выбраковыванию митохондрий с дефектным геномом из внутриклеточной популяции, в результате чего они не передаются потомкам. Важную роль в локальной трансляции на внешней мембране митохондрий играет также регулятор AKAP1/MDI, который привлекает мРНК-связывающий белок Larp, стимулирующий трансляцию [111, 112].

мРНК-связывающий цитозольный белок CLUH, представленный у всех эукариот – от дрожжей до млекопитающих, – связывается преимущественно с транскриптами, кодирующими митохондриальные белки, включая компоненты комплексов окислительного фосфорилирования и цикла трикарбоновых кислот [113]. При дефиците CLUH наблюдаются серьезные дисфункции клеточного дыхания и энергетического обмена, вызванные изменениями стабильности и трансляции ассоциированных с ним мРНК [114]. Гомолог CLUH у дрозофилы (Cluless) обнаружен в митохондриальной фракции, где он ассоциирован с мембранными белками (TOM20), а также в комплексе с рибосомами [115, 116]. На основании этих данных можно построить функциональную модель, в которой CLUH высших эукариот, подобно дрожжевому PUF3, участвует в связывании и локализации ядерных транскриптов митохондриальных белков на мембране митохондрий, регулирует их стабильность и трансляцию.

Подводя итог этого раздела, хотелось бы еще раз обратить внимание на сходство принципов локализованной трансляции на внешней мембране митохондрий и на мембранах ЭПР. На самом деле эти органеллы связывают намного более тесные взаимодействия, чем принято считать. Места близкого контакта между мембранами митохондрий и ЭПР играют ключевую роль в поддержании гомеостаза липидов и кальция, в инициации аутофагии, делении митохондрий и других процессах [117, 118]. Существенная доля транскриптов, локализованных на митохондриях и ЭПР, оказывается ассоциированной и с той, и с другой органеллой, а значит, трансляция, скорее всего, идет в области их контактов [5]. Как пример – мРНК *OSM1*, которая имеет двойную локализацию. В основе этого явления лежит использование альтернативных стартов трансляции, дающих разные сигнальные последовательности в белке [73]. Явление двойной локализации самих полипептидов также далеко не редкость [119]. В дрожжах недавно открыт новый механизм импорта белков в митохондрии – ER-SURF (ER surface-mediated protein targeting): митохондриальные белки изначально встраиваются в ЭПР, но затем перенаправляются с его поверхности в митохондрии с помощью ЭПР-локализованного шаперона DJP1 (рис. 2, V) [120].

РОЛЬ ЛОКАЛИЗОВАННОЙ ТРАНСЛЯЦИИ В ИМПОРТЕ БЕЛКОВ В ПЕРОКСИСОМЫ И ПРОЧИЕ МЕМБРАННЫЕ ОРГАНЕЛЛЫ

Важную структурную и функциональную связь с ЭПР и митохондриями имеют пероксисомы – одномембранные органеллы, ответственные за окисление жирных кислот, детоксикацию опасных форм кислорода и азота, а также ряд других важных функций [121, 122]. Единственный пока известный путь импорта белков в пероксисомы – посттрансляционный. В отличие от ЭПР и митохондрий, в эти органеллы полипептиды транспортируются в полностью свернутой форме, зачастую в составе олигомеров [121]. Адресация опосредована особыми сигнальными последовательностями – PTS (peroxisomal targeting sequences), которые находятся либо на С-конце (PTS1), либо на N-конце (PTS2) белков. И все же механизм импорта, сопряженный с трансляцией, для некоторых пероксисомных белков описан [123], однако синтез происходит не на самой органелле. Первоначальное встраивание белков в этом случае происходит в мембрану ЭПР, после чего они доставляются в пероксисомы направленным везикулярным транспортом. Такой ЭПР-опосредованный топогенез пероксисомных белков служит основой формирования пероксисом *de novo* и биогенеза их мембраны [121]. Еще одна особенность некоторых пероксисомных белков, имеющая отношение к трансляции, – их двойственная локализация, при которой одни изоформы оказываются в пероксисомах, а другие остаются в цитозоле [124]. Зачастую эти изоформы, отличающиеся наличием PTS1 на С-конце, синтезируются с одной и той же мРНК благодаря необычно высокому уровню сквозного прочтения стоп-кодона [125, 126].

Значительная роль в адресации белков в пероксисомы отводится локализации кодирующих их транскриптов в непосредственной близости от этих органелл или прямо на их поверхности. Работ по изучению локализации мРНК на пероксисомах пока очень немного, однако это направление исследований бурно развивается [127]. Так, Zipor и соавт. [128] проанализировали локализацию 50 дрожжевых мРНК, кодирующих пероксисомные белки, и для 12 из них (в том числе мРНК 8 пероксинов и 4 ферментов матрикса) обнаружили высокий уровень колокализации с пероксисомами: от 50 до 80%. Масштабный анализ транскриптома, ассоциированного с пероксисомами у мышей [129], выявил обогащение представителями, кодирующими пероксисомные белки, в том числе пероксины и ферменты матрикса, вовлеченные в β-окисление жирных кислот и биосинтез желчных кислот. Кроме того, пероксисомная фракция содержала мРНК, кодирующие митохондриальные и секретируемые белки.

В литературе иногда можно встретить данные по связи трансляции и с другими мембранными органеллами, а также по специфичной локализации мРНК на них. Так, недавно в скрининговом исследовании обнаружена избирательная локализация нескольких видов мРНК на эндосомах, аппарате Гольджи и на внешней стороне ядерной оболочки [130]. Кроме того, в гифах грибов показана локализованная трансляция мРНК септина на эндосомах [131, 132], а в нейронах поздние эндосомы, часто ассоциированные с митохондриями, служат платформой для трансляции многих мРНК и необходимы для эффективного синтеза ламина B2 [133].

ТРАНСЛЯЦИЯ В ЯДРЕ?

Пожалуй, наиболее спорный момент в истории изучения локализации трансляции связан с обнаружением 80S рибосомных комплексов и даже, предположительно, транслирующих рибосом в клеточном ядре. История этих исследований представляет собой цепочку работ, в которых авторы пытаются доказать или опровергнуть эти тезисы [134–136]. Впервые о “ядерной трансляции” заговорили в 50-х годах прошлого века, когда в работах Allfrey & Mirsky [137, 138] было показано включение меченых аминокислот в выделенные ядра тимоцитов теленка. Однако наличие рибосом на внешней ядерной мембране (которая непосредственно переходит в мембрану ЭПР) общеизвестно, а степень очистки ядер от цитоплазматической фракции в те времена была явно недостаточной, чтобы из этих работ можно было сделать однозначные выводы. Тем не менее в дальнейшем опыты по включению меченых аминокислот ядрами разных клеток многократно повторяли с использованием различных способов очистки и продемонстрировали энергозависимость этого процесса, чувствительность к ингибиторам белкового синтеза, ДНКазе и РНКазе (подробный разбор этих многочисленных работ 50–70-х годов можно найти в обзоре [139]). Из очищенных ядер удалось выделить функционально активные полисомы [140]. Изолированные ядрышки также активно включали аминокислоты [134, 141], что выглядит особенно правдоподобно с учетом наличия в них созревающих рибосомных субчастиц.

И все же по мере развития молекулярной биологии приходило понимание, что “легитимным” местом синтеза как цитозольных, так и ядерных белков может быть исключительно цитоплазма. Выяснилось, что созревание и ядерный экспорт большой и малой рибосомных субчастиц происходит по отдельности, причем финальные стадии биогенеза и “контроль качества” рибосомы проходят уже вне ядра [142], а до этого момента субчастицы связаны со специальными инактивирую-

щими факторами, препятствующими инициации трансляции [143]. Однако не может не вызывать удивления тот факт, что многие трансляционные факторы, тРНК и сопутствующие ферменты обнаруживают в ядре (хотя данные на этот счет несколько противоречивы) [144]. Факт отсутствия 80S рибосом в ядре также подвергается сомнению. Так, Al-Jubran и соавт. [145] применили метод бимолекулярной флуоресцентной комплементации, присоединив разные части флуоресцентного белка к компонентам малой и большой субчастиц, и наблюдали свечение в ядре. Совсем недавно Chouaib и др. [130] показали, что мРНК небольшого числа конкретных белков локализуются почти исключительно в ядре.

Кроме того, со временем стали появляться факты, свидетельствующие о наличии разнообразных "неканонических" трансляционных событий в клетке, – и их почти сразу начали связывать с гипотетической "ядерной трансляцией" [146]. В данный момент эта тема в основном ассоциируется с малопонятным пока процессом синтеза гипотетических "дефектных рибосомных продуктов" (DRiP; defective ribosomal products), или "продуктов пионерной трансляции" (PTP; pioneer translation products), которые считают результатом трансляции несплайсированных пре-мРНК и одним из источников пептидов для презентации в главном комплексе гистосовместимости I класса (MHC I) [147–149]. Другая ветвь исследований увязывает "ядерную трансляцию" с некоторыми проявлениями нонсенсопосредованной деградации мРНК (NMD; nonsense-mediated mRNA decay) – важного механизма контроля качества транскриптов, элиминирующего мРНК с преждевременными стоп-кодонами [150–152]. Основным аргументом в пользу такой связи служит то, что многие факторы NMD имеют ядерную или перинуклеарную локализацию [153, 154]. Обе эти концепции, в принципе, уживаются друг с другом, поскольку продукция PTP может быть связана именно с "пионерным раундом" трансляции неправильно сплайсированных транскриптов, из которых не были удалены интроны. Вопрос заключается только в том, действительно ли эти события происходят в ядре.

Появление этих аргументов спровоцировало новую волну работ сторонников "ядерной трансляции" с применением современных методов мечения белков в сочетании с электронной и конфокальной микроскопией. Существенный вклад в формирование обновленной концепции внесли работы лаборатории П. Кука (P. Cook) [150, 152, 155], в которых использованы разные типы пульс-мечения синтезируемых полипептидов, позволяющие детектировать места встраивания метки с помощью микроскопа. Другая группа авторов с помощью метода, основанного на встраивании в растущую полипептидную цепь антибиотика пуромицина (с последующей визуализацией продукта с помощью пуромицинспецифичных антител), также обнаружила интенсивное накопление метки в ядре [156]. Этот факт долгое время считался очень серьезным аргументом в пользу "ядерной трансляции", однако в двух недавно опубликованных работах [157, 158] метод пуромицилирования подвергся серьезной критике. Авторы выяснили, что в тех условиях, которые обычно используют при проведении реакции, продукты встраивания пуромицина покидают рибосому и быстро диффундируют от места синтеза, зачастую оказываясь в том числе и в ядре. Не исключено, что и другие типы мечения не лишены подобного недостатка. Таким образом, на сегодняшний день едва ли можно с уверенностью говорить о том, что существуют какие-либо неопровержимые аргументы в пользу существования "ядерной трансляции".

ЦИТОЗОЛЬНЫЕ РНП-ГРАНУЛЫ И "ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ ФАБРИКИ" КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ ЛОКАЛИЗАЦИИ И ТРАНСЛЯЦИИ мРНК

Стресс-гранулы, процессинговые тельца и другие виды РНП-гранул

Помимо конститутивно присутствующих органелл в цитоплазме клетки в различных условиях можно наблюдать временные немембранные образования, в частности РНП-гранулы – относительно крупные конденсаты, представляющие собой многокомпонентные мультифункциональные комплексы. К наиболее известным и изученным типам таких комплексов относятся стресс-гранулы (СГ) и процессинговые тельца (ПТ) [159, 160]. ПТ (рис. 3, I) существуют в клетке как в нормальных, так и в стрессовых условиях и обогащены факторами, участвующими в деградации РНК. Однако, по современным воззрениям, уничтожение мРНК не является основным предназначением ПТ. В отличие от ПТ, СГ (рис. 3, II) преимущественно формируются при определенных видах стресса и в них сконцентрированы мРНК в комплексе с малыми рибосомными субчастицами, факторами инициации и терминации трансляции, а также многочисленными РНК-связывающими белками [159]. Основной функцией как СГ, так и ПТ сейчас считается регуляция РНК-метаболизма: прежде всего избирательная трансляционная репрессия, а также контролируемая деградация и другие процессы [159, 160]. Принято считать, что в образовании ПТ, СГ, других крупных РНП-конденсатов и немембранных органелл важную роль играет явление разделения фаз жидкость–жидкость (LLPS; liquid-liquid phase separation), связанное со свойствами самих биополимеров: РНК и белков, имеющих неструктурированные или повторяющиеся участки [161–164]. Скорее всего, "зачатки" СГ – высокомолекуляр-

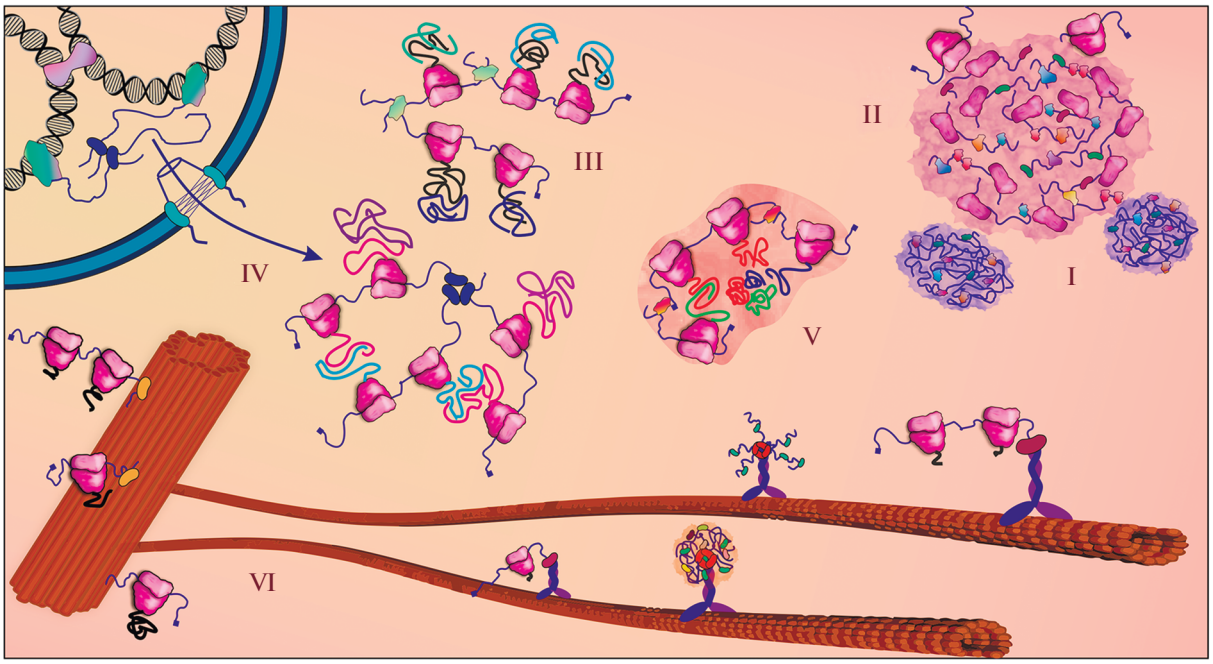

Рис. 3. Трансляция, ассоциированная с немембранными органеллами клетки. Схематически представлены: процессинговые тельца (I); стресс-гранула (II); “трансляционная фабрика” (III); трансперон (IV); ассемблисома (V); рибосомы и нуклеопротеидные комплексы, ассоциированные с элементами цитоскелета (центросомой и микротрубочками) (VI). Подробности в тексте.

ные РНП (пре-СГ) и РНК-РНК-конденсаты, находящиеся в динамическом равновесии между разборкой и ростом, – присутствуют в клетке и в нормальных условиях [165, 166]. При наступлении же стресса они используются как “точки роста” для образования полноценных СГ за счет LLPS.

СГ и ПТ традиционно считаются трансляционно неактивными компартментами (хотя бы потому, что в составе ПТ не обнаруживают рибосомы, а в СГ – 60S субчастицы). Однако, согласно некоторым данным, обе структуры иногда могут также выступать “платформой” для локализованной трансляции мРНК. Например, в ооцитах дрозофилы мРНК *gurken* транслируется непосредственно на поверхности ПТ [167]. Эта мРНК синтезируется в трофоцитах и в комплексе с трансляционными репрессорами транспортируется в ооциты, где связывается с поверхностью ПТ и активаторами трансляции. Другая мРНК, *bicoid*, на ранних стадиях развития ооцита локализуется в коровой части ПТ, а по мере его созревания перемещается на их периферию, где происходит ее трансляция [168]. Локализация факторов инициации трансляции и полисом на ближней периферии ПТ обнаружена и в клетках млекопитающих [169]. Возможно, такое соседство важно для быстрого возобновления трансляции мРНК сразу после их высвобождения из ПТ. Таким образом, данная структура, изначально считавшаяся местом хранения “приговоренных к деградации” транскриптов, на самом деле может играть роль в динамической регуляции биосинтеза белка.

Вопрос о трансляционной активности, ассоциированной с СГ, также весьма неоднозначен. Классической считается модель, согласно которой мРНК в СГ находятся в полностью репрессированном состоянии и возобновление их трансляции происходит только после разборки СГ [159]. Однако недавно выяснилось, что активно транслируемые мРНК могут временно взаимодействовать с СГ [170]. Новые данные свидетельствуют также о возможности трансляции транскриптов, локализованных непосредственно в СГ [171], а также в неких своеобразных СГ-подобных гранулах, находящихся в клеточных протрузиях (выпячиваниях цитоплазмы) [172, 173]. Эти факты заставляют задуматься о необходимости пересмотра устоявшейся модели.

Помимо ПТ и СГ, в клетках в разных условиях находят и другие типы РНК-гранул, которые носят ткане- и мРНК-специфичный характер [172, 174–177]. Например, гранулярные высокомолекулярные РНК-белковые комплексы широко представлены в нервных клетках [178, 179], где они служат транспортной формой неактивных полисом при перемещении мРНК вдоль нейритов [180, 181]. Активная трансляция может происходить непосредственно в таких гранулах [182]. Некоторые нейрональные гранулы, вероятно, представляют собой одиночные полисомы, “за-

мороженные” в неактивном состоянии [183] и способные быстро возобновить элонгацию при активации синапса [181]. В клетках зародышевой линии животных широко представлен другой тип образований – так называемые герминальные гранулы. В зависимости от организма и типа клеток (половые клетки или их предшественники, клетки окружающих тканей или клетки зародышевой линии эмбрионов) под этим термином могут подразумеваться немного разные структуры: полярные гранулы, P-гранулы, губчатые и хроматоидные тельца, тельца Бальбиани, гранулы в “митохондриальных облаках” или особый приядерный компартмент *nuage* [184]. Считается, что эти гранулы, помимо прочих их функций, служат хранилищем нетранслируемых родительских транскриптов, которые активируются при мейозе, после оплодотворения или на определенной стадии раннего эмбриогенеза [185, 186]. В некоторых случаях динамика этих гранул тесно связана с необычными пертурбациями, которые претерпевают во время мейоза митохондрии [184]. Локализация многих кодирующих и некодирующих РНК – компонентов этих гранул – имеет сложную динамику [187, 188]. Любопытно, что с гранулами ассоциирована также рРНК митохондриальных рибосом, которую обнаруживают в этот момент в цитоплазме [189, 190]. Не исключено, что это как-то связано с ее кодирующим потенциалом [191]. Сложный паттерн и динамика распределения мРНК обеспечивают, по-видимому, регуляцию трансляции при созревании половых клеток и на ранних стадиях эмбриогенеза [185].

“Трансляционные фабрики”, ассемблисомы, трансперoны и другие трансляционно активные мРНК-конденсаты

В последнее время стали появляться сведения о том, что и активно транслируемые транскрипты могут образовывать в клетке некие конденсаты, иногда именуемые “трансляционными фабриками” (рис. 3, III). Так, у дрожжей мРНК некоторых ферментов гликолиза в нормальных условиях формируют трансляционно активные гранулы, которые в случае стресса служат основой формирования ПТ [192, 193]. Эта особенность, по-видимому, характерна и для клеток человека [193]. Авторы решили назвать этот новый вид гранул “CoFe-гранулами” (core fermentation). Та же группа показала существование у дрожжей еще одного типа трансляционно активных частиц, в которых сосредоточены мРНК, кодирующие ряд трансляционных факторов [194]. Эти гранулы специфически наследуются дочерними клетками и, по-видимому, играют роль в фокусировке трансляционной активности в области поляризованного роста. Колокализация нескольких копий мРНК одного гена также показана напрямую в клетках человека: при визуализации транскриптов, с которых шла трансляция тяжелой цепи динеина, обнаружена их колокализация в 3–7-членных кластерах [195]. Согласно опубликованным недавно результатам крупномасштабного (более 500 мРНК) скрининга, около 6% мРНК человека присуща четкая локализация в клетке [130]. В большинстве случаев это гранулярная локализация или концентрация мРНК в определенных клеточных компартментах и на органеллах, хотя возможно образование конденсатов и в виде равномерно распределенной сети, как в случае уже упоминавшихся выше TIS-гранул, ассоциированных с мембраной ЭПР [15, 48].

Таким образом, нуклеопротеидные гранулы могут не только выступать негативными регуляторами трансляции, “маскируя” мРНК с помощью РНК-связывающих белков, но и служить платформой для активной трансляции. Механизм образования таких гранул и принципы рекрутирования в них мРНК изучены пока недостаточно. Возможно, конденсаты мРНК могут формироваться отчасти благодаря взаимодействию самих РНК – в особенности их длинных неструктурированных участков [48, 161]. Кроме того, в литературе обсуждается влияние ядерных событий на колокализацию функционально сходных мРНК. Возможно, соседство генов в ядре и их совместная транскрипция обеспечивают впоследствии соседство мРНК в цитоплазме, опосредованное ядерно-цитоплазматическими РНК-связывающими белками [196], – такие группы мРНК получили название “трансперонов” (рис. 3, IV), по аналогии с оперонами прокариот.

Однако, как минимум в некоторых случаях, образование цитоплазматических конденсатов мРНК связано с белок-белковыми взаимодействиями кодируемых ими продуктов. Котрансляционное связывание синтезируемого белка с его будущими функциональными партнерами давно известно для полицистронных мРНК прокариот. Теперь стало ясно, что этот механизм довольно распространен и в эукариотическом мире [197]. Взаимодействуют не только продукты, синтезируемые соседними рибосомами с одной мРНК [198], но и – что гораздо важнее – продукты разных мРНК. Впервые это было показано для нескольких гетероолигомерных комплексов дрожжей [199–201], затем подтверждено для мембранных [202], ядерных [203] и цитоплазматических [204–206] белковых комплексов в клетках человека. Котрансляционное взаимодействие продуктов не может не влиять на локализацию мРНК. В случае таких крупных продуктов-олигомеров, как протеасома, котрансляционные конденсаты мРНК и их продуктов могут даже формировать особые компартменты, названные ассемблисомами (рис. 3, V) [204]. Протеасомная ассемблисома формируется не только благодаря взаимодействию друг с другом продуктов трансля-

ции, но и при помощи специального транскрипт-специфичного механизма сегрегации мРНК, опосредованного белком NOT1 – компонентом комплекса Ccr4-Not. Комплекс Ccr4-Not участвует в формировании и других котрансляционных конденсатов [201, 207].

Интересно, что после начала синтеза двух компонентов протеасомы, RPT1 и RPT2, синтезирующие их рибосомы останавливаются. Эта остановка происходит в четко детерминированных местах, позволяя появившимся из рибосомного тоннеля участкам белков связаться друг с другом. Трансляция возобновляется только после установления взаимодействия и переноса мРНК в ассемблисому [204]. Как легко заметить, эта картина сильно напоминает описанный в первых главах обзора SRP-опосредованный контроль синтеза секретируемых или мембранных белков. Таким образом, в регуляции сходных процессов в клетке задействованы одинаковые механизмы. Более того, сходный принцип "заморозки" мРНК-рибосомных комплексов и их последующей активации "по сигналу" используется, вероятно, и в других случаях – например, при транспортировке неактивных мРНК в нейронах, как описано ниже.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ТРАНСЛЯЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В КЛЕТКЕ

Говоря о локализованной трансляции, о гипотетических "трансляционных фабриках" и трансперонах, нельзя не рассмотреть вопрос о внутриклеточной локализации компонентов самого трансляционного аппарата. Хорошо известно, что во время стресса 40S субчастицы рибосом, многие факторы инициации и мРНК-связывающие белки релокализуются в специальные немембранные органеллы – СГ, описанные выше. Однако некоторые факты указывают на то, что компоненты трансляционного аппарата могут быть неслучайно распределены в цитоплазме и в нормальных условиях. Так, методом фракционирования и иммуноцитохимии обнаружено неслучайное распределение факторов eIF4E и eIF4G в мышиных фибробластах: помимо диффузного распределения в цитоплазме, наблюдалось их сосредоточение в районе ЭПР, аппарата Гольджи, на лидирующем крае и в клеточных протрузиях [208, 209]. Эта локализация совпадала с распределением рибосомных белков и наблюдалась только при активном белковом синтезе [209]. Сложная и динамическая локализация выявлена также для поли(A)-связывающего белка PABP [210]. Наиболее яркий паттерн распределения имеет дрожжевой фактор eIF2B. При активной трансляции существенная доля его молекул локализована в специфических гранулах, называемых "eIF2B-тельцами" [211]; через эти тельца рециркулирует фактор eIF2, производя обмен GDP на GTP. В нейронах трансляционная машинерия может быть локально сконцентрирована в синапсах или ассоциирована с рецепторами стимулирующих лигандов, что необходимо для своевременной локальной активации трансляции определенных мРНК [212–214]. Кроме того, известно, что многие компоненты трансляционного аппарата (например, eIF3, eIF4G, eEF1A, eEF2, eRF3 и, возможно, сами рибосомы) взаимодействуют с элементами цитоскелета: микротрубочками, промежуточными и актиновыми филаментами, а также с соответствующими моторами [215, 216], – участвуя в активном транспорте трансляционных комплексов.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ мРНК И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЭЛЕМЕНТАМИ ЦИТОСКЕЛЕТА

Локализация мРНК для ее последующей компартментализованной трансляции не обязательно бывает связана с органеллами или гранулами. Часто в качестве места локализации выступает какая-то область клетки: например, ламеллоподии фибробластов и участки фокальных контактов обогащены мРНК β-актина и актинсвязывающих белков [217–219], мРНК *ASH1* дрожжей локализована исключительно в почке готовящейся к делению материнской клетки [220], а транскрипты морфогенов и гомеозисных генов *oskar*, *nanos*, *bicoid* и *gurken* после транспортировки из трофоцитов располагаются на определенных полюсах ооцита дрозофилы, что в дальнейшем определяет дорзо-вентральную и антериор-постериорную полярность эмбриона [221, 222]. Эти модели можно назвать классическими, они описаны в учебниках и во множестве обзоров. Другой популярный объект подобных исследований – это нейроны. В этих клетках именно локализация мРНК в значительной степени определяет протеомы нейритов и сомы [223], а в аксонах нейронов локальный синтез рибосомных белков необходим для "ремонта" рибосом на месте, поскольку транспорт новых рибосом из ядра, находящегося в соме, занимает в этих клетках слишком много времени [224]. Системный анализ локализации мРНК в культивируемых клетках человека [130] и эмбрионах дрозофилы [225, 226] показывает, что четко выраженная субклеточная локализация относится, скорее, к правилам, а не исключениям.

В большинстве случаев локализация мРНК определяет локализацию продукта, но иногда она нужна для неких промежуточных стадий его созревания или функционирования. Например, GTPаза RAB13 синтезируется с мРНК, локализованных в клеточных протрузиях, и, хотя сам продукт имеет перинуклеарную локализацию, его синтез в протрузиях важен для активации GTPазы, поскольку именно там синтезируемый белок RAB13

взаимодействует со своим фактором GDP/GTP-обмена – RABIF [205]. В клетках человека локализация мРНК рибосомных белков на лидирующем крае движущихся клеток, опосредованная белком LARP6, вероятно, играет важную роль в регуляции их трансляции и в контроле клеточной миграции [227]. И это несмотря на то, что для реализации своей функции эти белки, скорее всего, должны сначала попасть в ядрышко. Впрочем, их участия в локальном "ремонте" рибосом, как в нейронах [224], также нельзя исключить.

Тем не менее смысл локализации мРНК в определенных участках клеток не всегда очевиден [130]. Возможно, пространственное расположение трансляционных комплексов относительно других структур клетки может служить фактором, который задает нужную ориентацию белковых комплексов более высокого порядка. Недавно такой механизм воссоздан искусственно в клеточном лизате [228]. Локализовав с помощью магнитных наночастиц в определенном месте мРНК, кодирующую актинсвязывающий белок, авторы смогли организовать нужным образом структуру актиновых филаментов в месте локализации транскрипта.

Транспортировка мРНК к месту локализации происходит, как правило, в составе РНП-комплексов, трансляция в которых угнетена специфичными репрессорами (рис. 3, VI). Адрес доставки закодирован в последовательности мРНК – в *цис*-действующих элементах локализации, иногда образно называемых "зип-кодами" (zipcodes, почтовые индексы). Чаще всего эти последовательности располагаются в 3'-НТО мРНК, но встречаются и в кодирующей части или 5'-НТО; они могут значительно варьировать как по длине (от нескольких нуклеотидов до нескольких сотен), так и по структуре [220, 229, 230]. С элементами локализации в мРНК взаимодействуют различные белковые факторы, образуя РНП-комплексы, которые транспортируются по элементам цитоскелета – как правило, посредством направленного активного транспорта по микротрубочкам или, значительно реже, по промежуточным или актиновым филаментам с участием молекулярных моторов [218, 231, 232].

Классический пример мРНК-связывающего белка, обеспечивающего адресацию транскриптов с "зип-кодами", – ZBP1/IGF2BP1/IMP1. Он узнает участок в 3'-НТО мРНК β-актина (а также в целом ряде других транскриптов) и одновременно формирует комплекс с кинезинподобным моторным белком KIF11 [219, 233, 234]. В состав этой РНП-частицы входят и другие мРНК-связывающие белки, а также 40S субчастицы рибосом и ряд компонентов "пионерного раунда трансляции" [235]. Это позволяет предположить, что транспортировка происходит сразу после экспорта из ядра – еще до первого раунда трансляции. Сходные принципы лежат и в основе механизма транспортировки вышеупомянутых мРНК из ооцитов дрозофилы (комплекс РНК-связывающего белка Egalitarian и грузового адаптера динеина Bicaudal либо аналогичных им по функциям Staufen и кинезина-1), а также мРНК *ASH1* дрожжей (РНК-связывающий белок SHE2 и миозиновый мотор MYO4). С многочисленными работами по идентификации этих компонентов можно ознакомиться в обзорах [221, 236]. В транспорт мРНК в нейронах позвоночных вовлечено, по-видимому, множество разных мРНК-связывающих белков, в том числе: STAU1 и STAU2 (гомологи Staufen), FMRP, TDP-43 и важный компонент СГ – G3BP1 [236, 237]. В некоторых случаях известны РНК-связывающие белки, которые объединяют несколько мРНК конкретных генов в специфичные транспортировочные агрегаты [238, 239]. А вот ситуация с моторами в случае нейронального транспорта пока менее понятна, хотя недавно удалось выявить ключевую роль белка APC и кинезинового комплекса KIF3A/B/KAP3 в специфичном транспорте мРНК вдоль аксонов [173, 240].

Кроме транспортировки в составе индивидуального РНП и "замороженного" трансляционного комплекса, мРНК могут перемещаться по элементам цитоскелета и в составе крупных структур (СГ, ПТ или других гранул), а также на мембранных органеллах (митохондриях, эндосомах, лизосомах и т.д.). Последний способ, по-видимому, особенно распространен в аксонах и для его описания все чаще используют образное выражение "путешествие автостопом" (hitchhiking) [133, 236, 237].

В конечной локации мРНК высвобождается из комплексов с транспортными и репрессорными белками и оказывается доступной для трансляционного аппарата [241–243]. Например, в случае уже упоминавшихся мРНК β-актина человека и ASH1 дрожжей такое высвобождение регулируется фосфорилированием компонентов РНП, которые до этого взаимодействуют с трансляционными факторами, препятствуя инициации трансляции [234, 244]. Для нейронов также предложены два оригинальных механизма активации мРНК: путем разрезания 3'-НТО [245] и путем высвобождения неактивных мРНК-рибосомных комплексов из специфичных ассоциатов с трансмембранными рецепторами нейронстимулирующих лигандов [212, 213]. Впрочем, правило "молчаливой" транспортировки выполняется не всегда: например, при APC-зависимом транспорте в клеточные протрузии мРНК в процессе доставки могут транслироваться [246]. Локализация мРНК может быть также и результатом пассивной диффузии и "заякоривания" на определенных клеточных структурах [247]. Гораздо реже ассиметричное распределе-

ние мРНК в клетке достигается с помощью локальной защиты от деградации [248]. Интересно, что на локализацию мРНК в цитоплазме могут влиять события, происходившие с ней еще в ядре: тип промотора, с которого был синтезирован транскрипт [242], или вхождение гена в определенный трансперон [196].

Помимо транспортной магистрали, элементы цитоскелета могут выступать в качестве мест постоянной дислокации мРНК и некодирующих транскриптов [130, 249, 250], обеспечивая тем самым локальный синтез транспортных белков и другие функции [251–254]. Так, локализованная трансляция мРНК циклина B на митотическом веретене в быстро делящихся клетках эмбрионов амфибий помогает согласовать производство этого регулятора с циклами клеточного деления [255]. Локализованная трансляция мРНК аксонемального динеина в основании цилии (клеточной антенны) критична для сперматогенеза у дрозофилы [256]. Важным трансляционным "хабом" могут быть центросомы (рис. 3, VI): они аккумулируют на себе различные трансляционные компоненты [257–260] и специфические РНК [130, 226, 250, 255, 260, 261], хотя смысл и значение такой локализации пока неясны. Известно только, что во время клеточного деления некоторые мРНК направляются по микротрубочкам в прицентриольный матрикс, а затем перераспределяются между дочерними клетками посредством актинового транспорта, обеспечивая таким образом асимметричную сегрегацию транскриптов [261]. Нарушение центросомной локализации всего одной мРНК (*cen*) приводит к ошибкам в сборке веретена деления и геномной нестабильности на модели эмбриона дрозофилы [262]. Интересно, что синтез ряда белков самих центросом также происходит прямо на этих органеллах и обусловлено это продуктзависимой локализацией соответствующих мРНК [263]. Эта локализация регулируется в клеточном цикле и консервативна от дрозофилы до человека.

ЧАСТНЫЕ СЛУЧАИ ЛОКАЛИЗАЦИИ И ТРАНСЛЯЦИИ мРНК ВИРУСОВ И ТРАНСПОЗОНОВ

мРНК многих вирусов (особенно тех из них, у которых весь жизненный цикл проходит в цитоплазме) транслируются в специальных структурах – в составе частиц, гранул или в мембранных компартментах, которые вирусы формируют в ходе инфекции и где протекают определенные стадии их жизненного цикла [264]. Некое подобие таких структур могут образовывать и клеточные мРНК, транскрибируемые с ДНК-копий некоторых ретротранспозонов. Хотя подробное рассмотрение этой темы потребовало бы написания отдельного обзора, мы коснемся некоторых ее аспектов, проиллюстрировав их на конкретных примерах.

Мембрана ЭПР, в частности, служит "полигоном" для трансляции мРНК вирусов семейства *Flaviviridae*, включающего вирусы Зика, денге, гепатита С и другие [265–267]. На протяжении большей части жизненного цикла этих РНК-содержащих вирусов их плюс- и минус-цепи ассоциированы с мембранами ЭПР и с происходящими из них специальными мембранными структурами – "репликативными фабриками". По мере развития инфекции происходит реорганизация ЭПР и аппарата Гольджи, а трансляционные свойства мембран изменяются таким образом, что они становятся местом преимущественной трансляции вирусных мРНК, забирающих ресурсы у транскриптов клетки-хозяина. Благодаря пространственной изоляции все это происходит без значительной активации интерферонового ответа, UPR и других сигнальных путей, направленных на подавление вирусной инфекции. Сложные мембранные структуры, необходимые для репликации и происходящие из ЭПР, аппарата Гольджи, лизосом и реже митохондрий, иногда двухслойные, формируют и другие животные и растительные (+)РНК-содержащие вирусы: пикорнавирусы, коронавирусы, тогавирусы, калицивирусы и т.д. [264]. Так, в клетках, зараженных коронавирусами, было найдено от двух до шести новых типов мембранных структур, из которых наиболее хорошо охарактеризованы "запутанные мембраны" (convoluted membranes) и двумембранные везикулы (double-membrane vesicles) [268, 269]. В транскриптах многих РНК-содержащих вирусов содержатся множественные копии мотива SECReTE [270]. Например, в геноме циркулирующего сейчас в человеческой популяции коронавируса – SARS-CoV-2, вызывающего COVID-19, – обнаружено 40 таких участков, а также сигналы возможной митохондриальной локализации РНК [270, 271]. В случае же геномной мРНК вируса иммунодефицита человека, ВИЧ-1, ее локализация на митохондриях была показана экспериментально [272].

К сожалению, о роли таких структур в трансляции обычно мало что известно. В отдельных случаях (например, при инфекции вирусом Синдбис) выявлено обогащение этих фокусов одними трансляционными факторами (eIF3, eEF2) и обеднение другими (eIF2, eIF4G) [273]. Ортореовирусы имеют специальный механизм для активного привлечения компонентов трансляционного аппарата на границу и внутрь своих вирусных фабрик [274], при коронавирусной инфекции также наблюдается обогащение мембранных структур трансляционными компонентами [275]. В случае полиовируса локализация мРНК на мембранах может придавать трансляции дополнительную устойчивость благодаря CReP-опосредованному привлечению туда eIF2 [276].

Многие ДНК-содержащие вирусы характеризуются еще более внушительной реорганизацией мембранных компартментов клетки. Например, сложный репродуктивный цикл поксвирусов реализуется в особых околоядерных цитоплазматических локусах клетки-хозяина (виросомах, или тельцах Гварниери), в которых концентрируются факторы инициации трансляции (eIF4E, eIF4G, PABP) и другие важные трансляционные компоненты [277]. В то же время для сборки вирионов используется специальный гелеподобный компартмент (ATI-тельца), содержащий многочисленные копии белка ATI. Интересно, что трансляция мРНК, кодирующей ATI, происходит в этих тельцах, а не в виросомах [278], а для ее локализации используется, по-видимому, тот же принцип, что и в клеточных ассемблисомах: растущие из рибосомы ATI-пептиды взаимодействуют с другими молекулами ATI, локализованными в тельцах, обеспечивая заякоривание мРНК.

Одновременно с ремоделированием мембранных структур вирусы могут оказывать сильное влияние и на формирование клеточных РНП-гранул: СГ и ПТ. Интересно, что одни вирусы (например, гриппа и везикулярного стоматита, вирус Зика и пикорнавирусы) активно препятствуют формированию СГ, в то время как другие (вирус бешенства), наоборот, стимулируют их образование, используя этот механизм для подавления клеточной трансляции или для регуляции собственного цикла репликации [279–281]. SARS-CoV-2 при заражении клеток индуцирует разборку ПТ и препятствует сборке СГ, которые мешают продуктивной инфекции [282, 283]. Вместе с тем этот коронавирус использует LLPS для создания собственных РНП-конденсатов (см. работы [284, 285] и ссылки в них). Литература о взаимоотношениях вирусов с СГ и ПТ настолько обширна, что лучший способ детально в этом разобраться – обратиться к специализированным обзорам на эту тему [286, 287].

Ретротранспозон Ty1 дрожжей использует еще более изощренный путь, неразрывно связанный с ЭПР, для сборки вирусоподобных частиц, в которых реплицируется его геном [288]. РНК Ty1 по мере трансляции узнается SRP-частицей клетки-хозяина и доставляется на мембрану ЭПР, а синтезируемый с этой РНК белок оболочки Gag поступает в люмен ЭПР. Тем не менее Gag обнаруживают в цитоплазме в ассоциации с комплексом РНК Ty1 и SPR, хотя в отсутствие транслокации в ЭПР весь синтезируемый Gag быстро деградирует. Согласно предложенной модели, при транслокации в люмен ЭПР Gag принимает стабильную конформацию, а затем снова возвращается в цитоплазму и связывается с комплексом РНК и SRP, инициируя сборку вирусоподобных частиц [288].

РНК других известных ретротранспозонов также могут проявлять характерные паттерны локализации в клетке. Например, уникальная бицистронная мРНК автономного ретротранспозона LINE-1 (L1) локализуется в особых нуклеопротеидных частицах, которые обогащены белками – продуктами ее трансляции (ORF1p и ORF2p), необходимыми для транспозиции, а также маркерами СГ [289, 290]. Кроме того, состав этих частиц меняется в зависимости от жизненного цикла LINE-1 и от локализации в клетке – цитоплазматической или ядерной [291]. Интересно, что РНК неавтономных ретротранспозонов, которые используют ревертазу LINE-1 для транспозиции (Alu-повторов и SVA-элементов), находят в составе иных структур (см. [292]) – впрочем, рассмотрение локализации некодирующих РНК, к которым относятся транскрипты этих элементов, выходит за рамки данного обзора.

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ЛОКАЛИЗОВАННОЙ ТРАНСЛЯЦИИ

Большой интерес в области изучения локальной трансляции вызывает вопрос о том, различаются ли механизмы регуляции биосинтеза белков в зависимости от места локализации и трансляции кодирующих их мРНК. В частности неясно, одинаково ли регулируется трансляция свободными цитоплазматическими рибосомами и рибосомами, ассоциированными с мембранами органелл, существуют ли какие-то особенности в работе и циркуляции рибосом, трансляционных факторов и мРНК внутри и между разными компартментами. Совокупность предполагаемых на этот счет гипотез довольно обширна и включает крайние утверждения. Одни авторы доказывают, что для локализованной трансляции характерен особый, компартментзависимый способ контроля, который может значительно отличаться от классических внутриклеточных механизмов регуляции биосинтеза белка. Локализованные на мембране полисомы отличаются от цитозольных по динамике и структуре. Так, показано, что эти полисомы гораздо менее подвижны [10], а число рибосом в них в среднем больше, чем в составе свободных полисом [7, 10]. Это наводит на мысль, что такая раздельная регуляция тех и других вполне может иметь место. Однако другие авторы настаивают на отсутствии каких-либо значимых различий (см. ниже). Истина, вероятно, находится где-то посередине, но ее поиск осложняется недостатком экспериментальных данных по этой тематике, не всегда однозначной их трактовкой, а также наличием публикаций с противоречащими друг другу результатами. Ниже мы предлагаем рассмотреть аргументы обеих сторон.

Аргументы в пользу гипотезы компартментзависимой регуляции трансляции

К ярым сторонникам гипотезы компартментспецифичной трансляции принадлежит К. Ничитта (C. Nicchitta). В ряде работ, выполненных его группой, показано, что мРНК может проходить весь трансляционный цикл – от инициации до терминации и рециклинга – на мембране ЭПР без обмена рибосомами и мРНК с цитозолем [293–296]. Происходить это может за счет того, что рибосомы, ассоциированные с транслоконом ЭПР или другими рибосомными рецепторами на ЭПР, после терминации способны оставаться на мембране и инициировать трансляцию соседних мРНК, которые также могут быть связаны с мембраной за счет разных механизмов, описанных ранее (рис. 1). Этот принцип справедлив для мРНК, кодирующих не только секретируемые или мембранные, но и цитозольные белки [7, 8, 45], высвобождающиеся после синтеза в цитоплазму и никак не связанные с транслоконом. Таким образом, авторы фактически утверждают, что процессы трансляции в цитозоле и на мембране ЭПР могут идти независимо друг от друга и это, в свою очередь, создает возможность их компартментзависимой регуляции.

Факты такого разграниченного контроля Ничитта с соавторами раскрывают в своих работах. Например, они показали, что в случае некоторых видов стресса (стресс ЭПР и вирусная инфекция) трансляция в цитозоле подавлялась, в то время как на мембране ЭПР она оставалась на прежнем уровне или даже стимулировалась [297, 298]. В другой работе [299] продемонстрирована избирательная релокализация мРНК мембранных и секретируемых белков с мембраны ЭПР в цитозоль во время стресса ЭПР, в то время как находящиеся на мембране мРНК цитозольных белков, а также мРНК белков-участников стрессового ответа локализацию не изменяли. Перераспределение мРНК происходило в первые полчаса после стресса, а к концу первого часа транскрипты, покинувшие мембрану ЭПР, возвращались обратно. Такой способ уменьшить скорость поступления белков в ЭПР путем селективной релокализации мРНК предложен в качестве механизма, альтернативного или дополнительного к деградации ассоциированных с мембраной мРНК во время ответа на стресс [299]. Авторы этих работ выдвигают новую парадигму, в которой мембранам ЭПР отводится первоочередная роль в локализации трансляции большинства мРНК (включая те, которые кодируют цитозольные белки) и в создании особых условий для регуляции их трансляции [296]. При стрессе мембраны ЭПР могут служить платформой для синтеза антистрессовых белков, даже если сами эти белки имеют цитозольную локализацию.

Эта идея находит подтверждение и в работах других научных групп. Так, в исследовании Staudacher и др. [300] показана селективная релокализация ряда мРНК на мембрану ЭПР и стимуляция их трансляции на мембране в условиях гипоксии. В число таких транскриптов вошли мРНК, кодирующие элементы адаптационного ответа на гипоксию, ферменты гликолиза и другие мишени транскрипционного фактора HIF1A. В их 5'- и 3'-НТО обнаружены консервативные мотивы, необходимые для локализации на ЭПР и способствующие трансляции ЭПР-ассоциированными рибосомами.

Специфическая локализация мРНК может определять также быстрое возобновление их трансляции по окончании стресса. Например, в клетках с утраченным “митохондриальным якорем” SYNJ2BP некоторые мРНК, ассоциированные с внешней мембраной митохондрий, при возвращении в нормальные условия вовлекаются в трансляцию гораздо медленнее [109].

При анализе дифференцированных эффектов стресса на трансляцию в разных компартментах нельзя не учитывать их разную обогащенность трансляционными факторами. Так, недавно в работе группы M. Gromeier [276] показано, что ключевой фактор инициации eIF2 удерживается на мембранах ЭПР посредством взаимодействия с белком CReP. По мнению авторов, это обеспечивает селективную устойчивость трансляции некоторых транскриптов (например, мРНК полиовируса или мРНК резидентного шаперона ЭПР BiP) к стрессам, вызывающим инактивацию eIF2 или eIF4F. Кроме того, нельзя забывать, что локализация отдельных компонентов может сильно меняться в зависимости от условий – например, релокализация целого ряда трансляционных факторов в СГ может приводить к изменению их распределения между компартментами во время стресса.

С исторической точки зрения, идеи пространственно опосредованной регуляции синтеза белка не новы: подобные вопросы поднимались еще первооткрывателями локализованной трансляции, включая самого Паладе. Однако в современной науке эти идеи находят как положительные отклики, так и критику.

Аргументы против компартментзависимой регуляции и противоречивые данные

Тема трансляции мРНК, кодирующих цитозольные белки, на мембране ЭПР остается дискуссионной, так как в разных работах приводится различная оценка доли таких транскриптов. По данным рибосомного профайлинга клеток дрожжей и млекопитающих [8], они составляют не более 7–15%, с поправкой на возможные загрязне-

ния. Однако Reid & Nicchitta [7] считают, что не менее 20% “цитозольных” (согласно официальной аннотации) белков синтезируется ЭПР-ассоциированными рибосомами. Используя другой методический подход, основанный на визуализации трансляции единичных молекул мРНК, Voigt и соавт. [10] насчитали на мембране ЭПР порядка 7–8% от общего количества мРНК репортерного белка с цитоплазматической локализацией. Для другого репортера, секретируемого, 60% кодирующей его мРНК оказалось ассоциированной с ЭПР, из чего можно сделать вывод о динамическом характере связывания мРНК с ЭПР и возможности ее циркуляции между мембраной и цитоплазмой.

В работе Jan и др. [8] модель стабильной ассоциации рибосом с ЭПР после терминации трансляции опровергается. Авторы утверждают, что рибосомы после терминации быстро диссоциируют с мембраны, возвращаясь в пул цитозольных рибосом. Эта работа вызвала спор между двумя группами ученых [301, 302], который ярко охарактеризовал ситуацию, сложившуюся в области изучения локализованной трансляции, где в силу недостаточной разработанности темы возможны совершенно различные интерпретации одних и тех же результатов. Новые данные, опубликованные группой Nicchitta [11], внесли некоторую ясность в обсуждаемый вопрос, продемонстрировав возможность развития событий по обоим сценариям: в условиях ингибирования глобальной клеточной трансляции рибосомы могут диссоциировать с мембраны ЭПР как быстро, так и медленно, а определяется это видом рецептора, с которым связана рибосома.

Сразу два интересных наблюдения сделано еще в одной работе [303]. Unsworth и соавт. показали, что, во-первых, при окислительном стрессе, индуцированном арсенитом натрия, ЭПР-ассоциированные мРНК не уходят в СГ, как это делают “цитозольные” транскрипты. Во-вторых, в клетках, подвергнутых окислительному стрессу, ЭПР-ассоциированные полисомы устойчивы к обработке пуромицином, в то время как полисомы, синтезирующие цитозольные белки, при добавлении пуромицина распадаются. Авторы увидели здесь аналогию с “тяжелыми” полисомами, формирующимися во время митоза: они трансляционно менее активны, чем полисомы в активной фазе роста, и также не чувствительны к пуромицину [304]. При делении клеток это необходимо для защиты мРНК от деградации и быстрого возобновления трансляции по окончании митоза. В подтверждение этой аналогии можно вновь привести работу Reid & Nicchitta [7], где показано, что трансляция химерного транскрипта, направленного на ЭПР, восстанавливается после отмены стресса быстрее, чем трансляция “цитозольного” репортера.

Структурные и функциональные особенности рибосом в зависимости от вида транслируемых мРНК

В заключение этого раздела рассмотрим свидетельства о различиях в динамике и структуре самих рибосом, ассоциированных с мембранами органелл и локализованных в цитоплазме, а также о функциональной специализации рибосом, транслирующих различные пулы мРНК.

На разных этапах трансляционного цикла с рибосомой взаимодействуют десятки различных лигандов и партнеров. В случае двух популяций рибосом: свободных и ассоциированных с мембраной – состав ассоциированных с ними белков и прочих компонентов трансляционного аппарата может различаться. SRP-частица, которая взаимодействует с рибосомой на этапах распознавания SP или ТМД и транспортировки комплекса на мембрану ЭПР, относится к одному из таких компонентов. Согласно классическим представлениям, SRP распознает SP или ТМД по мере их появления из рибосомного тоннеля. Однако количество SRP в клетке крайне невелико, поэтому возникает вопрос, как обеспечивается эффективное сканирование всех транслирующих рибосом на наличие SP или ТМД. Chartron и соавт. [305] оригинально разрешают этот парадокс: SRP может быть ассоциирован с рибосомой, синтезирующей секретируемый белок, еще до появления N-концевого SP из рибосомного тоннеля. Согласно этой модели, первичное рекрутирование SPR на рибосому происходит независимо от сигнала в растущем пептиде, так как она предварительно связывается со специальными участками в 3'-НТО таких мРНК.

По мере синтеза и появления пептида из рибосомы с ним также может взаимодействовать уже упоминавшийся выше комплекс NAC. Для дрожжей показано [85, 306], что разные формы NAC (гетеродимеры αβ-NAC и αβ'-NAC) могут быть вовлечены в биогенез разных наборов белков за счет связывания различных субстратов. Комплексу αβ'-NAC отводится специфическая роль в биогенезе митохондриальных белков, поскольку он преимущественно связан с рибосомами, активно синтезирующими именно их.

Эти данные согласуются с гипотезой “рибосомного фильтра” и концепцией “специализированных рибосом”, согласно которым рибосомы и рибосомные комплексы гетерогенны по своему составу, что может обеспечивать селективную трансляцию различных пулов мРНК [307–310]. Помимо классических компонентов, упомянутых выше, гетерогенность может касаться и других ассоциированных с рибосомами белков. Например, в составе локализованных на мембране рибосом обнаружен белок PKM (мышечная пируваткиназа), проявляющий активность неканонического РНК-связыва-

ющего белка, специфичного для локализованных на ЭПР транскриптов [311]. Нельзя не упомянуть также идею “рибосомного кода” [312, 313], согласно которой разные паралоги рибосомных белков могут по-разному регулировать клеточные процессы – в том числе трансляцию локализованных мРНК [312]. У дрожжей 59 из 79 рибосомных белков кодируются паралогичными парами генов, и хотя их последовательности обычно характеризуются высоким процентом идентичности, удаление разных паралогов может приводить к различающимся фенотипам. Segev & Gerst [314] сообщали о мРНК-специфичной регуляции синтеза митохондриальных белков, которая обеспечивается пулом рибосом с разным составом белков-паралогов. Впрочем, некоторые авторы справедливо указывают на то, что аргументов в пользу концепции “специализированных рибосом” пока явно недостаточно [315].

МЕТОДЫ СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ В ИЗУЧЕНИИ ЛОКАЛИЗОВАННОЙ ТРАНСЛЯЦИИ

Многие из ярких открытий в области изучения локализованной трансляции, сделанных в последние годы и спровоцировавших взрывной рост интереса к этой теме, были бы невозможны без появления целого ряда новых экспериментальных подходов, основанных на методах системной биологии. Эти подходы позволяют проводить анализ локализации сразу большого числа мРНК и выявлять картину трансляции в целом. Появление микрочипов, а затем и высокопроизводительного секвенирования позволило определять набор мРНК, ассоциированных с теми или иными органеллами. Сначала это делали путем фракционирования цитоплазмы. Так был проведен полногеномный анализ транскриптома, ассоциированного с мембранами в клетках дрожжей и человека [2, 3], с митохондриями этих же организмов [88, 316, 317] и с пероксисомами мышей [129], а также определен набор транскриптов, локализованных в псевдоподиях мигрирующих фибробластов [173] и в отростках нейронов [318–320]. Позже был сделан рибосомный профайлинг (выделение и секвенирование фрагментов мРНК, заключенных в транслирующих рибосомах) мембранной фракции клеток или разных частей нейронов [7, 223].

Следующее поколение методов связано с прижизненной модификацией РНК, находящейся в интересующем компартменте, с последующим ее выделением и секвенированием. Такую локальную модификацию (в том числе биотинилирование или окисление оснований) можно осуществить прямо в живой клетке, если ввести в нее ген модифицирующего фермента (например, APEX или miniSOG), обеспечив белку соответствующую локализацию [5, 321, 322]. Подвергнуть локальному биотинилированию можно также РНК-связывающие белки, что после химической сшивки позволяет выделить РНК-белковые комплексы и получить таким образом еще больше информации [4, 323].

Крайне интересен метод проксимальноспецифичного рибосомного профайлинга, разработанный в лаборатории Дж. Вайсмана (J.S. Weissman) [8, 73]. Он позволяет пометить биотином и выделить только те рибосомы, которые в данный момент находятся в интересующем компартменте, а затем секвенировать заключенные в них фрагменты мРНК, которые они в этот момент транслировали. Используя такой вариант рибосомного профайлинга, авторы оценили динамику трансляции мРНК рибосомами, локализованными на мембранах ЭПР [8] и митохондрий [73].

Своеобразным апогеем “локальной транскриптомики” стал недавно разработанный метод секвенирования фрагментов РНК *in situ*, то есть прямо на фиксированном препарате клеток или тканей [324–326]. Так удается получать качественную и количественную информацию о распределении транскриптов на срезе или даже в трехмерном формате, хотя метод ограничен разрешением микроскопа.

Принципиально иной подход связан с развитием метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Этот метод даже в классическом своем варианте позволял собирать информацию по субклеточной локализации сотен и даже тысяч индивидуальных транскриптов [225], хотя для этого требовалось изготовление индивидуальных фиксированных препаратов. Современные же варианты FISH, с применением мультиплексирования, позволяют детектировать сотни и тысячи индивидуальных транскриптов одновременно и сразу в большом числе клеток [130, 226, 327–329]. В совокупности с прогрессивными методами флуоресцентной визуализации единичных молекул репортерных мРНК, появившимися в последнее время [330], это дает возможность оценить неоднородность в характере трансляции индивидуальных транскриптов. К недостаткам этих методов, по сравнению с подходами с использованием секвенирования, относится “аналоговый” принцип формирования сигнала, хотя именно технологии на основе FISH позволяют напрямую визуализировать расположение транскриптов в клетке.

Применение методов системной биологии позволило убедиться, что существенная доля мРНК (в зависимости от организма, вида клеток, стадии развития, условий и примененного метода – от нескольких процентов до ~3/4 выявляемых транскриптов) имеет в клетке четко детерминированную субклеточную локализацию: апикально-базальную, в протрузиях и местах клеточных

контактов, связанную с мембранами органелл, с центросомой, микротрубочками, различными видами гранул и т.д. [13, 225, 331–333]. Таким образом, адресная доставка мРНК с ее последующей локализованной трансляцией представляет исключительно важный механизм формирования внутриклеточных структур, компартментов и функционально отличающихся полюсов клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные выше факты позволяют заключить, что роль внутриклеточной локализации мРНК и локальной трансляции в поддержании целостности протеома и в нормальном функционировании эукариотической клетки, несомненно, высока. Изучение этих аспектов биосинтеза белка вызывает большой интерес в современной науке и активно развивается. Этому способствует постоянно расширяющийся арсенал разнообразных методов. Тем не менее нерешенных вопросов пока остается довольно много. Например, в то время как процессы котрансляционного рекрутирования рибосом на мембрану ЭПР и транслокация пептида в люмен описаны достаточно подробно, аналогичные события на митохондриях, а тем более в окрестностях других органелл нуждаются в более глубоком изучении. Неясен вклад “трансляционных фабрик” и прочих подобных РНК-конденсатов в процессы жизнедеятельности клетки, не изучена их структурная подоплека, практически отсутствуют данные о том, что происходит с этими элементами клетки под действием стресса, вирусной инфекции и других воздействий. Остаются нерешенными вопросы особенностей структуры трансляционных комплексов и регуляции биосинтеза белка в разных субклеточных компартментах. Тем не менее постоянно увеличивающееся число работ в области локализованной трансляции позволяет надеяться, что в ближайшее время многие из этих загадок будут решены и нас ждет еще много волнующих открытий.

Авторы благодарны Ларисе Мочаловой за обсуждение текста и ценные замечания. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (программа “Экспансия”, грант № 19-14-50309). Авторы являются членами Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета “Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология”.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Palade G.E. (1955) A small particulate component of the cytoplasm. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 59–68. https://doi.org/10.1083/jcb.1.1.59
2. Diehn M., Bhattacharya R., Botstein D., Brown P.O. (2006) Genome-scale identification of membrane-associated human mRNAs. *PLoS Genet.* **2**, e11. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020011
3. Diehn M., Eisen M.B., Botstein D., Brown P.O. (2000) Large-scale identification of secreted and membrane-associated gene products using DNA microarrays. *Nat. Genet.* **25**, 58–62. https://doi.org/10.1038/75603
4. Kaewsapsak P., Shechner D.M., Mallard W., Rinn J.L., Ting A.Y. (2017) Live-cell mapping of organelle-associated RNAs via proximity biotinylation combined with protein-RNA crosslinking. *eLife*. **6**, e29224. https://doi.org/10.7554/eLife.29224
5. Fazal F.M., Han S., Parker K.R., Kaewsapsak P., Xu J., Boettiger A.N., Chang H.Y., Ting A.Y. (2019) Atlas of subcellular RNA localization revealed by APEX-Seq. *Cell*. **178**, 473–490.e426. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.027
6. Lerner R.S., Seiser R.M., Zheng T., Lager P.J., Reedy M.C., Keene J.D., Nicchitta C.V. (2003) Partitioning and translation of mRNAs encoding soluble proteins on membrane-bound ribosomes. *RNA*. **9**, 1123–1137. https://doi.org/10.1261/rna.5610403
7. Reid D.W., Nicchitta C.V. (2012) Primary role for endoplasmic reticulum-bound ribosomes in cellular translation identified by ribosome profiling. *J. Biol. Chem.* **287**, 5518–5527. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.312280
8. Jan C.H., Williams C.C., Weissman J.S. (2014) Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science*. **346**, 1257521. https://doi.org/10.1126/science.1257521
9. Jagannathan S., Hsu J.C., Reid D.W., Chen Q., Thompson W.J., Moseley A.M., Nicchitta C.V. (2014) Multifunctional roles for the protein translocation machinery in RNA anchoring to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **289**, 25907–25924. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.580688
10. Voigt F., Zhang H., Cui X.A., Triebold D., Liu A.X., Eglinger J., Lee E.S., Chao J.A., Palazzo A.F. (2017) Single-molecule quantification of translation-dependent association of mRNAs with the endoplasmic reticulum. *Cell Rep.* **21**, 3740–3753. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.008
11. Hoffman A.M., Chen Q., Zheng T., Nicchitta C.V. (2019) Heterogeneous translational landscape of the endoplasmic reticulum revealed by ribosome proximity labeling and transcriptome analysis. *J. Biol. Chem.* **294**, 8942–8958. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007996
12. Kraut-Cohen J., Afanasieva E., Haim-Vilmovsky L., Slobodin B., Yosef I., Bibi E., Gerst J.E. (2013) Translation- and SRP-independent mRNA targeting to the endoplasmic reticulum in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*. **24**, 3069–3084. https://doi.org/10.1091/mbc.E13-01-0038
13. Weis B.L., Schleiff E., Zerges W. (2013) Protein targeting to subcellular organelles via MRNA localization. *Bio-*

chim. Biophys. Acta. **1833**, 260–273.
https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.004

14. Kraut-Cohen J., Gerst J.E. (2010) Addressing mRNAs to the ER: *cis* sequences act up! *Trends Biochem. Sci*. **35**, 459–469.
https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.02.006
15. Ma W., Mayr C. (2018) A membraneless organelle associated with the endoplasmic reticulum enables 3'UTR-mediated protein–protein interactions. *Cell*. **175**, 1492–1506, e1419.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.007
16. Blobel G., Sabatini D.D. (1971) Ribosome-membrane interaction in eukaryotic cells. In: *Biomembranes*. Ed. Manson L.A. Boston, MA.: Springer, 193–195.
https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3330-2_16
17. Blobel G., Dobberstein B. (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol*. **67**, 835–851.
https://doi.org/10.1083/jcb.67.3.835
18. Walter P., Ibrahimi I., Blobel G. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to *in-vitro*-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol*. **91**, 545–550.
https://doi.org/10.1083/jcb.91.2.545
19. Gilmore R., Blobel G., Walter P. (1982) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J. Cell Biol*. **95**, 463–469.
https://doi.org/10.1083/jcb.95.2.463
20. Nilsson I., Lara P., Hessa T., Johnson A.E., von Heijne G., Karamyshev A.L. (2015) The code for directing proteins for translocation across ER membrane: SRP cotranslationally recognizes specific features of a signal sequence. *J. Mol. Biol*. **427**, 1191–1201.
https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.06.014
21. Costa E.A., Subramanian K., Nunnari J., Weissman J.S. (2018) Defining the physiological role of SRP in protein-targeting efficiency and specificity. *Science*. **359**, 689–692.
https://doi.org/10.1126/science.aar3607
22. Matsuo Y., Inada T. (2021) The ribosome collision sensor Hel2 functions as preventive quality control in the secretory pathway. *Cell Rep*. **34**, 108877.
https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108877
23. Pfeffer S., Burbaum L., Unverdorben P., Pech M., Chen Y., Zimmermann R., Beckmann, R., Forster F. (2015) Structure of the native Sec61 protein-conducting channel. *Nat. Commun*. **6**, 8403.
https://doi.org/10.1038/ncomms9403
24. Voorhees R.M., Hegde R.S. (2016) Structure of the Sec61 channel opened by a signal sequence. *Science*. **351**, 88–91.
https://doi.org/10.1126/science.aad4992
25. Nyathi Y., Wilkinson B.M., Pool M.R. (2013) Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta*. **1833**, 2392–2402.
https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.021
26. Aviram N., Schuldiner M. (2017) Targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum at a glance. *J. Cell Sci*. **130**, 4079–4085.
https://doi.org/10.1242/jcs.204396
27. Hetz C., Papa F.R. (2018) The unfolded protein response and cell fate control. *Mol. Cell*. **69**, 169–181.
https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.017
28. Yanagitani K., Imagawa Y., Iwawaki T., Hosoda A., Saito M., Kimata Y., Kohno K. (2009) Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA. *Mol. Cell*. **34**, 191–200.
https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.033
29. Yanagitani K., Kimata Y., Kadokura H., Kohno K. (2011) Translational pausing ensures membrane targeting and cytoplasmic splicing of XBP1u mRNA. *Science*. **331**, 586–589.
https://doi.org/10.1126/science.1197142
30. Shanmuganathan V., Schiller N., Magoulopoulou A., Cheng J., Braunger K., Cymer F., Berninghausen O., Beatrix B., Kohno K., von Heijne G., Beckmann R. (2019) Structural and mutational analysis of the ribosome-arresting human XBP1u. *eLife*. **8**, e46267.
https://doi.org/10.7554/eLife.46267
31. Kanda S., Yanagitani K., Yokota Y., Esaki Y., Kohno K. (2016) Autonomous translational pausing is required for XBP1u mRNA recruitment to the ER via the SRP pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **113**, E5886–E5895.
https://doi.org/10.1073/pnas.1604435113
32. Plumb R., Zhang Z.R., Appathurai S., Mariappan M. (2015) A functional link between the co-translational protein translocation pathway and the UPR. *eLife*. **4**, e07426.
https://doi.org/10.7554/eLife.07426
33. Chen C.Y., Malchus N.S., Hehn B., Stelzer W., Avci D., Langosch D., Lemberg M.K. (2014) Signal peptide peptidase functions in ERAD to cleave the unfolded protein response regulator XBP1u. *EMBO J*. **33**, 2492–2506.
https://doi.org/10.15252/embj.201488208
34. Han P., Shichino Y., Schneider-Poetsch T., Mito M., Hashimoto S., Udagawa T., Kohno K., Yoshida M., Mishima Y., Inada T., Iwasaki S. (2020) Genome-wide survey of ribosome collision. *Cell Rep*. **31**, 107610.
https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107610
35. Mutka S.C., Walter P. (2001) Multifaceted physiological response allows yeast to adapt to the loss of the signal recognition particle-dependent protein-targeting pathway. *Mol. Biol. Cell*. **12**, 577–588.
https://doi.org/10.1091/mbc.12.3.577
36. Liu L., Liang X.H., Uliel S., Unger R., Ullu E., Michaeli S. (2002) RNA interference of signal peptide-binding protein SRP54 elicits deleterious effects and protein sorting defects in trypanosomes. *J. Biol. Chem*. **277**, 47348–47357.
https://doi.org/10.1074/jbc.M207736200
37. Ren Y.G., Wagner K.W., Knee D.A., Aza-Blanc P., Nasoff M., Deveraux Q.L. (2004) Differential regulation of the TRAIL death receptors DR4 and DR5 by the signal recognition particle. *Mol. Biol. Cell*. **15**, 5064–5074.
https://doi.org/10.1091/mbc.e04-03-0184
38. Johnson N., Powis K., High S. (2013) Post-translational translocation into the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta*. **1833**, 2403–2409.
https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.12.008
39. Shao S., Hegde R.S. (2011) A calmodulin-dependent translocation pathway for small secretory proteins. *Cell*. **147**, 1576–1588.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.048

40. Ast T., Schuldiner M. (2013) All roads lead to Rome (but some may be harder to travel): SRP-independent translocation into the endoplasmic reticulum. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 273–288. https://doi.org/10.3109/10409238.2013.782999
41. Borgese N., Coy-Vergara J., Colombo S.F., Schwappach B. (2019) The ways of tails: the GET pathway and more. *Protein J.* **38**, 289–305. https://doi.org/10.1007/s10930-019-09845-4
42. Liao G., Ma X., Liu G. (2011) An RNA-zipcode-independent mechanism that localizes Dia1 mRNA to the perinuclear ER through interactions between Dia1 nascent peptide and Rho-GTP. *J. Cell Sci.* **124**, 589–599. https://doi.org/10.1242/jcs.072421
43. Christensen A.K., Kahn L.E., Bourne C.M. (1987) Circular polysomes predominate on the rough endoplasmic reticulum of somatotropes and mammotropes in the rat anterior pituitary. *Am. J. Anat.* **178**, 1–10. https://doi.org/10.1002/aja.1001780102
44. Alekhina O.M., Terenin I.M., Dmitriev S.E., Vassilenko K.S. (2020) Functional cyclization of eukaryotic mRNAs. *Int. J. Mol. Sci.* **21,** 1677. https://doi.org/10.3390/ijms21051677
45. Pyhtila B., Zheng T., Lager P.J., Keene J.D., Reedy M.C., Nicchitta C.V. (2008) Signal sequence- and translation-independent mRNA localization to the endoplasmic reticulum. *RNA.* **14**, 445–453. https://doi.org/10.1261/rna.721108
46. Loya A., Pnueli L., Yosefzon Y., Wexler Y., Ziv-Ukelson M., Arava Y. (2008) The 3'-UTR mediates the cellular localization of an mRNA encoding a short plasma membrane protein. *RNA.* **14**, 1352–1365. https://doi.org/10.1261/rna.867208
47. Cohen-Zontag O., Baez C., Lim L.Q.J., Olender T., Schirman D., Dahary D., Pilpel Y., Gerst J.E. (2019) A secretion-enhancing cis regulatory targeting element (SECReTE) involved in mRNA localization and protein synthesis. *PLoS Genet.* **15**, e1008248. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008248
48. Ma W., Zhen G., Xie W., Mayr C. (2020) Unstructured mRNAs form multivalent RNA-RNA interactions to generate TIS granule networks. *bioRxiv.* 2020.02.14.949503. https://doi.org/10.1101/2020.02.14.949503
49. Cui X.A., Zhang H., Palazzo A.F. (2012) p180 promotes the ribosome-independent localization of a subset of mRNA to the endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* **10**, e1001336. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001336
50. Savitz A.J., Meyer D.I. (1990) Identification of a ribosome receptor in the rough endoplasmic reticulum. *Nature.* **346**, 540–544. https://doi.org/10.1038/346540a0
51. Ueno T., Kaneko K., Sata T., Hattori S., Ogawa-Goto K. (2012) Regulation of polysome assembly on the endoplasmic reticulum by a coiled-coil protein, p180. *Nucleic Acids Res.* **40**, 3006–3017. https://doi.org/10.1093/nar/gkr1197
52. Hsu J.C., Reid D.W., Hoffman A.M., Sarkar D., Nicchitta C.V. (2018) Oncoprotein AEG-1 is an endoplasmic reticulum RNA-binding protein whose interactome is enriched in organelle resident protein-encoding mRNAs. *RNA.* **24**, 688–703. https://doi.org/10.1261/rna.063313.117
53. Acosta-Alvear D., Karagoz G.E., Frohlich F., Li H., Walther T.C., Walter P. (2018) The unfolded protein response and endoplasmic reticulum protein targeting machineries converge on the stress sensor IRE1. *eLife.* **7**, e43036. https://doi.org/10.7554/eLife.43036
54. Genz C., Fundakowski J., Hermesh O., Schmid M., Jansen R.P. (2013) Association of the yeast RNA-binding protein She2p with the tubular endoplasmic reticulum depends on membrane curvature. *J. Biol. Chem.* **288**, 32384–32393. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.486431
55. Colomina N., Ferrezuelo F., Wang H., Aldea M., Gari E. (2008) Whi3, a developmental regulator of budding yeast, binds a large set of mRNAs functionally related to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **283**, 28670–28679. https://doi.org/10.1074/jbc.M804604200
56. Syed M.I., Moorthy B.T., Jenner A., Fetka I., Jansen R.P. (2018) Signal sequence-independent targeting of MID2 mRNA to the endoplasmic reticulum by the yeast RNA-binding protein Khd1p. *FEBS Lett.* **592**, 1870–1881. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13098
57. Castello A., Fischer B., Frese C.K., Horos R., Alleaume A.M., Foehr S., Curk T., Krijgsveld J., Hentze M.W. (2016) Comprehensive identification of RNA-binding domains in human cells. *Mol. Cell.* **63**, 696–710. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.029
58. Baltz A.G., Munschauer M., Schwanhausser B., Vasile A., Murakawa Y., Schueler M., Youngs N., Penfold-Brown D., Drew K., Milek M., Wyler E., Bonneau R., Selbach M., Dieterich C., Landthaler M. (2012) The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Mol. Cell.* **46**, 674–690. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.021
59. Bethune J., Jansen R.P., Feldbrugge M., Zarnack K. (2019) Membrane-associated RNA-binding proteins orchestrate organelle-coupled translation. *Trends Cell Biol.* **29**, 178–188. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.10.005
60. Kalies K.U., Gorlich D., Rapoport T.A. (1994) Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J. Cell Biol.* **126**, 925–934. https://doi.org/10.1083/jcb.126.4.925
61. Harada Y., Li H., Li H., Lennarz W.J. (2009) Oligosaccharyltransferase directly binds to ribosome at a location near the translocon-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 6945–6949. https://doi.org/10.1073/pnas.0812489106
62. Pfeffer S., Dudek J., Zimmermann R., Forster F. (2016) Organization of the native ribosome-translocon complex at the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **1860**, 2122–2129. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.024
63. Hansen K.G., Herrmann J.M. (2019) Transport of proteins into mitochondria. *Protein J.* **38**, 330–342. https://doi.org/10.1007/s10930-019-09819-6
64. Becker T., Song J., a Pfanner N. (2019) Versatility of preprotein transfer from the cytosol to mitochondria. *Trends Cell Biol.* **29**, 534–548. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.03.007

65. Wiedemann N., Pfanner N. (2017) Mitochondrial machineries for protein import and assembly. *Ann. Rev. Biochem*. **86**, 685–714. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014352
66. Kellems R.E., Butow R.A. (1972) Cytoplasmic-type 80 S ribosomes associated with yeast mitochondria. I. Evidence for ribosome binding sites on yeast mitochondria. *J. Biol. Chem*. **247**, 8043–8050.
67. Kellems R.E., Allison V.F., Butow R.A. (1974) Cytoplasmic type 80 S ribosomes associated with yeast mitochondria. II. Evidence for the association of cytoplasmic ribosomes with the outer mitochondrial membrane *in situ*. *J. Biol. Chem*. **249**, 3297–3303.
68. Suissa M., Schatz G. (1982) Import of proteins into mitochondria. Translatable mRNAs for imported mitochondrial proteins are present in free as well as mitochondria-bound cytoplasmic polysomes. *J. Biol. Chem*. **257**, 13048–13055.
69. Ades I.Z., Butow R.A. (1980) The products of mitochondria-bound cytoplasmic polysomes in yeast. *J. Biol. Chem*. **255**, 9918–9924.
70. Fujiki M., Verner K. (1993) Coupling of cytosolic protein synthesis and mitochondrial protein import in yeast. Evidence for cotranslational import *in vivo*. *J. Biol. Chem*. **268**, 1914–1920.
71. Mukhopadhyay A., Ni L., Weiner H. (2004) A cotranslational model to explain the *in vivo* import of proteins into HeLa cell mitochondria. *Biochem. J*. **382**, 385–392. https://doi.org/10.1042/BJ20040065
72. Yogev O., Karniely S., Pines O. (2007) Translation-coupled translocation of yeast fumarase into mitochondria *in vivo*. *J. Biol. Chem*. **282**, 29222–29229. https://doi.org/10.1074/jbc.M704201200
73. Williams C.C., Jan C.H., Weissman J.S. (2014) Targeting and plasticity of mitochondrial proteins revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science*. **346**, 748–751. https://doi.org/10.1126/science.1257522
74. MacKenzie J.A., Payne R.M. (2004) Ribosomes specifically bind to mammalian mitochondria via protease-sensitive proteins on the outer membrane. *J. Biol. Chem*. **279**, 9803–9810. https://doi.org/10.1074/jbc.M307167200
75. Gold V.A., Chroscicki P., Bragoszewski P., Chacinska A. (2017) Visualization of cytosolic ribosomes on the surface of mitochondria by electron cryo-tomography. *EMBO Rep*. **18**, 1786–1800. https://doi.org/10.15252/embr.201744261
76. Eliyahu E., Pnueli L., Melamed D., Scherrer T., Gerber A.P., Pines O., Rapaport D., Arava Y. (2010) Tom20 mediates localization of mRNAs to mitochondria in a translation-dependent manner. *Mol. Cell. Biol*. **30**, 284–294. https://doi.org/10.1128/MCB.00651-09
77. George R., Beddoe T., Landl K., Lithgow T. (1998) The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 2296–2301. https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2296
78. George R., Walsh P., Beddoe T., Lithgow T. (2002) The nascent polypeptide-associated complex (NAC) promotes interaction of ribosomes with the mitochondrial surface *in vivo*. *FEBS Lett*. **516**, 213–216. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)02528-0
79. Gamerdinger M., Hanebuth M.A., Frickey T., Deuerling E. (2015) The principle of antagonism ensures protein targeting specificity at the endoplasmic reticulum. *Science*. **348**, 201–207. https://doi.org/10.1126/science.aaa5335
80. Wiedmann B., Sakai H., Davis T.A., Wiedmann M. (1994) A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature*. **370**, 434–440. https://doi.org/10.1038/370434a0
81. Powers T., Walter P. (1996) The nascent polypeptide-associated complex modulates interactions between the signal recognition particle and the ribosome. *Curr. Biol*. **6**, 331–338. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)00484-0
82. Hsieh H.H., Lee J.H., Chandrasekar S., Shan S.O. (2020) A ribosome-associated chaperone enables substrate triage in a cotranslational protein targeting complex. *Nat. Commun*. **11**, 5840. https://doi.org/10.1038/s41467-020-19548-5
83. Funfschilling U., Rospert S. (1999) Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Mol. Biol. Cell*. **10**, 3289–3299. https://doi.org/10.1091/mbc.10.10.3289
84. Lesnik C., Cohen Y., Atir-Lande A., Schuldiner M., Arava Y. (2014) OM14 is a mitochondrial receptor for cytosolic ribosomes that supports co-translational import into mitochondria. *Nat. Commun*. **5**, 5711. https://doi.org/10.1038/ncomms6711
85. Ponce-Rojas J.C., Avendano-Monsalve M.C., Yanez-Falcon A.R., Jaimes-Miranda F., Garay E., Torres-Quiroz F., DeLuna A., Funes S. (2017) αβ'-NAC cooperates with Sam37 to mediate early stages of mitochondrial protein import. *FEBS J*. **284**, 814–830. https://doi.org/10.1111/febs.14024
86. Ahmed A.U., Fisher P.R. (2009) Import of nuclear-encoded mitochondrial proteins: a cotranslational perspective. *Int. Rev. Cell Mol. Biol*. **273**, 49–68. https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)01802-9
87. Lesnik C., Golani-Armon A., Arava Y. (2015) Localized translation near the mitochondrial outer membrane: an update. *RNA Biol*. **12**, 801–809. https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1058686
88. Sylvestre J., Vialette S., Corral Debrinski M., Jacq C. (2003) Long mRNAs coding for yeast mitochondrial proteins of prokaryotic origin preferentially localize to the vicinity of mitochondria. *Genome Biol*. **4**, R44. https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-7-r44
89. Gadir N., Haim-Vilmovsky L., Kraut-Cohen J., Gerst J.E. (2011) Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. **17**, 1551–1565. https://doi.org/10.1261/rna.2621111
90. Matsumoto, S., Uchiumi T., Saito T., Yagi M., Takazaki S., Kanki T., Kang D. (2012) Localization of mRNAs encoding human mitochondrial oxidative phosphorylation proteins. *Mitochondrion*. **12**, 391–398. https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.02.004
91. Zabezhinsky D., Slobodin B., Rapaport D., Gerst J.E. (2016) An essential role for COPI in mRNA localization to mitochondria and mitochondrial function. *Cell Rep*. **15**, 540–549. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.053
92. Sabharwal A., Sharma D., Vellarikkal S.K., Jayarajan R., Verma A., Senthivel V., Scaria V., Sivasubbu S. (2019) Organellar transcriptome sequencing reveals mito-

chondrial localization of nuclear encoded transcripts. *Mitochondrion*. **46**, 59–68.
https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.02.007

93. Golani-Armon A., Arava Y. (2016) Localization of nuclear-encoded mRNAs to mitochondria outer surface. *Biochemistry* (Mosc.). **81**, 1038–1043.
https://doi.org/10.1134/S0006297916100023
94. Sylvestre J., Margeot A., Jacq C., Dujardin G., Corral-Debrinski M. (2003) The role of the 3' untranslated region in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells. *Mol. Biol. Cell*. **14**, 3848–3856.
https://doi.org/10.1091/mbc.e03-02-0074
95. Garcia M., Delaveau T., Goussard S., Jacq C. (2010) Mitochondrial presequence and open reading frame mediate asymmetric localization of messenger RNA. *EMBO Rep*. **11**, 285–291.
https://doi.org/10.1038/embor.2010.17
96. Eliyahu E., Lesnik C., Arava Y. (2012) The protein chaperone Ssa1 affects mRNA localization to the mitochondria. *FEBS Lett*. **586**, 64–69.
https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.11.025
97. Corral-Debrinski M., Blugeon C., Jacq C. (2000) In yeast, the 3' untranslated region or the presequence of ATM1 is required for the exclusive localization of its mRNA to the vicinity of mitochondria. *Mol. Cell. Biol*. **20**, 7881–7892.
https://doi.org/10.1128/mcb.20.21.7881-7892.2000
98. Poulsen T.M., Imai K., Frith M.C., Horton P. (2019) Hallmarks of slow translation initiation revealed in mitochondrially localizing mRNA sequences. *bioRxiv*. 614255.
https://doi.org/10.1101/614255
99. Lin Y., Li F., Huang L., Polte C., Duan H., Fang J., Sun L., Xing X., Tian G., Cheng Y., Ignatova Z., Yang X., Wolf D.A. (2020) eIF3 associates with 80S ribosomes to promote translation elongation, mitochondrial homeostasis, and muscle health. *Mol. Cell*. **79**, 575–587.e7.
https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.06.003
100. Schatton D., Rugarli E.I. (2018) A concert of RNA-binding proteins coordinates mitochondrial function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. **53**, 652–666.
https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1553927
101. Gerber A.P., Herschlag D., Brown P.O. (2004) Extensive association of functionally and cytotopically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol*. **2**, E79.
https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020079
102. Jacobs Anderson J.S., Parker R. (2000) Computational identification of *cis*-acting elements affecting post-transcriptional control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*. **28**, 1604–1617.
https://doi.org/10.1093/nar/28.7.1604
103. Saint-Georges Y., Garcia M., Delaveau, T., Jourdren L., Le Crom S., Lemoine S., Tanty V., Devaux F., Jacq C. (2008) Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization. *PLoS One*. **3**, e2293.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002293
104. Quenault T., Lithgow T., Traven A. (2011) PUF proteins: repression, activation and mRNA localization. *Trends Cell Biol*. **21**, 104–112.
https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.09.013
105. Lee C.D., Tu B.P. (2015) Glucose-regulated phosphorylation of the PUF protein Puf3 regulates the translational fate of its bound mRNAs and association with RNA granules. *Cell Rep*. **11**, 1638–1650.
https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.05.014
106. Kershaw C.J., Costello J.L., Talavera D., Rowe W., Castelli L.M., Sims P.F., Grant C.M., Ashe M.P., Hubbard S.J., Pavitt G.D. (2015) Integrated multi-omics analyses reveal the pleiotropic nature of the control of gene expression by Puf3p. *Sci. Rep*. **5**, 15518.
https://doi.org/10.1038/srep15518
107. Lapointe C.P., Stefely J.A., Jochem A., Hutchins P.D., Wilson G.M., Kwiecien N.W., Coon J.J., Wickens M., Pagliarini D.J. (2018) Multi-omics reveal specific targets of the RNA-binding protein Puf3p and its orchestration of mitochondrial biogenesis. *Cell Syst*. **6**, 125–135.e6.
https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.11.012
108. Wang Z., Sun X., Wee J., Guo X., Gu Z. (2019) Novel insights into global translational regulation through Pumilio family RNA-binding protein Puf3p revealed by ribosomal profiling. *Curr. Genet*. **65**, 201–212.
https://doi.org/10.1007/s00294-018-0862-4
109. Qin W., Myers S.A., Carey D.K., Carr S.A., Ting A.Y. (2020) Functional proximity mapping of RNA binding proteins uncovers a mitochondrial mRNA anchor that promotes stress recovery. *bioRxiv*. 2020.11.17.387209.
https://doi.org/10.1101/2020.11.17.387209
110. Gehrke S., Wu Z., Klinkenberg M., Sun Y., Auburger G., Guo S., Lu B. (2015) PINK1 and Parkin control localized translation of respiratory chain component mRNAs on mitochondria outer membrane. *Cell Metab*. **21**, 95–108.
https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.007
111. Zhang Y., Wang Z. H., Liu Y., Chen Y., Sun N., Gucek M., Zhang, F., Xu H. (2019) PINK1 inhibits local protein synthesis to limit transmission of deleterious mitochondrial DNA mutations. *Mol. Cell*. **73**, 1127–1137.e1125.
https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.013
112. Zhang Y., Chen Y., Gucek M., Xu H. (2016) The mitochondrial outer membrane protein MDI promotes local protein synthesis and mtDNA replication. *EMBO J*. **35**, 1045–1057.
https://doi.org/10.15252/embj.201592994
113. Gao J., Schatton D., Martinelli P., Hansen H., Pla-Martin D., Barth E., Becker C., Altmueller J., Frommolt P., Sardiello M., Rugarli E.I. (2014) CLUH regulates mitochondrial biogenesis by binding mRNAs of nuclear-encoded mitochondrial proteins. *J. Cell Biol*. **207**, 213–223.
https://doi.org/10.1083/jcb.201403129
114. Schatton D., Pla-Martin D., Marx M.C., Hansen H., Mourier A., Nemazanyy I., Pessia A., Zentis P., Corona T., Kondylis V., Barth E., Schauss A.C., Velagapudi V., Rugarli E.I. (2017) CLUH regulates mitochondrial metabolism by controlling translation and decay of target mRNAs. *J. Cell Biol*. **216**, 675–693.
https://doi.org/10.1083/jcb.201607019
115. Sen A., Kalvakuri S., Bodmer R., Cox R.T. (2015) Clueless, a protein required for mitochondrial function, interacts with the PINK1-Parkin complex in *Drosophila*. *Dis. Model. Mech*. **8**, 577–589.
https://doi.org/10.1242/dmm.019208
116. Sen A., Cox R.T. (2016) Clueless is a conserved ribonucleoprotein that binds the ribosome at the mitochondrial outer membrane. *Biol. Open*. **5**, 195–203.
https://doi.org/10.1242/bio.015313

117. Giacomello M., Pellegrini L. (2016) The coming of age of the mitochondria-ER contact: a matter of thickness. *Cell Death Differ.* **23**, 1417–1427. https://doi.org/10.1038/cdd.2016.52
118. Shimizu S. (2019) Organelle zones in mitochondria. *J. Biochem.* **165**, 101–107. https://doi.org/10.1093/jb/mvy068
119. Yogev O., Pines O. (2011) Dual targeting of mitochondrial proteins: mechanism, regulation and function. *Biochim. Biophys. Acta.* **1808**, 1012–1020. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.07.004
120. Hansen K.G., Aviram N., Laborenz J., Bibi C., Meyer M., Spang A., Schuldiner M., Herrmann J.M. (2018) An ER surface retrieval pathway safeguards the import of mitochondrial membrane proteins in yeast. *Science.* **361**, 1118–1122. https://doi.org/10.1126/science.aar8174
121. Farre J.C., Mahalingam S.S., Proietto M., Subramani S. (2019) Peroxisome biogenesis, membrane contact sites, and quality control. *EMBO Rep.* **20**(1), e46864. https://doi.org/10.15252/embr.201846864
122. Islinger M., Voelkl A., Fahimi H.D., Schrader M. (2018) The peroxisome: an update on mysteries 2.0. *Histochem. Cell Biol.* **150**, 443–471. https://doi.org/10.1007/s00418-018-1722-5
123. Mayerhofer P.U., Bano-Polo M., Mingarro I., Johnson A.E. (2016) Human peroxin PEX3 is co-translationally integrated into the ER and exits the ER in budding vesicles. *Traffic.* **17**, 117–130. https://doi.org/10.1111/tra.12350
124. Ast J., Stiebler A.C., Freitag J., Bolker, M. (2013) Dual targeting of peroxisomal proteins. *Front. Physiol.* **4**, 297. https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00297
125. Jungreis I., Chan C.S., Waterhouse R.M., Fields G., Lin M.F., Kellis M. (2016) Evolutionary dynamics of abundant stop codon readthrough. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 3108–3132. https://doi.org/10.1093/molbev/msw189
126. Schueren F., Thoms S. (2016) Functional translational readthrough: a systems biology perspective. *PLoS Genet.* **12**, e1006196. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006196
127. Haimovich G., Cohen-Zontag O., Gerst J.E. (2016) A role for mRNA trafficking and localized translation in peroxisome biogenesis and function? *Biochim. Biophys. Acta.* **1863**, 911–921. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.007
128. Zipor G., Haim-Vilmovsky L., Gelin-Licht R., Gadir N., Brocard C., Gerst J.E. (2009) Localization of mRNAs coding for peroxisomal proteins in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 19848–19853. https://doi.org/10.1073/pnas.0910754106
129. Yarmishyn A.A., Kremenskoy M., Batagov A.O., Preuss A., Wong J.H., Kurochkin I.V. (2016) Genome-wide analysis of mRNAs associated with mouse peroxisomes. *BMC Genomics.* **17**, 1028. https://doi.org/10.1186/s12864-016-3330-x
130. Chouaib R., Safieddine A., Pichon X., Imbert A., Kwon O.S., Samacoits A., Traboulsi A.M., Robert M.C., Tsanov N., Coleno E., Poser I., Zimmer C., Hyman A., Le Hir H., Zibara K., Peter M., Mueller F., Walter T., Bertrand E. (2020) A dual protein-mRNA localization screen reveals compartmentalized translation and widespread co-translational RNA targeting. *Dev. Cell.* **54**(6), 773–791.e5. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.07.010
131. Baumann S., Konig J., Koepke J., Feldbrugge M. (2014) Endosomal transport of septin mRNA and protein indicates local translation on endosomes and is required for correct septin filamentation. *EMBO Rep.* **15**, 94–102. https://doi.org/10.1002/embr.201338037
132. Higuchi Y., Ashwin P., Roger Y., Steinberg G. (2014) Early endosome motility spatially organizes polysome distribution. *J. Cell Biol.* **204**, 343–357. https://doi.org/10.1083/jcb.201307164
133. Cioni J.M., Lin J.Q., Holtermann A.V., Koppers M., Jakobs M.A.H., Azizi A., Turner-Bridger B., Shigeoka T., Franze K., Harris W.A., Holt C.E. (2019) Late endosomes act as mRNA translation platforms and sustain mitochondria in axons. *Cell.* **176**, 56–72.e15. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.030
134. McLeod T., Abdullahi A., Li M., Brogna S. (2014) Recent studies implicate the nucleolus as the major site of nuclear translation. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1224–1228. https://doi.org/10.1042/BST20140062
135. Reid D.W., Nicchitta C.V. (2012) The enduring enigma of nuclear translation. *J. Cell Biol.* **197**, 7–9. https://doi.org/10.1083/jcb.201202140
136. Dahlberg J., Lund E. (2012) Nuclear translation or nuclear peptidyl transferase? *Nucleus.* **3**, 320–321. https://doi.org/10.4161/nucl.20754
137. Allfrey V.G. (1954) Amino acid incorporation by isolated thymus nuclei. I. The role of desoxyribonucleic acid in protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **40**, 881–885. https://doi.org/10.1073/pnas.40.10.881
138. Allfrey V.G., Mirsky A.E. (1955) Protein synthesis in isolated cell nuclei. *Nature.* **176**, 1042–1049. https://doi.org/10.1038/1761042a0
139. Стволинская Н.С., Газарян К.Г. (1976) Проблема внутриядерного синтеза белков. *Цитология.* **18**, 125–138.
140. Goidl J.A., Canaani D., Boublik M., Weissbach H., Dickerman H. (1975) Polyanion-induced release of polyribosomes from HeLa cell nuclei. *J. Biol. Chem.* **250**, 9198–9205.
141. Birnstiel M.L., Hyde B.B. (1963) Protein synthesis by isolated pea nucleoli. *J. Cell Biol.* **18**, 41–50. https://doi.org/10.1083/jcb.18.1.41
142. Pena C., Hurt E., Panse V.G. (2017) Eukaryotic ribosome assembly, transport and quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 689–699. https://doi.org/10.1038/nsmb.3454
143. Espinar-Marchena F.J., Babiano R., Cruz J. (2017) Placeholder factors in ribosome biogenesis: please, pave my way. *Microb. Cell.* **4**, 144–168. https://doi.org/10.15698/mic2017.05.572
144. Dahlberg J.E., Lund E., Goodwin E.B. (2003) Nuclear translation: what is the evidence? *RNA.* **9**, 1–8. https://doi.org/10.1261/rna.2121703
145. Al-Jubran K., Wen J., Abdullahi A., Roy Chaudhury S., Li M., Ramanathan P., Matina A., De S., Piechocki K., Rugjee K.N., Brogna S. (2013) Visualization of the joining of ribosomal subunits reveals the presence of 80S ribosomes in the nucleus. *RNA.* **19**, 1669–1683. https://doi.org/10.1261/rna.038356.113

146. Baboo S., Cook P.R. (2014) “Dark matter” worlds of unstable RNA and protein. *Nucleus*. **5**, 281–286. https://doi.org/10.4161/nucl.29577
147. Yewdell J.W., David A. (2013) Nuclear translation for immunosurveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 17612–17613. https://doi.org/10.1073/pnas.1318259110
148. Apcher S., Millot G., Daskalogianni C., Scherl A., Manoury B., Fahraeus R. (2013) Translation of pre-spliced RNAs in the nuclear compartment generates peptides for the MHC class I pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 17951–17956. https://doi.org/10.1073/pnas.1309956110
149. Martins R.P., Malbert-Colas L., Lista M.J., Daskalogianni C., Apcher S., Pla M., Findakly S., Blondel M., Fahraeus R. (2019) Nuclear processing of nascent transcripts determines synthesis of full-length proteins and antigenic peptides. *Nucleic Acids Res*. **47**, 3086–3100. https://doi.org/10.1093/nar/gky1296
150. Iborra F.J., Jackson D.A., Cook P.R. (2001) Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science*. **293**, 1139–1142. https://doi.org/10.1126/science.1061216
151. Kim S.H., Koroleva O.A., Lewandowska D., Pendle A.F., Clark G.P., Simpson C.G., Shaw P.J., Brown J.W. (2009) Aberrant mRNA transcripts and the nonsense-mediated decay proteins UPF2 and UPF3 are enriched in the *Arabidopsis* nucleolus. *Plant Cell*. **21**, 2045–2057. https://doi.org/10.1105/tpc.109.067736
152. Baboo S., Bhushan B., Jiang H., Grovenor C.R., Pierre P., Davis B.G., Cook P.R. (2014) Most human proteins made in both nucleus and cytoplasm turn over within minutes. *PLoS One*. **9**, e99346. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099346
153. Lykke-Andersen J., Shu M.D., Steitz J.A. (2000) Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell*. **103**, 1121–1131. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00214-2
154. Wilkinson M.F., Shyu A.B. (2002) RNA surveillance by nuclear scanning? *Nat. Cell Biol*. **4**, E144–E147. https://doi.org/10.1038/ncb0602-e144
155. Iborra F.J., Jackson D.A., Cook P.R. (2004) The case for nuclear translation. *J. Cell Sci*. **117**, 5713–5720. https://doi.org/10.1242/jcs.01538
156. David A., Dolan B.P., Hickman H.D., Knowlton J.J., Clavarino G., Pierre P., Bennink J.R., Yewdell J.W. (2012) Nuclear translation visualized by ribosome-bound nascent chain puromycylation. *J. Cell Biol*. **197**, 45–57. https://doi.org/10.1083/jcb.201112145
157. Enam S.U., Zinshteyn B., Goldman D.H., Cassani M., Livingston N.M., Seydoux G., Green R. (2020) Puromycin reactivity does not accurately localize translation at the subcellular level. *eLife*. **9**, e60303. https://doi.org/10.7554/eLife.60303
158. Hobson B.D., Kong L., Hartwick E.W., Gonzalez R.L., Sims P.A. (2020) Elongation inhibitors do not prevent the release of puromycylated nascent polypeptide chains from ribosomes. *eLife*. **9**, e60048. https://doi.org/10.7554/eLife.60048
159. Ivanov P., Kedersha N., Anderson P. (2019) Stress granules and processing bodies in translational control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. **11**(5), a032813. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032813
160. Corbet G.A., Parker R. (2019) RNP Granule formation: lessons from P-bodies and stress granules. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*. **84**, 203–215. https://doi.org/10.1101/sqb.2019.84.040329
161. Banani S.F., Lee H.O., Hyman A.A., Rosen M.K. (2017) Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **18**, 285–298. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7
162. Zhang H., Elbaum-Garfinkle S., Langdon E.M., Taylor N., Occhipinti P., Bridges A.A., Brangwynne C.P., Gladfelter A.S. (2015) RNA controls polyQ protein phase transitions. *Mol. Cell*. **60**, 220–230. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.017
163. Langdon E.M., Qiu Y., Ghanbari Niaki A., McLaughlin G.A., Weidmann C.A., Gerbich T.M., Smith J.A., Crutchley J.M., Termini C.M., Weeks K.M., Myong S., Gladfelter A.S. (2018) mRNA structure determines specificity of a polyQ-driven phase separation. *Science*. **360**, 922–927. https://doi.org/10.1126/science.aar7432
164. Van Treeck B., Parker R. (2018) Emerging roles for intermolecular RNA-RNA interactions in RNP assemblies. *Cell*. **174**, 791–802. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.023
165. Begovich K., Wilhelm J.E. (2020) An in vitro assembly system identifies roles for RNA nucleation and ATP in yeast stress granule formation. *Mol. Cell*. **79**, 991–1007.e4. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.07.017
166. Kershaw C.J., Nelson M.G., Lui J., Bates C.P., Jennings M.D., Hubbard S.J., Ashe M.P., Grant C.M. (2020) Integrated multi-omics reveals common properties underlying stress granule and P-body formation. *bioRxiv*. 2020.05.18.102517. https://doi.org/10.1101/2020.05.18.102517
167. Davidson A., Parton R.M., Rabouille C., Weil T.T., Davis I. (2016) Localized translation of gurken/TGF-alpha mRNA during axis specification is controlled by access to Orb/CPEB on processing bodies. *Cell Rep*. **14**, 2451–2462. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.038
168. Weil T.T., Parton R.M., Herpers B., Soetaert J., Veenendaal T., Xanthakis D., Dobbie I.M., Halstead J.M., Hayashi R., Rabouille C., Davis I. (2012) *Drosophila* patterning is established by differential association of mRNAs with P bodies. *Nat. Cell Biol*. **14**, 1305–1313. https://doi.org/10.1038/ncb2627
169. Cougot N., Molza A.E., Giudice E., Cavalier A., Thomas D., Gillet R. (2013) Structural organization of the polysomes adjacent to mammalian processing bodies (P-bodies). *RNA Biol*. **10**, 314–320. https://doi.org/10.4161/rna.23342
170. Moon S.L., Morisaki T., Khong A., Lyon K., Parker R., Stasevich T.J. (2019) Multicolour single-molecule tracking of mRNA interactions with RNP granules. *Nat. Cell Biol*. **21**, 162–168. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0263-4
171. Mateju D., Eichenberger B., Voigt F., Eglinger J., Roth G., Chao J.A. (2020) Single-molecule imaging reveals translation of mRNAs localized to stress granules. *Cell*. **183**, 1801–1812.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.010

172. Yasuda K., Zhang H., Loiselle D., Haystead T., Macara I.G., Mili S. (2013) The RNA-binding protein Fus directs translation of localized mRNAs in APC-RNP granules. *J. Cell Biol.* **203**, 737–746. https://doi.org/10.1083/jcb.201306058
173. Mili S., Moissoglu K., Macara I.G. (2008) Genome-wide screen reveals APC-associated RNAs enriched in cell protrusions. *Nature.* **453**, 115–119. https://doi.org/10.1038/nature06888
174. Buchan J.R. (2014) mRNP granules. Assembly, function, and connections with disease. *RNA Biol.* **11**, 1019–1030. https://doi.org/10.4161/15476286.2014.972208
175. Moujaber O., Stochaj U. (2018) Cytoplasmic RNA granules in somatic maintenance. *Gerontology.* **64**, 485–494. https://doi.org/10.1159/000488759
176. van Leeuwen W., Rabouille C. (2019) Cellular stress leads to the formation of membraneless stress assemblies in eukaryotic cells. *Traffic.* **20**, 623–638. https://doi.org/10.1111/tra.12669
177. Burke J.M., Lester E.T., Tauber D., Parker R. (2020) RNase L promotes the formation of unique ribonucleoprotein granules distinct from stress granules. *J. Biol. Chem.* **295**, 1426–1438. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011638
178. Pimentel J., Boccaccio G.L. (2014) Translation and silencing in RNA granules: a tale of sand grains. *Front. Mol. Neurosci.* **7**, 68. https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00068
179. Formicola N., Vijayakumar J., Besse F. (2019) Neuronal ribonucleoprotein granules: dynamic sensors of localized signals. *Traffic.* **20**, 639–649. https://doi.org/10.1111/tra.12672
180. Bramham C.R., Wells D.G. (2007) Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 776–789. https://doi.org/10.1038/nrn2150
181. Graber T.E., Hebert-Seropian S., Khoutorsky A., David A., Yewdell J.W., Lacaille J.C., Sossin W.S. (2013) Reactivation of stalled polyribosomes in synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 16205–16210. https://doi.org/10.1073/pnas.1307747110
182. Tatavarty V., Ifrim M.F., Levin M., Korza G., Barbarese E., Yu J., Carson J.H. (2012) Single-molecule imaging of translational output from individual RNA granules in neurons. *Mol. Biol. Cell.* **23**, 918–929. https://doi.org/10.1091/mbc.E11-07-0622
183. Batish M., van den Bogaard P., Kramer F.R., Tyagi S. (2012) Neuronal mRNAs travel singly into dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 4645–4650. https://doi.org/10.1073/pnas.1111226109
184. Schisa J.A. (2012) New insights into the regulation of RNP granule assembly in oocytes. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **295**, 233–289. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394306-4.00013-7
185. Kotani T., Maehata K., Takei N. (2017) Regulation of translationally repressed mRNAs in zebrafish and mouse oocytes. *Results Probl. Cell Differ.* **63**, 297–324. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6_13
186. Winata C.L., Korzh V. (2018) The translational regulation of maternal mRNAs in time and space. *FEBS Lett.* **592**, 3007–3023. https://doi.org/10.1002/1873-3468.13183
187. Horie M., Kotani T. (2016) Formation of mos RNA granules in the zebrafish oocyte that differ from cyclin B1 RNA granules in distribution, density and regulation. *Eur. J. Cell Biol.* **95**, 563–573. https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.10.001
188. Kloc M., Dougherty M.T., Bilinski S., Chan A.P., Brey E., King M.L., Patrick C.W., Jr., Etkin L.D. (2002) Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus. Dev. Biol.* **241**, 79–93. https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0488
189. Kloc M., Bilinski S., Chan A.P., Etkin L.D. (2001) Mitochondrial ribosomal RNA in the germinal granules in *Xenopus* embryos revisited. *Differentiation.* **67**, 80–83. https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2001.067003080.x
190. Kobayashi S., Amikura R., Okada M. (1994) Localization of mitochondrial large rRNA in germinal granules and the consequent segregation of germ line. *Int. J. Dev. Biol.* **38**, 193–199.
191. Merry T.L., Chan A., Woodhead J.S.T., Reynolds J.C., Kumaga H., Kim S.J., Lee C. (2020) Mitochondrial-derived peptides in energy metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **319**, E659–E666. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00249.2020
192. Lui J., Castelli L.M., Pizzinga M., Simpson C.E., Hoyle N.P., Bailey K.L., Campbell S.G., Ashe M.P. (2014) Granules harboring translationally active mRNAs provide a platform for P-body formation following stress. *Cell Rep.* **9**, 944–954. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.040
193. Morales-Polanco F., Bates C., Lui J., Casson J., Solari C.A., Pizzinga M., Forte G., Griffin C., Garner K.E.L., Burt H.E., Dixon H.L., Hubbard S., Portela P., Ashe M.P. (2021) Core Fermentation (CoFe) granules focus coordinated glycolytic mRNA localization and translation to fuel glucose fermentation. *iScience.* **24**, 102069. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102069
194. Pizzinga M., Bates C., Lui J., Forte G., Morales-Polanco F., Linney E., Knotkova B., Wilson B., Solari C.A., Berchowitz L.E., Portela P., Ashe M.P. (2019) Translation factor mRNA granules direct protein synthetic capacity to regions of polarized growth. *J. Cell Biol.* **218**, 1564–1581. https://doi.org/10.1083/jcb.201704019
195. Pichon X., Bastide A., Safieddine A., Chouaib R., Samacoits A., Basyuk E., Peter M., Mueller F., Bertrand E. (2016) Visualization of single endogenous polysomes reveals the dynamics of translation in live human cells. *J. Cell Biol.* **214**, 769–781. https://doi.org/10.1083/jcb.201605024
196. Nair R.R., Zabezhinsky D., Gelin-Licht R., Haas B., Dyhr M.C.A., Sperber H.S., Nusbaum C., Gerst J.E. (2020) Multiplexed mRNA assembly into ribonucleoprotein particles plays an operon-like role in the control of yeast cell physiology. *bioRxiv.* 2020.06.28.175851. https://doi.org/10.1101/2020.06.28.175851
197. Schwarz A., Beck M. (2019) The benefits of cotranslational assembly: a structural perspective. *Trends Cell Biol.* **29**, 791–803. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.07.006
198. Bertolini M., Fenzl K., Kats I., Wruck F., Tippmann F., Schmitt J., Auburger J.J., Tans S., Bukau B., Kramer G. (2021) Interactions between nascent proteins translated by adjacent ribosomes drive homomer assembly. *Science.* **371**, 57–64. https://doi.org/10.1126/science.abc7151

199. Shiber A., Doring K., Friedrich U., Klann K., Merker D., Zedan M., Tippmann F., Kramer G., Bukau B. (2018) Cotranslational assembly of protein complexes in eukaryotes revealed by ribosome profiling. *Nature.* **561**, 268–272. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0462-y
200. Duncan C.D., Mata J. (2011) Widespread cotranslational formation of protein complexes. *PLoS Genet.* **7**, e1002398. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002398
201. Kassem S., Villanyi Z., Collart M.A. (2017) Not5-dependent co-translational assembly of Ada2 and Spt20 is essential for functional integrity of SAGA. *Nucleic Acids Res.* **45**, 1186–1199. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1059
202. Liu F., Jones D.K., de Lange W.J., Robertson G.A. (2016) Cotranslational association of mRNA encoding subunits of heteromeric ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**, 4859–4864. https://doi.org/10.1073/pnas.1521577113
203. Kamenova I., Mukherjee P., Conic S., Mueller F., El-Saafin F., Bardot P., Garnier J.M., Dembele D., Capponi S., Timmers H.T.M., Vincent S.D., Tora L. (2019) Co-translational assembly of mammalian nuclear multisubunit complexes. *Nat. Commun.* **10**, 1740. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09749-y
204. Panasenko O.O., Somasekharan S.P., Villanyi Z., Zagatti M., Bezrukov F., Rashpa R., Cornut J., Iqbal J., Longis M., Carl S.H., Pena C., Panse V.G., Collart M.A. (2019) Co-translational assembly of proteasome subunits in NOT1-containing assemblysomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 110–120. https://doi.org/10.1038/s41594-018-0179-5
205. Moissoglu K., Stueland M., Gasparski A.N., Wang T., Jenkins L.M., Hastings M.L., Mili S. (2020) RNA localization and co-translational interactions control RAB13 GTPase function and cell migration. *EMBO J.* **39**, e104958. https://doi.org/10.15252/embj.2020104958
206. Wagner S., Herrmannova A., Hronova V., Gunisova S., Sen N.D., Hannan R.D., Hinnebusch A.G., Shirokikh N.E., Preiss T., Valasek L.S. (2020) Selective translation complex profiling reveals staged initiation and co-translational sssembly of initiation factor complexes. *Mol. Cell.* **79**(4), 546–560.e7. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.06.004
207. Villanyi Z., Ribaud V., Kassem S., Panasenko O.O., Pahi Z., Gupta I., Steinmetz L., Boros I., Collart M.A. (2014) The Not5 subunit of the ccr4-not complex connects transcription and translation. *PLoS Genet.* **10**, e1004569. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004569
208. Willett M., Flint S.A., Morley S.J., Pain V.M. (2006) Compartmentalisation and localisation of the translation initiation factor (eIF) 4F complex in normally growing fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **312**, 2942–2953. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.05.020
209. Willett M., Brocard M., Davide A., Morley S.J. (2011) Translation initiation factors and active sites of protein synthesis co-localize at the leading edge of migrating fibroblasts. *Biochem. J.* **438**, 217–227. https://doi.org/10.1042/BJ20110435
210. Gray N.K., Hrabalkova L., Scanlon J.P., Smith R.W. (2015) Poly(A)-binding proteins and mRNA localization: who rules the roost? *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 1277–1284. https://doi.org/10.1042/BST20150171
211. Campbell S.G., Hoyle N.P., Ashe M.P. (2005) Dynamic cycling of eIF2 through a large eIF2B-containing cytoplasmic body: implications for translation control. *J. Cell Biol.* **170**, 925–934. https://doi.org/10.1083/jcb.200503162
212. Koppers M., Cagnetta R., Shigeoka T., Wunderlich L.C., Vallejo-Ramirez P., Qiaojin Lin J., Zhao S., Jakobs M.A., Dwivedy A., Minett M.S., Bellon A., Kaminski C.F., Harris W.A., Flanagan J.G., Holt C.E. (2019) Receptor-specific interactome as a hub for rapid cue-induced selective translation in axons. *eLife.* **8**, e48718. https://doi.org/10.7554/eLife.48718
213. Tcherkezian J., Brittis P.A., Thomas F., Roux P.P., Flanagan J.G. (2010) Transmembrane receptor DCC associates with protein synthesis machinery and regulates translation. *Cell.* **141**, 632–644. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.008
214. Wang D.O., Kim S.M., Zhao Y., Hwang H., Miura S.K., Sossin W.S., Martin K.C. (2009) Synapse- and stimulus-specific local translation during long-term neuronal plasticity. *Science.* **324**, 1536–1540. https://doi.org/10.1126/science.1173205
215. Hoyle N.P., Ashe M.P. (2008) Subcellular localization of mRNA and factors involved in translation initiation. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 648–652. https://doi.org/10.1042/BST0360648
216. Chudinova E.M., Nadezhdina E.S. (2018) Interactions between the translation machinery and microtubules. Biochemistry (Mosc.). **83**, S176–S189. https://doi.org/10.1134/S0006297918140146
217. Lawrence J.B., Singer R.H. (1986) Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell.* **45**, 407–415. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90326-0
218. Mingle L.A., Okuhama N.N., Shi J., Singer R.H., Condeelis J., Liu G. (2005) Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *J. Cell Sci.* **118**, 2425–2433. https://doi.org/10.1242/jcs.02371
219. Condeelis J., Singer R.H. (2005) How and why does beta-actin mRNA target? *Biol. Cell.* **97**, 97–110. https://doi.org/10.1042/BC20040063
220. Chaudhuri A., Das S., Das B. (2020) Localization elements and zip codes in the intracellular transport and localization of messenger RNAs in *Saccharomyces cerevisiae. Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* **11**(4), e1591. https://doi.org/10.1002/wrna.1591
221. Weil T.T. (2014) mRNA localization in the *Drosophila* germline. *RNA Biol.* **11**, 1010–1018. https://doi.org/10.4161/rna.36097
222. Lasko P. (2012) mRNA localization and translational control in *Drosophila* oogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**(10), a012294. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012294
223. Zappulo A., van den Bruck D., Ciolli Mattioli C., Franke V., Imami K., McShane E., Moreno-Estelles M., Calviello L., Filipchyk A., Peguero-Sanchez E., Muller T., Woehler A., Birchmeier C., Merino E., Rajewsky N., Ohler U., Mazzoni E.O., Selbach M., Akalin A., Chekulaeva M. (2017) RNA localization is a key determinant of neurite-enriched proteome. *Nat. Commun.* **8**, 583. https://doi.org/10.1038/s41467-017-00690-6

224. Shigeoka T., Koppers M., Wong H.H., Lin J.Q., Cagnetta R., Dwivedy A., de Freitas Nascimento J., van Tartwijk F.W., Strohl F., Cioni J.M., Schaeffer J., Carrington M., Kaminski C.F., Jung H., Harris W.A., Holt C.E. (2019) On-site ribosome remodeling by locally synthesized ribosomal proteins in axons. *Cell Rep.* **29**, 3605–3619.e10. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.025

225. Wilk R., Hu J., Blotsky D., Krause H.M. (2016) Diverse and pervasive subcellular distributions for both coding and long noncoding RNAs. *Genes Dev.* **30**, 594–609. https://doi.org/10.1101/gad.276931.115

226. Lecuyer E., Yoshida H., Parthasarathy N., Alm C., Babak T., Cerovina T., Hughes T.R., Tomancak P., Krause H.M. (2007) Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell.* **131**, 174–187. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.003

227. Dermit M., Dodel M., Lee F.C.Y., Azman M.S., Schwenzer H., Jones J.L., Blagden S.P., Ule J., Mardakheh F.K. (2020) Subcellular mRNA localization regulates ribosome biogenesis in migrating cells. *Dev. Cell.* **55**, 298–313.e10. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.10.006

228. Kashida S., Wang D.O., Saito H., Gueroui Z. (2019) Nanoparticle-based local translation reveals mRNA as a translation-coupled scaffold with anchoring function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **116**, 13346–13351. https://doi.org/10.1073/pnas.1900310116

229. Chabanon H., Mickleburgh I., Hesketh J. (2004) Zipcodes and postage stamps: mRNA localisation signals and their trans-acting binding proteins. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **3**, 240–256. https://doi.org/10.1093/bfgp/3.3.240

230. Andreassi C., Riccio A. (2009) To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. *Trends Cell Biol.* **19**, 465–474. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.06.001

231. Bullock S.L. (2011) Messengers, motors and mysteries: sorting of eukaryotic mRNAs by cytoskeletal transport. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1161–1165. https://doi.org/10.1042/BST0391161

232. Marchand V., Gaspar I., Ephrussi A. (2012) An intracellular transmission control protocol: assembly and transport of ribonucleoprotein complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 202–210. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.12.014

233. Song T., Zheng Y., Wang Y., Katz Z., Liu X., Chen S., Singer R.H., Gu W. (2015) Specific interaction of KIF11 with ZBP1 regulates the transport of β-actin mRNA and cell motility. *J. Cell Sci.* **128**, 1001–1010. https://doi.org/10.1242/jcs.161679

234. Huttelmaier S., Zenklusen D., Lederer M., Dictenberg J., Lorenz M., Meng X., Bassell G.J., Condeelis J., Singer R.H. (2005) Spatial regulation of β-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature.* **438**, 512–515. https://doi.org/10.1038/nature04115

235. Jønson L., Vikesaa J., Krogh A., Nielsen L. K., Hansen T., Borup R., Johnsen A.H., Christiansen J., Nielsen F.C. (2007) Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules. *Mol. Cell. Proteomics.* **6**, 798–811. https://doi.org/10.1074/mcp.M600346-MCP200

236. Abouward R., Schiavo G. (2020) Walking the line: mechanisms underlying directional mRNA transport and localisation in neurons and beyond. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 2665–2681. https://doi.org/10.1007/s00018-020-03724-3

237. Dalla Costa I., Buchanan C.N., Zdradzinski M.D., Sahoo P.K., Smith T.P., Thames E., Kar A.N., Twiss J.L. (2021) The functional organization of axonal mRNA transport and translation. *Nat. Rev. Neurosci.* **22**, 77–91. https://doi.org/10.1038/s41583-020-00407-7

238. Cosker K.E., Fenstermacher S.J., Pazyra-Murphy M.F., Elliott H.L., Segal R.A. (2016) The RNA-binding protein SFPQ orchestrates an RNA regulon to promote axon viability. *Nat. Neurosci.* **19**, 690–696. https://doi.org/10.1038/nn.4280

239. Kim E., Jung H. (2020) Local mRNA translation in long-term maintenance of axon health and function. *Curr. Opin. Neurobiol.* **63**, 15–22. https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.01.006

240. Baumann S., Komissarov A., Gili M., Ruprecht V., Wieser S., Maurer S.P. (2020) A reconstituted mammalian APC-kinesin complex selectively transports defined packages of axonal mRNAs. *Sci. Adv.* **6**, eaaz1588. https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz1588

241. Bergalet J., Lecuyer E. (2014) The functions and regulatory principles of mRNA intracellular trafficking. *Adv. Exp. Med. Biol.* **825**, 57–96. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1221-6_2

242. Chin A., Lecuyer E. (2017) RNA localization: making its way to the center stage. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1861**, 2956–2970. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.06.011

243. Lazzaretti D., Bono F. (2017) mRNA localization in metazoans: a structural perspective. *RNA Biol.* **14**, 1473–1484. https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1338231

244. Paquin N., Menade M., Poirier G., Donato D., Drouet E., Chartrand P. (2007) Local activation of yeast ASH1 mRNA translation through phosphorylation of Khd1p by the casein kinase Yck1p. *Mol. Cell.* **26**, 795–809. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.016

245. Andreassi C., Luisier R., Crerar H., Darsinou M., Blokzijl-Franke S., Lenn T., Luscombe N.M., Cuda G., Gaspari M., Saiardi A., Riccio A. (2021) Cytoplasmic cleavage of IMPA1 3' UTR is necessary for maintaining axon integrity. *Cell Rep.* **34**, 108778. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108778

246. Moissoglu K., Yasuda K., Wang T., Chrisafis G., Mili S. (2019) Translational regulation of protrusion-localized RNAs involves silencing and clustering after transport. *eLife.* **8**, e44752. https://doi.org/10.7554/eLife.44752

247. Forrest K.M., Gavis E.R. (2003) Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **13**, 1159–1168.

248. Semotok J.L., Lipshitz H.D. (2007) Regulation and function of maternal mRNA destabilization during early Drosophila development. *Differentiation.* **75**, 482–506. https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00178.x

249. Blower M.D., Feric E., Weis K., Heald R. (2007) Genome-wide analysis demonstrates conserved localiza-

tion of messenger RNAs to mitotic microtubules. *J. Cell Biol.* **179**, 1365–1373.
https://doi.org/10.1083/jcb.200705163

250. Alliegro M.C. (2011) The centrosome and spindle as a ribonucleoprotein complex. *Chromosome Res.* **19**, 367–376.
https://doi.org/10.1007/s10577-011-9186-7

251. Blower M.D., Nachury M., Heald R., Weis K. (2005) A Rae1-containing ribonucleoprotein complex is required for mitotic spindle assembly. *Cell.* **121**, 223–234.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.016

252. Rosic S., Kohler F., Erhardt S. (2014) Repetitive centromeric satellite RNA is essential for kinetochore formation and cell division. *J. Cell Biol.* **207**, 335–349.
https://doi.org/10.1083/jcb.201404097

253. Mamon L.A., Ginanova V.R., Kliver S.F., Yakimova A.O., Atsapkina A.A., Golubkova E.V. (2017) RNA-binding proteins of the NXF (nuclear export factor) family and their connection with the cytoskeleton. *Cytoskeleton.* **74**, 161–169.
https://doi.org/10.1002/cm.21362

254. Ito K.K., Watanabe K., Kitagawa D. (2020) The emerging role of ncRNAs and RNA-binding proteins in mitotic apparatus formation. *Noncoding RNA.* **6**(1), 13.
https://doi.org/10.3390/ncrna6010013

255. Groisman I., Huang Y.S., Mendez R., Cao Q., Theurkauf W., Richter J.D. (2000) CPEB, maskin, and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: implications for local translational control of cell division. *Cell.* **103**, 435–447.

256. Fingerhut J.M., Yamashita Y.M. (2020) mRNA localization mediates maturation of cytoplasmic cilia in *Drosophila* spermatogenesis. *J. Cell Biol.* **219**, e202003084.
https://doi.org/10.1083/jcb.202003084

257. Amato R., Morleo M., Giaquinto L., di Bernardo D., Franco B. (2014) A network-based approach to dissect the cilia/centrosome complex interactome. *BMC Genomics.* **15**, 658.
https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-658

258. Muller H., Schmidt D., Steinbrink S., Mirgorodskaya E., Lehmann V., Habermann K., Dreher F., Gustavsson N., Kessler T., Lehrach H., Herwig R., Gobom J., Ploubidou A., Boutros M., Lange B.M. (2010) Proteomic and functional analysis of the mitotic *Drosophila* centrosome. *EMBO J.* **29**, 3344–3357.
https://doi.org/10.1038/emboj.2010.210

259. Davies A.H., Barrett I., Pambid M.R., Hu K., Stratford A.L., Freeman S., Berquin I.M., Pelech S., Hieter P., Maxwell C., Dunn S.E. (2011) YB-1 evokes susceptibility to cancer through cytokinesis failure, mitotic dysfunction and HER2 amplification. *Oncogene.* **30**, 3649–3660.
https://doi.org/10.1038/onc.2011.82

260. Iaconis D., Monti M., Renda M., van Koppen A., Tammaro R., Chiaravalli M., Cozzolino F., Pignata P., Crina C., Pucci P., Boletta A., Belcastro V., Giles R.H., Surace E.M., Gallo S., Pende M., Franco B. (2017) The centrosomal OFD1 protein interacts with the translation machinery and regulates the synthesis of specific targets. *Sci. Rep.* **7**, 1224.
https://doi.org/10.1038/s41598-017-01156-x

261. Lambert J.D., Nagy L.M. (2002) Asymmetric inheritance of centrosomally localized mRNAs during embryonic cleavages. *Nature.* **420**, 682–686.
https://doi.org/10.1038/nature01241

262. Ryder P.V., Fang J., Lerit D.A. (2020) centrocortin RNA localization to centrosomes is regulated by FMRP and facilitates error-free mitosis. *J. Cell Biol.* **219**, e202004101.
https://doi.org/10.1083/jcb.202004101

263. Safieddine A., Coleno E., Salloum S., Imbert A., Traboulsi A.M., Kwon O.S., Lionneton F., Georget V., Robert M.C., Gostan T., Lecellier C.H., Chouaib R., Pichon X., Le Hir H., Zibara K., Mueller F., Walter T., Peter M., Bertrand E. A choreography of centrosomal mRNAs reveals a conserved localization mechanism involving active polysome transport. *Nat. Commun.* **12**, 1352.
https://doi.org/10.1038/s41467-021-21585-7

264. Romero-Brey I., Bartenschlager R. (2014) Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. *Viruses.* **6**, 2826–2857.
https://doi.org/10.3390/v6072826

265. Paul D., Madan V., Bartenschlager R. (2014) Hepatitis C virus RNA replication and assembly: living on the fat of the land. *Cell Host Microbe.* **16**, 569–579.
https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.10.008

266. Reid D.W., Campos R.K., Child J.R., Zheng T., Chan K.W.K., Bradrick S.S., Vasudeva, S.G., Garcia-Blanco M.A., Nicchitta C.V. (2018) Dengue virus selectively annexes endoplasmic reticulum-associated translation machinery as a strategy for co-opting host cell protein synthesi. *J. Virol.* **92**, e01766-17.
https://doi.org/10.1128/JVI.01766-17

267. Ropidi M.I.M., Khazali A.S., Rashid N. N., Yusof R. (2020) Endoplasmic reticulum: a focal point of Zika virus infection. *J. Biomed. Sci.* **27**, 27.
https://doi.org/10.1186/s12929-020-0618-6

268. Knoops K., Kikkert M., Worm, S. H., Zevenhoven-Dobbe J.C., van der Meer Y., Koster A.J., Mommaas A.M., Snijder E.J. (2008) SARS-coronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum. *PLoS Biol.* **6**, e226.
https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060226

269. Ulasli M., Verheije M.H., de Haan C.A., Reggiori F. (2010) Qualitative and quantitative ultrastructural analysis of the membrane rearrangements induced by coronavirus. *Cell. Microbiol.* **12**, 844–861.
https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01437.x

270. Haimovich G., Olender T., Baez C., Gerst J.E. (2020) Identification and enrichment of SECReTE *cis*-acting RNA elements in the *Coronaviridae* and other (+) single-strand RNA viruses. *bioRxiv.* 2020.04.20.050088.
https://doi.org/10.1101/2020.04.20.050088

271. Wu K.E., Fazal F.M., Parker K.R., Zou J., Chang H.Y. (2020) RNA-GPS predicts SARS-CoV-2 RNA residency to host mitochondria and nucleolus. *Cell Syst.* **11**, 102–108.e3.
https://doi.org/10.1016/j.cels.2020.06.008

272. Somasundaran M., Zapp M.L., Beattie L.K., Pang L., Byron K.S., Bassell G.J., Sullivan J.L., Singer R.H. (1994) Localization of HIV RNA in mitochondria of infected cells: potential role in cytopathogenicity. *J. Cell Biol.* **126**, 1353–1360.
https://doi.org/10.1083/jcb.126.6.1353

273. Sanz M.A., Castello A., Ventoso I., Berlanga J.J., Carrasco L. (2009) Dual mechanism for the translation of subgenomic mRNA from Sindbis virus in infected and

uninfected cells. *PLoS One*. **4**, e4772.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004772

274. Desmet E.A., Anguish L.J., Parker J.S. (2014) Virus-mediated compartmentalization of the host translational machinery. *mBio*. **5**, e01463–01414.
https://doi.org/10.1128/mBio.01463-14

275. V'Kovski P., Gerber M., Kelly J., Pfaender S., Ebert N., Braga Lagache S., Simillion C., Portmann J., Stalder H., Gaschen V., Bruggmann R., Stoffel M.H., Heller M., Dijkman R., Thiel V. (2019) Determination of host proteins composing the microenvironment of coronavirus replicase complexes by proximity-labeling. *eLife*. **8**, e42037.
https://doi.org/10.7554/eLife.42037

276. Kastan J.P., Dobrikova E.Y., Bryant J.D., Gromeier M. (2020) CReP mediates selective translation initiation at the endoplasmic reticulum. *Sci. Adv.* **6**, eaba0745.
https://doi.org/10.1126/sciadv.aba0745

277. Walsh D., Arias C., Perez C., Halladin D., Escandon M., Ueda T., Watanabe-Fukunaga R., Fukunaga R., Mohr I. (2008) Eukaryotic translation initiation factor 4F architectural alterations accompany translation initiation factor redistribution in poxvirus-infected cells. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2648–2658.
https://doi.org/10.1128/MCB.01631-07

278. Katsafanas G.C., Moss B. (2020) Specific Anchoring and local translation of poxviral ATI mRNA at cytoplasmic inclusion bodies. *J. Virol.* **94**, e01671-19.
https://doi.org/10.1128/JVI.01671-19

279. Ng C.S., Jogi M., Yoo J.S., Onomoto K., Koike S., Iwasaki T., Yoneyama M., Kato H., Fujita T. (2013) Encephalomyocarditis virus disrupts stress granules, the critical platform for triggering antiviral innate immune responses. *J. Virol.* **87**, 9511–9522.
https://doi.org/10.1128/JVI.03248-12

280. Bonenfant G., Williams N., Netzband R., Schwarz M.C., Evans M.J., Pager C.T. (2019) Zika virus subverts stress granules to promote and restrict viral gene expression. *J. Virol.* **93**, e00520-19.
https://doi.org/10.1128/JVI.00520-19

281. Nikolic J., Civas A., Lama Z., Lagaudriere-Gesbert C., Blondel D. (2016) Rabies virus infection induces the formation of stress granules closely connected to the viral factories. *PLoS Pathog*. **12**, e1005942.
https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005942

282. Robinson C.-A., Kleer M., Mulloy R.P., Castle E.L., Boudreau B.Q., Corcoran J.A. (2020) Human coronaviruses disassemble processing bodies. *bioRxiv*. 2020.11.08.372995.
https://doi.org/10.1101/2020.11.08.372995

283. Luo L., Li Z., Zhao T., Ju X., Ma P., Jin B., Zhou Y., He S., Huang J., Xu X., Zou Y., Li P., Liang A., Liu J., Chi T., Huang X., Ding Q., Jin Z., Huang C., Zhang Y. (2021) SARS-CoV-2 nucleocapsid protein phase separates with G3BPs to disassemble stress granules and facilitate viral production. *Sci. Bull.* (Beijing).
https://doi.org/10.1016/j.scib.2021.01.013

284. Savastano A., Ibanez de Opakua A., Rankovic M., Zweckstetter M. (2020) Nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 phase separates into RNA-rich polymerase-containing condensates. *Nat. Commun.* **11**, 6041.
https://doi.org/10.1038/s41467-020-19843-1

285. Perdikari T.M., Murthy A.C., Ryan V.H., Watters S., Naik M.T., Fawzi N.L. (2020) SARS-CoV-2 nucleocapsid protein phase-separates with RNA and with human hnRNPs. *EMBO J.* **39**(24), e106478.
https://doi.org/10.15252/embj.2020106478

286. Reineke L.C., Lloyd R.E. (2013) Diversion of stress granules and P-bodies during viral infection. *Virology*. **436**, 255–267.
https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.11.017

287. McCormick C., Khaperskyy D.A. (2017) Translation inhibition and stress granules in the antiviral immune response. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 647–660.
https://doi.org/10.1038/nri.2017.63

288. Doh J.H., Lutz S., Curcio M.J. (2014) Co-translational localization of an LTR-retrotransposon RNA to the endoplasmic reticulum nucleates virus-like particle assembly sites. *PLoS Genet.* **10**, e1004219.
https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004219

289. Doucet A.J., Hulme A.E., Sahinovic E., Kulpa D.A., Moldovan J.B., Kopera H.C., Athanikar J.N., Hasnaoui M., Bucheton A., Moran J.V., Gilbert N. (2010) Characterization of LINE-1 ribonucleoprotein particles. *PLoS Genet.* **6**, e1001150.
https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001150

290. Goodier J.L., Zhang L., Vetter M.R., Kazazian H.H., Jr. (2007) LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6469–6483.
https://doi.org/10.1128/MCB.00332-07

291. Mita P., Wudzinska A., Sun X., Andrade J., Nayak S., Kahler D.J., Badri S., LaCava J., Ueberheide B., Yun C.Y., Fenyo D., Boeke J.D. (2018) LINE-1 protein localization and functional dynamics during the cell cycle. *eLife*. **7**, e30058.
https://doi.org/10.7554/eLife.30058

292. Goodier J.L., Mandal P.K., Zhang L., Kazazian H.H., Jr. (2010) Discrete subcellular partitioning of human retrotransposon RNAs despite a common mechanism of genome insertion. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1712–1725.
https://doi.org/10.1093/hmg/ddq048

293. Potter M.D., Nicchitta C.V. (2000) Regulation of ribosome detachment from the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **275**, 33828–33835.
https://doi.org/10.1074/jbc.M005294200

294. Nicchitta C.V., Lerner R.S., Stephens S.B., Dodd R.D., Pyhtila B. (2005) Pathways for compartmentalizing protein synthesis in eukaryotic cells: the template-partitioning model. *Biochem. Cell Biol.* **83**, 687–695.
https://doi.org/10.1139/o05-147

295. Jagannathan S., Reid D.W., Cox A.H., Nicchitta C.V. (2014) *De novo* translation initiation on membrane-bound ribosomes as a mechanism for localization of cytosolic protein mRNAs to the endoplasmic reticulum. *RNA*. **20**, 1489–1498.
https://doi.org/10.1261/rna.045526.114

296. Reid D.W., Nicchitta C.V. (2015) Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 221–223.
https://doi.org/10.1038/nrm3958

297. Stephens S.B., Dodd R.D., Brewer J.W., Lager P.J., Keene J.D., Nicchitta C.V. (2005) Stable ribosome binding to the endoplasmic reticulum enables compartment-specific regulation of mRNA translation. *Mol. Biol. Cell*. **16**, 5819–5831.
https://doi.org/10.1091/mbc.e05-07-0685

298. Lerner R.S., Nicchitta C.V. (2006) mRNA translation is compartmentalized to the endoplasmic reticulum

following physiological inhibition of cap-dependent translation. *RNA*. **12**, 775–789.
https://doi.org/10.1261/rna.2318906

299. Reid D.W., Chen Q., Tay A.S., Shenolikar S., Nicchitta C.V. (2014) The unfolded protein response triggers selective mRNA release from the endoplasmic reticulum. *Cell*. **158**, 1362–1374.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.012
300. Staudacher J.J., Naarmann-de Vries I.S., Ujvari S.J., Klinger B., Kasim M., Benko E., Ostareck-Lederer A., Ostareck D.H., Bondke Persson A., Lorenzen S., Meier J.C., Bluthgen N., Persson P.B., Henrion-Caude A., Mrowka R., Fahling M. (2015) Hypoxia-induced gene expression results from selective mRNA partitioning to the endoplasmic reticulum. *Nucleic Acids Res*. **43**, 3219–3236.
https://doi.org/10.1093/nar/gkv167
301. Reid D.W., Nicchitta C.V. (2015) Comment on "Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling". *Science*. **348**, 1217.
https://doi.org/10.1126/science.aaa7257
302. Jan C.H., Williams C.C., Weissman J.S. (2015) Response to Comment on "Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling". *Science*. **348**, 1217.
https://doi.org/10.1126/science.aaa8299
303. Unsworth H., Raguz S., Edwards H.J., Higgins C.F., Yague E. (2010) mRNA escape from stress granule sequestration is dictated by localization to the endoplasmic reticulum, *FASEB J*. **24**, 3370–3380.
https://doi.org/10.1096/fj.09-151142
304. Sivan G., Kedersha N., Elroy-Stein O. (2007) Ribosomal slowdown mediates translational arrest during cellular division. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 6639–6646.
https://doi.org/10.1128/MCB.00798-07
305. Chartron J.W., Hunt K.C., Frydman J. (2016) Cotranslational signal-independent SRP preloading during membrane targeting. *Nature*. **536**, 224–228.
https://doi.org/10.1038/nature19309
306. del Alamo M., Hogan D.J., Pechmann S., Albanese V., Brown P.O., Frydman J. (2011) Defining the specificity of cotranslationally acting chaperones by systematic analysis of mRNAs associated with ribosome-nascent chain complexes. *PLoS Biol.* **9**, e1001100.
https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001100
307. Mauro V.P., Edelman G.M. (2007) The ribosome filter redux. *Cell Cycle*. **6**, 2246–2251.
https://doi.org/10.4161/cc.6.18.4739
308. Shi Z., Fujii K., Kovary K.M., Genuth N.R., Rost H.L., Teruel M.N., Barna M. (2017) Heterogeneous ribosomes preferentially translate distinct subpools of mRNAs genome-wide. *Mol. Cell*. **67**, 71–83.e77.
https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.021
309. Genuth N.R., Barna M. (2018) Heterogeneity and specialized functions of translation machinery: from genes to organisms. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 431–452.
https://doi.org/10.1038/s41576-018-0008-z
310. Emmott E., Jovanovic M., Slavov N. (2019) Ribosome stoichiometry: from form to function. *Trends Biochem. Sci.* **44**, 95–109.
https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.10.009
311. Simsek D., Tiu G.C., Flynn R.A., Byeon G.W., Leppek K., Xu A.F., Chang H.Y., Barna M. (2017) The mammalian ribo-interactome reveals ribosome functional diversity and heterogeneity. *Cell*. **169**, 1051–1065.e18.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.022
312. Komili S., Farny N.G., Roth F.P., Silver P.A. (2007) Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell*. **131**, 557–571.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.037
313. Gerst J.E. (2018) Pimp my ribosome: ribosomal protein paralogs specify translational control. *Trends Genet.* **34**, 832–845.
https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.08.004
314. Segev N., Gerst J.E. (2018) Specialized ribosomes and specific ribosomal protein paralogs control translation of mitochondrial proteins. *J. Cell Biol.* **217**, 117–126.
https://doi.org/10.1083/jcb.201706059
315. Ferretti M.B., Karbstein K. (2019) Does functional specialization of ribosomes really exist? *RNA*. **25**, 521–538.
https://doi.org/10.1261/rna.069823.118
316. Marc P., Margeot A., Devaux F., Blugeon C., Corral-Debrinski M., Jacq C. (2002) Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep.* **3**, 159–164.
https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf025
317. Mercer T.R., Neph S., Dinger M.E., Crawford J., Smith M.A., Shearwood A.M., Haugen E., Bracken C.P., Rackham O., Stamatoyannopoulos J.A., Filipovska A., Mattick J.S. (2011) The human mitochondrial transcriptome. *Cell*. **146**, 645–658.
https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.051
318. Minis A., Dahary D., Manor O., Leshkowitz D., Pilpel Y., Yaron A. (2014) Subcellular transcriptomics-dissection of the mRNA composition in the axonal compartment of sensory neurons. *Dev. Neurobiol.* **74**, 365–381.
https://doi.org/10.1002/dneu.22140
319. Gumy L.F., Yeo G.S., Tung Y.C., Zivraj K.H., Willis D., Coppola G., Lam B.Y., Twiss J.L., Holt C.E., Fawcett J.W. (2011) Transcriptome analysis of embryonic and adult sensory axons reveals changes in mRNA repertoire localization *RNA*. **17**, 85–98.
https://doi.org/10.1261/rna.2386111
320. Taylor A.M., Berchtold N.C., Perreau V.M., Tu C.H., Li Jeon N., Cotman C.W. (2009) Axonal mRNA in uninjured and regenerating cortical mammalian axons. *J. Neurosci.* **29**, 4697–4707.
https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6130-08.2009
321. Padron A., Iwasaki S., Ingolia N.T. (2019) Proximity RNA labeling by APEX-Seq reveals the organization of translation initiation complexes and repressive RNA granules. *Mol. Cell*. **75**, 875–887.e5.
https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.030
322. Wang P., Tang W., Li Z., Zo, Z., Zhou Y., Li R., Xiong T., Wang J., Zou P. (2019) Mapping spatial transcriptome with light-activated proximity-dependent RNA labeling, *Nat. Chem. Biol.* **15**, 1110–1119.
https://doi.org/10.1038/s41589-019-0368-5
323. Benhalevy D., Anastasakis D.G., Hafner M. (2018) Proximity-CLIP provides a snapshot of protein-occupied RNA elements in subcellular compartments. *Nat. Methods*. **15**, 1074–1082.
https://doi.org/10.1038/s41592-018-0220-y
324. Lee J.H., Daugharthy E.R., Scheiman J., Kalhor R., Yang J.L., Ferrante T.C., Terry R., Jeanty S.S., Li C., Amamoto R., Peters D.T., Turczyk B.M., Marblestone A.H., Invers S.A., Bernard A., Mali P., Rios X., Aach J., Church G.M. (2014) Highly multiplexed sub-

cellular RNA sequencing *in situ*. *Science*. **343**, 1360–1363.
https://doi.org/10.1126/science.1250212

325. Wang X., Allen W.E., Wright M.A., Sylwestrak E.L., Samusik N., Vesuna S., Evans K., Liu C., Ramakrishnan C., Liu J., Nolan G.P., Bava F.A., Deisseroth K. (2018) Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science*. **361**(6400), eaat5691.
https://doi.org/10.1126/science.aat5691
326. Fürth D., Hatini V., Lee J.H. (2019) *In situ* transcriptome accessibility sequencing (INSTA-seq). *bioRxiv*. 722819.
https://doi.org/10.1101/722819
327. Chen K.H., Boettiger A.N., Moffitt J.R., Wang S., Zhuang X. (2015) RNA imaging. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science*. **348**, aaa6090.
https://doi.org/10.1126/science.aaa6090
328. Eng C.L., Lawson M., Zhu Q., Dries R., Koulena N., Takei Y., Yun J., Cronin C., Karp C., Yuan G.C., Cai L. (2019) Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seqFISH. *Nature*. **568**, 235–239.
https://doi.org/10.1038/s41586-019-1049-y
329. Xia C., Fan J., Emanuel G., Hao J., Zhuang X. (2019) Spatial transcriptome profiling by MERFISH reveals subcellular RNA compartmentalization and cell cycle-dependent gene expression *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **116**, 19490–19499.
https://doi.org/10.1073/pnas.1912459116
330. Biswas J., Liu Y., Singer R.H., Wu B. (2019) Fluorescence imaging methods to investigate translation in single cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11**, a032722.
https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032722
331. Koppel I., Fainzilber M. (2018) Omics approaches for subcellular translation studies. *Mol. Omics*. **14**, 380–388.
https://doi.org/10.1039/c8mo00172c
332. Taliaferro J.M. (2019) Classical and emerging techniques to identify and quantify localized RNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. **10**, e1542.
https://doi.org/10.1002/wrna.1542
333. Buxbaum A.R., Haimovich G., Singer R.H. (2015) In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 95–109.
https://doi.org/10.1038/nrm3918

mRNA TARGETING, TRANSPORT AND LOCAL TRANSLATION IN EUKARYOTIC CELLS: FROM THE CLASSICAL VIEW TO A DIVERSITY OF NEW CONCEPTS

K. A. Lashkevich[1] and S. E. Dmitriev[1, 2, 3, *]

[1] *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*
[2] *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*
[3] *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*
**e-mail: sergey.dmitriev@belozersky.msu.ru*

Spatial organization of protein biosynthesis in the eukaryotic cell has been studied for more than fifty years, thus many facts have already been included in textbooks. According to the classical view, mRNAs encoding secreted and transmembrane proteins are translated by ribosomes associated with endoplasmic reticulum membranes, while soluble cytoplasmic proteins are synthesized on free polysomes. However, in the last few years, new data has emerged, revealing selective translation of mRNA on mitochondria and plastids, in proximity to peroxisomes and endosomes, in various granules and at the cytoskeleton (actin network, vimentin intermediate filaments, microtubules and centrosomes). There are also long-standing debates about the possibility of protein synthesis in the nucleus. Localized translation can be determined by targeting signals in the synthesized protein, nucleotide sequences in the mRNA itself, or both. With RNA-binding proteins, many transcripts can be assembled into specific RNA condensates and form RNP particles, which may be transported by molecular motors to the sites of active translation, form granules and provoke liquid-liquid phase separation in the cytoplasm, both under normal conditions and during cellular stress. The translation of some mRNAs occurs in specialized "translation factories", assemblysomes, transperons and other structures necessary for the correct folding of proteins, interaction with functional partners and formation of oligomeric complexes. Intracellular localization of mRNA has a significant impact on the efficiency of its translation and presumably determines its response to cell stress. Compartmentalization of mRNAs and the translation machinery also plays an important role in viral infections. Many viruses provoke the formation of specific intracellular structures, virus factories, for the production of their proteins. Here we review the current concepts of the molecular mechanisms of transport, selective localization and local translation of cellular and viral mRNAs, their effects on protein targeting and topogenesis, and on the regulation of protein biosynthesis in different compartments of the eukaryotic cell. Special attention is paid to new systems biology approaches, providing new cues to the study of localized translation.

Keywords: localized translation, endoplasmic reticulum, mitochondria, nuclear translation, translation factories, assemblysomes, viral factories, stress granules, mRNA transport

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 5, с. 829–845

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.29

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУБКЛОНАЛЬНОЙ СТРУКТУРЫ ОПУХОЛИ ПО ДАННЫМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ НА ПРИМЕРЕ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ И АКРАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ

© 2021 г.
Г. С. Краснов[a], Л. Г. Гукасян[a], И. С. Абрамов[a], Т. В. Наседкина[a], *

[a] *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия*

**e-mail: nased@biochip.ru*

Поступила в редакцию 10.11.2020 г.
После доработки 15.12.2020 г.
Принята к публикации 15.12.2020 г.

Внутриопухолевая гетерогенность и клональная изменчивость опухоли, приводящие к развитию устойчивости к терапии, появлению рецидивов и метастазов, представляют собой одну из центральных проблем клинической онкологии. Высокопроизводительное секвенирование экзома позволяет анализировать субклональную организацию опухоли. Проведен сравнительный анализ данных секвенирования таргетной панели, клинического экзома и полного экзома в опухолях с различной мутационной нагрузкой (острый миелоидный лейкоз у детей и акральная меланома). Таргетное секвенирование образцов, полученных от пациентов с острым миелоидным лейкозом, выявляет более одной потенциальной драйверной мутации в генах сигнальных путей *KIT*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *FLT3* у одного пациента, что отражает сложную клональную структуру субстрата опухоли. Анализ результатов секвенирования экзома позволяет выделить кластеры мутантных аллелей, соответствующих различным популяциям лейкозных клеток в образце. Сравнение мутационного профиля первичного образца острого миелоидного лейкоза, образца на стадии ремиссии и при рецидиве позволяет проследить динамику изменения клонального состава опухоли. На примере акральной меланомы исследована субклональная структура опухоли. С применением средств SciClone и ClonEvol проведена кластеризация мутантных аллелей, встречающихся в образцах с близкой частотой. На основе этих данных выполнено предсказание внутриопухолевого клонального состава, предложена модель клональной эволюции – изменения клонального состава опухоли при метастазировании, включающие появление новых мутаций, которые могут быть связаны с дальнейшей прогрессией заболевания. Примененный подход позволяет выявлять мутации, обусловливающие формирование новых опухолевых клонов, обладающих пролиферативным преимуществом, в том числе, в условиях противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: высокопроизводительное секвенирование, акральная меланома, острый миелоидный лейкоз, соматические мутации, частота вариантного аллеля

DOI: 10.31857/S0026898421050050

Процесс развития опухоли неразрывно связан с приобретением и накоплением генетических и эпигенетических изменений в опухолевой клетке [1]. Некоторые из этих мутаций обеспечивают клетку пролиферативным преимуществом перед другими опухолевыми клетками (драйверные мутации), тогда как другие имеют нейтральный эффект (пассажирские мутации) [2]. Опухолевая клетка, обладающая селективным преимуществом, лучше взаимодействует с локальным микроокружением и может размножаться быстрее, чем другие клетки и генерировать большее количество дочерних клеток. Этот процесс получил название “клональная экспансия” [3, 4].

Эволюционную историю опухоли можно проследить с использованием методов высокопроизводительного секвенирования. Мутации, которые произошли в клетке-предшественнике опухолевых клеток, будут присутствовать во всех ее потомках (кроме случаев делеции мутантного аллеля) и могут служить маркерами клональной популяции [5]. По мере своего развития опухоль может приобретать как дополнительные драйверные, так и пассажирские мутации и образовывать субпопуляции клеток, несущих мутации, отсутствующие в других клетках данной опухоли.

Долю клеток, несущих определенную мутацию, можно определить по частоте вариантного аллеля с этой мутацией (variant allele frequency, VAF). Ины-

ми словами, в случае секвенирования генома или экзома VAF – это доля прочтений, картированных на данное положение и содержащих такую нуклеотидную замену. На величину VAF безусловно влияет то, что опухолевый образец может содержать и неопухолевые клетки (стромальные и иммунные клетки, фибробласты), которые не имеют общих соматических мутаций с клонами опухоли. Также VAF зависит от количества копий хромосомы или данного региона хромосомы, поэтому в алгоритмах расчета должен учитываться такой параметр, как копийность участка (CNV, copy number variation) [6]. Считается, что обилие соматических мутаций и перестроек, выявляемых уже на момент постановки диагноза, в значительной степени может увеличивать эволюционный потенциал злокачественного новообразования, способствовать развитию устойчивости к лечению и обуславливать плохой исход в случае со́лидных опухолей [7].

Применение методов высокопроизводительного секвенирования (NGS) позволяет с высокой чувствительностью оценить клональность в отдельных образцах. Точное определение частоты встречаемости различных вариантных аллелей (VAF) и статистический анализ могут предсказывать клональный состав опухоли исходя из результатов кластерного анализа мутаций, по значениям VAF [8–10]. Прогрессирование злокачественного фенотипа можно оценить путем сравнения образцов, полученных при первичной диагностике и при рецидиве в случае заболеваний кроветворной системы, или первичной опухоли и метастатических участков при солидных опухолях [11, 12].

Один из примеров использования этого подхода – изучение мутаций при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) у взрослых, позволившее выявить высокую гетерогенность популяции лейкозных клеток одного пациента и пути формирования клонов, имеющих различные мутационные профили в процессе развития заболевания [13–16]. В то же время, проявление внутриопухолевой гетерогенности при ОМЛ у детей имеет свои особенности [17]. Опухоли у детей обладают гораздо меньшей мутационной нагрузкой по сравнению с опухолями у взрослых [18]. Наибольший интерес для изучения субклональной организации злокачественных опухолей кроветворной системы представляет анализ мутационного профиля при CBF (core binding factor)–ОМЛ у детей [19, 20]. Для лейкозов этой группы характерны хромосомные перестройки t(8;21) (химерный ген *RUNX1–RUNX1T1*) и inv(16)/t(16;16) (химерный ген *CBFB/MYH11*), вовлекающие субъединицы фактора транскрипции CBF. Первое событие лейкемогенеза – слияние генов, кодирующих белок CBF. При этом предполагается, что для дальнейшего перехода в ОМЛ требуются вторичные события – мутации в генах, вовлеченных в процессы пролиферации и дифференцировки.

Внутриопухолевая гетерогенность считается одной из основных причин неэффективности иммунной и таргетной терапии при метастатической меланоме [21–23]. Глубокое секвенирование генома первичной опухоли и метастатических очагов различной локализации позволило выявить клональную структуру образцов меланомы, определить инициирующую роль мутаций *BRAF* и *NRAS* при меланоме, обнаружить генетические изменения, ответственные за устойчивость к таргетной терапии вемурафенибом [12]. Акральная меланома – один из подтипов меланомы кожи, отличающийся локализацией на участках, не подверженных инсоляции (ладони, стопы, подногтевое пространство), характеризуется отличным от других подтипов меланомы кожи мутационным профилем, в частности, пониженной частотой драйверных мутаций в генах *BRAF* и *NRAS* [24]. Поэтому представляет интерес определение клональной структуры меланомы этого подтипа с целью изучения вероятных механизмов опухолевой прогрессии.

В настоящей работе с использованием различных алгоритмов исследована внутриопухолевая гетерогенность и субклональная организация опухоли при ОМЛ у детей и при акральной меланоме у взрослых. Полученные данные позволяют проследить клональную эволюцию опухоли, выявить значимые мутационные события и генетические маркеры, отвечающие за прогрессию заболевания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты. В исследование включены парные архивные образцы костного мозга 11 пациентов с ОМЛ (первичный образец–ремиссия или первичный образец–ремиссия–рецидив) и серия образцов норма–опухоль–метастаз, полученных от пациента с акральной меланомой [25]. Образцы хранили при –80°C до момента использования. Описание образцов, полученных от пациентов с ОМЛ, и клинические характеристики представлены в табл. 1.

Все пациенты получали химиотерапию по протоколам лечения ОМЛ AML-BFM-93/98 или ОМЛ-ММ-2000, включающую следующие этапы: индукция (7–10 дней), консолидация (до 50–60 дней) и поддерживающая терапия (до 2 лет с начала заболевания). Таким образом, образцы в ремиссии были отобраны на этапе поддерживающей терапии у всех пациентов, кроме пациента 6, который закончил лечение. В первичных образцах костного мозга при диагностическом обследовании выявляли от 50 до 80% бластных клеток, в образцах ремиссии – 0% бластов. Транслокации t(8;21) и inv(16) в образцах костного мозга определяли с использованием набора ЛК-БИОЧИП (“БИОЧИП-ИМБ”, Россия), как описано ранее

[26]. Метод ПЦР в реальном времени использовали для определения минимальной остаточной болезни в период ремиссии [27].

Использовали также результаты исследования образца меланомы, полученного от мужчины 77 лет. Первичная опухоль представляла собой меланому кожи правой пяточной области (акральная меланома) толщиной 12 мм, стадия IIIb, уровень инвазии по Кларку 4. Проведено хирургическое удаление опухоли и прилегающей области кожи и клетчатки. В двух из трех лимфоузлов клетчатки обнаружены метастазы. Гистологически опухоль представляла собой изъязвляющуюся беспигментную эпителиоидноклеточную и веретеноклеточную меланому. Через 6 мес. был удален пахово-подвздошный лимфоузел, полностью замещенный метастазом беспигментной меланомы веретеноклеточного и эпителиоидноклеточного строения с очагами некроза. Исследовали свежезамороженную ткань первичной опухоли и ткань метастаза в паховом лимфоузле, полученную при хирургическом лечении [25]. После удаления метастаза пациенту назначена терапия препаратом Роферон-А (интерферон альфа-2а), данные об эффективности лечения отсутствуют.

Выделение ДНК. Геномную ДНК выделяли из образцов замороженной ткани/костного мозга и крови с использованием набора QIAamp DNA MiniKit (“Qiagen”, Германия). Концентрацию ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 2 (“Invitrogen”, США), набора реагентов Qubit® dsDNAHS (“Invitrogen”). Чистоту ДНК оценивали с помощью микроспектрофотометра NanoDrop™ 3300 (“Thermo Scientific”, США), степень фрагментации определяли с помощью гель-электрофореза.

Высокопроизводительное секвенирование. Целевые последовательности ДНК отбирали с ис-

Таблица 1. Клинико-биологические характеристики пациентов с острым миелоидным лейкозом

ID	Пол	Возраст, год	Диагноз	Транслокация	Тип образца
ОМЛ-1	ж	6	ОМЛ, М2	t(8;21)	О
					Рем 19 мес.
ОМЛ-2	ж	3	ОМЛ, М2	t(8;21)	О
					Рем 12 мес.
ОМЛ-3	ж	6	ОМЛ, М2	t(8;21)	О
					Рем 12 мес.
ОМЛ-4	м	5	ОМЛ, М4	inv(16)	О
					Рем 6 мес.
ОМЛ-5	м	15	ОМЛ, М2	t(8;21)	О
					Рем 6 мес.
ОМЛ-6	м	12	ОМЛ, М4	inv(16)	О
					Рем 34 мес.
ОМЛ-7	м	13	ОМЛ, М4	inv(16)	О
					Рем 12 мес.
ОМЛ-8	ж	17	ОМЛ, М2	t(8;21)	О
					Рем 7 мес.
ОМЛ-9	м	9	ОМЛ, М2	t(8;21)	О
					Рем 12 мес.
ОМЛ-10	м	11	ОМЛ, М2	t(8;21)	О
					Рем 8 мес.
ОМЛ-11	м	12	ОМЛ, М2	t(8;21)	О
					Рем 6 мес.
					Рец 10 мес.

Примечание. О – образец опухоли при первичной диагностике, Рем – образец костного мозга, взятый в период ремиссии, Рец – образец костного мозга в рецидиве.

пользованием панели жидких зондов NimbleGen (“Roche”, Швейцария). В случае пациентов с ОМЛ использовали таргетную панель, включающую 84 гена, ассоциированных с лейкозами. Подготовку образцов проводили согласно [25, 26] по стандартному протоколу для приготовления библиотек KAPA Library Preparation Kit (“Roche”). Подготовку библиотек для полноэкзомного секвенирования образцов ОМЛ проводили с использованием набора Nextera Exome (“Illumina”, США), согласно инструкции производителя. Секвенирование проводили на платформе NextSeq 500 (“Illumina”). Секвенирование образца акральной меланомы выполнено ранее с использованием панели зондов, комплементарных кодирующей части 4100 генов (“медицинский экзом”) [25]. При таргетном секвенировании среднее покрытие составило не менее ×500, при полноэкзомном севенировании не менее ×100, при секвенировании медицинского экзома – не менее ×300.

Работы по секвенированию выполнены в Центре высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН с использованием оборудования ЦКП “Геном” (http://www.eimb.ru/ru1/ckp/ccu_genome_c.php).

Результаты секвенирования у пациентов с ОМЛ подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру (при VAF > 20%). Визуализацию прочтений, в том числе при VAF <5%, проводили с использованием Java-приложения IGV (Integrative Genomics Viewer) (https://software.broadinstitute.org/software/igv).

Внутреннюю тандемную дупликацию гена *FLT3* (FLT3-ITD) определяли с помощью фрагментного анализа методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500/3500xL (“Applied Biosystems”, США) с использованием аналога стандарта длин GeneScan™ 1200 LIZ® (“Синтол”, Россия), как описано ранее [26].

Анализ результатов секвенирования. После первичного контроля качества (FastQC 0.11.9, fastp 0.20.0), провели обрезку 5'-концов, фильтрацию прочтений по длине и методом плавающего окна; также были удалены остатки адаптеров (Trimmomatic 0.38) [28]. После этого оценивали бактериальное загрязнение пула прочтений. Прочтения картировали на референсный геном человека GRCh37 (Ensembl release 75; hg19) при помощи bowtie2 2.3.5.1. Проводили сортировку BAM-файлов (samtools 1.10), маркировку групп прочтений, переупорядочение прочтений (AddOrReplaceReadGroups, ReorderSam, FixMateInformation из набора picard-tools 2.21.3) и далее маркировку дуплицированных прочтений, наиболее вероятно произошедших от одного фрагмента ДНК (ПЦР- и оптических дубликатов) при помощи инструмента MarkDuplicatesWithMateCigar из пакета picard-tools 2.21.3. После этого проводили процедуру перекалибровки качества прочтения за счет сравнения пулов известных ранее (т.е. аннотированных dbSNP, версия 2018-07) и новых замен. С этой целью использовали инструменты BaseRecalibrator и ApplyBQSR из пакета GATK (версия 4.0.8.1) [29]. Соматические мутации (точечные замены и инсерции/делеции, далее индели) идентифицировали с использованием Mutect2 также из пакета GATK 4.0.8.1 [30].

Перед непосредственным поиском соматических мутаций создавали так называемую “панель норм” (panel of norms, PoN) – каталог вариаций, наблюдаемых в образцах с нормальной тканью (или образцах в ремиссии в случае лейкозов), вошедших в анализ. Для этого запускали алгоритм Mutect2 в режиме “tumor only” на всех образцах ДНК из нормальной ткани (ремиссии) и формировали VCF-файл со всеми выявленными отличиями от референсного генома. Затем проводили поиск соматических мутаций в опухоли с использованием Mutect2 в режиме сравнения с соответствующей нормой (ремиссией), дополнительно с подключением каталога PoN и данных о герминальных вариантах gnomAD 2.0.1. Полученные VCF-файлы фильтровали с помощью GATK FilterMutectCalls. Список мутаций, прошедших фильтрацию, аннотировали с помощью Annovar, PMID 20601685. Использовали базы данных о популяционных частотах аллелей (gnomAD, 1000 Genomes Project, Kaviar, ESP 6500, ExAC), а также dbSNP, ClinVar, COSMIC, локализацию в домене белка (Interpro), информацию о консервативности геномной области (phastCons, phyloP). Кроме того, для оценки патогенности мутации использовали SIFT [31], PolyPhen2 [32], Mutation Taster [33], LRT [34], PROVEAN, M-CAP, DANN, VEST3, MetaSVM и MetaLR. На основе полученных предсказаний оценивали так называемый “скор патогенности” (pathogenicity score). Чем большее число алгоритмов оценивает замену как патогенную, чем ниже ее частота в популяции и выше степень консервативности геномного локуса, содержащего данную замену, тем выше значение “скора патогенности”.

Варианты с популяционной частотой более 1% из анализа исключали. Стоит отметить, что количество таких вариантов не превышало 5% от всех соматических вариантов, локализованных в кодирующих областях, и 10% всех соматических вариантов, которые прошли FilterMutectCalls, включая интронные и межгенные. Дополнительно список соматических вариантов был отфильтрован в соответствии с минимальным порогом покрытия прочтениями (минимум 20 прочтений для нормального образца и минимум 10 для образца опухоли). Из анализа исключали также мутации, локализованные в polyN-мотивах (в частности GGGTG >

GGGGG, CCCCG > CCCCC и др.) и имеющие низкое покрытие, VAF менее 1%.

Для дальнейшего выделения кластеров мутаций у пациентов с ОМЛ использовали данные полноэкзомного секвенирования (пациенты 1, 2 и 3). Копийность участков генома CNV (copy number variation) определяли с использованием алгоритмов CNVkit [PMID: 27100738], cn.MOPS [35], Control-FREEC [36], основанных на сравнительном анализе покрытия геномных областей, включенных в таргетную панель. При этом падение покрытия свидетельствует о делеции определенных локусов, увеличение покрытия – о наличии дупликаций или амплификаций соответствующих участков генома. Однако этот подход часто оказывается неприменимым при анализе данных экзомного секвенирования, где присутствует этап обогащения таргетных участков с использованием метода гибридизации. В этом случае наблюдаемое покрытие может быть чувствительным к присутствию делеций/амплификаций только лишь в том случае, если гибридизационные зонды на обоих этапах обогащения берутся в избытке по сравнению с геномной ДНК. Исключение здесь составляют гомозиготные делеции, присутствующие в подавляющем большинстве клеток образца.

По этой причине мы также использовали сравнительный анализ частот бета-аллелей (beta allele frequency, BAF) в парных образцах норма–опухоль [9, 37]. Несмотря на то, что средства Control-FREEC и CNVkit предлагают проведение BAF-анализа, мы не сочли его удовлетворительным: скорее он может использоваться как источник информации, дополняющей данные по анализу покрытия. В связи с этим мы реализовали собственный алгоритм поиска событий CNV. С этой целью использовали VCF-файл с герминальными мутациями в паре образцов норма–опухоль, полученный freeBayes, GATK HaplotypeCaller, VarScan или другими средствами. На первом этапе отбирали все герминальные гетерозиготные варианты с 40% < VAF < 60% в норме и покрытием не менее 30 как в норме, так и в опухоли. Исключали варианты, не аннотированные в dbSNP. Случаи вероятного CNV регистрировали при выходе значений VAF в опухоли за пределы 40–60% и отличиями в VAF между нормой и опухолью более 25%, а также значением *p*-value по тесту Фишера <0.05 для количества прочтений (ридов), соответствующего референсному (дикий тип) и альтернативному (мутантный) аллелям в норме и опухоли. Далее значения ΔVAF интерполировали на весь геном за счет усреднения несколькими плавающими окнами. По анализу BAF достаточно легко выявлять локусы с аномалиями, но не всегда можно определить характер изменения в локусе (гетерозиготная делеция, двукратная амплификация и др.), поэтому в большинстве случаев локусы с подозрением на наличие CNV исключали перед кластеризацией вариантов в образцах ОМЛ.

В образце акральной меланомы идентифицированы кластеры соматических мутаций с использованием SciClone, пакета для среды R 25102416 [38]. В идеале каждый кластер должен содержать соматические мутации с близкими значениями VAF. Каждый такой кластер содержит одну или несколько драйверных мутаций, возникновение которых дает клону пролиферативное преимущество. Это ведет к росту его дочерней субпопуляции и, соответственно, увеличению VAF как для всех этих драйверных мутаций, так и всех “пассажирских”, которые клон уже содержал на момент появления новых драйверных мутаций. Для точности при оценке VAF выбирали только мутации, расположенные в участках с покрытием не менее 30 ридов. Из анализа исключали мутации, локализованные в областях с измененной копийностью. Оценивали возможные модели клональной эволюции, используя пакет программ ClonEvol 28950321 [39]. Диаграммы клональной эволюции построены с использованием пакета Fishplot PMID 27821060.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ спектра мутаций в первичном образце и в период ремиссии у 11 пациентов с CBF–ОМЛ, проведенный при помощи алгоритма Mutect2, выявил мутации, представленные только в опухолевых клетках. Использованы результаты секвенирования таргетной панели, включающей кодирующие участки 84 генов, ассоциированных с развитием лейкозов. У всех пациентов в первичном образце (или в рецидиве) выявлена транслокация t(8;21) или inv(16). В образцах, взятых в период ремиссии, транслокации не обнаруживали, что указывало на крайне низкий уровень (или отсутствие) опухолевых клеток в образцах костного мозга в момент взятия биоматериала и позволило при поиске соматических мутаций использовать данный образец как норму.

Клинически значимые соматические варианты, выявленные у пациентов с ОМЛ при таргетном секвенировании, представлены в табл. 2.

Мутации в генах сигнальных путей с участием рецепторных тирозинкиназ (РТК) (*NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *CBL* и *KIT*) обнаружены у семи пациентов из 11, при этом одновременное присутствие двух мутаций в этих генах выявлено у четырех пациентов (36%). Прогностическая роль мутаций в генах *NRAS* и *KRAS* при CBF–ОМЛ до конца не выяснена [40, 41]. Мутация FLT3-ITD, как правило, ассоциирована с плохим прогнозом, отмечено также неблагоприятное влияние определенных мутаций в гене *KIT* на течение заболевания [42, 43]. Мутация в гене *ETV6* (пациент 5) по своей значимости сопоставима с мутациями в сигналь-

ных путях [44]. У трех пациентов, помимо мутаций в РТК-сигнальных путях, найдены мутации в генах *ASLX1*, *ASLX2* (модификаторы хроматина), *SMC3* и *RAD21*. Мутации в этих генах характерны для пациентов с t(8;21), прогностическая значимость их различна [45]. Так, на мышиных моделях показано, что мутации в гене *ASXL1*, приводящие к потере функции белка, вызывают миелоидную трансформацию гемопоэтических клеток [46]. Также мутации в этом гене ассоциированы с плохим прогнозом при ОМЛ у детей и взрослых [47]. Мутации в гене *ASXL2* ассоциированы скорее с благоприятным прогнозом [48]. Обращает на себя внимание значительная вариабельность профилей VAF в образцах опухоли с различными соматическими мутациями – от 2–5 до 86%.

Ранее обнаружили, что мутации в генах белков сигнальных путей, в которых участвуют РТК, характерны для 60–70% пациентов с t(8;21) и почти 90% пациентов с inv(16). При этом у части пациентов один образец содержит одновременно более одной мутации [45, 49, 50]. Серия экспериментов по генотипированию индивидуальных колоний лейкозных клеток позволила выявить иерархические связи между различными мутациями у одного пациента [51–53]. Полученные данные дают основания полагать, что мутации в генах сигнальных путей ("сигнальные" мутации, signal mutations) присутствуют в независимых клонах. Существование клонов, имеющих общего предшественника и несущих независимые генетические изменения, затрагивающие один и тот же путь, соответствует феномену "клональной интерференции" (или параллельной эволюции) и описано при различных видах рака [54], в том числе ОМЛ [55]. В этом случае каждая сигнальная мутация, т.е. мутация в генах *NRAS*, *KRAS*, *FLT3*, *JAK2*, *CBL*, *PTPN11* и *KIT*, служит маркером отдельного клона, а количество таких мутаций в образце может определять количество независимых клонов [50, 53]. Явление клональной интерференции, по-видимому, не распространяется на мутации в генах эпигенетической регуляции/модификации хроматина (*ASXL1*, *ASXL2*, *TET1*, *TET2*, *BCOR*, *BCORL1*, *EZH2*, *KDM6A*) и когезинового комплекса (*RAD21*, *SMC1A*, *SMC3*, *STAG2*) [50], хотя в ряде исследований эти мутации и описывают как взаимоис-

Таблица 2. Клинически значимые соматические варианты (мутации), выявленные в образцах опухоли пациентов с ОМЛ (VAF в ремиссии составил 0% для всех мутаций) при таргетном секвенировании кодирующих участков 84 генов

ID, транслокация	Ген	Мутация	Аминокислота	Функция	VAF опухоли, %
ОМЛ-1, t(8;21)	*CBL*	c.1227+1->AATT	Сплайсинг	Протоонкоген	86
	SMC3	c.2999_3000insGAAAGG	L1000delinsLKG	Белок когезинового комплекса	42
	ASLX1	c.1768_1769insCTTAGC	p.T590delinsTX	Модификатор хроматина	40
ОМЛ-2, t(8;21)	*ASXL2*	c.1834C>T	p.Gln612Ter	Модификатор хроматина	44
	KRAS	c.38G>A	p.Gly13Asp	РТК-путь	30
	KRAS	c.35G>A	p.Gly12Asp	РТК-путь	8
ОМЛ-4, inv(16)	*NRAS*	c.A182G	p.Q61R	РТК-путь	39
	KIT	c.A2447T	p.D816V	РТК-путь	5
ОМЛ-5, t(8;21)	*ETV6*	c.C1195T	p.R399C	Фактор транскрипции	41
	RAD21	c.C1816T	p.Q606X	Белок когезинового комплекса	33
ОМЛ-6, inv(16)	*KIT*	c.1253_1254insCTTCTT	p.Y418delinsYFF	РТК-путь	33
	NRAS	c.A182G	p.Q61H	РТК-путь	5
ОМЛ-8, t(8;21)	*NRAS*	c.G38A	p.G13D	РТК-путь	38
ОМЛ-10, t(8;21)	*FLT3*	ITD 110 п.о.	Сдвиг рамки	РТК	32
ОМЛ-11, t(8;21)	*KIT*	c.T2454G	p.N818K	РТК-путь	21 (О) 32 (Рец)
	KRAS	c.G38A	p.G13D	РТК-путь	4 (О)
	CSF3R	c.175_176insTC-CCAGTCTC	p.P59fs	Рецептор фактора роста	2 (Рец)

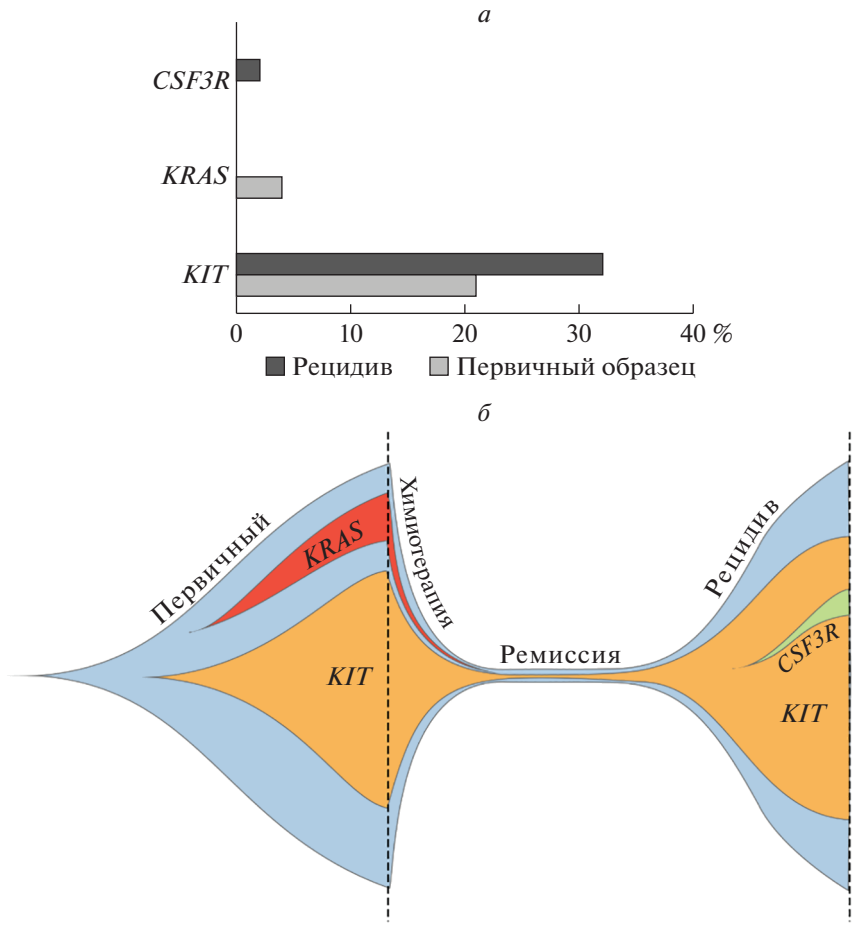

Рис. 1. Динамика клональной структуры образцов на различных этапах лечения (пациент 11). *а* – Профиль соматических мутаций с различным значением VAF; *б* – графическое представление клональной эволюции. В рецидиве заболевания исчезает мутантный клон с мутацией *KRAS* и появляется новая минорная мутация в гене *CSF3R*.

ключающие [42]. Показано, что клональная интерференция при CBF–ОМЛ считается независимым фактором плохого прогноза [50].

Сравнительный анализ мутационного профиля первичных образцов и образцов в рецидиве заболевания дает более точное представление о клональной структуре опухоли (рис. 1). У пациента ОМЛ-11 с t(8;21) в первичном образце выявлены две мутации в генах *KIT* и *KRAS,* имеющие значения VAF 21 и 4% соответственно. Согласно опубликованным данным, появление двух мутаций в РТК-сигнальном пути (*KIT* и *KRAS*) одновременно в одних и тех же клетках крайне маловероятно [50]. По этой причине можно предположить, что уже на начальных стадиях заболевания присутствовали два клона: основной – с мутацией *KIT*, и минорный – с мутацией *KRAS*. В период ремиссии ни одна из этих мутаций методом NGS не выявляется. Наиболее вероятно, что в период ремиссии сохранилось некоторое количество клеток исходного клона и их активное деление привело в дальнейшем к развитию рецидива. При этом в рецидиве заболевания выявляется только мутация *KIT* с VAF 32%, в то время как второй клон с мутацией *KRAS* был элиминирован в ходе химиотерапии (рис. 1). Однако возникает и новая потенциально драйверная мутация в гене *CSF3R* (VAF около 5%). Ген *CSF3R* вовлечен в патогенез ОМЛ [20].

В целом, исследование мутационного профиля первичного образца и образца в рецидиве позволяет проследить многоступенчатый процесс эволюции лейкозных клеток и выявить возможные факторы устойчивости к терапии [56–58].

ОМЛ у детей относится к опухолям с низкой мутационной нагрузкой [56]. В нашем исследовании таргетное секвенирование выявило относительно небольшое число значимых соматических мутаций в одном образце. С целью более детального анализа структуры субстрата опухоли при ОМЛ проведено полноэкзомное секвенирование образцов ОМЛ-1, ОМЛ-2, ОМЛ-4. Для корректной оценки значений VAF определена копий-

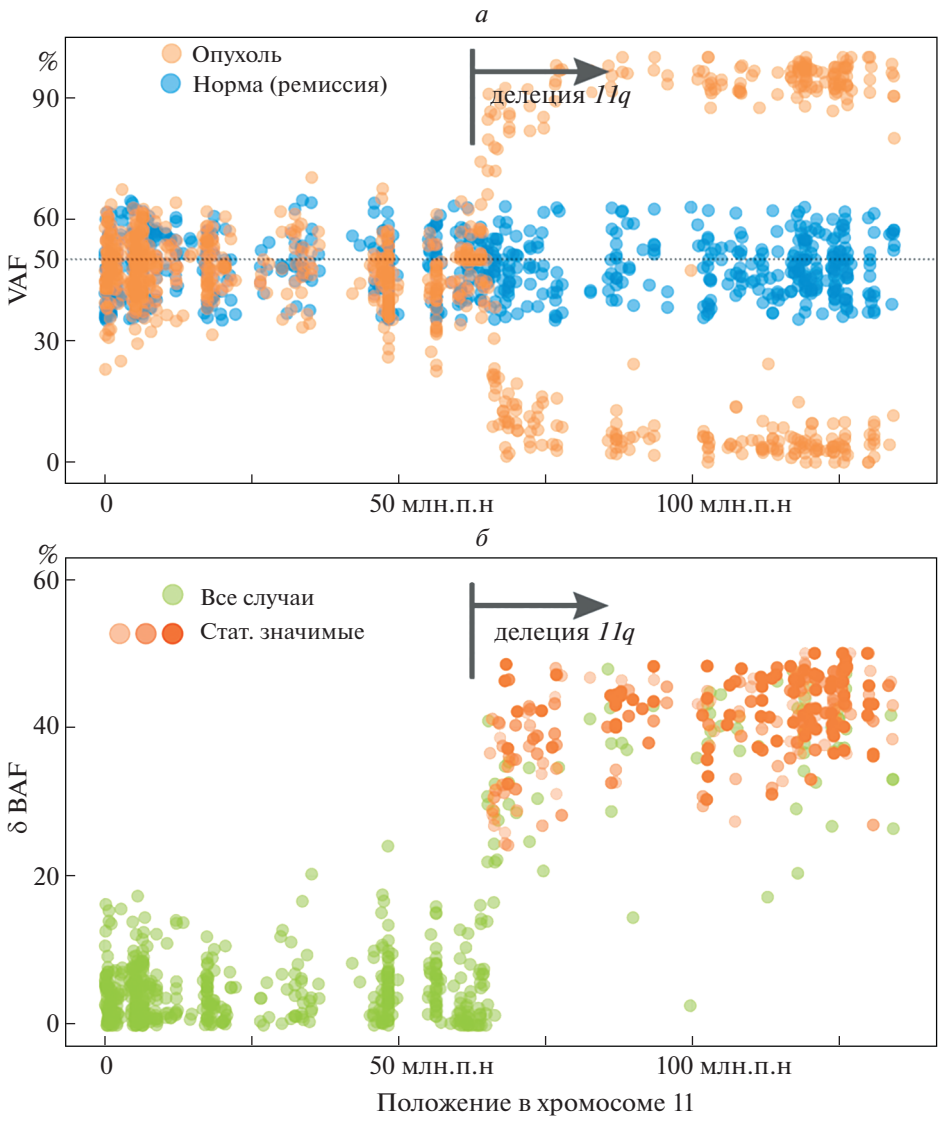

Рис. 2. Результаты BAF-анализа хромосомы 11 в образце ОМЛ-1. *а* – Профили VAF для гетерозиготных герминальных мутаций в норме и опухоли. В области 11q видна явная потеря гетерозиготности всеми мутациями, VAF которых в норме колебался в области 50%. *б* – Разница между VAF гетерозиготных герминальных мутаций между нормой и опухолью. Для области 11q различия статистически значимы ($p < 0.05$). Всего в анализ вошли 824 гетерозиготных герминальных мутации на хромосоме 11.

ность участков генома, содержащих выявленные соматические мутации.

При проведении BAF-анализа выбирали гетерозиготные герминальные варианты (с VAF от 40 до 60%) и смотрели изменение их значений VAF по отдельным хромосомам. Например, в случае делеции участка генома в клетках опухоли гетерозиготный герминальный мутантный аллель или выпадает, или переходит в гомозиготное состояние. Таким способом мы выявили делецию половины хромосомы 11 в образце ОМЛ-1 (рис. 2).

Применение алгоритмов cn.MOPS. CNVkit и Control-FREEC, основанных на анализе покрытия, таких четких результатов не дало. Наиболее вероятно, это связано с тем, что при подготовке библиотек для секвенирования отбор последовательностей проводят с использованием панели зондов. При этом гибридизационные зонды, как правило, не находятся в избытке по сравнению с ДНК образца. Алгоритм BAF-анализа, предложенный в данной работе, оказался более универсальным, его можно применять для анализа CNV при различных вариантах таргетного секвенирования (в том числе полноэкзомного). Дальнейший анализ (кластеризацию) проводили с учетом копийности участков генома, в которых были локализованы соматические варианты.

При анализе распределения значений VAF можно отметить, что ни в одном из образцов ОМЛ-1, ОМЛ-2, ОМЛ-4 эти значения не были сконцентрированы в одной области (т.е. распределение имеет более одного пика), а соматические варианты формируют группы (кластеры) в зависимости от значения VAF (рис. 3). В образце ОМЛ-1 выявлено в общей сложности 29 соматических вариантов, явно формирующих два кластера с пиками плотности VAF 5–20% (кластер 1) и 35–65% (кластер 2). Необходимо отметить, что в случае мутации в гене *CBL* значение VAF составляло изначально 86% (см. также табл. 1), однако по данным BAF-анализа ген *CBL* находится в области протяженной гетерозиготной делеции всего длинного плеча 11q, поэтому значение VAF было скорректировано. В целом, среднее значение VAF по кластеру 2 находится в области 47%, что говорит о высоком содержании бластных клеток (более 90%) в исходном образце. У некоторых генов (*ASXL1*, *FZD9* и др.) значения VAF превышают 50% (при отсутствии делеций/амплификаций в соответствующих областях). Небольшая доля таких случаев вполне ожидаема; это объясняется случайной природой оцениваемых величин (пуассоновское распределение при оценке числа ридов). Таким образом, можно предположить, что образец ОМЛ-1 содержит, как минимум, два клона лейкозных клеток – основного (включает мутации из кластера 2) и “нового”, произошедшего от основного клона и включающего, помимо мутаций из кластера 2, еще и мутации из кластера 1. В дальнейшем возможен отбор клеток, получивших дополнительное пролиферативное преимущество в результате новых соматических мутаций, и вытеснение основного клона за счет “нового”. В каждом кластере присутствуют мутации в генах, которые могут быть связаны с развитием лейкозов: кластер 2 – гены *ASXL1*, *CBL*, *SMC3* и др.; кластер 1 – *MTIF2, STAB1* и др. (рис. 3*а*, табл. 3).

В образце ОМЛ-2 картина распределения соматических вариантов по VAF также характеризуется бимодальностью. Основное отличие от образца ОМЛ-1 состоит в том, что каждый из кластеров содержит различные драйверные мутации в гене *KRAS:* первый кластер – мутацию G12D, второй – G13D. Каждая из этих мутаций приводит к конститутивной активности белка KRAS и передаче сигналов в пути ERK. Согласно опубликованным данным, эти две мутации (G12D и G13D) практически не встречаются одновременно, так как появление второй мутации уже не дает клетке пролиферативного преимущества [50, 51]. Таким образом, опираясь на эту информацию, можно утверждать, что опухоль представлена двумя основными типами клонов, каждый из которых содержит мутацию в гене *KRAS*, при этом оба клона независимо произошли от общего предка, не имеющего *KRAS*-мутаций. Основной опухолевый клон, содержит мутации не только в *KRAS* (G13D), но и в генах *ASXL2, SPI1, SLC22A10* (значения VAF от 30 до 50%) (рис. 3*б*, табл. 3). Минорный опухолевый клон содержит мутацию *KRAS* (G12D) с VAF порядка 10% и целый ряд синонимичных “пассажирских” мутаций с VAF от 5 до 20%, которые тоже допустимо отнести к минорному клону вследствие неточности оценки VAF.

Весьма своеобразна картина распределения VAF в образце ОМЛ-4 (рис. 3*в*). Мы видим также бимодальное распределение – два кластера соматических вариантов. В кластере 2 с VAF порядка 35% представлена драйверная мутация в гене *KIT*,

Таблица 3. Соматические варианты, выявленные в образцах ОМЛ-1, ОМЛ-2 и ОМЛ-4 при полноэкзомном секвенировании

ID	Ген	Мутация	Аминокислота	Функция белка	VAF, %
ОМЛ-1	*FZD9*	c.C307T	p.Q103X	Рецептор Wnt-сигнального пути	58
	CACNB4	c.712_713insA	p.S238fs	Белок кальциевых каналов	43
	CSNK1G3	c.C569T	p.P190L	Серин/треониновая протеинкиназа	43
	MTIF2	c.A1364C	p.K455T	Митохондриальный фактор инициации трансляции	6
	STAB1	c.C6547T	p.R2183C	Трансмембранный рецептор, участвует в ангиогенезе, клеточной адгезии, хоминге лимфоцитов	6
ОМЛ-2	*SLC22A10*	c.C1088A	p.P363H	Транспортер органических анионов	50
	SPI1	c.C676A	p.Q226K	Протоонкоген, участвует в дифференцировке миелоидных клеток	42
ОМЛ-4	*CHD8*	c.G2269A	p.D757N	Участвует в организации хроматина	39
	FNDC1	c.3535_3537del	p.1179_1179del	Активатор сигнализации G-белка	8

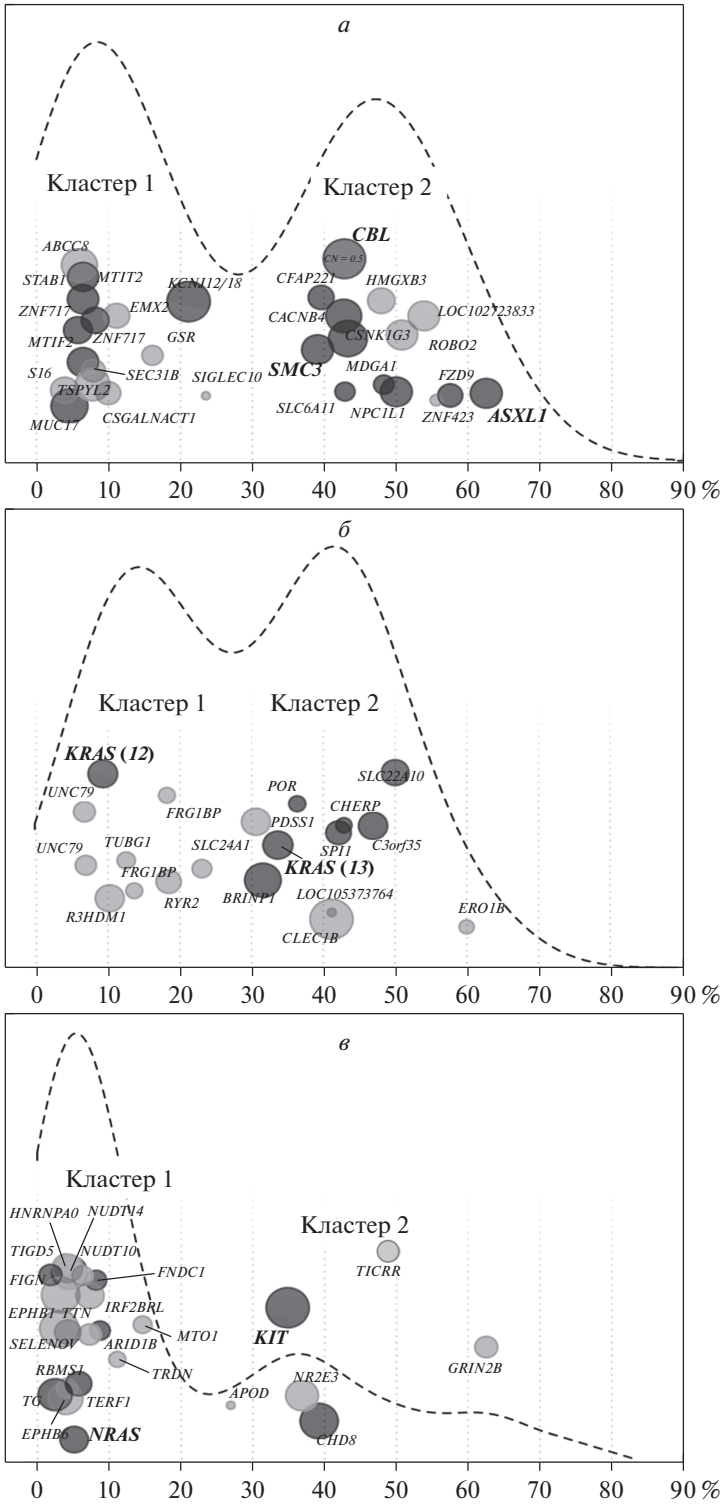

Рис. 3. Распределение соматических вариантов, полученных при полноэкзомном секвенировании, в зависимости от значения VAF. У всех трех пациентов отмечено бимодальное распределение соматических мутаций по значению VAF, что говорит о неоднородной внутриопухолевой клональной структуре. Каждый кружок соответствует одному соматическому варианту (точечная замена или инсерция/делеция). Размер кружка пропорционален глубине покрытия (минимально 25, максимально 100 прочтений). Пунктирная линия отражает плотность распределения соматических вариантов по значениям VAF. *а* – Образец ОМЛ-1; *б* – ОМЛ-2; *в* – ОМЛ-4. *Крупным шрифтом* отмечены мутации, выявленные при таргетном секвенировании. *Темным цветом* отмечены несинонимичные варианты (инсерции/делеции, точечные замены, сайты сплайсинга, появление и утрата стоп-кодона); *светлым* – молчащие мутации (синонимичные, интронные и межгенные варианты).

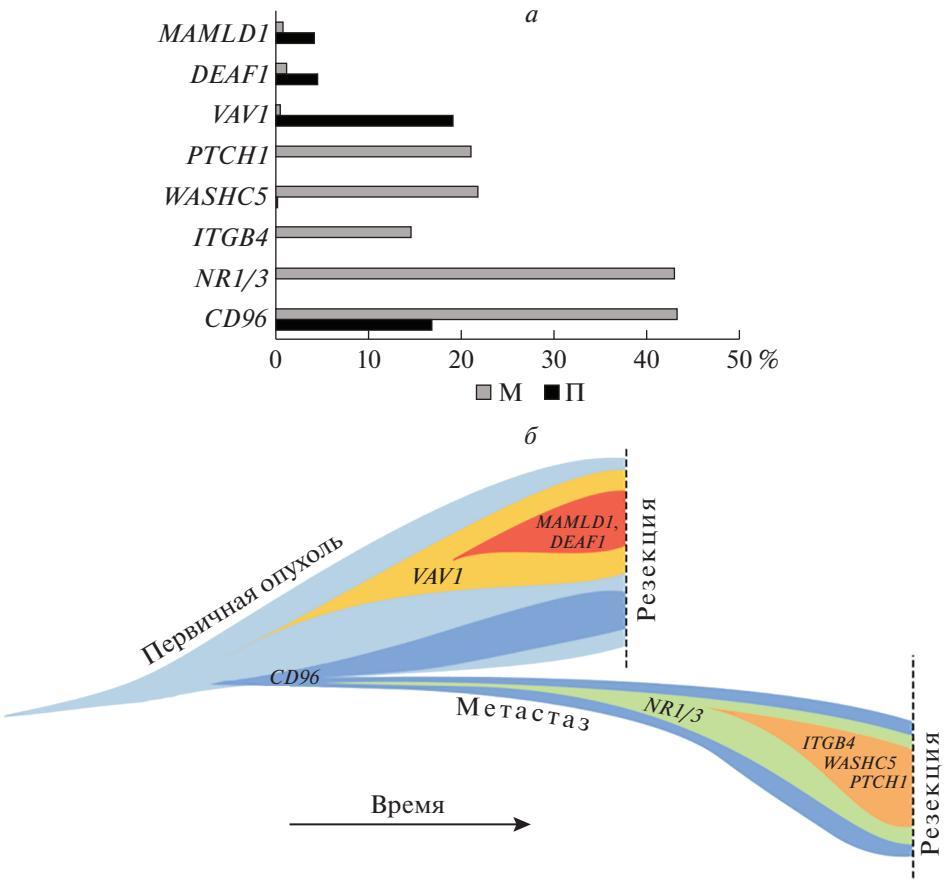

Рис. 4. Модель клональной эволюции опухоли у пациента с акральной меланомой (П – первичная опухоль, М – метастаз). *а* – Частоты вариантных аллелей в первичной опухоли и метастазе (по оси *x* – значения VAF (%), по оси *y* – названия генов). *б* – Диаграмма динамической смены мутаций при переходе от опухоли к метастазу (адаптация рисунка, полученного ClonEvol). Клоны опухолевых клеток содержат различные мутации, описанные преимущественно как драйверные.

в кластере 1 – с VAF порядка 5% – драйверная мутация в гене *NRAS*. Это позволяет, как минимум, говорить о двух клонах – основном (с долей порядка 70–80%) и минорном (с долей порядка 10%), накопившим, помимо *NRAS*, несколько других мутаций, часть которых может влиять на пролиферацию лейкозных клеток (*NUDT14*, *FNDC1*), а часть явно относится к пассажирским (синонимичные замены) (табл. 3). Минорный клон с мутацией *NRAS,* скорее всего, представляет собой самостоятельную популяцию клеток, независимую от основного клона с мутацией в гене *KIT* [50, 51].

Таким образом, анализ распределения частот альтернативных аллелей (VAF) в опухолевых клетках позволяет предположить множественные события клональной эволюции при развитии ОМЛ. Более высокие значения VAF могут соответствовать мутациям, которые произошли на ранних стадиях развития. Клетки основного клона приобретают дополнительные мутации, давая начало новым субпопуляциям, которые могут вносить вклад в ускоренную прогрессию заболевания [50].

Внутриопухолевую гетерогенность и клональную структуру солидных опухолей изучают с использованием сравнительного анализа мутационного профиля исходной опухоли и метастаза. Рассмотрим модель клональной эволюции опухоли на примере пациента с метастатической формой акральной меланомы после проведенного хирургического лечения (рис. 4).

В первичной опухоли обнаружены две потенциально значимые (согласно оценке патогенности при помощи PolyPhen2, SIFT и другим алгоритмам) мутации в генах *VAV1* (E556Q) и *CD96* (M1I). В метастазе выявлены три клинически значимые мутации в генах *CD96* (M1I), *ITGB4* (I1285F), *WASHC5* (Q78H) (рис. 4*а*). Лишь одна мутация, локализованная в гене *CD96*, встречается и в первичной опухоли (17%), и в метастазе (43%). Ген *CD96* кодирует белок семейства иммуноглобулинов, – важный негативный регулятор иммунного ответа, который рассматривается в настоящее время как возможная мишень иммунотерапии, наряду с PD-1 и CTLA-4 [59]. Мутация M1I (заме-

на метионина на изолейцин) приводит к утрате стартового кодона при синтезе белка; ее роль в опухолевом процессе не ясна, однако, в данном случае эта мутация служит маркером опухолевых клеток меланомы. В первичной опухоли представляет интерес также мутация E556Q в гене *VAV1*. Белок VAV1 участвует в активации сигнальных путей, связанных с перестройками цитоскелета. Ген *VAV1* в настоящее время рассматривают в качестве онкогена, вовлеченного в развитие целого ряда злокачественных новообразований [60].

Как можно предположить, миграция опухолевых клеток, несущих мутацию M1I *CD96*, в паховый лимфоузел произошла на раннем этапе развития меланомы; какое-то время клетки находились в состоянии относительного покоя, так как на момент удаления первичного очага отдаленные метастазы не были выявлены. Прогрессия заболевания и формирование отдаленного метастаза могли быть связаны с появлением новых мутаций, в том числе, мутации I1285F в гене *ITGB4*. Белковый продукт данного гена участвует в клеточной адгезии, запускает механизмы клеточной пролиферации, он описан как один из ключевых факторов инвазии опухоли [61]. Мутации в генах *NR1I3* и *WASCH5* в метастазах меланомы кожи обнаруживали ранее и другие авторы [62].

Акральная меланома относится к редкому подтипу меланом кожи, составляя всего лишь 2–3% от всех случаев меланом кожи, и отличается особенностями молекулярно-генетического профиля [63]. Характерные для меланомы кожи мутации в генах *BRAF*, *NRAS*, *KIT* встречаются реже. Около 38% случаев акральной меланомы относятся к так называемому “тройному дикому типу” (triple WT), в то время как при других подтипах меланом кожи такие случаи составляют около 11%. Полногеномное секвенирование образцов акральной меланомы указывает на существенный вклад структурных перестроек генома в развитие опухоли [64]. Нами исследована акральная меланома, относящаяся к “тройному дикому типу”. Сравнительный анализ первичной опухоли и метастаза выявил новые генетические маркеры, которые могут быть ассоциированы с развитием заболевания или представлять собой молекулярные мишени для таргетной терапии.

При исследовании мутационного профиля солидных опухолей всегда следует иметь в виду локальную гетерогенность, при которой различные участки опухоли могут различаться как морфологически, так и по совокупности генетических изменений [54]. В качестве примера мы выбрали опухоль небольшого размера (менее 25 мм). Для выделения ДНК использовали максимально большой объем исходного материала, чтобы по возможности получить суммарные препараты (bulk tumor) ДНК опухоли и ДНК метастаза, сбалансированно отражающие разнородный клональный состав.

Таким образом, анализ данных высокопроизводительного секвенирования позволяет изучать пути эволюции опухолевых клеток на основе анализа субклональной архитектуры опухоли, выявлять роль молекулярных маркеров в формировании опухолевого клона, а также определять маркеры прогрессии заболевания и устойчивости к терапии. Полноэкзомное секвенирование позволяет анализировать больше молекулярных маркеров, что наиболее важно в случае опухолей с низкой мутационной нагрузкой; однако на сегодняшний день это достаточно дорогостоящее исследование. Использование таргетных панелей позволяет проводить глубокое секвенирование отдельных участков генома с меньшими финансовыми затратами; в ряде случаев это дает возможность выявлять минорные клоны, которые могут играть ведущую роль в дальнейшем развитии заболевания и, что немаловажно, в устойчивости к терапии [65, 66]. Оценка клонального разнообразия исходного образца при ОМЛ и выявление доминирующих клонов, представленных с высокой частотой, имеет значение для прогноза заболевания и оценки риска развития рецидива [41, 50, 67]. В целом, стратегии оценки клонального разнообразия и отслеживания траекторий развития опухолевых клеток на основе высокопроизводительного секвенирования суммарного образца опухоли с последующим определением частот вариантных аллелей находят все более широкое применение, в том числе, и в практической онкологии [50, 67, 68], несмотря на целый ряд ограничений этого подхода [69].

Наиболее точный анализ внутриопухолевой гетерогенности (или же всей экосистемы опухоли, тесно взаимодействующей с микроокружением) с реконструкцией цепи событий опухолевой микроэволюции обеспечивает лишь секвенирование ДНК единичных опухолевых клеток [55, 69, 70]. Однако анализ полных экзомов или геномов единичных клеток не только останется чрезвычайно дорогим в ближайшем будущем, но также, по-видимому, сохранит и другие ограничения, в том числе, слабую репрезентативность выборки из-за малого количества анализируемых клеток и отсутствия метода амплификации всего генома, обеспечивающего оптимальный охват и однородность покрытия [69].

Также следует иметь в виду, что свой вклад во внутриопухолевую гетерогенность, особенно в наблюдаемую на транскриптомном уровне (при анализе единичных клеток), вносят такие факторы, как эпигенетическая регуляция, стадия клеточной дифференцировки клонообразующей опухолевой клетки, разные стадии клеточного цикла, стохастичность генной экспрессии, влияние опухолево-

го микроокружения и клеточная трофика, прямо зависящая от геометрического расположения клетки в образце. Именно сочетание генетических и негенетических факторов определяет, в конечном счете, фенотип опухолевой клетки и ее ответ на терапию [69, 71, 72]. Дальнейшее развитие технологий анализа единичных клеток, в том числе прослеживание судьбы единичной клетки в нескольких поколениях [73] и определение профиля экспрессии генов единичных опухолевых клеток [74, 75] позволит более точно предсказывать пути эволюции раковых клеток и разрабатывать новые подходы к лечению онкологических заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №18-15-00398).

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. От всех участников исследования получено информированное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tabin C.J., Bradley S.M., Bargmann C.I., Weinberg R.A., Papageorge A.G., Scolnick E.M., Dhar R., Lowy D.R., Chang E.H. (1982) Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature*. **300**, 143–149.
2. Garraway L.A., Lander E.S. (2013) Lessons from the cancer genome. *Cell*. **153**, 17–37.
3. Greaves M., Maley C.C. (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature*. **481**, 306–313.
4. Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz Jr. L.A., Kinzler K.W. (2013) Cancer genome landscapes. *Science*. **339**, 1546–1558.
5. Campbell P.J., Pleasance E.D., Stephens P.J., Dicks E., Rance R., Goodhead I., Follows G.A., Green A.R., Futreal P.A., Stratton M.R. (2008) Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 13081–13086.
6. Beerenwinkel N., Schwarz R.F., Gerstung M., Markowetz F. (2015) Cancer evolution: mathematical models and computational inference. *Syst. Biol*. **64**, e1–e25.
7. Burrell R.A., McGranahan N., Bartek J., Swanton C. (2013) The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. **501**(7467), 338–345.
8. Zare H., Wang J., Hu A., Weber K., Smith J., Nickerson D., Song C., Witten D., Blau C.A., Noble W.S. (2014) Inferring clonal composition from multiple sections of a breast cancer. *PLoS Comput. Biol*. **10**, e1003665.
9. Dentro S., Wedge D.C., Loo P.V. (2017) Principles of reconstructing the subclonal architecture of cancers. *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. **7**(8), a026625.
10. Xiao Y., Wang X., Zhang H., Ulintz P.J., Li H., Guan Y. (2020) FastClone is a probabilistic tool for deconvoluting tumor heterogeneity in bulk-sequencing samples. *Nat. Commun*. **11**(1), 4469.
11. Grove C.S., Vassiliou G.S. (2014) Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Dis. Model Mech*. **7**(8), 941–951.
12. Ding L., Kim M., Kanchi K.L., Dees N.D., Lu C., Griffith M., Fenstermacher D., Sung H., Miller C.A., Goetz B., Wendl M.C., Griffith O., Cornelius L.A., Linette G.P., McMichael J.F., Sondak V.K., Fields R.C., Ley T.J., Mulé J.J., Wilson R.K., Weber J.S. (2014) Clonal architectures and driver mutations in metastatic melanomas. *PLoS One*. **9**(11), e111153.
13. Cancer Genome Atlas Research N. (2013) Genomic and epigenomic landscapes of adult *de novo* acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med*. **368**, 2059–2074.
14. Welch J.S., Ley T.J., Link D.C., Miller C.A., Larson D.E., Koboldt D.C., Wartman L.D., Lamprecht T.L., Liu F., Xia J., Kandoth C., Fulton R.S., McLellan M.D., Dooling D.J., Wallis J.W., Chen K., Harris C.C., Schmidt H.K., Kalicki-Veizer J.M., Lu C., Zhang Q., Lin L., O'Laughlin M.D., McMichael J.F., Delehaunty K.D., Fulton L.A., Magrini V.J., McGrath S.D., Demeter R.T., Vickery T.L., Hundal J., Cook L.L., Swift G.W., Reed J.P., Alldredge P.A., Wylie T.N., Walker J.R., Watson M.A., Heath S.E., Shannon W.D., Varghese N., Nagarajan R., Payton J.E., Baty J.D., Kulkarni S., Klco J.M., Tomasson M.H., Westervelt P., Walter M.J., Graubert T.A., DiPersio J.F., Ding L., Mardis E.R., Wilson R.K. (2012) The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. **150**(2), 264–278.
15. Kim T., Yoshida K., Kim Y.K., Tyndel M.S., Park H.J., Choi S.H., Ahn J.S., Jung S.H., Yang D.H., Lee J.J., Kim H.J., Kong G., Ogawa S., Zhang Z., Kim H.J., Kim D.D. (2016) Clonal dynamics in a single AML case tracked for 9 years reveals the complexity of leukemia progression. *Leukemia*. **30**(2), 295–302.
16. Shlush L.I., Mitchell A. (2015) AML evolution from preleukemia to leukemia and relapse. *Best Pract. Res. Clin. Haematol*. **28**(2–3), 81–89.
17. Masetti R., Castelli I., Astolfi A., Bertuccio S.N., Indio V., Togni M., Belotti T., Serravalle S., Tarantino G., Zecca M., Pigazzi M., Basso G., Pession A., Locatelli F. (2016) Genomic complexity and dynamics of clonal evolution in childhood acute myeloid leukemia studied with whole-exome sequencing. *Oncotarget*. **7**(35), 56746–56757.
18. Rahal Z., Abdulhai F., Kadara H., Saab R. (2018) Genomics of adult and pediatric solid tumors. *Am. J. Cancer Res*. **8**(8), 1356–1386. eCollection 2018.
19. Faber Z.J., Chen X., Gedman A.L., Boggs K., Cheng J., Ma J., Radtke I., Chao J.R., Walsh M.P., Song G., Andersson A.K., Dang J., Dong L., Liu Y., Huether R., Cai Z., Mulder H., Wu G., Edmonson M., Rusch M., Qu C., Li Y., Vadodaria B., Wang J., Hedlund E., Cao X., Yergeau D., Nakitandwe J., Pounds S.B., Shurtleff S., Fulton R.S., Fulton L.L., Easton J., Parganas E., Pui C.H., Rubnitz J.E., Ding L., Mardis E.R.,

Wilson R.K., Gruber T.A., Mullighan C.G., Schlenk R.F., Paschka P., Döhner K., Döhner H., Bullinger L., Zhang J., Klco J.M., Downing J.R. (2016) The genomic landscape of core-binding factor acute myeloid leukemias. *Nat. Genet*. **48**(12), 1551–1556.

20. Christen F., Hoyer K., Yoshida K., Hou H.A., Waldhueter N., Heuser M., Hills R.K., Chan W., Hablesreiter R., Blau O., Ochi Y., Klement P., Chou W.C., Blau I.W., Tang J.L., Zemojtel T., Shiraishi Y., Shiozawa Y., Thol F., Ganser A., Löwenberg B., Linch D.C., Bullinger L., Valk P.J.M., Tien H.F., Gale R.E., Ogawa S., Damm F. (2019) Genomic landscape and clonal evolution of acute myeloid leukemia with t(8;21): an international study on 331 patients. *Blood*. **133**(10), 1140–1151.
21. Grzywa T.M., Paskal W., Włodarski P.K. (2017) Intratumor and intertumor heterogeneity in melanoma. *Transl. Oncol*. **10**(6), 956–975.
22. Reuben A., Spencer C.N., Prieto P.A., Gopalakrishnan V., Reddy S.M., Miller J.P., Mao X., De Macedo M.P., Chen J., Song X., Jiang H., Chen P.-L., Beird H.C., Garder H.R., Roh W., Wani K., Chen E., Haymaker C., Forget M.-A., Little L.D., Gumbs C., Thornton R.L., Hudgens C.W., Chen W.-S., Austin-Breneman J., Szczepaniak R., Nezi L., Codbill A.P., Bernatchez C., Roszik J., Hwu P., Woodman S.E., Chin L., Tawbi H., Davies M.A., Gershenwald J.E., Amaria R.N., Glitza I.C., Diab A., Patel S.P., Hu L., Lee J.E., Grimm E.A., Tetzlaff M.T., Lazar A.J., Wistuba I.I., Clise-Dwyer K., Carter B.W., Zhang J., Futreal P.A., Sharma P., Allison J.P., Cooper Z.A., Wargo J.A. (2017) Genomic and immune heterogeneity are associated with differential responses to therapy in melanoma. *NPJ Genom. Med*. **2**, 10.
23. Kemper K., Krijgsman O., Cornelissen-Steijger P., Shahrabi A., Weeber F., Song J.Y., Kuilman T., Vis D.J., Wessels L.F., Voest E.E., Schumacher T.N., Blank C.U., Adams D.J., Haanen J.B., Peeper D.S. (2015) Intra- and inter-tumor heterogeneity in a vemurafenib-resistant melanoma patient and derived xenografts. *EMBO Mol. Med*. **7**(9), 1104–1118.
24. Yeh I., Jorgenson E., Shen L., Xu M., North J.P., Shain A.H., Reuss D., Wu H., Robinson W.A., Olshen A., von Deimling A., Kwok P.Y., Bastian B.C., Asgari M.M. (2019) Targeted genomic profiling of acral melanoma. *J. Natl. Cancer Inst*. **111**(10), 1068–1077.
25. Абрамов И.С., Емельянова М.А., Рябая О.О., Краснов Г.С., Заседателев А.С., Наседкина Т.В. (2019) Соматические мутации, вносящие вклад в метастазирование акральной меланомы. *Молекуляр. биология*. **53**(4), 648–653.
26. Гукасян Л.Г., Краснов Г.С., Муравенко О.В., Иконникова А.Ю., Юрасов Р.А., Байдун Л.В., Ибрагимова С.З., Наседкина Т.В. (2020) Драйверные мутации при остром миелоидном лейкозе с инверсией хромосомы 16. *Молекуляр. биология*. **54**(3), 389–397.
27. Zhang L., Cao Z., Ruan M., Zeng Q., Zhao L., Li Q., Zou Y., Wang J., Zhu X. (2014) Monitoring the AML1/ETO fusion transcript to predict outcome in childhood acute myeloid leukemia. *Pediatr. Blood Cancer*. **61**(10), 1761–1766.
28. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. **30**(15), 2114–2120.
29. McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernytsky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M., DePristo M.A. (2010) The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. **20**(9), 1297–1303.
30. Cibulskis K., Lawrence M.S., Carter S.L., Sivachenko A., Jaffe D., Sougnez C., Gabriel S., Meyerson M., Lander E.S., Getz G. (2013) Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat. Biotechnol*. **31**(3), 213–219.
31. Vaser R., Adusumalli S., Leng S.N., Sikic M., Ng P.C. (2016) SIFT missense predictions for genomes. *Nat. Protoc*. **11**(1), 1–9.
32. Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods*. **7**(4), 248–249.
33. Schwarz J.M., Cooper D.N., Schuelke M., Seelow D. (2014) MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods*. **11**(4), 361–362.
34. Chun S., Fay J.C. (2009) Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome Res*. **19**(9), 1553–1561.
35. Povysil G., Tzika A., Vogt J., Haunschmid V., Messiaen L., Zschocke J., Klambauer G., Hochreiter S., Wimmer K. (2017) panelcn.MOPS: copy number detection in targeted NGS panel data for clinical diagnostics. *Hum. Mutat*. **38**, 889–897.
36. Boeva V., Popova T., Bleakley K., Chiche P., Cappo J., Schleiermacher G., Janoueix-Lerosey I., Delattre O., Barillot E. (2012) Control-FREEC: a tool for assessing copy number and allelic content using next-generation sequencing data. *Bioinformatics*. **28**(3), 423–425.
37. Carter S.L., Cibulskis K., Helman E., McKenna A., Shen H., Zack T., Laird P.W., Onofrio R.C., Winckler W., Weir B.A., Beroukhim R., Pellman D., Levine D.A., Lander E.S., Meyerson M., Getz G. (2012) Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nat. Biotechnol*. **30**, 413–421.
38. Miller C.A., White B.S., Dees N.D., Griffith M., Welch J.S., Griffith O.L., Vij R., Tomasson M.H., Graubert T.A., Walter M.J., Ellis M.J., Schierding W., DiPersio J.F., Ley T.J., Mardis E.R., Wilson R.K., Ding L. (2014) SciClone: inferring clonal architecture and tracking the spatial and temporal patterns of tumor evolution. *PLoS Comput. Biol*. **10**(8), e1003665.
39. Dang H.X., White B.S., Foltz S.M., Miller C.A., Luo J., Fields R.C., Maher C.A. (2017) ClonEvol: clonal ordering and visualization in cancer sequencing. *Ann. Oncol*. **28**(12), 3076–3082.
40. Klein K., Kaspers G., Harrison C.J., Beverloo H.B., Reedijk A., Bongers M., Cloos J., Pession A., Reinhardt D., Zimmerman M., Creutzig U., Dworzak M., Alonzo T., Johnston D., Hirsch B., Zapotocky M., de Moerloose B., Fynn A., Lee V., Taga T., Tawa A., Auvrignon A., Zeller B., Forestier E., Salgado C., Balwierz W., Popa A., Rubnitz J., Raimondi S., Gibson B. (2015) Clinical impact of additional cytogenetic aberra-

tions, cKIT and RAS mutations, and treatment elements in pediatric t(8;21)-AML: results from an international retrospective study by the International Berlin–Frankfurt–Munster Study Group. *J. Clin. Oncol.* **33**(36), 4247–4258.

41. Duployez N., Marceau-Renaut A., Boissel N., Petit A., Bucci M., Geffroy S., Lapillonne H., Renneville A., Ragu C., Figeac M., Celli-Lebras K., Lacombe C., Micol J.B., Abdel-Wahab O., Cornillet P., Ifrah N., Dombret H., Leverger G., Jourdan E., Preudhomme C. (2016) Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood.* **127**(20), 2451–2459.
42. Duployez N., Willekens C., Marceau-Renaut A., Boudry-Labis E., Preudhomme C. (2015) Prognosis and monitoring of core-binding factor acute myeloid leukemia: current and emerging factors. *Expert. Rev. Hematol.* **8**(1), 43–56.
43. Allen C., Hills R.K., Lamb K., Evans C., Tinsley S., Sellar R., Brien M.O., Yin J.L., Burnett A.K., Linch D.C., Gale R.E. (2013) The importance of relative mutant level for evaluating impact on outcome of *KIT*, *FLT3* and *CBL* mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia.* **27**(9), 1891–1901.
44. Farrar J.E., Schuback H.L., Ries R.E., Wai D., Hampton O.A., Trevino L.R., Alonzo T.A., Guidry Auvil J.M., Davidsen T.M., Gesuwan P., Hermida L., Muzny D.M., Dewal N., Rustagi N., Lewis L.R., Gamis A.S., Wheeler D.A., Smith M.A., Gerhard D.S., Meshinchi S. (2016) Genomic profiling of pediatric acute myeloid leukemia reveals a changing mutational landscape from disease diagnosis to relapse. *Cancer Res.* **76**(8), 2197–2205.
45. Панферова А.В., Гаськова М.В., Зеркаленкова Е.А., Апрелова Е.В., Казакова А.Н., Тимофеева Н.М., Солдаткина О.И., Никитин Е.Н., Чекменева Ю.Ю., Калинина И.И., Плясунова С.А., Ольшанская Ю.В., Новичкова Г.А., Масчан М.А., Масчан А.А. (2018) Молекулярно-генетическая характеристика ОМЛ с t(8;21) у детей. *Вопр. гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии.* **17**(1), 9–15.
46. Yang H., Kurtenbach S., Guo Y., Lohse I., Durante M.A., Li J., Li Z., Al-Ali H., Li L., Chen Z., Field M.G., Zhang P., Chen S., Yamamoto S., Zhuo Li., Zhuo Y., Nimer S.D., Harbour J.W., Wahlestedt C., Xu M., Yang F.-C. (2018) Gain of function of ASXL1 truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies. *Blood.* **131**(3), 328.
47. Schnittger S., Eder C., Jeromin S., Alpermann T., Fasan A., Grossmann V., Kohlmann A., Tllig T., Klopp N., Wichmann H.-E., Kreuzer K.-A., Schmid C., Staib P., Peceny R., Schmitz N., Kern W., Haferlach C., Haferlach T. (2013) ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia.* **27**(1), 82.
48. Yamato G., Shiba N., Yoshida K., Shiraishi Y., Hara Y., Ohki K., Okubo J., Okuno H., Chiba K., Tanaka H., Kinoshita A., Moritake H., Kiyokawa N., Tomizawa D., Park M.J., Sotomatsu M., Taga T., Adachi S., Tawa A., Horibe K., Arakawa H., Miyano S., Ogawa S., Hayashi Y. (2017) ASXL2 mutations are frequently found in pediatric AML patients with t(8;21)/ RUNX1-RUNX1T1 and associated with a better prognosis. *Genes Chromosomes Cancer.* **56**(5), 382–393.
49. Krauth M.T., Eder C., Alpermann T., Bacher U., Nadarajah N., Kern W., Haferlach C., Haferlach T., Schnittger S. (2014) High number of additional genetic lesions in acute myeloid leukemia with t(8;21)/ RUNX1-RUNX1T1: frequency and impact on clinical outcome. *Leukemia.* **28**(7), 1449–1458.
50. Itzykson R., Duployez N., Fasan A., Decool G., Marceau-Renaut A., Meggendorfer M., Jourdan E., Petit A., Lapillonne H., Micol J.B., Cornillet-Lefebvre P., Ifrah N., Leverger G., Dombret H., Boissel N., Haferlach T., Preudhomme C. (2018) Clonal interference of signaling mutations worsens prognosis in core-binding factor acute myeloid leukemia. *Blood.* **132**(2), 187–196.
51. Bashey A., Gill R., Levi S., Farr C.J., Clutterbuck R., Millar J.L., Pragnell I.B., Marshall C.J. (1992) Mutational activation of the *N-ras* oncogene assessed in primary clonogenic culture of acute myeloid leukemia (AML): implications for the role of N-ras mutation in AML pathogenesis. *Blood.* **79**(4), 981–989.
52. Hirsch P., Zhang Y., Tang R., Joulin V., Boutroux H., Pronier E., Moatti H., Flandrin P., Marzac C., Bories D., Fava F., Mokrani H., Betems A., Lorre F., Favier R., Féger F., Mohty M., Douay L., Legrand O., Bilhou-Nabera C., Louache F., Delhommeau F. (2016) Genetic hierarchy and temporal variegation in the clonal history of acute myeloid leukaemia. *Nat. Commun.* **7**, 12475.
53. Itzykson R., Kosmider O., Renneville A., Morabito M., Preudhomme C., Berthon C., Adès L., Fenaux P., Platzbecker U., Gagey O., Rameau P., Meurice G., Oréar C., Delhommeau F., Bernard O.A., Fontenay M., Vainchenker W., Droin N., Solary E. (2013) Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood.* **121**(12), 2186–2198.
54. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S., Math M., Larkin J., Endesfelder D., Gronroos E., Martinez P., Matthews N., Stewart A., Tarpey P., Varela I., Phillimore B., Begum S., McDonald N.Q., Butler A., Jones D., Raine K., Latimer C., Santos C.R., Nohadani M., Eklund A.C., Spencer-Dene B., Clark G., Pickering L., Stamp G., Gore M., Szallasi Z., Downward J., Futreal P.A., Swanton C. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* **366**(10), 883–892.
55. Paguirigan A.L., Smith J., Meshinchi S., Carroll M., Maley C., Radich J.P. (2015) Single-cell genotyping demonstrates complex clonal diversity in acute myeloid leukemia. *Sci. Transl. Med.* **7**(281), 281re282.
56. Masetti R., Castelli I., Astolfi A., Bertuccio S.N., Indio V., Togni M., Belotti T., Serravalle S., Tarantino G., Zecca M., Pigazzi M., Basso G., Pession A., Locatelli F. (2016) Genomic complexity and dynamics of clonal evolution in childhood acute myeloid leukemia studied with whole-exome sequencing. *Oncotarget.* **7**(35), 56746–56757.
57. Shiba N., Yoshida K., Shiraishi Y., Okuno Y., Yamato G., Hara Y., Nagata Y., Chiba K., Tanaka H., Terui K., Kato M., Park M.J., Ohki K., Shimada A., Takita J., Tomizawa D., Kudo K., Arakawa H., Adachi S., Taga T., Tawa A., Ito E., Horibe K., Sanada M., Miyano S.,

Ogawa S., Hayashi Y. (2016) Whole-exome sequencing reveals the spectrum of gene mutations and the clonal evolution patterns in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **175**(3), 476–489.

58. Sood R., Hansen N.F., Donovan F.X., Carrington B., Bucci D., Maskeri B., Young A., Trivedi N.S., Kohlschmidt J., Stone R.M., Caligiuri M.A., Chandrasekharappa S.C., Marcucci G., Mullikin J.C., Bloomfield C.D., Liu P. (2016) Somatic mutational landscape of AML with inv(16) or t(8;21) identifies patterns of clonal evolution in relapse leukemia. *Leukemia.* **30**(2), 501–504.
59. Liu F., Huang J., He F., Ma X., Fan F., Meng M., Zhuo Y., Zhang L. (2020) CD96, a new immune checkpoint, correlates with immune profile and clinical outcome of glioma. *Sci. Rep.* **10**(1), 10768.
60. Shalom B., Farago M., Pikarsky E., Katzav S. (2018) *Vav1* mutations identified in human cancers give rise to different oncogenic phenotypes. *Oncogenesis.* **7**(10), 80. https://doi.org/10.1038/s41389-018-0091-1
61. Bierie B., Pierce S.E., Kroeger C., Stover D.G., Pattabiraman D.R., Thiru P., Donaher J.L., Reinhardt F., Chaffer C.L., Keckesova Z., Weinberg R.A. (2017) Integrin-β4 identifies cancer stem cell-enriched populations of partially mesenchymal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**(12), E2337–E2346.
62. Wilmott J.S., Johansson P.A., Newell F., Waddell N., Ferguson P., Quek C., Patch A.M., Nones K., Shang P., Pritchard A.L., Kazakoff S., Holmes O., Leonard C., Wood S., Xu Q., Saw R.P.M., Spillane A.J., Stretch J.R., Shannon K.F., Kefford R.F., Menzies A.M., Long G.V., Thompson J.F., Pearson J.V., Mann G.J., Hayward N.K., Scolyer R.A. (2019) Whole genome sequencing of melanomas in adolescent and young adults reveals distinct mutation landscapes and the potential role of germline variants in disease susceptibility. *Int. J. Cancer.* **144**(5), 1049–1060.
63. Yeh I., Jorgenson E., Shen L., Xu M., North J.P., Shain A.H., Reuss D., Wu H., Robinson W.A., Olshen A., von Deimling A., Kwok P.Y., Bastian B.C., Asgari M.M. (2019) Targeted genomic profiling of acral melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **111**(10), 1068–1077.
64. Newell F., Wilmott J.S., Johansson P.A., Nones K., Addala V., Mukhopadhyay P., Broit N., Amato C.M., Van Gulick R., Kazakoff S.H., Patch A.M., Koufariotis L.T., Lakis V., Leonard C., Wood S., Holmes O., Xu Q., Lewis K., Medina T., Gonzalez R., Saw R.P.M., Spillane A.J., Stretch J.R., Rawson R.V., Ferguson P.M., Dodds T.J., Thompson J.F., Long G.V., Levesque M.P., Robinson W.A., Pearson J.V., Mann G.J., Scolyer R.A., Waddell N., Hayward N.K. (2020) Whole-genome sequencing of acral melanoma reveals genomic complexity and diversity. *Nat. Commun.* **11**(1), 5259.
65. Lindsley R.C., Mar B.G., Mazzola E., Grauman P.V., Shareef S., Allen S.L., Pigneux A., Wetzler M., Stuart R.K., Erba H.P., Damon L.E., Powell B.L., Lindeman N., Steensma D.P., Wadleigh M., DeAngelo D.J., Neuberg D., Stone R.M., Ebert B.L. (2015) Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood.* **125**(9), 1367–1376.
66. Jahn N., Terzer T., Sträng E., Dolnik A., Cocciardi S., Panina E., Corbacioglu A., Herzig J., Weber D., Schrade A., Götze K., Schröder T., Lübbert M., Wellnitz D., Koller E., Schlenk R.F., Gaidzik V.I., Paschka P., Rücker F.G., Heuser M., Thol F., Ganser A., Benner A., Döhner H., Bullinger L., Döhner K. (2020) Genomic heterogeneity in core-binding factor acute myeloid leukemia and its clinical implication. *Blood Adv.* **4**(24), 6342–6352.
67. Cerrano M., Duchmann M., Kim R., Vasseur L., Hirsch P., Thomas X., Quentin S., Pasanisi J., Passet M., Rabian F., Rahmé R., Lengliné E., Raffoux E., Dhédin N., Sébert M., Maarek O., Raimbault A., Celli-Lebras K., Adès L., Fenaux P., Boissel N., Delhommeau F., Soulier J., Dombret H., Clappier E., Sujobert P., Itzykson R. (2020) Clonal dominance is an adverse prognostic factor in acute myeloid leukemia treated with intensive chemotherapy. *Leukemia.* **35**(3), 712–723.
68. Lin Z., Meng X., Wen J., Corral J.M., Andreev D., Kachler K., Schett G., Chen X., Bozec A. (2020) Intratumor heterogeneity correlates with reduced immune activity and worse survival in melanoma patients. *Front Oncol.* **10**, 596493.
69. Caiado F., Silva-Santos B., Norell H. (2016) Intra-tumour heterogeneity – going beyond genetics. *FEBS J.* **283**(12), 2245–2258.
70. Miles L.A., Bowman R.L., Merlinsky T.R., Csete I.S., Ooi A.T., Durruthy-Durruthy R., Bowman M., Famulare C., Patel M.A., Mendez P., Ainali C., Demaree B., Delley C.L., Abate A.R., Manivannan M., Sahu S., Goldberg A.D., Bolton K.L., Zehir A., Rampal R., Carroll M.P., Meyer S.E., Viny A.D., Levine R.L. (2020) Single-cell mutation analysis of clonal evolution in myeloid malignancies. *Nature.* **587**(7834), 477–482.
71. Easwaran H., Tsai H.-C., Baylin S.B. (2014) Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol. Cell.* **54**(5), 716–727.
72. Gerstung M., Pellagatti A., Malcovati L., Giagounidis A., Porta M.G.D., Jädersten M., Dolatshad H., Verma A., Cross N.C.P., Vyas P., Killick S., Hellström-Lindberg E., Cazzola M., Papaemmanuil E., Campbell P.J., Boultwood J. (2015) Combining gene mutation with gene expression data improves outcome prediction in myelodysplastic syndromes. *Nat. Commun.* **6**, 5901.
73. Blundell J.R., Levy S.F. (2014) Beyond genome sequencing: lineage tracking with barcodes to study the dynamics of evolution, infection, and cancer. *Genomics.* **104**, 417–430.
74. Patel A.P., Tirosh I., Trombetta J.J., Shalek A.K., Gillespie S.M., Wakimoto H., Cahill D.P., Nahed B.V., Curry W.T., Martuza R.L., Louis D.N., Rozenblatt-Rosen O., Suvà M.L., Regev A., Bernstein B.E. (2014) Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science.* **344**, 1396–1401.
75. Junker J.P., van Oudenaarden A. (2015) Single-cell transcriptomics enters the age of mass production. *Mol. Cell.* **58**, 563–564.

DETERMINATION OF SUBCLONAL TUMOR STRUCTURE IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN CHILDREN AND ACRAL MELANOMA USING NEXT-GENERATION SEQUENCING DATA

G. S. Krasnov[1], L. G. Ghukasyan[1], I. S. Abramov[1], and T. V. Nasedkina[1, *]

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

**e-mail: nased@biochip.ru*

Intratumoral heterogeneity and clonal variability is one of the central problems of clinical oncology, being the reason for the development of resistance to therapy, relapse and metastases. The use of high-throughput sequencing of tumor exome allows investigating tumor subclonal organization. Comparative analysis of target panel sequencing data, clinical exome and complete exome in tumors with different mutational load (acute myeloid leukemia in children and acral melanoma) was carried out. Target sequencing of acute myeloid leukemia (AML) samples shows the presence of more than one potential driver mutation in signaling pathway genes *KIT*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *FLT3* in one patient, reflecting the complex clonal structure of the tumor substrate. Analysis of exome sequencing data from the same AML patients allows the isolation of clusters of mutant alleles corresponding to different populations of leukemic cells in the sample. Comparison of the mutation profile of the primary AML sample, the sample in remission and in relapse makes it possible to trace the dynamics of change in the clonal composition of the tumor. Subclonal tumor structure was also investigated in the acral melanoma case as an example. Using SciClone and ClonEvol packages, the clustering of mutant alleles presented in the sample with a close frequency was carried out. Based on these data, a prediction of the intratumoral clonal composition was made and a model of clonal evolution was proposed describing changes in the clonal composition of the tumor during metastasis, including the appearance of new mutations that may be associated with further progression of the disease. The approach used allows the identification of mutations causing the formation of new tumor clones, which may have a proliferative advantage, also in the conditions of antitumor therapy.

Keywords: high-throughput sequencing, acral melanoma, acute myeloid leukemia, somatic mutations, variant allele frequency

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 5, с. 846–857

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 577.213.08;577.2.08

РЕПОРТЕРНАЯ СИСТЕМА ЛЮЦИФЕРАЗА-EGFP ДЛЯ ОЦЕНКИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ[1]

© 2021 г.
X. X. Wang[a, *], H. J. Jia[b], Y. R. Lv[a, b], H. H. Sun[a, b], X. L. Wei[c], J. Y. Tan[c], Z. Z. Jing[b, **]

[a] *School of Public Health, Lanzhou University, Lanzhou, 730000 China*

[b] *State Key Laboratory of Veterinary of Etiological Biology, Key Laboratory of Veterinary Public Health of Agricultural Ministry, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, 730000 China*

[c] *Institute of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, 730000 China*

**e-mail: wangxiaoxia@lzu.edu.cn*

***e-mail: jingzhizhong@caas.cn*

Поступила в редакцию 06.06.2020 г.
После доработки 22.10.2020 г.
Принята к публикации 03.11.2020 г.

Метилирование – эпигенетическая модификация ДНК, играющая важную роль во многих биологических процессах. Представлена система pLTR-Luc2P-EGFP для оценки метилирования ДНК в клетках млекопитающих. В этой системе экспрессия репортерного гена люциферазы Luc2P-EGFP находится под контролем 5'-длинного концевого повтора (LTR) HIV-1, который содержит несколько CpG-сайтов. Метилирование этих CpG-сайтов приводит к прекращению экспрессии Luc2P-EGFP, что можно визуализировать с помощью флуоресцентной микроскопии с последующей количественной оценкой в тесте определения люциферазной активности. Для проверки действия системы конструкцию pLTR-Luc2P-EGFP метилировали *in vitro*, трансфицировали в линию клеток 293T и наблюдали снижение экспрессии Luc2P-EGFP. Уровень метилирования ДНК определяли, используя предварительно смешанные образцы репортерной ДНК с уровнями метилирования от 0 до 100%. Показано, что точность определения люциферазной активности превышает точность вестерн-блотинга против EGFP. Анализ методом Bland–Altman показал, что результаты определения люциферазной активности хорошо согласуются с фактическими уровнями метилирования ДНК. Нами создана репортерная система, способная эффективно и надежно выявлять количественные изменения в метилировании ДНК в клетках млекопитающих. Эту систему можно использовать в качестве инструмента для высокопроизводительного скрининга молекул, модулирующих метилирование ДНК.

Ключевые слова: люцифераза светлячка, ген *Luc2P*, клеточная репортерная система, промотор HIV-1, 5'-LTR, метилирование ДНК

DOI: 10.31857/S0026898421050098

ВВЕДЕНИЕ

Эпигенетика описывает фенотипические изменения, которые влияют на экспрессию генов, не затрагивая нуклеотидные последовательности ДНК [1]. Эпигенетические изменения, в число которых входят метилирование ДНК, модификации гистонов и микроРНК, наследуемы и обратимы [1, 2]. С тех пор, как более 40 лет назад Riggs A.D. [3] и Holliday R. [4] предложили убедительную модель молекулярного механизма наследования, метилирование ДНК рассматривали как парадигму передачи эпигенетической информации [5]. В настоящее время очевидно, что метилирование ДНК – это распространенная эпигенетическая модификация, которая играет важную регуляторную роль в таких процессах, как сайленсинг транспозонов, геномный импринтинг, инактивация X-хромосомы и процессы развития [6, 7]. Нарушения метилирования часто ассоциированы с повышенной частотой возникновения некоторых заболеваний [8].

В клетках млекопитающих метилирование в основном происходит по C5 цитозинового кольца (5mC) [9–11]. Метилцитозин содержится преимущественно в CpG-динуклеотидах, которые составляют только 1% генома человека. Однако богатые CpG участки, так называемые CpG-островки, расположены в промоторных областях более 70% всех известных генов человека [12–14]. 5mC, особенно кластеризованные в сайтах CpG, являются важными сайленсерами транскрипции с промоторов генов и эндогенных ретротранспо-

[1] Текст представлен на английском языке.

зонов в геноме [15–17]. Многие исследования показали, что эпигенетический сайленсинг множества генов, вызванный гиперметилированием CpG-островков, ассоциированных с промотором, часто связан с развитием конкретных заболеваний [18–20]. В связи с этим разработка простого, надежного и чувствительного метода обнаружения метилирования ДНК и его изменений (например, гипер- или гипометилирования) представляет большой интерес.

Традиционные методы анализа метилирования ДНК основаны преимущественно на обработке бисульфитом натрия, при которой неметилированный цитозин превращается в урацил, в то время как метилированный цитозин устойчив к бисульфиту и не подвергается превращению [21]. Это позволяет различить метилированную и неметилированную ДНК, для чего используют метил-специфичную ПЦР, секвенирование ДНК или комбинированный бисульфитный рестрикционный анализ. Благодаря своей надежности и точности эти методы широко используются для количественной оценки сайт-специфического метилирования ДНК. Однако они требуют проведения таких сложных процедур, как клонирование и секвенирование, что ограничивает их использование в высокопроизводительном анализе [22, 23]. Вместе с тем, разработаны методы, основанные на высокоэффективной жидкостной хроматографии [24], ПЦР с рестрикционными ферментами [25] и газовая хроматография/масс-спектрометрия [26]. Эти методы сложны, трудоемки и дороги. В связи с этим возникает потребность в более удобном и простом методе определения метилирования ДНК.

Люциферазы, выделенные из некоторых видов животных, – это ферменты, катализирующие реакцию, которая сопровождается испусканием света (биолюминесценцией). Люцифераза часто используется в качестве репортера для мониторинга активности гена/промотора гена из-за ее высокой чувствительности, надежности сигнала и удобства анализа. К примеру, Sanchez и соавт. использовали репортерный ген люциферазы для анализа взаимосвязи между структурой и биологической активностью стриголактонов [27]. Solberg и соавт. с помощью люциферазного теста охарактеризовали активность 5'-фланкирующего промотора гена *Tcf3* мыши [28]. Более того, комбинация двух люцифераз – светлячковой и *Renilla* – повысила точность и воспроизводимость анализа; при этом люцифераза *Renilla* служит внутренним контролем при мониторинге количества и жизнеспособности клеток. Таким образом, репортерный люциферазный тест можно рассматривать как мощный инструмент для изучения регуляторных элементов генов. Так, для изучения регуляции транскрипции гена *Sox2* человека создан репортерный люциферазный тест на основе клеточной линии 293-Sox2-Luciferase [29]. Недавно для тестирования перекрестной нейтрализации коронавирусов сыворотками пациентов с SARS и COVID-19 получен репортерный люциферазный вирус icSARS-CoV-2-nLuc-GFP [30].

Теория эпигенетической регуляции предполагает, что активность промотора согласуется с уровнем метилирования ДНК [31, 32]. Поэтому уровень люциферазной активности в дальнейшем использовали в качестве показателя статуса метилирования и/или изменений метилирования промотора гена. Так, по уровню активности люциферазы светлячка оценили влияние Gadd45a на метилирование ДНК [33]. Определение метилирования участков CpG с использованием плазмиды, содержащей HIV LTR-люциферазу, упомянуто в небольшом отчете [34]. Однако количественную точность и надежность детекции, включая дозовую зависимость между уровнями метилирования и активностью люциферазы, еще предстоит оценить.

Чтобы полностью охарактеризовать свойства репортерной системы на основе люциферазы, в качестве репортера для мониторинга активности промотора мы использовали модифицированный ген люциферазы светлячка (*Luc2P*), слитый с EGFP, и создали клеточную систему для измерения изменений метилирования ДНК. Результат анализа активности люциферазы подтвержден путем сравнения с данными, полученными с помощью анализа чувствительности к HpaII [35] и вестерн-блотинга [36, 37]. Нами доказано, что эта репортерная система позволяет надежно и точно измерять изменения метилирования ДНК в живых клетках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Конструкции ДНК. Экспрессионную плазмиду pEGFP-N1, приобретенную у “BD Biosciences Clontech” (США), использовали в качестве основы для конструирования pLTR-Luc2P-EGFP. 5'-LTR HIV-1 амплифицировали с помощью ПЦР из HIV-1 pNL4.3 и использовали для замены цитомегаловирусного промотора (CMV) в плазмиде pEGFP-N1 по сайтам AseI и NheI. *Luc2P* амплифицировали из pGL4.32 [luc2P/NF-kB-RE/Hygro] (“Promega”, США) и клонировали в pEGFP-N1 по сайтам HindIII и BamHI. Правильность структуры плазмиды pLTR-Luc2P-EGFP проверена секвенированием. Для ПЦР-амплификации использовали праймеры:

5'-AseI-LTR – TCGTATTAATTGGAAGG-GCTAATTTGGTC;

3'-NheI-LTR – CTAGCTAGCTGCTA-GAGATTTTCCACACTGAC;

5'-HindIII-luc2P – CCCAAGCTTATG-GAAGATGCCAAAAACATTA;

3'-BamHI-luc2P – CGGGATCCGACGTT-GATCCTGGCGCTGG.

Метилирование ДНК плазмиды *in vitro*. Плазмиду pLTR-Luc2P-EGFP обрабатывали CpG-метилазой M.SssI (“Zymo Res”, США). Плазмиду (2 мкг) инкубировали с 0.6 мМ S-аденозилметионина и 4 ед. M.SssI при 30°C в течение 6 ч. Затем в реакционную систему добавляли 2 ед. M.SssI и продолжали инкубировать при 30°C в течение 6–8 ч. Обработанную плазмиду концентрировали с использованием 3 М ацетата натрия. Полное CpG-метилирование плазмиды pLTR-Luc2P-EGFP подтверждено расщеплением эндонуклеазами (HpaII и MspI, “Thermo Fisher Scientific”, США) и бисульфит-опосредованным картированием остатков метилцитозина.

Бисульфит-опосредованное картирование метилцитозина. После бисульфитной конверсии (“Zymo Res.”) интересующие области плазмиды pmeLTR-Luc2P-EGFP, обработанной M.SssI, и неметилированной плазмиды pLTR-Luc2P-EGFP амплифицировали с помощью ПЦР (праймеры для LTR: LTR-BSP-F, 5'-TATGAGTTAGTATGGATGGG-3', и LTR-BSP-R, 5'-AATCTAACCAAAAAAACCCAATACA-3'). Продукты ПЦР выделяли из геля с помощью набора для экстракции ДНК (“Axygen”, США) и клонировали в вектор pJET1.2 для секвенирования. Данные анализировали с помощью онлайн-сервиса программного обеспечения QUantification Tool for Methylation Analysis (http://quma.cdb.riken.jp/) [38].

Культуры клеток и транзиентная трансфекция. Клетки линий 293T (эмбриональная почка человека, HEK) и HeLa культивировали в среде DMEM (“Gibco”, США) с добавлением 100 ед./мл пенициллина, 0.1 мг/мл стрептомицина и 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS, “Gibco”). Клетки культивировали при 37°C в инкубаторе с содержанием 5% CO_2.

Клетки 293T для проведения транзиентной трансфекции высевали в 12-луночные планшеты. По достижении 80% монослоя клетки трансфицировали неметилированной плазмидой pLTR-Luc2P-EGFP или метилированной pmeLTR-Luc2P-EGFP с использованием реагента FuGENE® HD (“Promega”), следуя протоколу производителя. Контрольный вектор pGL4.74 с геном люциферазы *Renilla* [hRluc/TK] (“Promega”) котрансфицировали с репортерным вектором в соотношении 1 : 10.

Иммунофлуоресцентный анализ. Для определения 5mC клетки HeLa, выращенные на покровных стеклах, трансфицировали неметилированной и метилированной плазмидой pLTR-Luc2P-EGFP (0.2 мкг/лунку) в течение 36 ч и фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 15 мин при комнатной температуре. Клетки трижды промывали PBS и для блокирования инкубировали в PBS, содержащем 5% FBS и 0.3% Triton X-100, затем инкубировали в течение ночи при 4°C с моноклональными антителами к 5mC (1 : 100, “EpiGentek”, США). На следующий день после повторного выдерживания при комнатной температуре в течение 1 ч клетки трижды промывали PBS и инкубировали с антителами козы к IgG (H + L) мыши, конъюгированными с красителем Alexa Fluor 555 (1 : 500, “Thermo Fisher”) в течение 1 ч при 37°C. После трех отмывок в PBS клетки инкубировали с раствором DAPI (“Beyotime”, Китай) в течение 3–5 мин. Образцы промывали PBS, затем помещали на предметные стекла со средой для фиксации флуоресценции (“Beyotime”) и исследовали с помощью конфокального микроскопа (“Leica Inc”, Германия).

Для обнаружения EGFP клетки 293T исследовали через 36–48 ч после трансфекции с помощью флуоресцентного инвертированного микроскопа Nikon (Nikon ECLIPSE T*i,* Япония), изображения фотографировали и обрабатывали с помощью NIS-Elements D.

Вестерн-блотинг. Через 48 ч после трансфекции клетки линии 293T лизировали на льду в буфере RIPA с добавлением ингибиторов протеаз (“Beyotime”). Лизаты фракционировали с помощью электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле (SDS-PAGE) и переносили на нитроцеллюлозную (NC) мембрану (“Millipore”, США). Мембраны блокировали 5%-ным обезжиренным сухим молоком в PBS, инкубировали с антителами кролика к GFP (разведение 1 : 400 в PBS, “Santa Cruz”, США) и снова инкубировали со вторичными антителами козы к IgG кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (IgG-HRP, разведение 1 : 10000 в PBS, “Elabscience”, США), иммуноблотинг GAPDH выполняли с антителом к GAPDH человека (1 : 10000, “Sigma”, США) в качестве контроля. Детектировали с использованием усиленной хемилюминесценции (“Bio-Rad”, США).

Анализ активности люциферазы. Активность люциферазы светлячков и *Renilla* измеряли с использованием системы анализа репортеров люциферазы Dual-Glo® (“Promega”). Через 48 ч после трансфекции в лунки планшета добавляли реагент Dual-Glo® в объеме, равном объему культуральной среды. Планшет переворачивали в течение 20 мин для достижения полного лизиса. Люминесценцию люциферазы светлячка (Fluc) измеряли на люминометре для микропланшетов GloMax®-96 (“Promega”). Затем добавляли равное количество реагента Dual-Glo® Stop & Glo® и через 20 мин измеряли люминесценцию *Renilla* (Rluc). Относительную активность люциферазы (RLA, Relative Luciferase Activity) рассчитывали по соотношению активностей Fluc/Rluc.

Относительный коэффициент ответа (RRR, Relative Response Ratio) рассчитывали по формуле [(экспериментальный RLA) – (RLA клеток, трансфицированных полностью метилированной ДНК)]/[(RLA клеток, трансфицированных неметилированной ДНК)-(RLA клеток, трансфицированных полностью метилированной ДНК)].

Анализ чувствительности к HpaII. Уровни CpG-метилирования 5'-LTR в pLTR-Luc2P-EGFP определяли с помощью количественной ПЦР в реальном времени (кПЦР) после расщепления HpaII, которое блокируется метилированием CpG [35]. Суммарную ДНК выделяли из трансфицированных клеток с помощью набора Quick-DNA™ Miniprep Plus ("Zymo"). ДНК (0.5 мкг) инкубировали с 10 ед. HpaII или в контрольной реакции без HpaII при 37°C в течение 4 ч и инактивировали в течение 20 мин при 80°C. В количественной ПЦР с SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus, "Takara", Китай) использовали равные количества как в контрольной реакции, так и в реакции с добавлением HpaII. Затем амплифицировали 5'-LTR, фланкирующий два сайта расщепления HpaII. В качестве внутреннего стандарта использовали конститутивный ген *GAPDH*. ПЦР проводили на приборе Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR в следующих условиях: 95°C в течение 30 с, затем 40 циклов – 95°C, 5 с и 60°C, 30 с. Последовательности праймеров для 5'-LTR: прямой – GCCAATGAAGGAGAGAACAACA и обратный – AGCGGAAAGTCCCTTGTA; для *GAPDH*: прямой – GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC и обратный – CAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGT. Реакцию проводили в трех повторностях. Чувствительность сайта CCGG к HpaII рассчитывали как $[1-2^{Ct\,(пустой)\,-\,Ct\,(HpaII)}] \times 100\%$.

Статистический анализ. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение, вычисленное по данным по крайней мере двух независимых экспериментов; каждое повторение состоит не менее чем из трех технических повторов. Двусторонний *t*-критерий Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выполнены с использованием SPSS (версия 21, IBM). Статистически значимым считали $P < 0.05$.

Гистограмма получена с помощью Graphpad Prism 6 для наиболее наглядного отображения данных. Стандартную кривую строили с помощью Excel 2013, чтобы показать корреляцию между результатами трех анализов метилирования ДНК и стандартом. График Bland–Altman получен с помощью программного обеспечения MedCalc для оценки соответствия трех анализов метилирования ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование и метилирование репортерного вектора pLTR-Luc2P-EGFP

В качестве основы для создания репортерного вектора использовали pEGFP-N1. Модифицированную люциферазу светлячка Luc2P встраивали в сайт множественного клонирования, в качестве репортера использовали слитый белок Luc2P-EGFP. Исходный промотор CMV был заменен на 5'-LTR HIV-1, который содержит восемь сайтов CpG и легко метилируется [34, 39] (рис. 1*а*). После метилирования *in vitro* с помощью M.SssI вектор pmeLTR-Luc2P-EGFP может быть доставлен в клетки млекопитающих. Затем статус метилирования промотора 5'-LTR можно отслеживать, анализируя чувствительность к HpaII (ПЦР в реальном времени) прямо [35] или косвенно за счет измерения уровня экспрессии репортерного гена Luc2P-EGFP. В трансфицированных клетках экспрессию Luc2P-EGFP можно оценивать качественно с помощью флуоресцентной микроскопии, полуколичественно – с помощью вестерн-блотинга (антитела к GFP) или определять количественно по активности люциферазы (рис. 1*б*).

Вектор pmeLTR-Luc2P-EGFP после обработки M.SssI анализировали с использованием рестриктаз HpaII/MspI. Оба фермента распознают один и тот же сайт CCGG, однако расщепление HpaII может быть заблокировано метилированием CpG [40]. На рис. 2*а* приведена картина расщепления метилированной и неметилированной ДНК рестриктазой MspI, показывающая присутствие сайтов CCGG в векторе pLTR-Luc2P-GFP. Однако устойчивой к действию HpaII была только ДНК, обработанная M.SssI, что указывает на полное метилирование CpG-сайтов в pmeLTR-Luc2P-EGFP после обработки M.SssI. Эффективность метилирования подтверждена также бисульфитным секвенированием области LTR. Как показано на рис. 2*б*, в четырех из шести плазмидных клонов, обработанных M.SssI (M1–M6), степень метилирования CpG-сайтов составляла 87.5%, а в остальных двух – 75%. Напротив, во всех шести неметилированных клонах (U1–U6) метилированы были 0% сайтов CpG. Затем pmeLTR-Luc2P-EGFP трансфицировали в клетки линии HeLa, 5mC определяли с помощью иммунофлуоресцентного анализа. В клетках, трансфицированных неметилированной ДНК, 5mC не обнаружен (рис. 2*в*, нижняя панель). В клетках, трансфицированных pmeLTR-Luc2P-EGFP, 5mC обнаружен и в основном локализован в ядре (рис. 2*в*, верхняя панель). По-видимому, pmeLTR-Luc2P-EGFP остается метилированным и стабильным после доставки в живые клетки.

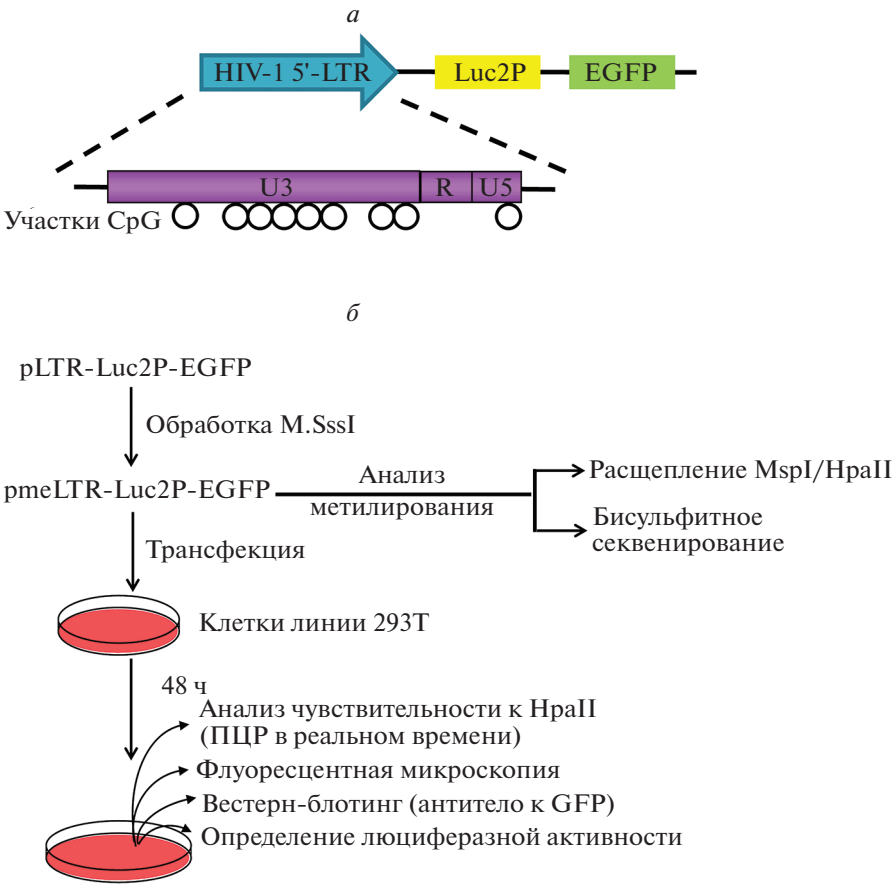

Рис. 1. Описание репортерного вектора и схема эксперимента. *а* – Схематическое изображение конструкции pLTR-Luc2P-EGFP. Показаны ключевые компоненты, в которых экспрессия слитого белка Luc2P-EGFP находится под контролем промотора 5'-LTR HIV-1. *б* – Схематическая иллюстрация экспериментальных процедур.

Оценка репортерной системы

Для оценки репортерной системы равные количества репортерных плазмид, обработанных или необработанных M.SssI, вводили в клетки линии 293T. Через 48 ч после трансфекции клетки анализировали согласно схеме, представленной на рис. 1*б*. Методами флуоресцентной микроскопии и вестерн-блотинга показано более сильное подавление экспрессии Luc2P-GFP в клетках, трансфицированных pmeLTR-Luc2P-EGFP, чем в клетках, трансфицированных неметилированной плазмидой (рис. 3*а*, *б*). Аналогичный результат получен с помощью анализа активности люциферазы, т.е. относительная активность люциферазы в клетках, трансфицированных pmeLTR-Luc2P-EGFP, была значительно снижена (рис. 3*в*, $P < 0.01$). Более того, чувствительность ДНК, выделенной из клеток, трансфицированных pmeLTR-Luc2P-EGFP, к HpaII была значительно снижена (рис. 3*г*, $P < 0.01$), т.е. подавление экспрессии гена коррелирует с метилированием промотора. Таким образом, показано, что эти три метода (обнаружение EGFP, Luc2P, 5mC в области LTR) позволяют отличать метилированные образцы ДНК от неметилированных.

Количественная оценка статуса метилирования с помощью репортерной системы

Позволяет ли наша система количественно определять метилирование ДНК? Чтобы понять это, мы провели эксперимент с разведением. Полностью метилированную плазмиду (pmeLTR-Luc2P-EGFP) принимали за 100%, а неметилированную (pLTR-Luc2P-EGFP) – за 0%. Плазмиды смешивали в различных соотношениях (3 : 1, 2 : 2, 1 : 3) с получением 75, 50 и 25% метилированной плазмиды. Смесью ДНК с разными градиентами метилирования (100, 75, 50, 25, 0%) трансфицировали клетки линии 293T и определяли статус метилирования. Как следует из рис. 4, снижение уровней метилирования приводит к постепенному увеличению экспрессии Luc2P-GFP; на это указывает интенсивность флуоресценции, данные вестерн-блотинга, относительный коэффициент ответа (RRR) люциферазного теста. Та же тенденция показана при анализе чувствительно-

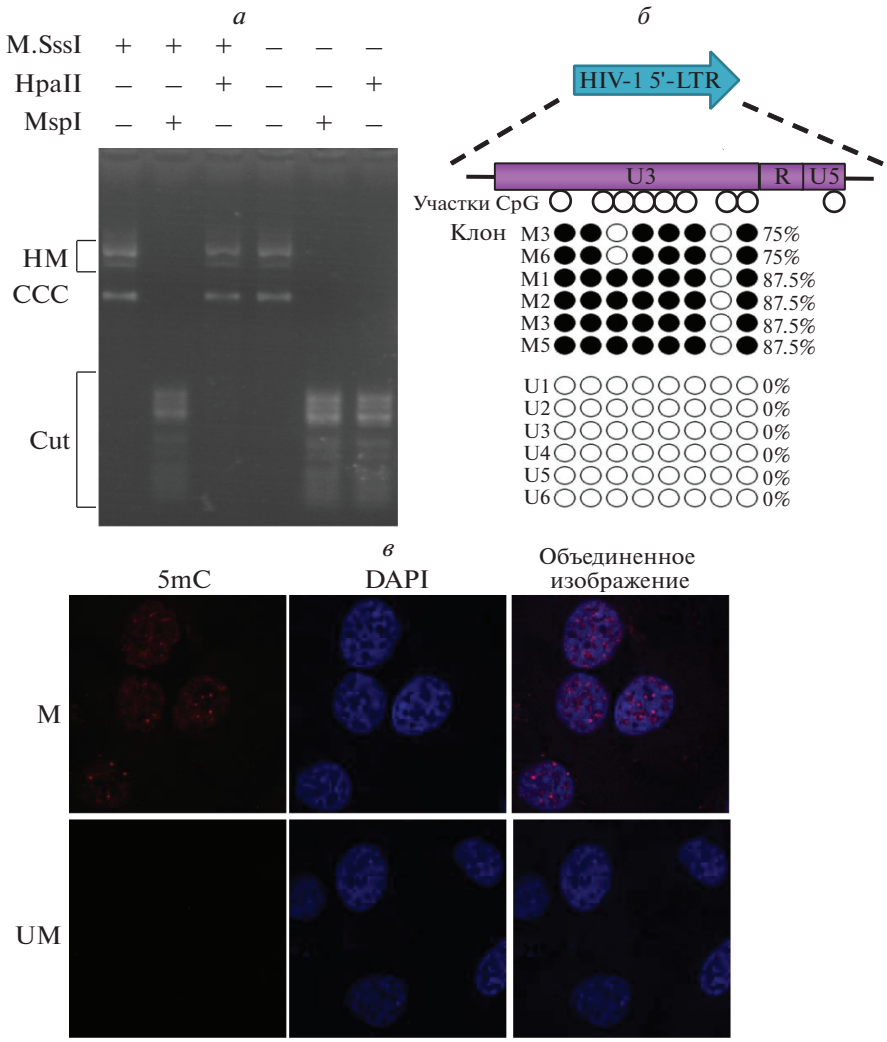

Рис. 2. Анализ метилирования ДНК, опосредованного M.SssI. *а* – Расщепление ДНК рестрикционной эндонуклеазой. Метилированные (M.SssI+) и неметилированные (M.SssI-) расщепляли ДНК-субстраты pLTR-Luc2P-GFP, как показано. HM, CCC и Cut – более высокая масса, ковалентно замкнутая кольцевая и расщепленная плазмида соответственно. *б* – Бисульфит-опосредованное картирование pLTR-Luc2P-GFP. Каждая строка представляет собой молекулу ДНК, независимо клонированную из метилированных (M1–M6) или неметилированных (U1–U6) клонов pLTR-Luc2P-EGFP. Каждый столбец представляет один CpG-сайт в области LTR. Белые кружки указывают на неметилированные CpG-сайты, закрашенные – на метилированные. Уровень метилирования ппоказан как процент метилированных CpG в каждом клоне. *в* – Иммунофлуоресцентный анализ 5mC в метилированных (M) или неметилированных (UM) клетках, трансдуцированных pLTR-Luc2P-EGFP. Клетки HeLa, трансдуцированные репортерной плазмидой, окрашивали антителом к 5mC и DAPI. Показаны репрезентативные результаты трех экспериментов.

сти к HpaII. Тем самым мы подтвердили, что представленная репортерная система может найти применение в количественных измерениях метилирования ДНК.

Оценка точности и надежности методов определения метилирования ДНК

Чтобы оценить точность методов определения метилированния ДНК, проведен линейный регрессионный анализ данных, представленных на рис. 4, отложенных в зависимости от процента метилирования. На рис. 5 показана сильная регрессионная зависимость между нормированными значениями и процентом метилированния ДНК ($R^2 = 0.9156$ для вестерн-блотинга; $R^2 = 0.9613$ для люциферазного теста; $R^2 = 0.9867$ для анализа чувствительности к HpaII), что свидетельствует о хорошей корреляции между измеренным значением и фактическим уровнем метилирования.

Соответствие результатов измерений проанализировано также с помощью графика Bland–Altman [41, 42]. Все значения, полученные с помощью вестерн-блотинга, люциферазного теста и анализа чувствительности к HpaII, находятся

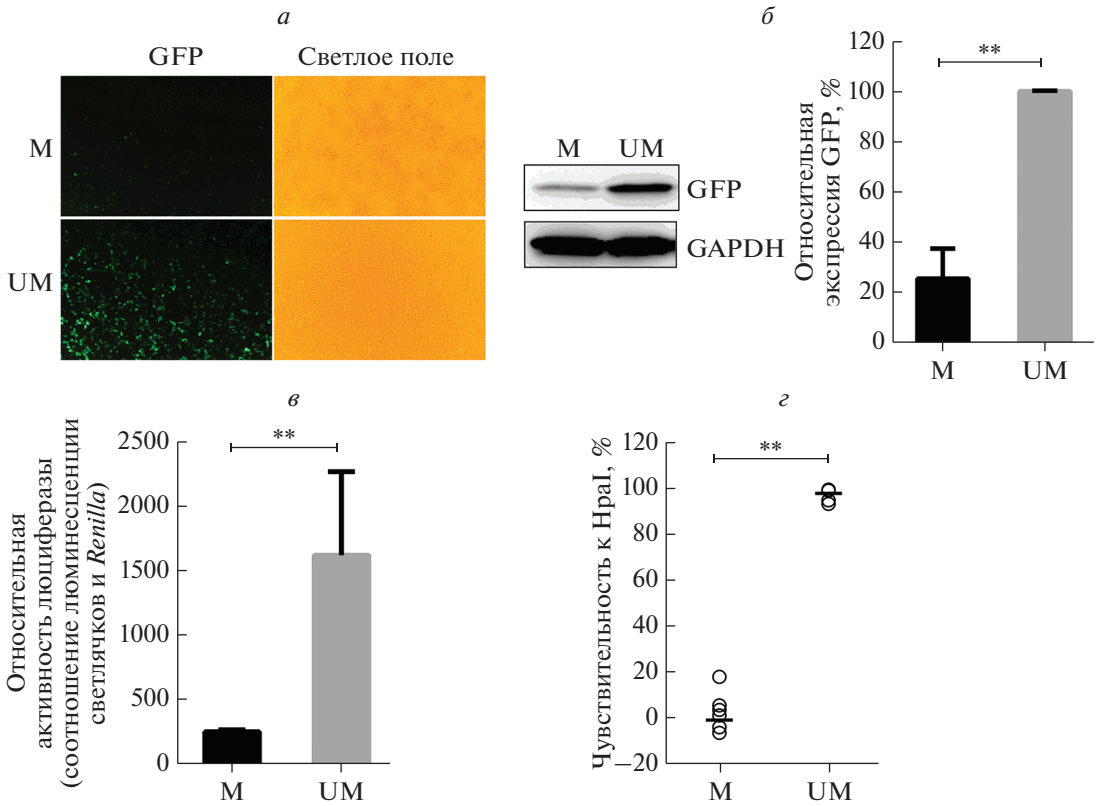

Рис. 3. Оценка репортерной системы pLTR-Luc2P-EGFP в клетках линии 293T. *а* – Изображение флуоресценции Luc2P-EGFP, полученное методом флуоресцентной микроскопии. Интенсивность флуоресценции EGFP в клетках линии 293T, трансфицированных репортерными векторами M или UM (слева). Клетки высевали примерно с одинаковой плотностью, о чем свидетельствуют данные фазово-контрастной микроскопии (справа). *б* – Вестерн-блотинг Luc2P-EGFP в клетках, трансдуцированных векторами M и UM. Репрезентативное изображение блота получено из трех экспериментов. На гистограмме представлены данные, определенные по относительной интенсивности флуоресценции с использованием анализа изображений (среднее ± стандартное отклонение из трех экспериментов. $^{**}P < 0.01$, *t*-критерий Стьюдента). *в* – Относительная активность люциферазы в клетках линии 293T, трансфицированных плазмидами M и UM. Эксперименты проводили 3 раза, по три повторности каждый. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. $^{**}P < 0.01$, *t*-критерий Стьюдента. *г* – Чувствительность области LTR к HpaII в клетках, трансфицированных плазмидами M и UM. Открытые кружки – данные отдельного эксперимента, короткая линия – средние значения. $^{**}P < 0.01$, *t*-критерий Стьюдента.

рамках соответствия, представленного на рис. 6; в эти рамки попадают все 100% различий. Считается, что если в пределы соответствия попадают более 95% различий, то соответствие считают хорошим [42]. Таким образом, результаты, полученные с помощью трех методов, хорошо соответствуют фактическому уровню 5mC pLTR-Luc2P-EGFP.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами представлена репортерная система, позволяющая оценивать модификации 5mC в клетках млекопитающих вместе с точной и надежной визуализацией и количественным определением событий метилирования, включая ПЦР в реальном времени, вестерн-блотинг и анализ люциферазной активности. Первые два метода, несмотря на то что для них требуются только реактивы, доступные в молекулярно-биологических лабораториях, более сложны и трудоемки, чем люциферазный тест. Для анализа люциферазной активности требуется специальное оборудование и реагенты, однако отсутствует этап подготовки образца. Таким образом, это простой, быстрый, высоко чувствительный метод, позволяющий получать точные результаты с минимальными усилиями.

Люциферазу впервые обнаружили у светлячка (*Photinus pyralis*) в 1985 г. В настоящее время метод определения люциферазы широко используется в науке и промышленности [43]. Репортерные системы, содержащие люциферазу, применяют в функциональной геномике (например, в скрининге РНК-интерференции) для изучения сигнальных путей, молекулярных механизмов и определения биологической активности. Начиная с 1987 г., термин “люциферазный репортерный тест” встретился более чем в 20000 публикаций [44]. Репортерные гены люциферазы облада-

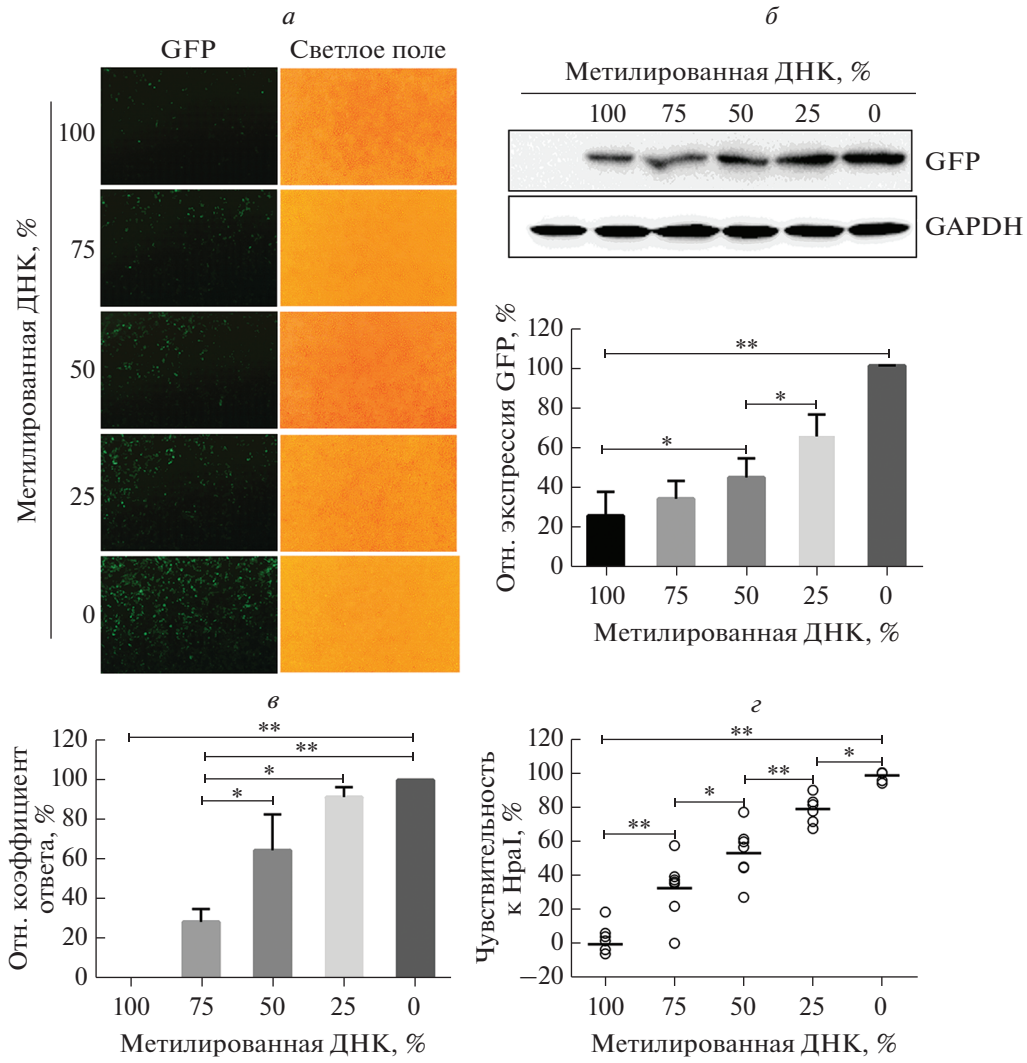

Рис. 4. Количественная оценка точности репортерной системы. Клетки линии 293T, трансфицированные pLTR-Luc2P-EGFP, метилированными на 100, 75, 50, 25, 0%, изучали с помощью флуоресцентной микроскопии (*а*), вестерн-блотинга (*б*), определения люциферазной активности, представленного в виде относительного коэффициента ответа (*в*) и анализа чувствительности к HpaII (*г*). Эксперименты проводили 3 раза, культуры получали в трех повторностях. Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение. Репрезентативное флуоресцентное изображение и изображение блота получены из результатов трех экспериментов. Светлые кружки (*г*) – данные отдельных экспериментов, линии – средние значения. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

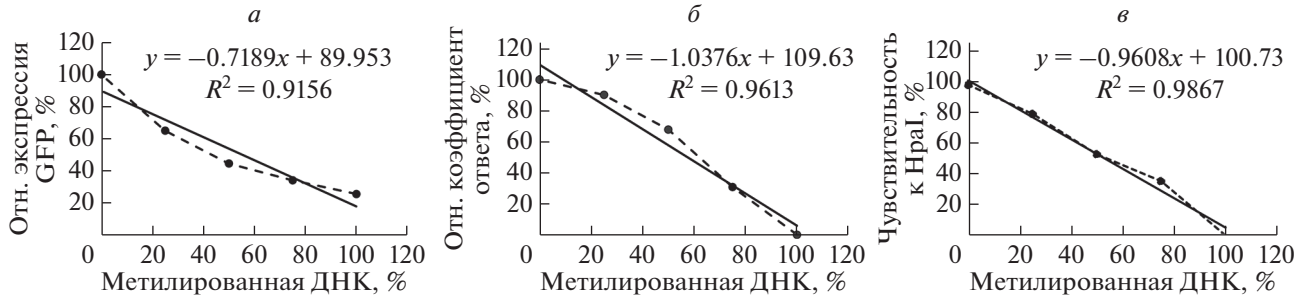

Рис. 5. Анализ линейной регрессии между уровнем метилирования трансфицированной плазмиды и нормированными значениями, полученными методом вестерн-блотинга (*а*), определения люциферазной активности (*б*) и чувствительности к HpaII (*в*), представленными на рис. 4. Сплошной кружок – средние значения, прямая линия – соответствующая стандартная кривая, пунктиром показана связь между фактическими значениями. Приведено уравнение кривой линейной регрессии и коэффициент корреляции (R^2).

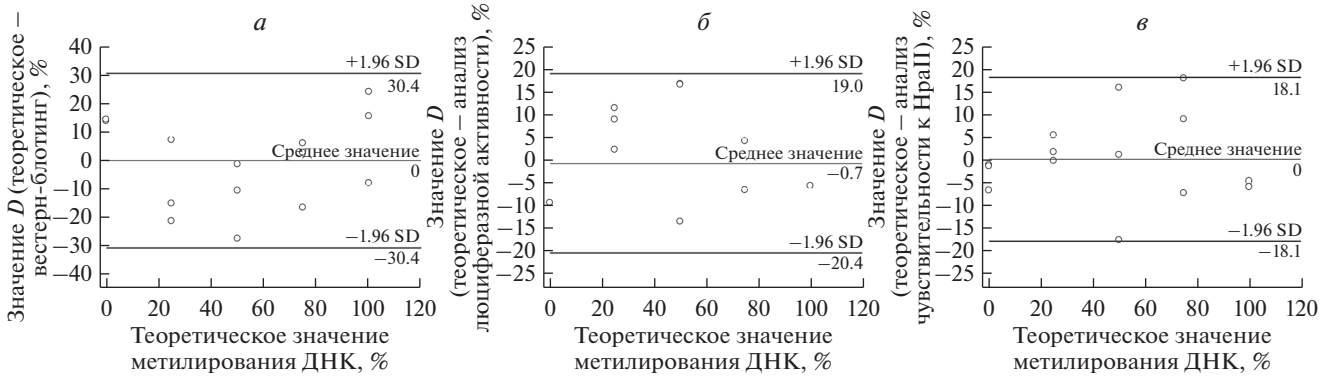

Рис. 6. Графики Bland–Altman для вестерн-блотинга (*а*), анализа люциферазной активности (*б*) и анализа чувствительности к HpaII (*в*). Значения *D* представляют разницу между полученными результатами и соответствующим процентом метилирования. Пунктирные линии соответствуют среднему значению (%), сплошные линии – среднему значению (%) ± 1.96 стандартного отклонения, полые кружки – различия в величинах *D*.

ют следующими важными характеристиками: исключительной чувствительностью (в 10–1000 раз большей, чем у таких флуоресцентных репортеров, как GFP), широким динамическим диапазоном, отсутствием эндогенной активности в клетках-хозяевах, мешающей, как правило, количественному определению, и моментальным измерением [45].

Таким образом, мы использовали двойной люциферазный тест для оценки метилирования 5'-LTR HIV-1 в трансфицированных клетках линии 293T. Люцифераза светлячка Luc2P отслеживает транскрипционную активность промотора LTR, в то время как люцифераза *Renilla* служит внутренним контролем для минимизации изменчивости из-за ошибок пипетирования, разной жизнеспособности клеток и эффективности трансфекции [46]. Соотношение двух сигналов люциферазы (относительная активность люциферазы) является эквивалентом относительной экспрессии Luc2P-EGFP и косвенно отражает статус метилирования промотора. В нашем исследовании экспрессию Luc2P-EGFP также выявляли с помощью вестерн-блотинга. Показано, что с помощью обоих методов можно измерять уровень экспрессии белка в линейном диапазоне от 0 до 100% метилированной ДНК. Люциферазный тест имеет более высокую точность (R^2 = = 0.9613), чем вестерн-блотинг (R^2 = 0.9156). В то же время для непосредственного изучения метилирования LTR мы применяли анализ чувствительности к HpaII, который основан на комбинации чувствительной к метилированию рестриктазы HpaII и количественной ПЦР [35, 47]. Показано, что чувствительность к HpaII также отрицательно коррелирует с уровнем метилирования pLTR-Luc2P-EGFP. Анализ Bland–Altman показал, что люциферазный тест сопоставим с анализом чувствительности к HpaII и хорошо согласуется с фактическим уровнем метилирования ДНК. Таким образом, доказано, что определение люциферазной активности вполне может использоваться для детектирования метилирования ДНК в живых клетках.

Более того, простота и чувствительность делает люциферазный тест высокопроизводительным инструментом для поиска новых соединений, которые модулируют метилирование ДНК. Действительно, люциферазные тесты использовали для скрининга противомикробных агентов против *Mycobacterium tuberculosis* и иммуносупрессоров еще в 1990-х гг. [48, 49]. В дальнейшем подтвердили потенциальную пользу люциферазного теста при проведении скрининговых исследований, поскольку этот метод может не только снизить стоимость скрининга лекарственных средств, но и повысить надежность и предсказуемость результатов [50].

Что касается нашей репортерной системы, в которой экспрессия люциферазы управляется промотором HIV-1, то ее можно использовать для поиска соединений, направленных на реактивацию латентного HIV-1. Латентный период HIV-1 представляет основное препятствие для полного удаления этого вируса из организма инфицированных. Реактивация латентного вируса – это первый шаг в стратегии “бей и убей”, новом направлении в терапии HIV-1 [51]. Показано, что метилирование ДНК в области LTR тесно связано с регуляцией латентности вируса [52]. Гиперметилирование подавляет экспрессию вирусных генов и стабилизирует латентное состояние HIV-1. Соединения, деметилирующие LTR, реактивируют латентный вирус и могут в дальнейшем использоваться для устранения или уменьшения вирусных резервуаров [51, 53]. По этой причине вместо использования HIV-инфицированных клеточных линий или первичных культур клеток, где латентность мо-

жет быть достигнута с помощью более чем одного механизма, соединения, реактивирующие вирус исключительно через деметилирование ДНК, могут быть проверены в нашей репортерной системе, что также применимо к изучению метилирования LTR в латентном периоде HIV-1. Тем самым можно расширить скрининг соединений против заболеваний, вызванных аномальными изменениями метилирования [54].

В заключение необходимо отметить, что разработана и проверена репортерная система pLTR-Luc2P-EGFP на основе люциферазы. Доказана пригодность и надежность этой системы оценки изменений метилирования. Наше исследование продвигает использование биолюминесценции в области эпигенетики и предлагает новый метод скрининга соединений, метилирующих/деметилирующих ДНК.

Исследование поддержано Национальным фондом естественных наук Китая (№ 81501734, 81803308), Фондом естественных наук провинции Gansu Китая (№ 20JR5RA215), а также Фондом фундаментальных исследований для центральных университетов (№ lzujbky-2015-260).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Xiaoxia Wang и Huaijie Jia придумали и разработали исследование. Xiaoxia Wang, Huaijie Jia и Xiaole Wei проводили эксперименты и писали статью. Yanrong Lv, Huihui Sun и Jiying Tan анализировали данные. Zhizhong Jing проверял и редактировал рукопись. Все авторы читали и одобрили окончательную рукопись.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kanwal R., Gupta S. (2012) Epigenetic modifications in cancer. *Clin. Genet.* **81**(4), 303–311.
2. Ellis L., Atadja P.W., Johnstone R.W. (2009) Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol. Cancer Ther.* **8**(6), 1409–1420.
3. Riggs A.D. (1975) X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.* **14**, 9–25.
4. Holliday R., Pugh J.E. (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science.* **187**, 226–232.
5. Jeltsch A., Jurkowska R.Z. (2014) New concepts in DNA methylation. *Trends Biochem. Sci.* **39**(7), 310–318.
6. Wu S.C., Zhang Y. (2010) Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**(9), 607–620.
7. Jaenisch R., Bird A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33**(Suppl), 245–254.
8. Nadasi E., Clark J.S., Szanyi I., Varjas T., Ember I., Baliga R., Arany I. (2009) Epigenetic modifiers exacerbate oxidative stress in renal proximal tubule cells. *Anticancer Res.* **29**(6), 2295–2299.
9. Rodriguez-Paredes M., Esteller M. (2011) Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat. Med.* **17**(3), 330–339.
10. Zhu J.K. (2009) Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 143–166.
11. Suzuki M.M., Bird A. (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.* **9**(6), 465–476.
12. Momparler R.L. (2003) Cancer epigenetics. *Oncogene.* **22**(42), 6479–6483.
13. Plass C. (2002) Cancer epigenomics. *Hum. Mol. Genet.* **11**(20), 2479–2488.
14. Tsai A.G., Lu H., Raghavan S.C., Muschen M., Hsieh C.L., Lieber M.R. (2008) Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity. *Cell.* **135**(6), 1130–1142.
15. Varley K.E., Gertz J., Bowling K.M., Parker S.L., Reddy T.E., Pauli-Behn F., Cross M.K., Williams B.A., Stamatoyannopoulos J.A., Crawford G.E., Absher D.M., Wold B.J., Myers R.M. (2013) Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res.* **23**(3), 555–567.
16. Baylin S.B., Jones P.A. (2011) A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer.* **11**(10), 726–734.
17. Berman B.P., Weisenberger D.J., Aman J.F., Hinoue T., Ramjan Z., Liu Y., Noushmehr H., Lange C.P., van Dijk C.M., Tollenaar R.A., van Den Berg D., Laird P.W. (2011) Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat. Genet.* **44**(1), 40–46.
18. Xiwei W., Rauch T.A., Xueyan Z., Bennett W.P., Latif F., Krex D., Pfeifer G.P. (2010) CpG island hypermethylation in human astrocytomas. *Cancer Res.* **70**(7), 2718–2727.
19. Tao L.H., Wang W., Li L., Kramer P.K., Pereira M.A. (2005) DNA hypomethylation induced by drinking water disinfection by-products in mouse and rat kidney. *Toxicol. Sci.* **87**(2), 344–352.
20. Boultwood J., Wainscoat J.S. (2007) Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *Br. J. Haematol.* **138**(1), 3–11.
21. Fuso A., Scarpa S., Grandoni F., Strom R., Lucarelli M. (2006) A reassessment of semiquantitative analytical procedures for DNA methylation: comparison of bisulfite- and HpaII polymerase-chain-reaction-based methods. *Analyt. Biochem.* **350**(1), 24–31.
22. Aichinger E., Köhler C. (2010) Bisulphite sequencing of plant genomic DNA. *Methods Mol. Biol.* **655**, 433–443.
23. Docherty S.J., Davis O.S.P., Haworth C.M.A., Plomin R., Mill J. (2010) DNA methylation profiling using bisulfite-based epityping of pooled genomic DNA. *Methods.* **52**(3), 255–258.

24. Kuo K.C., McCune R.A., Gehrke C.W., Midgett R., Ehrlich M. (1980) Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. *Nucl. Acids Res.* **8**(20), 4763–4776.

25. Boers R., Boers J., de Hoon B., Kockx C., Ozgur Z., Molijn A., van IjckenW., Laven J., Gribnau J. (2018) Genome-wide DNA methylation profiling using the methylation-dependent restriction enzyme LpnPI. *Genome Res.* **28**(1), 88–99.

26. Tang Y., Gao X.-D., Wang Y.S., Yuan B.-F., Feng Y.-Q. (2012) Widespread existence of cytosine methylation in yeast DNA measured by gas chromatography/mass spectrometry. *Analyt. Chem.* **84**(16), 7249–7255.

27. Sanchez E., Artuso E., Lombardi C., Visentin I., Lace B., Saeed W., Lolli M.L, Kobauri P., Ali Z., Spyrakis F., Cubas P., Cardinale F., Prandi C. (2018) Structure-activity relationships of strigolactones via a novel, quantitative in planta bioassay. *J. Exp. Botany.* **69**(9), 2333–2343.

28. Solberg N., Machon O., Krauss S. (2012) Characterization and functional analysis of the 5'-flanking promoter region of the mouse Tcf3 gene. *Mol. Cell. Biochem.* **360**, 289–299.

29. Xiao D., Zhang W., Li Y., Liu K., Zhao J., Sun X., Shan L., Mao Q., Xia H. (2016) A novel luciferase knock-in reporter system for studying transcriptional regulation of the human *Sox2* gene. *J. Biotechnol.* **219**, 110–116.

30. Hou Y.J., Okuda K., Edwards C.E., Martinez D.R., Asakura T., Dinnon K.H., 3rd, Kato T., Lee R.E., Yount B.L., Mascenik T.M., Chen G., Olivier K.N., Ghio A., Tse L.V., Leist Sarah R., Gralinski L.E., Schäfer A., Dang H., Gilmore R., Nakano S., Sun L., Fulcher M.L., Livraghi-Butrico A., Nicely N.I.,. Cameron M., Cameron C., Kelvin D.J., de Silva A., Margolis D.M., Markmann A., Bartelt L., Zumwalt R., Martinez F.J., Salvatore S.P., Borczuk A., Tata P.R., Sontake V., Kimple A., Jaspers I., O'Neal W.K., Randell S.H., Boucher R.C., Baric R.S. (2020) SARS-CoV-2 reverse-genetics reveals a variable infection gradient in the respiratory tract. *Cell.* **182**(2), 429–446 e414.

31. Antequera F. (2003) Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**(8), 1647–1658.

32. Jones P.A. (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **13**(7), 484–492.

33. Li Z., Gu T.P., Weber A.R., Shen J.Z., Li B.Z., Xie Z.G., Yin R., Guo F., Liu X., Tang F., Wang H., Schar P., Xu G.-L. (2015) Gadd45a promotes DNA demethylation through TDG. *Nucl. Acids Res.* **43**(8), 3986–3997.

34. Ishida T., Hamano A., Koiwa T., Watanabe T. (2006) 5' Long terminal repeat (LTR)-selective methylation of latently infected HIV-1 provirus that is demethylated by reactivation signals. *Retrovirology.* **3**, 69.

35. Guo J.U., Su Y., Zhong C., Ming G.L., Song H. (2011) Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell.* **145**(3), 423–434.

36. Hirano S. (2012) Western blot analysis. *Methods Mol. Biol.* **926**, 87–97.

37. Jiang C., Wu D., Haacke E.M. (2017) Ferritin-EGFP. Chimera as an endogenous dual-reporter for both fluorescence and magnetic resonance imaging in human glioma U251 cells. *Tomography.* **3**(1), 1–8.

38. Kumaki Y., Oda M., Okano M. (2008) QUMA: quantification tool for methylation analysis. *Nucl. Acids Res.* **36**(Web Server issue), W170–175.

39. Power D., Santoso N., Dieringer M., Yu J., Huang H., Simpson S., Seth I., Miao H., Zhu J. (2015) IFI44 suppresses HIV-1 LTR promoter activity and facilitates its latency. *Virology.* **481**, 142–150.

40. Fouse S.D., Nagarajan R.O., Costello J.F. (2010) Genome-scale DNA methylation analysis. *Epigenomics.* **2**(1), 105–117.

41. Du J., Gay M.C.L., Lai C.T., Trengove R.D., Hartmann P.E., Geddes D.T. (2017) Comparison of gravimetric, creamatocrit and esterified fatty acid methods for determination of total fat content in human milk. *Food Chem.* **217**, 505–510.

42. Euser A.M., Dekker F.W., le Cessie S. (2008) A practical approach to Bland–Altman plots and variation coefficients for log transformed variables. *J. Clin. Epidemiol.* **61**(10), 978–982.

43. Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010) Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem. Biol.* **17**(6), 646–657.

44. Yun C., Dasgupta R. (2014) Luciferase reporter assay in *Drosophila* and mammalian tissue culture cells. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **6**(1), 7–23.

45. Xie W., Silvers R., Ouellette M., Wu Z., Lu Q., Li H., Gallagher K., Johnson K., Montoute M. (2016) A luciferase reporter gene system for high-throughput screening of gamma-globin gene activators. *Methods Mol. Biol.* **1439**, 207–226.

46. Stables J., Scott S., Brown S., Roelant C., Burns D., Lee M.G., Rees S. (1999) Development of a dual glow-signal firefly and *Renilla* luciferase assay reagent for the analysis of G-protein coupled receptor signalling. *J. Receptor Signal Transduction Res.* **19**, 395–410.

47. Gadkar V., Filion M. (2014) New developments in quantitative real-time polymerase chain reaction technology. *Curr. Issues Mol. Biol.* **16**, 1–6.

48. Cooksey R.C., Crawford J.T., Jacobs W.R., Jr., Shinnick T.M. (1993) A rapid method for screening antimicrobial agents for activities against a strain of *Mycobacterium tuberculosis* expressing firefly luciferase. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* **37**(6), 1348–1352.

49. Baldari C.T., Di Somma M.M., Majolini M.B., Ulivieri C., Milia E., Telford J.L. (1998) NF-AT-luciferase reporter T cell lines as tools to screen immunosuppressive drugs. *Biol. J. Internat. Assoc. Biol. Standardization.* **26**(1), 1–5.

50. Michelini E., Cevenini L., Calabretta M.M., Calabria D., Roda A. (2014) Exploiting *in vitro* and *in vivo* bioluminescence for the implementation of the three Rs principle (replacement, reduction, and refinement) in drug discovery. *Analyt. Bioanalyt. Chem.* **406**(23), 5531–5539.

51. Henderson L.J., Reoma L.B., Kovacs J.A., Nath A. (2020) Advances toward curing HIV-1 infection in tissue reservoirs. *J. Virol.* **94**(3), e00375–19.

52. Kauder S.E., Bosque A., Lindqvist A., Planelles V., Verdin E. (2009) Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS Pathogens.* **5**(6), 1–15.

53. Bouchat S., Delacourt N., Kula A., Darcis G., van Driessche B., Corazza F., Gatot J.S., Melard A., Vanhulle C., Kabeya K., Pardons M., Avettand-Fenoel V., Clumeck N., De Wit S., Rohr O., RouziouxC., Van Lint C. (2016) Sequential treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine and deacetylase inhibitors reactivates HIV-1. *EMBO Mol. Med.* **8**(2), 117–138.

54. Greenberg M.V.C., Bourc'his D. (2019) The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**(10), 590–607.

A LUCIFERASE-EGFP REPORTER SYSTEM FOR THE EVALUATION OF DNA METHYLATION IN MAMMALIAN CELLS

X. X. Wang[1, *], H. J. Jia[2], Y. R. Lv[1, 2], H. H. Sun[1, 2], X. L. Wei[3], J. Y. Tan[3], and Z. Z. Jing[2, **]

[1]*School of Public Health, Lanzhou University, Lanzhou, 730000 China*

[2]*State Key Laboratory of Veterinary of Etiological Biology, Key Laboratory of Veterinary Public Health of Agricultural Ministry, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, 730000 China*

[3]*Institute of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, 730000 China*

**e-mail: wangxiaoxia@lzu.edu.cn*

***e-mail: jingzhizhong@caas.cn*

DNA methylation is an essential epigenetic modification involved in numerous biological processes. Here, we present a cell-based system pLTR-Luc2P-EGFP for evaluation of DNA methylation in mammalian cells. In this system, the expression of reporter gene luciferase2P (Luc2P)-EGFP is under the control of HIV-1 promoter 5' long terminal repeat (LTR), which contains multiple CpG sites. Once these sites are methylated, the expression of Luc2P-EGFP is turned off, which may be visualized under fluorescence microscopy, with quantification performed in luciferase activity assay. As a proof of principle, pLTR-Luc2P-EGFP was methylated *in vitro*, and transfected into 293T cells, where the reduction of Luc2P-EGFP expression was confirmed. Premixed reporter DNA samples with the methylation levels varying from 0 to 100% were used for quantitative measurements of DNA methylation. The resulting standard curves indicated the accuracy of luciferase activity exceeding that of the Western blotting against EGFP. The Bland–Altman analysis showed that data from luciferase activity assay were in good agreement with the actual DNA methylation levels. In summary, we have established a reporter system coupled with reliable detection technique capable of efficient quantifying the changes in methylation in mammalian cells. This system may be utilized as a high throughput screening tool for identifying molecules that modulate DNA methylation.

Keywords: Luc2P firefly luciferase, cell-based reporter system, HIV-1 promoter 5' LTR, DNA methylation

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 5, с. 858–869

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 612.017.1:612.112.31

МИТОКСАНТРОН ИНГИБИРУЕТ ИНДУЦИРУЕМЫЕ FMLP ДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В НЕЙТРОФИЛАХ ЧЕЛОВЕКА[1]

© 2021 г. S. G. Ali[a], D. Shehwar[a], M. R. Alam[a, *]

[a] Department of Biochemistry, Quaid-i-Azam University, Islamabad, 45320 Pakistan

*e-mail: mralam@qau.edu.pk

Поступила в редакцию 24.10.2020 г.
После доработки 18.12.2020 г.
Принята к публикации 15.01.2021 г.

В борьбе с патогенами нейтрофилы используют различные механизмы, включая дегрануляцию, фагоцитоз и высвобождение внеклеточных нейтрофильных ловушек (NET). Изучено влияние синтетического формил-пептида (FMLP) на нейтрофилы человека *in vitro*, а также роль митоксантрона (MTX) – фармакологического блокатора митохондриального Ca^{2+}-унипортера (MCU), в изменениях нейтрофилов, вызванных FMLP. Изолированные нейтрофилы и препараты нейтрофилов цельной крови обрабатывали MTX, а затем стимулировали FMLP. Морфологию нейтрофилов и их содержание определяли с использованием светопольной микроскопии и окрашивания мазков по Филдсу. Повреждение нейтрофилов оценивали также по высвобождению внеклеточной ДНК. Показано, что дегенеративные изменения в нейтрофилах и повышение выхода ДНК из клеток, стимулированных FMLP, негативно ассоциированы с присутствием тромбоцитов в препаратах цельной крови. Предобработка MTX существенно снижает индуцируемое FMLP повреждение нейтрофилов и высвобождение ДНК. Индуцируемые FMLP изменения нейтрофилов уменьшает также метформин – известный ингибитор образования NET. Таким образом, мы не только подтвердили, что FMLP способен повреждать нейтрофилы, но также выявили вклад MCU в регуляцию морфологических изменений нейтрофилов человека, индуцированных FMLP.

Ключевые слова: препараты цельной крови, внеклеточные нейтрофильные ловушки, дегенерация нейтрофилов, N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин, митохондриальный Ca^{2+}-унипортер, митоксантрон

DOI: 10.31857/S0026898421050025

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы – жизненно важные компоненты системы врожденного иммунитета – являются первой линией защиты от патогенов [1]. В ходе воспаления нейтрофилы поступают в участки инфекции, где убивают патогены с использованием таких механизмов, как дегрануляция, образование активных форм кислорода (ROS) и фагоцитоз [2]. При этом сильные стимулы влияют также на морфологию нейтрофилов, вызывая изменение формы ядер и экспансию цитоплазмы. В таких нейтрофилах расширена ядерная область, ликвидированы ядерные доли, деконденсирован хроматин, искажена форма клетки, разрушены ядерная и плазматическая мембраны, что может приводить к выходу покрытой клеточными белками ДНК в виде внеклеточных ловушек (NET), еще одной стратегии борьбы с инфекцией [3, 4]. В последнее время большой интерес вызывает участие NET в патогенезе таких неинфекционных болезней, как аутоиммунные состояния [5], почечно- и желчнокаменная болезни [6] и даже в первичной дисфункции трансплантата [7]. Более того, дегенеративные изменения нейтрофилов вносят вклад в патогенез таких заболеваний, связанных с воспалением, как атеросклероз, воспалительная болезнь кишечника, легочные синдромы [8–11].

Формил-метионил-лейцил-фенилаланин (FMLP) – мощный хемоаттрактант хемокинов, который имитирует формил-пептиды, высвобождаемые бактериями в ходе инфекции [12]. FMLP связывается с рецепторами формил-пептидов на нейтрофилах [13] и индуцирует дегрануляцию и фагоцитоз нейтрофилов, повышая уровень клеточного Ca^{2+} и продукцию ROS [14]. Однако роль FMLP в индукции дегенеративных

[1] Статья представлена авторами на английском языке.
Сокращения: WB – цельная кровь; WBP – препараты цельной крови, свободные от тромбоцитов; NET – внеклеточные нейтрофильные ловушки; FMLP – N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин; MCU – митохондриальный Ca^{2+}-унипортер; MTX – митоксантрон.

изменений, которые могут быть ассоциированы с образованием NET в нейтрофилах, не установлена. Сообщается, что митохондриальный унипортер Ca^{2+} (MCU), который регулирует вход Ca^{2+} в митохондрии [15], индуцирует поляризацию и хемотаксис нейтрофилов [16], но его участие в образовании NET и дегенерации нейтрофилов, индуцируемой формил-пептидами, не доказано. Нами изучены опосредуемые FMLP изменения нейтрофилов и определен вклад поглощения Ca^{2+} митохондриями путем фармакологической модуляции MCU с использованием недавно идентифицированного блокатора – митоксантрона (MTX).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение препарата нейтрофилов центрифугированием в градиенте плотности (DGP). Обычно нейтрофилы изучают, используя обогащенные препараты этих клеток из крови животных, здоровых доноров и/или пациентов [17]. Нейтрофилы из крови человека выделяли с использованием центрифугирования в двойном градиенте плотности. У каждого донора отбирали по 3 мл крови в 15 мл фальконовскую пробирку, содержащую 12 мкл гепарина (20 МЕ/мл) в качестве коагулянта, и разбавляли 3 мл сбалансированного солевого раствора Хенкса (HBSS; “ThermoFisher”, США; Ref: 14175-095). Затем в такую же пробирку вносили 3 мл Pancoll Human Granulocytes 1.119 г/мл (“Pan-Biotech”, ФРГ, CAT. № 60110) и осторожно наслаивали сверху 3 мл Pancoll Human 1.077 г/мл (“Pan-Biotech”, CAT. № 60100) в соответствии с инструкциями фирмы. На верхний слой Pancoll медленно и осторожно наслаивали 6 мл разбавленной крови. Пробирки центрифугировали в бакет-роторе (“Kokusan” Япония; модель № H-103RS) при 1600 об./мин в течение 40 мин без торможения. После центрифугирования отбирали слой мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC). В случае центрифугирования в двойном градиенте плотности мы не видели отдельного слоя гранулоцитов, как утверждалось в протоколе фирмы. Гранулоциты соосаждались с эритроцитами на дно пробирки.

Нижний слой, содержащий гранулоциты и эритроциты, разбавляли 5 мл HBSS и снова центрифугировали при 800 об./мин в течение 10 мин без торможения при комнатной температуре в той же центрифуге. После декантирования супернатанта в осадке, содержащем тонкий белый слой гранулоцитов, проводили лизис эритроцитов с использованием 33 и 267 мМ NaCl.

В качестве альтернативного дешевого и быстрого метода выделения PBMC из цельной крови использовали только Pancoll Human 1.077 г/мл. Нижний слой, содержащий красные кровяные клетки, обрабатывали для выделения нейтрофилов. В этом же методе 2 мл Pancoll 1.077 г/мл вносили в другую 15 мл фальконовскую пробирку, тщательно наслаивали на него 3 мл разбавленной крови и центрифугировали при 1600 об./мин без торможения в течение 15 мин при комнатной температуре. Слой PBMC отсасывали и переносили в отдельную пробирку. Слой эритроцитов разбавляли 5 мл HBSS, эритроциты лизировали, как описано ранее. Изолированные нейтрофилы ресуспендировали в HBSS и хранили при комнатной температуре до проведения эксперимента.

Получение препаратов нейтрофилов цельной крови (WBP). Ранее нейтрофилы получали, используя центрифугирование в градиенте плотности в комбинации с лизисом эритроцитов для отделения нейтрофилов от других клеток крови. Однако механический стресс, ассоциированный с активацией нейтрофилов, поставил под вопрос возможность использования длительного центрифугирования и осмотического шока для обогащения фракции нейтрофилов в градиенте плотности [18]. Поэтому для оценки изменений, вызванных центрифугированием в градиенте плотности, и влияния тромбоцитов на опосредуемую FMLP дегенерацию нейтрофилов применили подход, основанный на использовании цельной крови (WB). Для этого 5 мл крови отбирали в 15 мл фальконовскую пробирку, содержащую 20 мкл гепарина (20 МЕ/мл) в качестве антикоагулянта. Затем кровь переносили в две пробирки – 2 мл в одну и 3 мл в другую. Для опытов с WB в первой пробирке кровь (2 мл) разводили 2 мл HBSS. При получении препарата нейтрофилов из цельной крови (WBP) пробирку с 3 мл крови центрифугировали при 1100 об./мин в течение 20 мин без торможения при комнатной температуре. Всю обогащенную тромбоцитами плазму, полученную после стадии центрифугирования, удаляли, а оставшийся слой (примерно 2 мл), содержащий эритроциты и лейкоциты, разбавляли 2 мл HBSS для дальнейших опытов.

Стимуляция нейтрофилов. Способность FMLP индуцировать дегенеративные изменения изучали на нейтрофилах (DGP, WB и WBP), которые стимулировали 50 нМ FMLP (Cat No. Sc-358988A, “Santa Cruz Biotechnology”, США) в течение 15 мин при 37°C в инкубаторе (“Thermo Scientific”, США). В процессе инкубации микроцентрифужные пробирки, содержащие контрольные образцы (обработанные и необработанные FMLP), постоянно вращали в роторном миксере.

Предварительная обработка нейтрофилов митоксантроном (MTX) и метформином. Стимулированные FMLP нейтрофилы (DGP и WBP) предварительно обрабатывали 10 мкМ MTX (Cat № sc-203136, “Santa Cruz”) в течение 60 мин при 37°C в инкубаторе с постоянным вращением в роторном миксере. В качестве положительного контроля

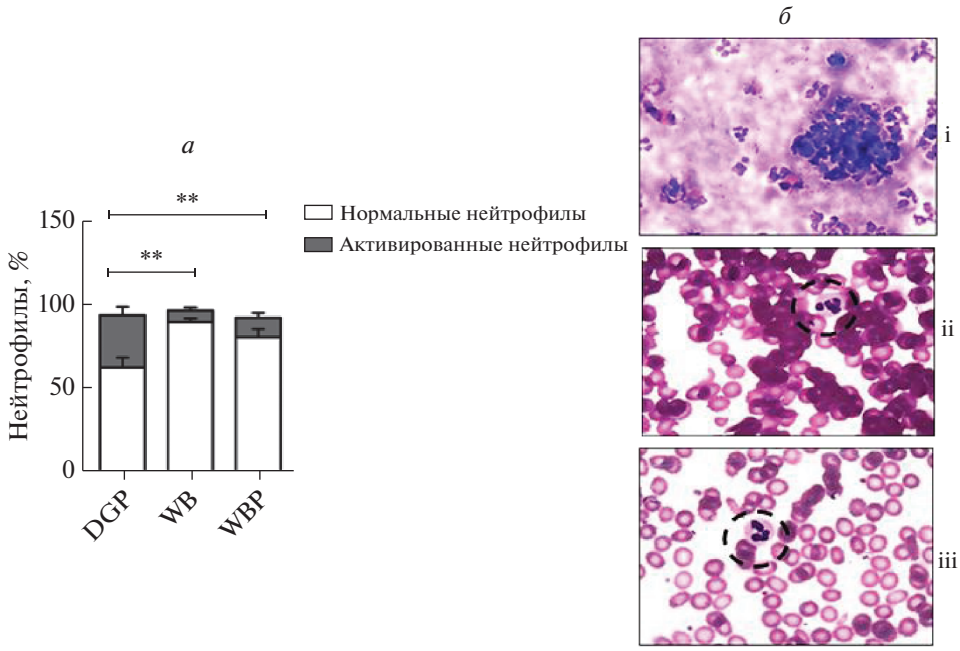

Рис. 1. Основанное на дифференциальном центрифугировании в градиенте плотности (DGP) выделение приводит к большей активации нейтрофилов, чем при выделении из цельной крови (WB) и из препаратов цельной крови, свободных от тромбоцитов (WBP). *а* – Содержание (%) нормальных нейтрофилов в WB и WBP выше, чем в DGP. На диаграмме представлены результаты сравнения нормальных и активированных нейтрофилов ($n = 4$). Содержание активированных нейтрофилов в DGP значительно выше, чем в WB и WBP. $^{**}p < 0.01$ как для DGP vs WB, так и для группы DGP vs WBP. *б* – Микроскопическое изображение нейтрофилов в трех разных препаратах. i – Нейтрофилы, выделенные в DGP, ii и iii – нейтрофилы из WBP и WB.

при сравнении влияния MTX на FMLP-стимулированные нейтрофилы мы использовали метформин, который супрессирует нетоз (NETosis) путем ингибирования комплекса I. С этой целью стимулированные FMLP нейтрофилы (WBP) предварительно обрабатывали 1 мМ метформином в течение 30 мин при 37°C при постоянном перемешивании [19].

Морфологическая характеристика и количественное определение нейтрофилов. Для проверки морфологических изменений, возникающих в нейтрофилах в ответ на стимуляцию FMLP, растворы, содержащие обработанные FMLP нейтрофилы, наносили на предметные стекла, высушивали на воздухе и фиксировали метанолом (“Sigma Aldrich”, ФРГ; Cat № 32213-2) в течение 1 мин. Затем стекла окрашивали по методу Филдса. Изображения нейтрофилов при увеличении ×100 получали на световом микроскопе (“Olympus” CX41, Япония) с цифровой камерой (“Tuksen”; модель ISH5000). На каждом стекле обсчитывали примерно 100–150 клеток.

Выделение и количественное определение внеклеточной ДНК (вкДНК). Для дальнейшего анализа влияния FMLP на нейтрофилы использовали вкДНК, выделяемую центрифугированием на спин-колонках. Образцы контрольных и стимулированных FMLP растворов, содержащих нейтрофилы, наносили на колонки, центрифугировали в течение 10 мин при 1600 об./мин при комнатной температуре в микроцентрифуге (“Thermo scientific Heraeus Fresco 17”; Model No. 75002420) и тщательно собирали бесклеточные супернатанты. Количество вкДНК определяли спектрофотометрически при 260 нм.

Статистический анализ. Результаты анализировали, используя GraphPad Prism v5. T-тест. Статистически значимые различия между группами рассчитывали с помощью одно- и двухфакторного метода ANOVA. Значения $p < 0.05$ считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обогащение в градиенте плотности активирует нейтрофилы

При центрифугировании в градиенте плотности нейтрофилы подвергаются механическому стрессу, что может приводить к их поляризации и активации [1]. Поэтому мы сравнили морфологию нейтрофилов в WB, в препаратах, полученных с помощью DGP, и в препаратах, свободных от тромбоцитов (WBP). Показано, что в препаратах, полученных с помощью DGP, содержание (%) активированных нейтрофилов существенно выше,

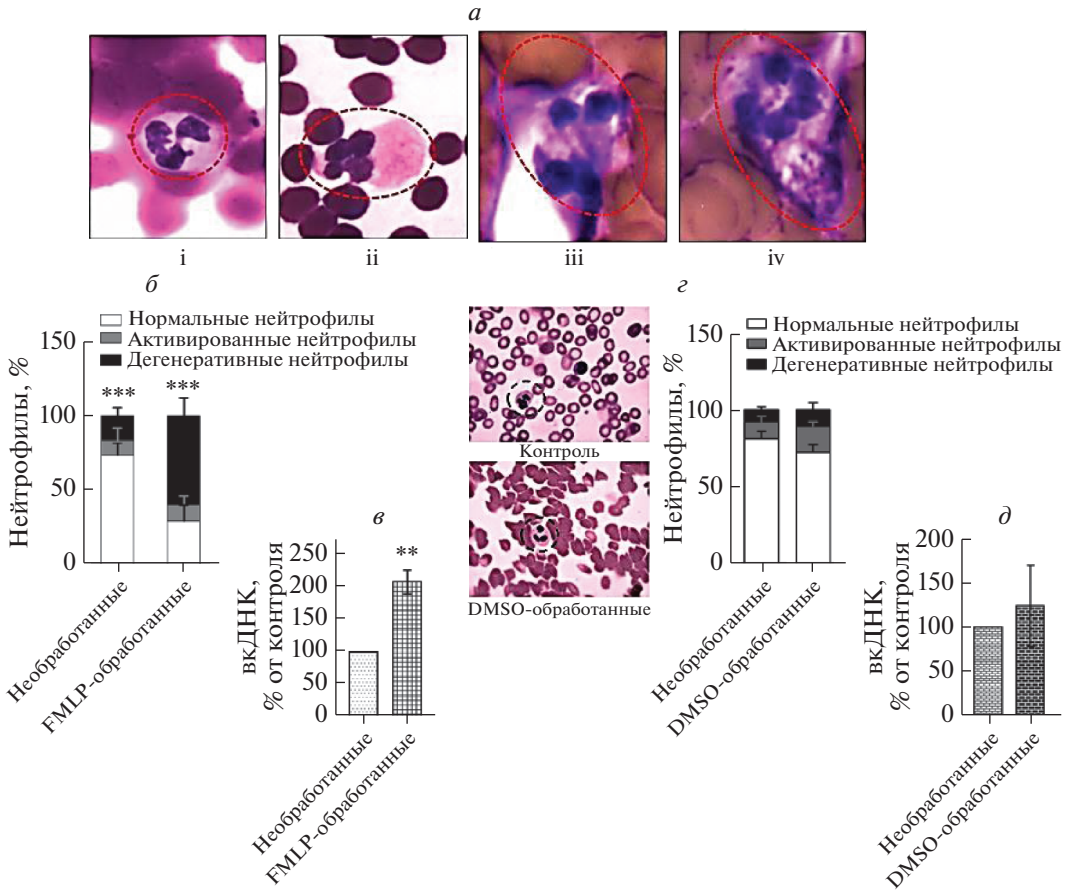

Рис. 2. FMLP индуцирует дегенеративные изменения в нейтрофилах человека. *а* – Морфологическая характеристика стимулированных FMLP нейтрофилов (мазки, окрашенные по Филдсу). *б* – Контрольные препараты WBP содержат больше нормальных и меньше измененных нейтрофилов, но при обработке 50 нМ FMLP доля дегенеративных нейтрофилов заметно возрастает. На диаграмме приведены средние значения ± SEM ($n = 5$); ***$p < 0.001$ для нормальных и дегенерированных нейтрофилов как в необработанных, так и в обработанных образцах. *в* – Содержание вкДНК в суспензии WBP, обработанной FMLP, выше, чем в необработанной. Результаты анализа образцов, полученных от каждого донора, нормировали по отношению к необработанной группе для снижения ошибки, обусловленной индивидуальной вариабельностью концентрации ДНК. На диаграмме представлены средние значения ± SEM ($n = 7$), **$p = 0.001$. *г* – Обработка DMSO незначительно влияет на изменение уровней нормальных и дегенеративных нейтрофилов. На диаграмме представлена доля нормальных и активированных нейтрофилов в обработанных и необработанных DMSO образцах WBP ($n = 4$). *д* – Содержание вкДНК, выделенной из контрольных и обработанных DMSO нейтрофилов, различается незначительно. На диаграмме представлены результаты сравнения количества вкДНК, вышедшей из обработанных и необработанных DMSO нейтрофилов ($n = 4$).

чем в WB и WBP (рис. 1*а*). Микроскопическое исследование нестимулированных нейтрофилов выявило поляризацию плазматической мембраны и разрушение ядерных долей в препарате DGP (рис. 1*б*-i), что считается признаком активированных клеток. Напротив, в препаратах WBP (рис. 1*б*-ii) и в WB нейтрофилы (рис. 1*б*-iii) имеют нормальную плазматическую мембрану и ядра с несколькими дольками.

Обработка FMLP повышает число дегенеративных нейтрофилов

С помощью микроскопического исследования мы разделили стимулированные FMLP-нейтрофилы в препаратах WBP на три главных категории: нормальные нейтрофилы с интактными ядрами с несколькими дольками и плазматической мембраной (рис. 2*а*-i); активированные нейтрофилы, имеющие поляризованную форму (рис. 2*а*-ii), и нейтрофилы с искаженной формой, разбухшими ядрами, разделенными ядерными дольками, увеличенным размером и высвобожденными тонкими внеклеточными филаментами (рис. 2а-iii и 2*а*-iv).

Обнаружено, что стимуляция нейтрофилов в препаратах WBP FMLP (50 нМ) приводит к изменению их морфологии. Сравнение доли измененных и нормальных нейтрофилов в необработанных образцах выявило высокую способность FMLP вы-

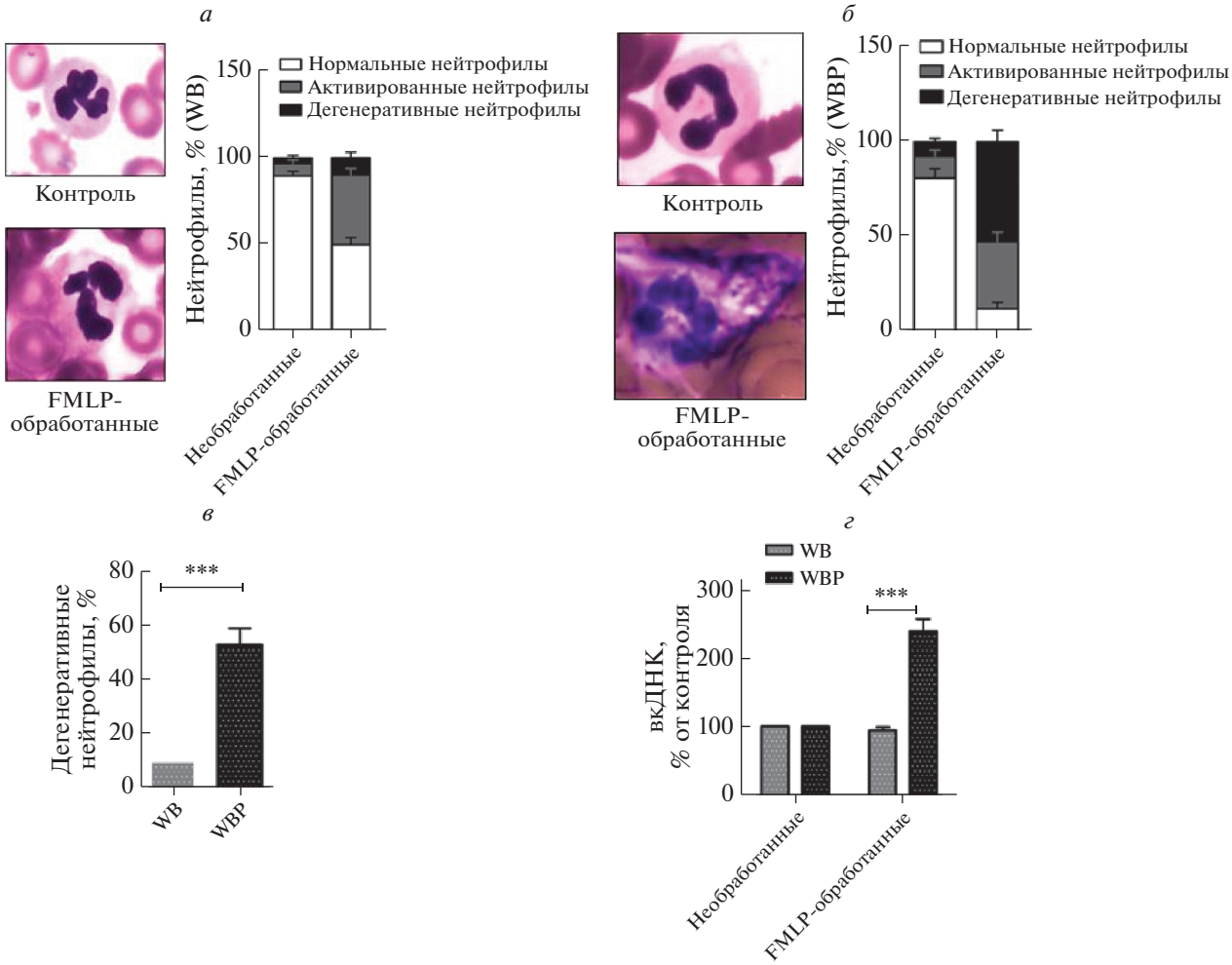

Рис. 3. Покоящиеся тромбоциты ингибируют опосредуемое FMLP повреждение нейтрофилов. *а* – В препаратах WB не выявлено различий в дегенерации нейтрофилов, обработанных 50 нМ FMLP и в необработанных образцах. Морфология нейтрофилов и диаграмма активированных нейтрофилов после стимуляции FMLP. На диаграмме показано сравнение доли нормальных активированных и дегенеративных нейтрофилов в WB ($n = 4$). *б* – Значительное повышение доли дегенеративных нейтрофилов в препаратах WBP (без тромбоцитов) после стимуляции FMLP. Сравнение обработанных и необработанных FMLP нейтрофилов в WBP. На диаграмме показаны доли нормальных, активированных и измененных нейтрофилов в контрольных и стимулированных FMLP образцах WBP ($n = 4$). *в* – Доля измененных нейтрофилов в препаратах WBP, не содержащих тромбоцитов, значительно выше, чем в препаратах WB, содержащих тромбоциты. Приведены средние значения ± SEM ($n = 4$), ***$p < 0.001$ для нейтрофилов в WBP. *г* – Сравнение высвобождения вкДНК в WB и WBP свидетельствует о более высоком содержании вкДНК в отсутствие тромбоцитов в образцах, стимулированных в 50 нМ FMLP. На диаграмме представлено содержание вкДНК, высвобождаемой контрольными и стимулированными FMLP образцами WB и WBP. ***$p < 0.001$ для высвобождения вкДНК нейтрофилами, стимулированным FMLP, в WB vs WBP.

зывать повреждение нейтрофилов. Примечательно, что наши данные показывают значительное увеличение доли измененных нейтрофилов в группе, обработанной FMLP, что ассоциировано со снижением доли нормальных клеток (рис. 2*б*). Эти данные подтверждают тот факт, что FMLP способен вызывать дегенеративные изменения в нейтрофилах, что может быть связано с некрозом или высвобождением NET-подобных филаментов.

Высвобождаемая из нейтрофилов вкДНК используется также для диагностического выявления NET или поврежденных клеток при определенных патологиях [20, 21]. Интересно, что нами обнаружены значимые различия в высвобождении вкДНК стимулированными FMLP и необработанными контрольными образцами, что подтверждается микроскопическими данными (рис. 2*в*). На основании этих результатов мы предполагаем, что FMLP способен индуцировать в нейтрофилах человека дегенеративные изменения, которые могут быть связаны с некрозом или нетозом.

Нами показано также, что 0.45%-ный DMSO, использованный как растворитель FMLP, не может индуцировать такие морфологические изме-

нения в нейтрофилах (рис. 2*г*). Обработка DMSO также не приводит к увеличению выхода вкДНК (рис. 2*д*).

Покоящиеся тромбоциты ингибируют дегенеративные изменения нейтрофилов, индуцируемые FMLP

Взаимодействие тромбоцитов с нейтрофилами рассматривали как длительный процесс, развивающийся в течение многих лет [3]. По нашим данным, число активированных нейтрофилов в WB и WBP увеличивается при стимуляции FMLP по сравнению с необработанными клетками (рис. 3*а*, *б*). Однако доля измененных нейтрофилов в WBP возрастает более значительно, чем в WB (рис. 3*в*). Эти препараты отличаются только наличием тромбоцитов, поэтому заманчиво было предположить, что присутствие покоящихся тромбоцитов в WB подавляет опосредуемое FMLP повреждение нейтрофилов.

Нами изучено также влияние покоящихся тромбоцитов на опосредуемое FMLP высвобождение вкДНК. Обнаружено, что стимуляция FMLP образцов WB не приводит к значительному высвобождению вкДНК по сравнению с контрольной группой. Интересно, что нами обнаружено значительно более существенное высвобождение вкДНК в стимулированных FMLP образцах WBP (рис. 3*г*). Таким образом, покоящиеся тромбоциты существенно влияют на высвобождение вкДНК нейтрофилами, стимулированными FMLP.

Митоксантрон препятствует возникновению дегенеративных изменений в нейтрофилах, опосредуемых FMLP

Для определения роли поглощения Ca^{2+} митохондриями в опосредуемых FMLP дегенеративных изменениях нейтрофилов человека использовали MTX – недавно описанный блокатор MCU [22]. Нами показано, что предварительная обработка MTX приводит к значительному снижению доли измененных нейтрофилов в образцах, стимулированных FMLP (рис. 4*а*). В соответствии с уже опубликованными результатами изучения роли метформина в уменьшении ассоциированных с NET дегенеративных изменений в нейтрофилах [23], наши данные показывают снижение доли дегенеративных нейтрофилов в клетках, стимулированных FMLP после предварительной обработки метформином (рис. 4*б*).

Используя данные, полученные с помощью светопольной микроскопии, мы проверили, может ли MTX ингибировать опосредованное FMLP высвобождение вкДНК нейтрофилами. Примечательно, что нами выявлено значительное снижение высвобождения вкДНК нейтрофилами, обработанными MTX и метформином (рис. 4*в*, *г*).

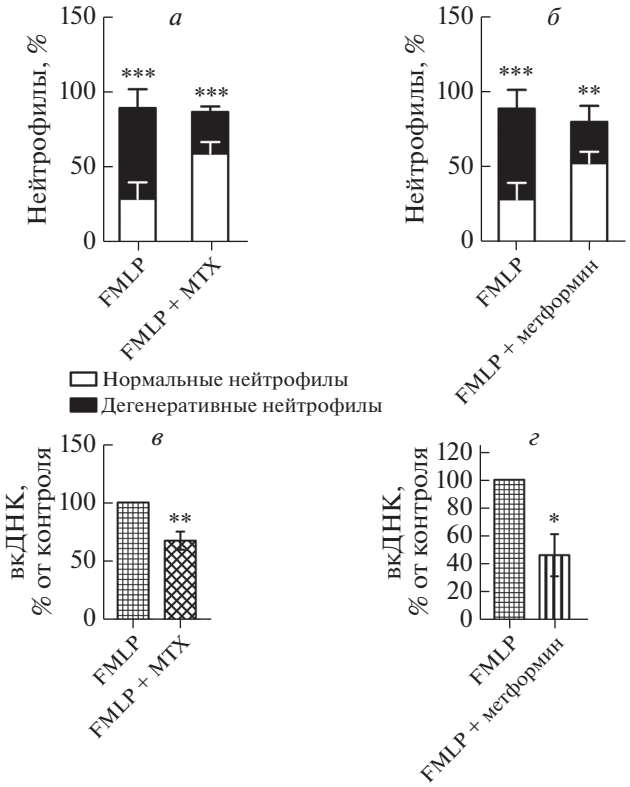

Рис. 4. Митоксантрон (MTX) и метформин ослабляют индуцируемые FMLP изменения в нейтрофилах. *а* – FMLP-стимулированные нейтрофилы, предобработанные 10 мкМ MTX (FMLP + MTX), содержат значительно меньше измененных нейтрофилов, чем образцы, которые не обрабатывали MTX (FMLP). На диаграмме представлены средние значения ± SEM ($n = 5$), ***$p < 0.001$ для нормальных нейтрофилов по сравнению с дегенерированными в группах, получавших как FMLP, так и FMLP + MTX. *б* – FMLP-стимулированные нейтрофилы, предобработанные 1 мМ метформина, содержат значительно меньше (%) дегенеративных нейтрофилов, чем образцы без обработки (FMLP). На диаграмме представлены средние значения ± SEM ($n = 5$), **$p < 0.001$, ***$p < 0.01$ по сравнению с группой FMLP. *в* – Сравнение количества вкДНК, высвобождаемой нейтрофилами, стимулированными FMLP, с/без предварительной обработки MTX. После обработки этим препаратом количество вкДНК значительно снижается. Результаты анализа образцов, полученных от каждого индивида, нормировали по результатам группы FMLP для снижения разброса данных, обусловленного индивидуальной вариабельностью и различным числом клеток. На диаграмме представлены средние значения ± SEM ($n = 7$), **$p < 0.01$ для группы FMLP + MTX. *г* – Сравнение количества вкДНК, высвобождаемой из стимулированных FMLP нейтрофилов, с/без предварительной обработки метформином. Обработка клеток метформином значительно снижает количество высвобождаемой вкДНК. Представлены средние значения ± SEM ($n = 4$), *$p < 0.05$ для группы FMLP + метформин.

Микроскопический анализ и количественное определение вкДНК в образцах, предварительно обработанных метформином, также свидетель-

ствуют о супрессии дегенерации нейтрофилов под действием FMLP.

Все сказанное позволяет предположить, что ингибирование MCU под действием MTX снижает число дегенеративных нейтрофилов и высвобождение вкДНК в ответ на обработку FMLP. Подтверждена роль метформина в ингибировании дегенеративных изменений в нейтрофилах человека.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Центрифугирование в градиенте плотности часто применяют при изучении физиологии нейтрофилов [24]. Однако механический стресс, возникающий при этом, приводит к поляризации нейтрофилов [18, 25]. Предварительная активация нейтрофилов в ходе выделения может влиять на их чувствительность к индукторам дегенерации или на образование NET. Таким образом, предактивированные нейтрофилы не подходят для изучения дегенеративных изменений и способности синтетических соединений, подобных FMLP, индуцировать NET. С этой целью мы определили сначала морфологический статус нейтрофилов, выделенных с помощью центрифугирования в градиенте плотности, и обнаружили более высокое содержание активированных нейтрофилов. Активация нейтрофилов может влиять на исход стимуляции нейтрофилов FMLP *ex vivo*. Поэтому мы применили альтернативный и дешевый метод, в котором индуцируемые FMLP изменения морфологии нейтрофилов человека изучают в WB-образцах.

FMLP – синтетический аналог бактериальных формил-пептидов, который стимулирует мобилизацию Ca^{2+} нейтрофилами через мобилизацию рецепторов формил-пептидов [26]. Опосредуемая FMLP активация нейтрофилов вносит вклад в поляризацию [1, 27], направленную миграцию, адгезию и продукцию ROS клетками [14]. Однако сообщения о NET-индуцирующем потенциале FMLP неоднозначны [28]. Выделяют две категории образования NET, основанные на участии NADPH-оксидазы (NOX). NOX-зависимый процесс включает образование ROS с последующим некротическим лизисом нейтрофилов после высвобождения NET [29, 30]. Утверждалось, что генерация ROS под действием FMLP не может индуцировать образование NET в нейтрофилах, поскольку для этого необходима аутофагия и продукция супероксидных радикалов [31]. В 2016 г. показали, что стимуляция нейтрофилов 1 мкМ FMLP не индуцирует высвобождение NET, что свидетельствует в пользу этого утверждения [32]. Напротив, недавно обнаружили, что стимуляции нейтрофилов 1 мкМ FMLP приводит к образованию NET [33]. Показано также, что обработка клеток FMLP (4 ч, 30 нМ) действует как потенциальный индуктор образования NET [34].

Нами установлено, что дегенеративные изменения в стимулированных FMLP нейтрофилах согласуются с данными о способности FMLP индуцировать образование NET. Изменения, включающие экспансию ядерных компонентов и набухание хроматина с последующей дезинтеграцией ядерной оболочки, смешиванием ядерного содержимого с белками цитоплазматических гранул и разрушением ядерной и цитоплазматических мембран, характерны для NET-ассоциированной дегенерации нейтрофилов [4, 35]. Некоторые характеристики нейтрофилов, ассоциированные с образованием NET, включают деконденсацию ядер, утрату ядерной лобуляции и высвобождение тонких филаментов [36]. В нашей работе морфологические изменения нейтрофилов были ассоциированы с образованием NET. Однако набухание цитоплазмы, наряду с правильной локализацией ядра и разрушением плазматической мембраны, наблюдаемые в нейтрофилах с признаками дегенерации, считаются также признаками некроза. Поскольку сообщалось, что FMLP индуцирует в нейтрофилах некротические повреждения [37], дегенеративные изменения в них могут быть результатом некроза. Таким образом, понять точный механизм дегенеративных изменений нейтрофилов, индуцированных FMLP, и их связь с NETозом или некрозом позволят дальнейшие эксперименты.

Предполагается, что присутствие вкДНК можно рассматривать как прогностический признак патологий, ассоциированных с NET [38]. Описано использование повышенного уровня вкДНК в сыворотке в качестве маркера образования NET – прогностического маркера некротизирующего энтероколита (NEC) у мышей и человека [39]. Повышенный уровень вкДНК предложено считать предиктивным маркером NETоза и воспаления при сахарном диабете типа 2 [40]. Описано существование тесной ассоциации между отложением NET и повышенным уровнем вкДНК при различных заболеваниях, включая ревматоидный артрит, системную красную волчанку, связанное с трансфузией острое повреждение легкого и рак [38, 41–44]. Присутствие окисленной вкДНК выявлено при разных воспалительных состояниях, что указывает на участие опосредуемого ROS окислительного стресса в воспалительном потенциале ДНК, высвобожденной из клеток с признаками дегенерации [45–47]. Более того, митохондриальное происхождение вкДНК считается потенциальной причиной воспалительного эффекта [48, 49]. Нами показано значительное увеличение доли вкДНК, высвобождаемой нейтрофилами, стимулированными FMLP, по сравнению с необработанными. Несмотря на это, индуцированные ROS изменения морфологии нейтрофилов, обра-

ботанных FMLP, также могут быть причиной высвобождения вкДНК. С другой стороны, циркулирующая вкДНК может происходить и из клеток, погибших в результате некроза [20]. Учитывая это, нельзя считать NET единственным источником вкДНК в наших образцах, стимулированных FMLP. Таким образом, обнаруженные нами дегенеративные изменения нейтрофилов, индуцированные FMLP, могут быть связаны с некрозом или образованием NET.

Взаимодействие циркулирующих нейтрофилов с другими белыми клетками крови, красными клетками крови и тромбоцитами вносит вклад в их физиологию [13, 14, 50]. Взаимодействие тромбоцитов с нейтрофилами зависит от связывания P-селектина на поверхности тромбоцитов с гликопротеиновым лигандом 1 P-селектина (PSGL-1) на нейтрофилах [8, 51]. В нескольких исследованиях показано, что активированные тромбоциты индуцируют образование NET при воспалительных болезнях и тромбозе [9, 10, 52]. Однако влияние покоящихся тромбоцитов на индуцируемую FMLP дегенерацию нейтрофилов не изучено. Интересно, что наши результаты показали ингибирование опосредуемой FMLP дегенерации в присутствии покоящихся тромбоцитов в препаратах WB. Эти данные подтвердили также полученные ранее результаты, согласно которым образование ROS нейтрофилами, стимулированными FMLP, ингибируется в присутствии покоящихся тромбоцитов *in vitro* [53]. Учитывая это, мы отделили обогащенную тромбоцитами плазму из цельной крови и получили WBP-препараты, которые не содержат тромбоциты. В WBP-препаратах нейтрофилов, стимулированных FMLP, обнаружено увеличение доли дегенеративных нейтрофилов. Поэтому мы можем утверждать, что присутствие покоящихся тромбоцитов ингибирует связанное с FMLP повреждение нейтрофилов *in vitro*. Однако точный механизм опосредуемой тромбоцитами супрессии дегенерации нейтрофилов еще предстоит определить.

Роль Ca^{2+}-сигналов и изменений цитоплазматической концентрации Ca^{2+} в ходе стимуляции и миграции нейтрофилов хорошо известна [54]. Показано, что FMLP вызывает увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме и митохондриях [55]. Недавно обнаружено участие Ca^{2+}-чувствительных рецепторов в стимулированных FMLP нейтрофилах [56]. Опосредуемое IP_3 высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума увеличивает концентрацию Ca^{2+} в цитозоле [26], часть которого захватывается также митохондриями через MCU. Вследствие этого индуцируемый Ca^{2+} метаболизм ведет к продукции митохондриями ROS, которые активируют протеинкиназу C. Активация протеинкиназы C может, в свою очередь, запускать окисление NADPH, вызывающее окислительный взрыв и активацию нейтрофилов при разных иммунных ответах [14, 29, 56, 57]. MCU – недавно открытый белок внутренней мембраны митохондрий, который регулирует гомеостаз Ca^{2+} [58]. Обнаружено, что MCU играет значительную роль в хемотаксисе и поляризации нейтрофилов путем модуляции полимеризации F-актина и расщепления митохондрий [16]. Однако вклад MCU в некроз нейтрофилов или в NET-ассоциированную дегенерацию остается неизученным. Мы использовали MTX, новый блокатор MCU, для изучения роли MCU в опосредованной FMLP дегенерации нейтрофилов. Нами показано, что предварительная обработка нейтрофилов MTX снижает стимулируемую FMLP дегенерацию клеток. Поскольку известно, что FMLP индуцирует образование ROS в нейтрофилах [59], можно предположить, что дегенеративные изменения, выявленные в нашей работе, могут быть следствием индуцируемой FMLP активации NOX через открытие канала MCU, запускаемого опосредуемым IP_3 избытком Ca^{2+}.

Способность MTX подавлять индукцию повреждений в стимулированных FMLP нейтрофилах подтверждена также количественным определением вкДНК, которая высвобождается в условиях окислительного стресса, вызванного избытком Ca^{2+} в митохондриях и увеличенной продукцией ROS. Поэтому ингибирование митохондриального Ca^{2+} MTX ведет к значительному снижению концентрации вкДНК по сравнению с необработанными нейтрофилами. Эти результаты указывают на ключевую роль MCU в индукции дегенеративных изменений в нейтрофилах человека, стимулированных FMLP. В дополнение к MTX мы проверили также действие метформина (противодиабетическое средство, снижающее формирование NET) на клетки, стимулированные FMLP. Сообщалось, что метформин подавляет дегенеративные изменения нейтрофилов, ассоциированные с NET через ингибирование комплекса I [60, 61]. Интересно, что мы также наблюдали заметное снижение морфологических изменений и высвобождения вкДНК нейтрофилами, стимулированными FMLP, при обработке метформином. Мы предполагаем, что ингибирование метформином комплекса I, который является местом продукции ROS в митохондриях, может снижать негативное действие FMLP, сдерживая образование ROS в нейтрофилах.

Таким образом, полученные нами результаты подтверждают способность FMLP индуцировать дегенеративные изменения в нейтрофилах на самых ранних стадиях стимуляции. Изменения, индуцируемые FMLP, напоминают ответ нейтрофилов на высвобождение NET. Однако существует также возможность некротических повреждений нейтрофилов, вызванных FMLP. WBP, ис-

пользованные в нашей работе, могут обеспечивать условия, сходные с условиями, окружающими нейтрофилы в организме, пригодные для изучения сложных механизмов дегенеративных процессов. Полученные нами результаты подчеркивают важный вклад покоящихся тромбоцитов в опосредуемое FMLP повреждение нейтрофилов. Эти результаты могут способствовать пониманию аномальных повреждений нейтрофилов, индуцированных инфекцией, способной провоцировать развитие тяжелых воспалительных заболеваний. Наши данные свидетельствуют в пользу представлений о том, что MCU вносит вклад в опосредуемое FMLP повреждение нейтрофилов, которое может быть ассоциировано с образованием NET или некрозом. Поэтому ингибирование MCU может служить потенциальной терапевтической мишенью при болезнях, ассоциированных с обширными повреждениями нейтрофилов.

Авторы признательны всем донорам крови за участие в этом исследовании.

К участию в исследовании были привлечены здоровые взрослые доноры, от каждого из которых получено письменное информированное согласие. Экспериментальные исследования одобрены Этическим комитетом института в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г.

Финансирование этого исследования было предоставлено URF Quaid-i-Azam University, Исламабад, Пакистан.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ekpenyong A.E., Toepfner N., Fiddler C., Herbig M., Li W., Cojoc G., Summers C., Guck J., Chilvers E.R. (2017) Mechanical deformation induces depolarization of neutrophils. *Sci. Adv.* **3**, e1602536. https://doi.org/10.1126/sciadv.1602536
2. Teng T.S., Ji A.L., Ji X.Y., Li Y.Z. (2017) Neutrophils and immunity: from bactericidal action to being conquered. *J. Immunol. Res.* **2017**, 9671604. https://doi.org/10.1155/2017/9671604
3. Lisman T. (2018) Platelet-neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease. *Cell Tissue Res.* **371**, 567–576. https://doi.org/10.1007/s00441-017-2727-4
4. Lawrence S.M., Corriden R., Nizet V. (2020) How neutrophils meet their end. *Trends Immunol.* **41**, 531–544. https://doi.org/10.1016/j.it.2020.03.008
5. Pruchniak M.P., Kotula I., Manda-Handzlik A, (2015) Neutrophil extracellular traps (Nets) impact upon autoimmune disorders. *Cent. Eur. J. Immunol.* **40**, 217–224. https://doi.org/10.5114/ceji.2015.52836
6. Munoz L.E., Boeltz S., Bilyy R., Schauer C., Mahajan A., Widulin N., Gruneboom A., Herrmann I., Boada E., Rauh M., Krenn V., Biermann M.H.C., Podolska M.J., Hahn J., Knopf J., Maueroder C., Paryzhak S., Dumych T., Zhao Y., Neurath M.F., Hoffmann M.H., Fuchs T.A., Leppkes M., Schett G., Herrmann M. (2019) Neutrophil extracellular traps initiate gallstone formation. *Immunity.* **51**, 443–450,e4. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.07.002
7. Sayah D.M., Mallavia B., Liu F., Ortiz-Munoz G., Caudrillier A., DerHovanessian A., Ross D.J., Lynch J.P., 3rd, Saggar R., Ardehali A., Lung Transplant Outcomes Group I, Ware L.B., Christie J.D., Belperio J.A., Looney M.R. (2015) Neutrophil extracellular traps are pathogenic in primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **191**, 455–463. https://doi.org/10.1164/rccm.201406-1086OC
8. Etulain J., Martinod K., Wong S.L., Cifuni S.M., Schattner M., Wagner D.D. (2015) P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood.* **126**, 242–246. https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-624023
9. Patel M.S., Miranda-Nieves D., Chen J., Haller C.A., Chaikof E.L. (2017) Targeting P-selectin glycoprotein ligand-1/P-selectin interactions as a novel therapy for metabolic syndrome. *Transl. Re*s. **183**, 1–13. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.11.007
10. Pircher J., Engelmann B., Massberg S., Schulz C. (2019) Platelet-neutrophil crosstalk. *Atherothrombosis. Thromb. Haemost.* **119**, 1274–1282. https://doi.org/10.1055/s-0039-1692983
11. Zhou G.X., Liu Z.J. (2017) Potential roles of neutrophils in regulating intestinal mucosal inflammation of inflammatory bowel disease. *J. Dig. Dis.* **18**, 495–503. https://doi.org/10.1111/1751-2980.12540
12. Li L., Chen K., Xiang Y., Yoshimura T., Su S., Zhu J., Bian X.W., Wang J.M. (2016) New development in studies of formyl-peptide receptors: critical roles in host defense. *J. Leukoc. Biol.* **99**, 425–435. https://doi.org/10.1189/jlb.2RI0815-354RR
13. Dahlgren C., Gabl M., Holdfeldt A., Winther M., Forsman H. (2016) Basic characteristics of the neutrophil receptors that recognize formylated peptides, a danger-associated molecular pattern generated by bacteria and mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* **114**, 22–39. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.04.014
14. Wen X., Xu X., Sun W., Chen K., Pan M., Wang J.M., Bolland S.M., Jin T. (2019) G-protein-coupled formyl peptide receptors play a dual role in neutrophil chemotaxis and bacterial phagocytosis. *Mol. Biol. Cell.* **30**, 346–356. https://doi.org/10.1091/mbc.E18-06-0358
15. Paupe V., Prudent J. (2018) New insights into the role of mitochondrial calcium homeostasis in cell migration. *Biochem. Biophys. Res. Commu*n. **500**, 75–86. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.039
16. Zheng X., Chen M., Meng X., Chu X., Cai C., Zou F. (2017) Phosphorylation of dynamin-related protein 1 at Ser616 regulates mitochondrial fission and is involved in mitochondrial calcium uniporter-mediated neutrophil polarization and chemotaxis. *Mol. Immunol.* **87**, 23–32. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.03.019
17. Freitas M., Porto G., Lima J.L., Fernandes E. (2008) Isolation and activation of human neutrophils *in vitro*. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clin. Biochem.* **41**, 570–575. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.12.02118

18. Ekpenyong A.E., Toepfner N., Chilvers E.R., Guck J. (2015) Mechanotransduction in neutrophil activation and deactivation. *Biochim. Biophys. Acta*. **1853**, 3105–3116.
https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.015

19. Zmijewski J.W., Lorne E., Zhao X., Tsuruta Y., Sha Y., Liu G., Siegal G.P., Abraham E. (2008) Mitochondrial respiratory complex I regulates neutrophil activation and severity of lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. **178**, 168–179.
https://doi.org/10.1164/rccm.200710-1602OC

20. Jackson Chornenki N.L., Coke R., Kwong A.C., Dwivedi D.J., Xu M.K., McDonald E., Marshall J.C., Fox-Robichaud A.E., Charbonney E., Liaw P.C. (2019) Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis. *Intensive Care Med. Exp*. **7**, 29.
https://doi.org/10.1186/s40635-019-0251-4

21. Margraf S., Logters T., Reipen J., Altrichter J., Scholz M., Windolf J. (2008) Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock*. **30**, 352–358.
https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31816a6bb1

22. Arduino D.M., Wettmarshausen J., Vais H., Navas-Navarro P., Cheng Y., Leimpek A., Ma Z., Delrio-Lorenzo A., Giordano A., Garcia-Perez C., Medard G., Kuster B., Garcia-Sancho J., Mokranjac D., Foskett J.K., Alonso M.T., Perocchi F. (2017) Systematic identification of MCU modulators by orthogonal interspecies chemical screening. *Mol. Cell*. **67**, 711–723,e7.
https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.07.019

23. Menegazzo L., Scattolini V., Cappellari R., Bonora B.M., Albiero M., Bortolozzi M., Romanato F., Ceolotto G., Vigili de Kreutzeberg S., Avogaro A., Fadini G.P. (2018) The antidiabetic drug metformin blunts NETosis *in vitro* and reduces circulating NETosis biomarkers *in vivo*. *Acta Diabetol*. **55**, 593–601.
https://doi.org/10.1007/s00592-018-1129-8

24. Cabanis A., Gressier B., Lebegue S., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Cazin M., Cazin J.C. (1994) A rapid density gradient technique for separating polymorphonuclear granulocytes. *APMIS*. **102**, 119–121.
https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1994.tb04855.x

25. Yap B., Kamm R.D. (2005) Mechanical deformation of neutrophils into narrow channels induces pseudopod projection and changes in biomechanical properties. *J. Appl. Physiol*. **98**, 1930–1939.
https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01226.2004

26. Dorward D.A., Lucas C.D., Chapman G.B., Haslett C., Dhaliwal K., Rossi A.G. (2015) The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function during acute inflammation. *Am. J. Pathol*. **185**, 1172–1184.
https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.01.020

27. Servant G., Weiner O.D., Herzmark P., Balla T., Sedat J.W., Bourne H.R. (2000) Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science*. **287**, 1037–1040.
https://doi.org/10.1126/science.287.5455.1037

28. Bufe B., Schumann T., Kappl R., Bogeski I., Kummerow C., Podgorska M., Smola S., Hoth M., Zufall F. (2015) Recognition of bacterial signal peptides by mammalian formyl peptide receptors: a new mechanism for sensing pathogens. *J. Biol. Chem*. **290**, 7369–7387.
https://doi.org/10.1074/jbc.M114.626747

29. Воробьева Н.В., Черняк Б.В. (2020) НЕТоз: молекулярные механизмы, роль в физиологии и патологии (обзор). *Биохимия*. **85**(10), 1383–1397.
https://doi.org/10.1134/S0006297920100065

30. Nguyen G.T., Green E.R., Mecsas J. (2017) Neutrophils to the ROScue: mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. **7**, 73.
https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373

31. Remijsen Q., Vanden Berghe T., Wirawan E., Asselbergh B., Parthoens E., De Rycke R., Noppen S., Delforge M., Willems J., Vandenabeele P. (2011) Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell. Res*. **21**, 290–304.
https://doi.org/10.1038/cr.2010.150

32. Yuen J., Pluthero F.G., Douda D.N., Riedl M., Cherry A., Ulanova M., Kahr W.H., Palaniyar N., Licht C. (2016) NETosing neutrophils activate complement both on their own NETs and bacteria via alternative and non-alternative pathways. *Front. Immunol*. **7**, 137.
https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00137

33. Pruchniak M.P., Demkow U., (2019) Potent NETosis inducers do not show synergistic effects *in vitro*. *Cent. Eur. J. Immunol*. **44**, 51–58.
https://doi.org/10.5114/ceji.2019.84017

34. Tatsiy O., McDonald P.P. (2018) Physiological stimuli induce PAD4-dependent, ROS-independent NETosis, with early and late events controlled by discrete signaling pathways. *Front. Immunol*. **9**, 2036.
https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02036

35. Neubert E., Meyer D., Rocca F., Gunay G., Kwaczala-Tessmann A., Grandke J., Senger-Sander S., Geisler C., Egner A., Schon M.P., Erpenbeck L., Kruss S. (2018) Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. *Nat. Commun*. **9**, 3767.
https://doi.org/10.1038/s41467-018-06263-5

36. Воробьева Н.В., Пинегин Б.В. (2014) Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, роль в норме и при патологии (обзор). *Биохимия*. **79**(12), 1582–1593.
https://doi.org/10.1134/s0006297914120025

37. Peniche A.G., Bonilla D.L., Palma G.I., Melby P.C., Travi B.L., Osorio E.Y. (2017) A secondary wave of neutrophil infiltration causes necrosis and ulceration in lesions of experimental American cutaneous leishmaniasis. *PLoS One*. **12**, e0179084.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179084

38. Zhang S., Lu X., Shu X., Tian X., Yang H., Yang W., Zhang Y., Wang G. (2014) Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus. *Intern. Med*. **53**, 2763–2771.
https://doi.org/10.2169/internalmedicine.53.2570

39. Vincent D., Klinke M., Eschenburg G., Trochimiuk M., Appl B., Tiemann B., Bergholz R., Reinshagen K., Boettcher M. (2018) NEC is likely a NETs dependent process and markers of NETosis are predictive of NEC in mice and humans. *Sci. Rep*. **8**, 12612.
https://doi.org/10.1038/s41598-018-31087-0

40. Bryk A.H., Prior S.M., Plens K., Konieczynska M., Hohendorff J., Malecki M.T., Butenas S., Undas A. (2019) Predictors of neutrophil extracellular traps markers in type 2 diabetes mellitus: associations with a prothrombotic state and hypofibrinolysis. *Cardiovasc. Diabetol.* **18**, 49. https://doi.org/10.1186/s12933-019-0850-0

41. Lood C., Blanco L.P., Purmalek M.M., Carmona-Rivera C., De Ravin S.S., Smith C.K., Malech H.L., Ledbetter J.A., Elkon K.B., Kaplan M.J. (2016) Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat. Med.* **22**, 146–153. https://doi.org/10.1038/nm.4027

42. Sur Chowdhury C., Giaglis S., Walker U.A., Buser A., Hahn S., Hasler P. (2014) Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis. Res. Ther.* **16**, R122. https://doi.org/10.1186/ar4579

43. Thomas G.M., Carbo C., Curtis B.R., Martinod K., Mazo I.B., Schatzberg D., Cifuni S.M., Fuchs T.A., von Andrian U.H., Hartwig J.H., Aster R.H., Wagner D.D. (2012) Extracellular DNA traps are associated with the pathogenesis of TRALI in humans and mice. *Blood.* **119**, 6335–6343. https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-405183

44. Oklu R., Sheth R.A., Wong K.H.K., Jahromi A.H., Albadawi H. (2017) Neutrophil extracellular traps are increased in cancer patients but does not associate with venous thrombosis. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* **7**, S140–S149. https://doi.org/10.21037/cdt.2017.08.01

45. Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., Izevskaya V.L., Baranova A., Veiko N.N. (2013) Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 649747. https://doi.org/10.1155/2013/649747

46. Lunec J., Herbert K., Blount S., Griffiths H.R., Emery P. (1994) 8-Hydroxydeoxyguanosine. A marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. *FEBS Lett.* **348**, 131–138. https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00583-4

47. Collins L.V., Hajizadeh S., Holme E., Jonsson I.M., Tarkowski A. (2004) Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces *in vivo* and *in vitro* inflammatory responses. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 995–1000. https://doi.org/10.1189/jlb.0703328

48. Oka T., Hikoso S., Yamaguchi O., Taneike M., Takeda T., Tamai T., Oyabu J., Murakawa T., Nakayama H., Nishida K., Akira S., Yamamoto A., Komuro I., Otsu K. (2012) Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature.* **485**, 251–255. https://doi.org/10.1038/nature10992

49. West A.P., Khoury-Hanold W., Staron M., Tal M.C., Pineda C.M., Lang S.M., Bestwick M., Duguay B.A., Raimundo N., MacDuff D.A., Kaech S.M., Smiley J.R., Means R.E., Iwasaki A., Shadel G.S. (2015) Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature.* **520**, 553–557. https://doi.org/10.1038/nature14156

50. Jerke U., Rolle S., Purfürst B., Luft F.C., Nauseef W.M., Kettritz R. (2013) B2 integrin-mediated cell–cell contact transfers active myeloperoxidase from neutrophils to endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 12910–12919. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.434613

51. Polanowska-Grabowska R., Wallace K., Field J.J., Chen L., Marshall M.A., Figler R., Gear A.R., Linden J. (2010) P-selectin-mediated platelet-neutrophil aggregate formation activates neutrophils in mouse and human sickle cell disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 2392–2399. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.211615

52. Ye Z., Zhong L., Zhu S., Wang Y., Zheng J., Wang S., Zhang J., Huang R. (2019) The P-selectin and PSGL-1 axis accelerates atherosclerosis via activation of dendritic cells by the TLR4 signaling pathway. *Cell Death Dis.* **10**, 507. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1736-5

53. Bengtsson T., Zalavary S., Stendahl O., Grenegard M. (1996) Release of oxygen metabolites from chemoattractant-stimulated neutrophils is inhibited by resting platelets: role of extracellular adenosine and actin polymerization. *Blood.* **87**, 4411–4423.

54. Gupta A.K., Giaglis S., Hasler P., Hahn S. (2014) Efficient neutrophil extracellular trap induction requires mobilization of both intracellular and extracellular calcium pools and is modulated by cyclosporine A. *PLoS One.* **9**, e97088. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097088

55. Bagur R., Hajnoczky G. (2017) Intracellular Ca^{2+} sensing: its role in calcium homeostasis and signaling. *Mol. Cell.* **66**, 780–788. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.028

56. Zhai T.Y., Cui B.H., Zou L., Zeng J.Y., Gao S., Zhao Q., Wang Y., Xie W.L., Sun Y.H. (2017) Expression and role of the calcium-sensing receptor in rat peripheral blood polymorphonuclear neutrophils. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 3869561. https://doi.org/10.1155/2017/3869561

57. Itakura A., McCarty O.J. (2013) Pivotal role for the mTOR pathway in the formation of neutrophil extracellular traps via regulation of autophagy. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **305**, C348–C54. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00108.2013

58. Pathak T., Trebak M. (2018) Mitochondrial Ca^{2+} signaling. *Pharmacol. Ther.* **192**, 112–123. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.07.001

59. Hidalgo M.A., Carretta M.D., Teuber S.E., Zarate C., Carcamo L., Concha I.I., Burgos R.A. (2015) fMLP-induced IL-8 release is dependent on NADPH oxidase in human neutrophils. *J. Immunol. Res* **2015**, 120348. https://doi.org/10.1155/2015/120348

60. Teng X., Liu Z., Wang H., Ye S. (2016) Neutrophil extracellular trap mitochondrial DNA and its autoantibody in systemic lupus erythematosus and a proof-of-concept trial of metformin. *Arthritis Rheumatol.* **68**, 3043. https://doi.org/10.1002/art.39864

61. Rena G., Hardie D.G., Pearson E.R. (2017) The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia.* **60**, 1577–1585. https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z

MITOXANTRONE INHIBITS FMLP-INDUCED DEGENERATIVE CHANGES IN HUMAN NEUTROPHILS

S. G. Ali[1], D. Shehwar[1], and M. R. Alam[1, *]

[1]*Department of Biochemistry, Quaid-i-Azam University, Islamabad, 45320 Pakistan*

**e-mail: mralam@qau.edu.pk*

Neutrophils fight with invading pathogens through various mechanisms including degranulation, phagocytosis, and the release of neutrophil extracellular traps (NETs). This study aimed to determine the impact of a synthetic formyl-peptide (FMLP) on human neutrophils *in vitro* and to determine the role of mitoxantrone (MTX), a pharmacological blocker of mitochondrial Ca^{2+} Uniporter (MCU), on FMLP-induced alterations. Isolated neutrophils and a whole-blood preparation of neutrophils were pre-treated with MTX and then stimulated with FMLP. Field's stained smears and brightfield microscopy was employed for morphological characterization and quantification of neutrophils. The release of cell-free DNA (cfDNA) was also measured for determining neutrophil damage. Our data demonstrated degenerative changes in neutrophils and a greater cfDNA release upon stimulation with FMLP which was negatively associated with the presence of platelets in whole blood preparation. Interestingly, MTX pre-treatment significantly reduced FMLP-triggered neutrophil damage and cfDNA release. Metformin, a known inhibitor of NETs formation, also decreased the FMLP-induced changes in neutrophils. In addition to confirming the degenerative potential of FMLP, this study reveals a novel contribution of MCU in regulating FMLP-induced morphological alteration in human neutrophils.

Keywords: whole blood preparation, neutrophil degeneration, neutrophil extracellular traps (NETs), N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP), mitochondrial Ca^{2+}uniporter, mitoxantrone

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 5, с. 870–880

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 57.052:57.085.23

АННЕКСИН A8 РЕГУЛИРУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ A549 ЗА СЧЕТ РЕГУЛЯЦИИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ EGFR-Akt-mTOR[1]

© 2021 г. G.-Z. Zhou[a, *], Y.-H. Sun[a], Y.-Y. Shi[a], Q. Zhang[b], L. Zhang[a], L.-Q. Cui[a], G.-C. Sun[c]

[a]College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, 450001 China

[b]Henan Academy of Fishery Sciences, Zhengzhou, 450044 China

[c]College of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, 450001 China

*e-mail: gzzhou@163.com

Поступила в редакцию 21.10.2020 г.
После доработки 27.01.2021 г.
Принята к публикации 01.02.2021 г.

Аннексин A8 (ANXA8), входящий в состав семейства аннексинов, участвует в регуляции многих процессов в раковых клетках, включая пролиферацию, метастазирование и воспаление. Однако роль ANXA8 в развитии рака легкого в настоящее время недостаточно изучена. Ранее по данным транскриптомного анализа мы установили пониженную экспрессию мРНК ANXA8 при обработке клеток немелкоклеточного рака легкого человека линии A549 аналогом куркумина (MHMD). Теперь, используя количественную ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и иммуноблотинг, мы продолжили исследование экспрессии ANXA8 в клетках A549 и сравнили ее с экспрессией в клетках нормального легочного эпителия человека (линия BE-AS-2B). Индукция сверхэкспрессии *ANXA8* с помощью плазмиды pEGFP-ANXA8 способствовала пролиферации и миграции клеток A549. Более того, в клетках со сверхэкспрессией *ANXA8* зарегистрировано повышенное содержание циклина E1 – белка клеточного цикла. Нокдаун *ANXA8* с помощью РНК-интерференции приводил к снижению жизнеспособности клеток A549 и ограничению их миграционной подвижности. Экспрессия основных участников сигнального пути рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), таких как PI3K, Akt, mTOR, p70S6K и 4EBP1, также изменялась при нокдауне или сверхэкспрессии *ANXA8* в клетках A549, что подтверждает участие ANXA8 в активации сигнального пути EGFR/Akt/mTOR. Результаты проведенного исследования дают основания для дальнейшего изучения функциональной роли ANXA8 в развитии рака легкого.

Ключевые слова: аннексин A8, немелкоклеточный рак легкого человека, пролиферация, метастазирование, EGFR

DOI: 10.31857/S0026898421050116

Аннексины представляют собой семейство белков, вовлеченных в транспорт везикул, пролиферацию клеток, апоптоз и другие клеточные процессы [1]. Суперсемейство аннексинов позвоночных состоит из 12 высокогомологичных белков, вовлеченных в регуляцию множества физиологических и патофизиологических процессов. Ранее продемонстрирован вклад некоторых аннексинов в пролиферацию, инвазию и метастазирование различных видов злокачественых опухолей. Например, Sun и др. [2] обнаружили, что аннексин A10 (ANXA10) способствует эпителиально-мезенхимальному переходу и метастазированию внепеченочной холангиокарциномы за счет активации сигнального пути PLA2G4A/PGE2/STAT3. Также повышенная экспрессия *ANXA2* оказывала влияние на пролиферацию, инвазию и миграцию клеток колоректального рака за счет активации STAT3 [3], тогда как подавление экспрессии *ANXA2* блокировало пролиферацию и метастазирование гепатомы [4]. Lima и др. [5] установили, что ANXA1, который регулируется глюкокортикоидами и обладает противовоспалительным действием, по-видимому, является основной мишенью лекарств, индуцирующих образование cAMP и cAMP-миметиков. Недавно показано, что *ANXA1* может быть геном-мишенью гонадолиберина в гонадотропных клетках LβT2 [6]. О разнообразии функциональных свойств аннексинов можно судить и по активными исследованиям ANXA6 и ANXA7 [7–9].

ANXA8, будучи важным членом семейства аннексинов, оказывает влияние на несколько внутриклеточных сигнальных путей. Так, Jiang и др.

[1] Статья представлена авторами на английском языке.

[10] обнаружили, что ANXA8 регулирует гомеостаз эндометрия свиней через сигнальный путь Akt. Он также регулирует фенотип клеток пигментного эпителия сетчатки [11], а Heitzig и др. [12] подтвердили, что ANXA8 способствует VEGF-A-индуцируемому разрастанию кровеносных сосудов в эндотелиальных клетках. Ряд авторов указывает на возможность использования ANXA8 как прогностического маркера при развитии рака яичников [13] и метастазировании плоскоклеточного рака полости рта в лимфатические узлы [14]. Также обнаружена эктопическая экспрессия *ANXA8* при раке поджелудочной железы [15].

Ранее в исследованиях, посвященных влиянию синтетического аналога куркумина (MHDM) на транскриптом клеток немелкоклеточного рака легкого человека линии A549, мы обнаружили, что обработка MHDM индуцировала апоптоз клеток A549 и снижение экспрессии гена *ANXA8* [16, 17]. Однако детально роль ANXA8 в регуляции деления и миграции клеток A549 мы не исследовали. Теперь мы подтвердили разницу в экспрессии *ANXA8* между клетками A549 и клетками нормального человеческого эпителия линии BE-AS-2B. Кроме того, используя технологии подавления или индукции экспрессии гена *ANXA8*, мы изучили влияние этого аннексина на фенотип клеток A549 (включая их жизнеспособность, скорость миграции и содержание факторов, регулирующих клеточный цикл).

Известно также, что ANXA8 может активировать сигнальный путь рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). Будучи участником семейства мембранных тирозинкиназ и рецепторов факторов роста, EGFR и его лиганды участвуют в развитии многих видов рака, в особенности со́лидных опухолей [18]. В связи с этим их считают потенциальными мишенями для онкотерапии. Связывание лиганда с EGFR приводит к образованию гомо- и гетеродимеров рецептора с последующей активацией нижележащих сигнальных путей, таких как PI3K/Akt, участвующих в пролиферации, выживании и миграции клеток [19]. Интересно, что ранее выявлена способность ANXA8 активировать фосфорилирование белка Akt [10]. Исходя из этого, мы исследовали влияние сайленсинга и сверхэкспрессии *ANXA8* на активацию сигнального пути EGFR в клетках A549. Получены результаты, на основании которых можно говорить о важной роли ANXA8 в пролиферации клеток A549 через активацию сигнального пути EGFR/Akt/mTOR. Эти знания позволяют нам приблизиться к пониманию механизма деления клеток рака легкого, а также задуматься о прогностическом и терапевтическом потенциале ANXA8.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии и реагенты. MHDM был любезно предоставлен Dr. Gangchun Sun (College of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, Китай) [17]. Первичные поликлональные антитела: мышиные против ANXA8, кроличьи против Akt и фосфорилированного (p) Akt – были приобретены у компании “Sigma Aldrich” (“Merck”, Германия); моноклональные кроличьи антитела против mTOR, p-mTOR, EGFR, p-EGFR, PI3K и p-PI3K, а также мышиные моноклональные антитела против циклина E1 и поликлональные кроличьи антитела против p70S6K, p-p70S6K, 4EBP1 и p-4EBP1 – у “Cell Signaling Technology, Inc.” (США). Поликлональные антитела к GAPDH и тубулину приобретены соответственно у “Proteintech Group, Inc.” и “Abbkine Scientific Co., Ltd.” (Китай).

Фрагмент гена *ANXA8* синтезирован в компании “Sangon Biotech” (Китай), а малые интерферирующие РНК (siРНК), специфичные к мРНК ANXA8, – в компании “Shanghai GenePharma” (Китай).

Клетки линии A549 немелкоклеточного рака легкого человека культивировали в среде RPMI-1640 (“Gibco”, “Thermo Fisher Scientific”, США) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; “Zhengjiang Tianhang Biotechnology”, Китай). Клетки линии BE-AS-2B нормального бронхиального эпителия человека культивировали в среде DMEM (“Beijing Solarbio Science and Technology”, Китай). Все клетки культивировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO_2.

Конструирование рекомбинантных плазмид и трансфекция. Рекомбинантный эукариотический вектор pEGFP-ANXA8 сконструирован путем клонирования в векторе pEGFP-N3 (“Clontech Laboratories, Inc.”, США) полной открытой рамки считывания *ANXA8*, используя соответствующие праймеры (прямой 5'-GGCTCGAGAGATGGCCTG-3' и обратный 5'-TCGAATTCTCTGGGGTCGC-3') согласно стандартному протоколу. ПЦР ставили по следующей программе: изначальное плавление 94°C в течение 5 мин, затем 35 циклов: 30 с при 94°C, 30 с при 57°C и 30 с при 72°C; в завершение проводили элонгацию при 72°C в течение 7 мин. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле и визуализировали с помощью бромистого этидия. Плазмиду pEGFP-ANXA8 и siРНК к *ANXA8* вводили в клетки A549 с помощью Lipofectamine 2000 (“Thermo Fisher Scientific”) согласно протоколу производителя.

МТТ-тест. После трансфекции плазмидой pEGFP-ANXA8 или siРНК клетки линии A549 снимали с помощью трипсина и рассаживали в 96-луночные планшеты для анализа жизнеспособности с помощью МТТ-теста. Вкратце, 20 мкл

MTT (5 мг/мл, “GEN-VIEW Scientific Inc.”, Китай) добавляли к клеткам и инкубировали в темноте 4 ч при 37°C. Далее культуральную среду полностью удаляли и добавляли к клеткам 100 мкл DMSO. Оптическую плотность при 490 нм измеряли на планшетном ридере (“BioTek Instruments”, США). Выживаемость клеток считали по следующей формуле: Жизнеспособность (%) = = [A_{490}(образца)/A_{490}(контроля)] × 100 (n = 5).

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Тотальную РНК из клеток A549, трансфицированных плазмидой pEGFP-ANXA8, и контрольных клеток выделяли по протоколу производителя (“Sigma-Aldrich”). После получения кДНК на основе выделенной РНК (“Vazyme Biotech”, Китай) проводили количественную ПЦР (“Bio-Rad Laboratories”, США), используя праймеры на ген *ANXA8* (прямой праймер: 5'-TGGGACCCTGATAAGAAACAT-3', обратный праймер: 5'-TCCTGGAGACTCTGGCTTCAT-3') по следующей программе: 95°C в течение 5 мин, далее 40 циклов: 30 с при 95°C, 30 с при 57°C и 30 с при 72°C. Поглощение SYBR Green I в лунках измеряли в конце каждого цикла. Качество ПЦР-продуктов оценивали по кривой плавления при температурах 60–95°C. В качестве эндогенного контроля использовали *GAPDH* (прямой праймер: 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTG-3' и обратный праймер: 5'-CTCTTGTGCTCTTGCTGGG-3'). Уровень экспрессии гена *ANXA8* считали относительно *GAPDH* по методу $2^{-\Delta\Delta Cq}$ [20]. Образцы анализировали в не менее чем в трех повторах.

Иммуноблотинг. Клетки собирали и лизировали для последующего выделения белка. Концентрацию белка определяли на микропланшетном спектрофотометре (“BioTek Instruments”) по методу Брэдфорда [21]. Далее белки разделяли с помощью электрофореза в SDS-ПААГ и переносили на PVDF-мембрану (“Sangon Biotech”). Сначала мембраны инкубировали с первичными антителами, описанными выше. После трехкратной промывки в буфере TBS: 0.05 M Трис-HCl (pH 7.6), 0.15 M NaCl – с добавлением Tween 20 (TBST) мембраны инкубировали со вторичными антителами: козьими антикроличьими (“Beijing Solarbio Science & Technology Co., Ltd.”, Китай) или антимышиными (“Abbkine Scientific Co., Ltd.”), – конъюгированными с пероксидазой хрена, и затем проявляли с использованием набора Enhanced Chemiluminescence Substrate kit (“Sangon Biotech”). Для денситометрического анализа иммуноблотинга использовали программу ImageJ (1.44p) (https://imagej.nih.gov/ij/).

Иммунофлуоресцентный анализ. Клетки A549 и BE-AS-2B высевали на 6-луночные планшеты (3×10^5 клеток/лунка). Клетки A549 обрабатывали MHDM (4 мкМ) в течение 48 ч. После фиксации 4%-ным параформальдегидом в течение 10 мин при комнатной температуре клетки инкубировали с антителами к ANXA8 в течение 18 ч при 4°C. После трехкратной отмывки с помощью TBST клетки инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с FITC, в течение 4 ч. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33 342 в течение 15 мин. После тщательной отмывки с TBST клетки помещали в 50%-ный раствор глицерина в PBS и анализировали на флуоресцентном микроскопе Nikon TE2000-U (“Nikon Corporation”, Япония).

Анализ миграции клеток. После трансфекции клеток A549 в 6-луночном планшете плазмидой pEGFP-ANXA8 (600 нг/лунка) или siРНК к мРНК ANXA8 их высевали в верхнюю камеру системы Cepeda Transwell (“Corning”, США) и оценивали скорость миграции в нижнюю камеру со средой, содержащей 10% FBS. Через 24 и 48 ч камеры извлекали, среду из лунок верхней камеры удаляли и дважды промывали клетки PBS, после чего их фиксировали метанолом в течение 30 мин. В это время нижнюю камеру высушивали при комнатной температуре. Далее в лунки добавляли 600 мкл 0.1%-ного раствора кристаллического фиолетового на 15 мин, после чего планшет промывали и оценивали миграцию клеток с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 (“Nikon Corporation”).

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью теста Даннета ($n \geq 3$) и представляли в виде среднего ± стандартная ошибка среднего (SEM). Анализ проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 22 (“IBM Corp.”). Значения $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ и $^{***}P < 0.001$ отражают степень статистически достоверных различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение экспрессии ANXA8 в клетках A549

Ранее на основании данных транскриптомного анализа нами был сделан вывод о повышенной экспрессии *ANXA8* в клетках A549, обработанных MHMD, по сравнению с контрольными клетками [17]. По результатам проведенного нами теперь количественного анализа методом ПЦР в реальном времени содержание мРНК ANXA8 в клетках A549 оказалось в 60 раз больше, чем в клетках линии BE-AS-2B нормального легкого (рис. 1*а*), тогда как обработка MHMD (4 мкМ) через 48 ч приводила к снижению экспрессии гена *ANXA8* в клетках A549. В этой группе уровень экспрессии был всего в три раза выше по сравнению с клетками BE-AS-2B. Более того, по данным иммуноблотинга содержание белка ANXA8 было также значительно выше в клетках A549 по сравнению с клетками BE-AS-2B (рис. 1*б*). По результатам иммунофлуоресцентного анализа, после

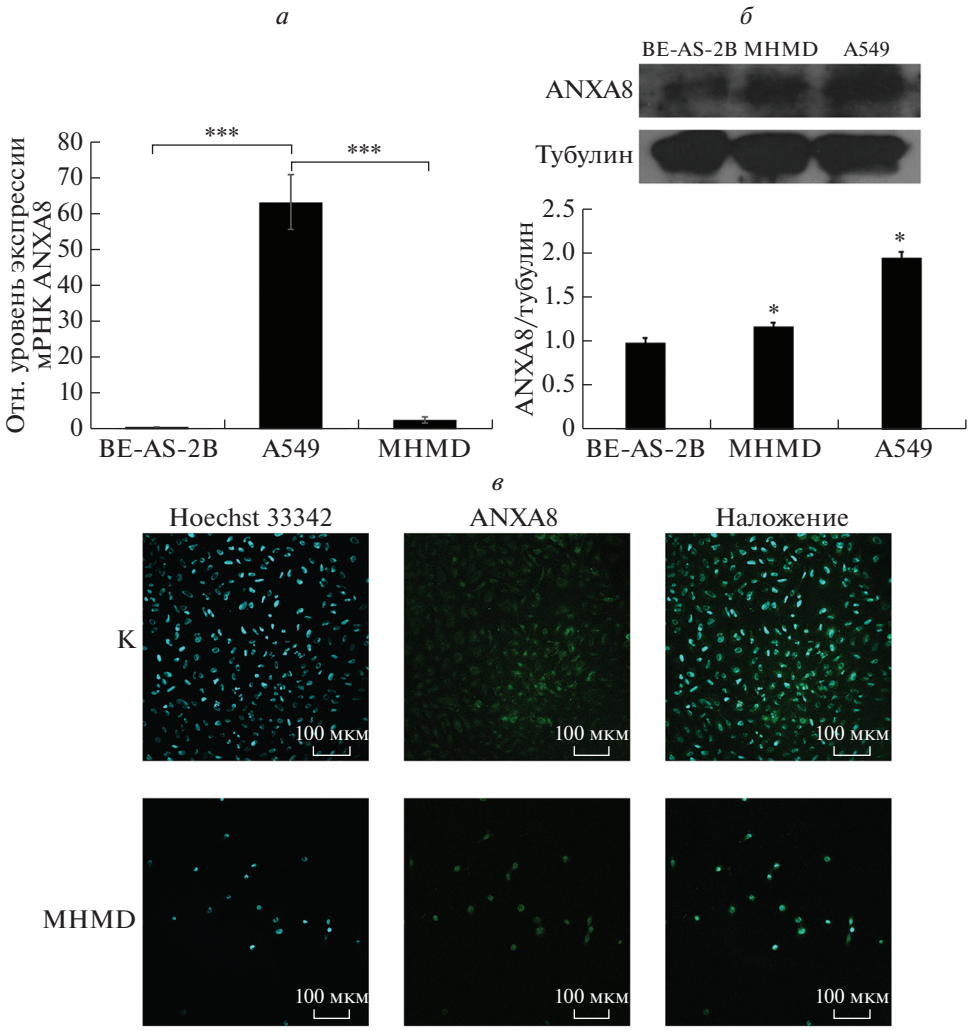

Рис. 1. Экспрессия *ANXA8*. *а* – Анализ экспрессии гена *ANXA8* в нормальных клетках легкого (BE-AS-2B) по сравнению с раковыми клетками линии A549 в присутствии MHDM (4 мкМ) или без него. Наибольший уровень экспрессии наблюдался в клетках A549. *б* – Анализ содержания белка ANXA8 в вышеуказанных культурах клеток методом иммуноблотинга (вверху). Выявлен достоверно повышенный уровень ANXA8 в клетках линии A549 по сравнению с обработанными MHDM и клетками BE-AS-2B (внизу). *в* – Иммунофлуоресцентный анализ клеток A549 обработанных (MHDM) и не обработанных (K) MHDM. Число позитивных сигналов снижено в MHDM-обработанных клетках. $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$.

инкубации с MHDM в клетках A549 снижался флуоресцентный сигнал от ANXA8 (рис. 1*в*), что вполне соответствовало данным транскриптомного анализа. Учитывая предыдущие исследования, в которых показана способность MHMD блокировать пролиферацию клеток A549 [16], мы предположили, что ингибирующий эффект MHDM на деление раковых клеток может быть связан со снижением уровня экспрессии *ANXA8*.

Биологический эффект сверхэкспрессии ANXA8 на клетки A549

Эффективность сверхэкспрессии *ANXA8* при трансфекции клеток A549 плазмидой pEGFP-ANXA8 подтверждена с помощью иммунофлуоресцентного анализа. В монослое клеток A549 наблюдали большое число зеленых, ANXA8-позитивных, сигналов (рис. 2*а*). Эффективность трансфекции составила 70% – уровень, достаточный для проведения анализа. Экспрессию гена *ANXA8* оценивали количественной ОТ-ПЦР. По сравнению с контрольными клетками для транфицированных клеток выявлена повышенная экспрессия *ANXA8* в течение 24 ч, с пиком через 21 ч (рис. 2*б*). Кроме того, выделенные из клеток, трансфицированных плазмидой pEGFP-ANXA8, белки проанализировали методом иммуноблотинга и подтвердили в них избыточную экспрессию белка ANXA8 (рис. 2*в*).

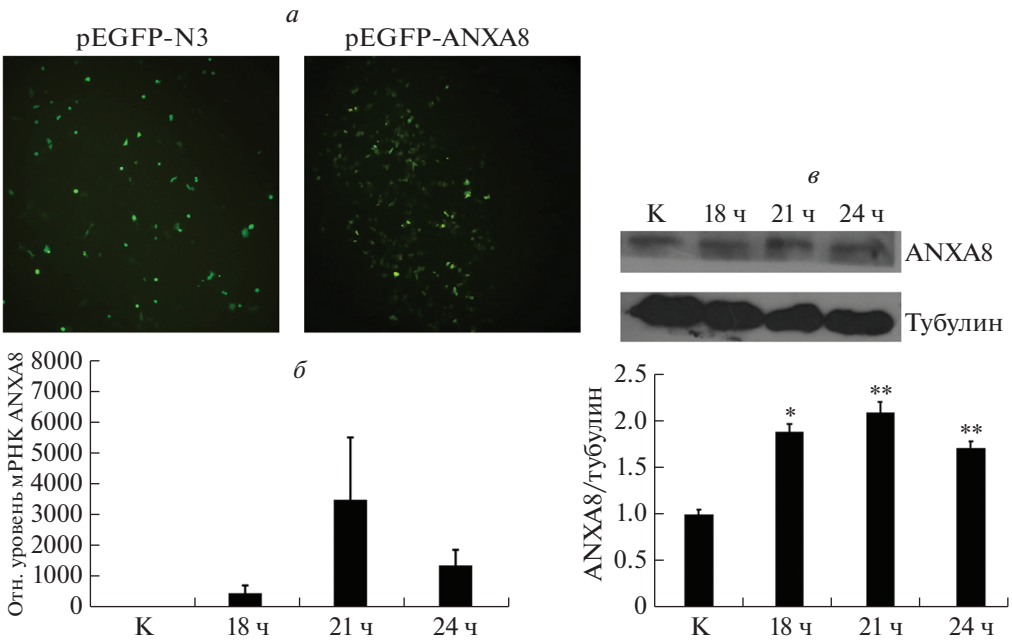

Рис. 2. Сверхэкспрессия белка ANXA8 в клетках линии A549, трансфицированных плазмидой pEGFP-ANXA8. *а* – Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток на белок ANXA8 (pEGFP-N3 – контрольная плазмида). *б* – Экспрессию гена *ANXA8* в течение 24 ч после трансфекции клеток A549 оценивали по уровню мРНК ANXA8 методом количественной ОТ-ПЦР. *в* – Иммуноблотинг и полуколичественный анализ белка ANXA8 в препаратах трансфицированных клеток в указанных временных точках. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Далее мы приступили к исследованию влияния избыточной экспрессии *ANXA8* на биологические процессы в клетках линии A549. По результатам МТТ-теста выявлена повышенная выживаемость трансфицированных pEGFP-ANXA8 клеток по сравнению с контролем (рис. 3*а*), из чего можно предположить, что сверхэкспрессия *ANXA8* усиливает пролиферацию клеток A549. С целью оценить влияние сверхэкспрессии *ANXA8* на миграционную активность клеток A549 мы провели эксперимент с использованием системы Transwell. Установлено, что скорость миграции трансфицированных клеток повышена относительно контрольных (рис. 3*б*), так что сверхэкспрессия *ANXA8* усиливает миграцию раковых клеток.

Исследовано влияние сверхэкспрессии *ANXA8* на состояние клеточного цикла. Нарушения в клеточном цикле характерны для многих видов злокачественных опухолей и считаются важным маркером развития опухоли. Наиболее часто в раковых клетках регистрируют повышенные уровни циклинов D1 и E1. Мы обнаружили небольшое повышение уровня экспрессии циклина E1 в клетках линии A549, трансфицированных плазмидой pEGFP-ANXA8, по сравнению с трансфицированными контрольной плазмидой pEGFP-N3 (рис. 3*в*, *г*). По-видимому, ANXA8 может быть вовлечен в развитие немелкоклеточного рака легкого.

Нокдаун ANXA8 приводит к снижению пролиферации и миграции клеток A549

Убедившись, что сверхэкспрессия *ANXA8* индуцирует пролиферацию и миграцию клеток линии A549, мы проанализировали влияние сайленсинга экспрессии *ANXA8* на эти же клетки. Четыре siРНК (A1, A2, A3 и A4), специфичных к мРНК ANXA8, были сконструированы, синтезированы и использованы для трансфекции клеток линии A549 (рис. 4*а*). Из трансфицированных клеток выделили тотальную РНК и белки, проанализировали экспрессию мРНК и белка ANXA8. По результатам количественной ОТ-ПЦР A1 и A2 оказывали наибольший интерферирующий эффект на мРНК ANXA8 (рис. 4*б*), а на основании иммуноблотинга последовательность A2 была выбрана как наиболее оптимальная для подавления экспрессии *ANXA8* в клетках линии A549 (рис. 4*в*) при сравнении с другими тремя siРНК.

Через 48 ч после успешной трансфекции клеток A549 (рис. 5*а*) проведен МТТ-тест и выявлено понижение жизнеспособности клеток, трансфицированных siРНК A2, на 40% по сравнению с контрольной группой (рис. 5*б*). По-видимому, сайленсинг *ANXA8* до определенной степени подавляет пролиферацию клеток A549. Также, используя систему Transwell, мы проанализировали влияние siРНК A2 на способность клеток A549 к миграции и выявили снижение скорости мигра-

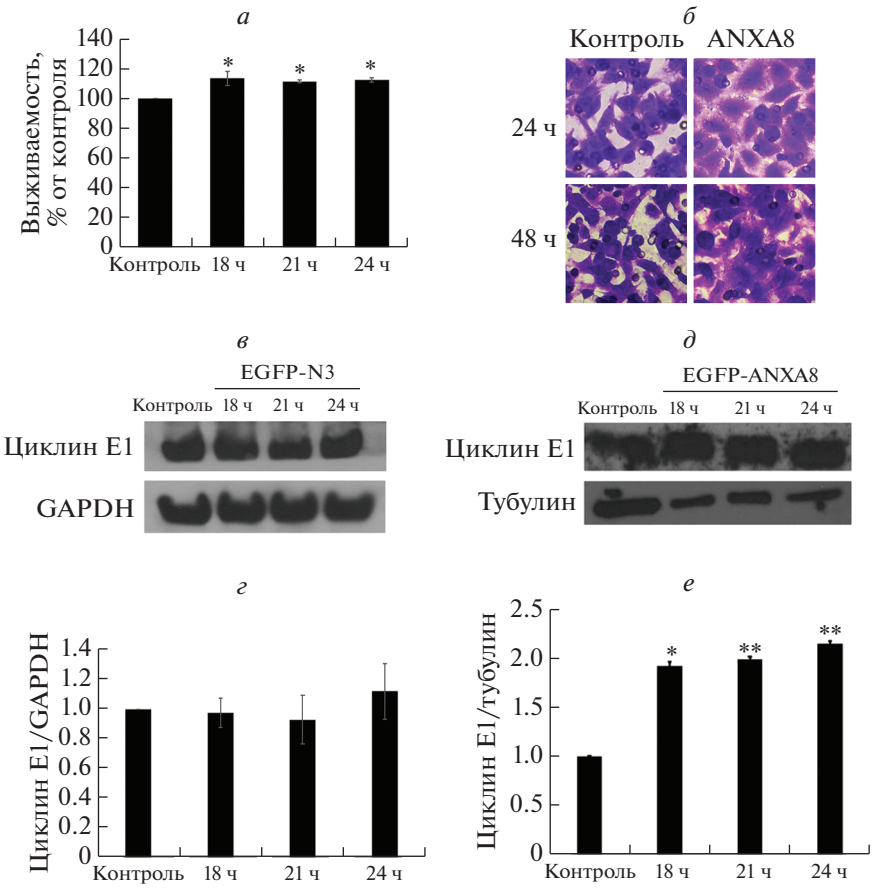

Рис. 3. Влияние трансфекции клеток линии A549 плазмидой pEGFP-ANXA8 на их пролиферацию и миграцию. В качестве контроля использовали вектор pEGFP-N3. *а* – Анализ выживаемости клеток в указанные временные точки с помощью МТТ-теста. У pEGFP-ANXA8-трансфицированных клеток повышена жизнеспособность по сравнению с контрольной группой. *б* – ANXA8 повышает миграционную способность клеток A549 в тесте с использованием системы Transwell. Показаны результаты анализа вестерн-блот экспрессии циклина E1 в клетках A549, трансфицированных pEGFP-N3 (*в*) или pEGFP-ANXA8 (*г*). Выявлено повышенное содержание циклина E1 в группе pEGFP-ANXA8.

ции трансфицированных клеток (рис. 5*в*). Таким образом, показано, что сайленсинг *ANXA8* ингибирует миграцию клеток линии A549.

Влияние экспрессии ANXA8 на активацию сигнального пути EGFR

Ранее сообщалось о ключевой роли сигнального пути EGFR в поддержании неконтролируемого деления раковых клеток и прогрессии злокачественных опухолей [22]. Основываясь на обнаруженных нами эффектах ANXA8 на пролиферацию клеток линии A549, мы проверили возможную взаимосвязь между белком ANXA8 и сигнальным путем EGFR. Выявлено, что через 24 и 48 ч после трансфекции siPHK к *ANXA8* в клетках линии A549 снижен уровень как EGFR, так и фосфорилирования нижележащих по сигнальному пути факторов: PI3K, Akt, mTOR, 4EBP1 и p70S6K (рис. 6). Кроме того, через 18, 21 и 24 ч после трансфекции клеток A549 проанализировано содержание ключевых белков сигнального пути EGFR. Установлено, что содержание EGFR, Akt и mTOR повышено в клетках A549, трансфицированных pEGFP-ANXA8 (рис. 6*а*, *в*), но не siPHK A2 к *ANXA8* (рис. 6*а*, *б*), что подтверждает регуляторную роль ANXA8 в активации сигнального пути EGFR/Akt/mTOR в клетках линии A549.

Кроме того, мы оценили экспрессию факторов нижележащего каскада сигнального пути mTOR (p70S6K и 4EBP1) в клетках, трансфицированных siPHK или плазмидой pEGFP-ANXA8. Установлено, что сайленсинг *ANXA8* индуцировал снижение уровня фосфорилированных форм p-p70S6K и p-4EBP1 (рис. 7*а*, *б*), тогда как при сверхэкспрессии *ANXA8* их уровень повышался (рис. 7*а*, *в*), но не в трансфицированных siPHK A2 клетках. Таким образом, ANXA8, по-видимому, участвует в регуляции сигнального пути mTOR/p70S6K/4EBP1 в клетках линии A549 и может быть вовлечен в пролиферацию этих клеток.

а

Структура исследованных siPHK

siPHK	Последовательность (5' → 3')
si-ANXA8 (A1)	CCC UCU ACA AAG CCA UGA ATT UUC AUG GCU UUG UAG AGG GTT
si-ANXA8 (A2)	GCC AUG AAG GGC UUA GGA ATT UUC CUA AGC CCU UCA UGG CTT
si-ANXA8 (A3)	GUG GGA CUG AUG AGA UGA ATT UUC AUC UCA UCA GUC CCA CTT
si-ANXA8 (A4)	GGA CCC UGA UAA GAA ACA UTT AUG UUU CUU AUC AGG GUC CTT
siPHKscr	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT

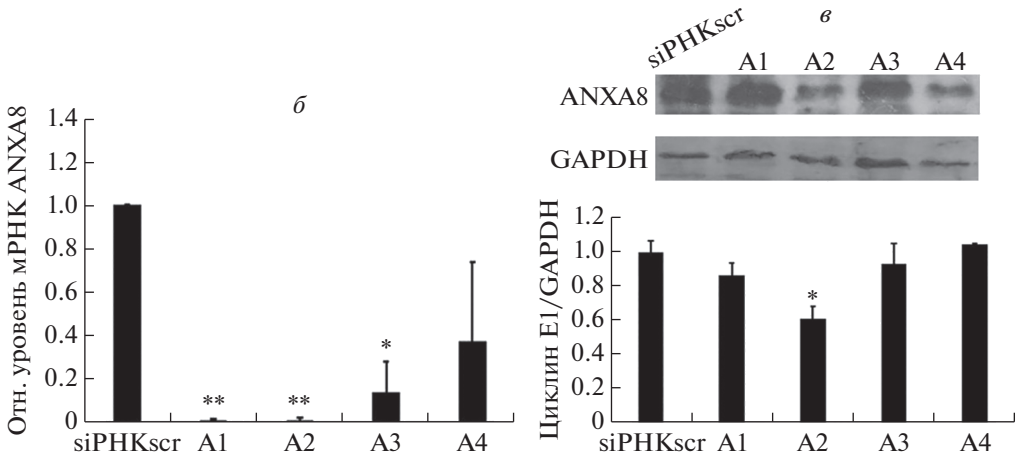

Рис. 4. Скрининг siPHK к гену *ANXA8*. *а* – Последовательности четырех siPHK к *ANXA8* (A1, A2, A3 и A4), а также скремблированной (siPHKscr), используемой в качестве контроля. *б* – Влияние siPHK на ингибирование экспрессии *ANXA8* через 48 ч после трансфекции по результатам количественной ОТ-ПЦР. Уровень экспрессии мРНК ANXA8 нормирован на экспрессию мРНК GAPDH. Наибольший интерферирующий эффект выявлен для siPHK A1 и A2. *в* – Иммуноблотинг и полуколичественный анализ содержания белка ANXA8 в клетках A549, трансфицированных siPHK. Наибольший нокдаун-эффект выявлен для siPHK A2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Будучи важным членом семейства аннексинов, ANXA8 характеризуется разным уровнем экспрессии в здоровой ткани и в опухолях и участвует в пролиферации, дифференцировке, метастазировании и лекарственной устойчивости раковых клеток. Однако, насколько нам известно, влияние ANXA8 на биологические процессы, вовлеченные в развитие рака легкого, ранее не исследовались. В этой работе мы исследовали функцию ANXA8 в клетках линии A549 немелкоклеточного рака легкого человека, основываясь на ранее полученных нами данных транскриптомного анализа этих клеток. Результаты количественной ОТ-ПЦР и иммуноблотинга подтвердили ранее обнаруженный повышенный уровень экспрессии *ANXA8* в клетках A549 по сравнению с нормальными клетками бронхиального эпителия [17].

Как показано в проведенном нами исследовании, ANXA8 может быть вовлечен в регуляцию пролиферации и миграции клеток A549. Сверхэкспрессия *ANXA8* в клетках A549, трансфицированных плазмидой pEGFP-ANXA8, сопровождалась увеличением их скорости деления и миграции, тогда как сайленсинг *ANXA8* с помощью технологии РНК-интерференции снижал их выживаемость и миграционную активность. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными эффектами ANXA8 на клетки эндометрия свиней и рака поджелудочной железы [10, 15]. Jiang с соавт. [10] трансфицировали клетки эндометрия плазмидой pcDNA3.1-ANXA8 и siPHK, специфичной к мРНК ANXA8, и установили, что сверхэкспрессия *ANXA8* сопровождается повышением экспресии ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) и облегчает переход клеток в S-

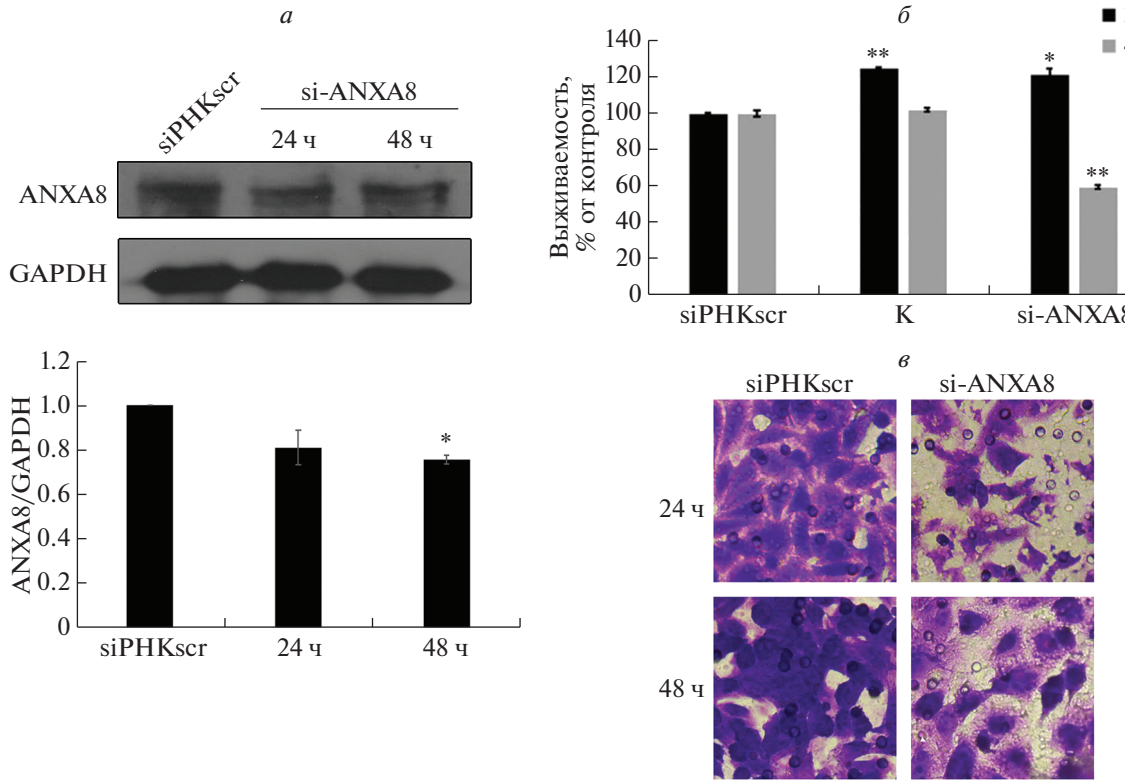

Рис. 5. Влияние сайленсинга *ANXA8* на пролиферацию и миграцию клеток линии A549. *а* – Экспрессия белка ANXA8 по результатам иммуноблотинга снижена в клетках A549, трансфицированных siPHK A2 (si-ANXA8), по сравнению с трансфицированными контрольной siPHK (siPHKscr). *б* – Анализ жизнеспособности клеток A549 через 48 ч после трансфекции. В клетках, трансфицированных siPHK A2 число живых клеток снижено по сравнению с трансфицированными siPHKscr и нетрансфицированными клетками (K). *в* – Миграционную способность клеток оценивали в системе Transwell: через 24 и 48 ч после трансфекции siPHK A2 число мигрировавших в нижнюю камеру клеток значительно меньше, чем клеток, трансфицированных siPHKscr.

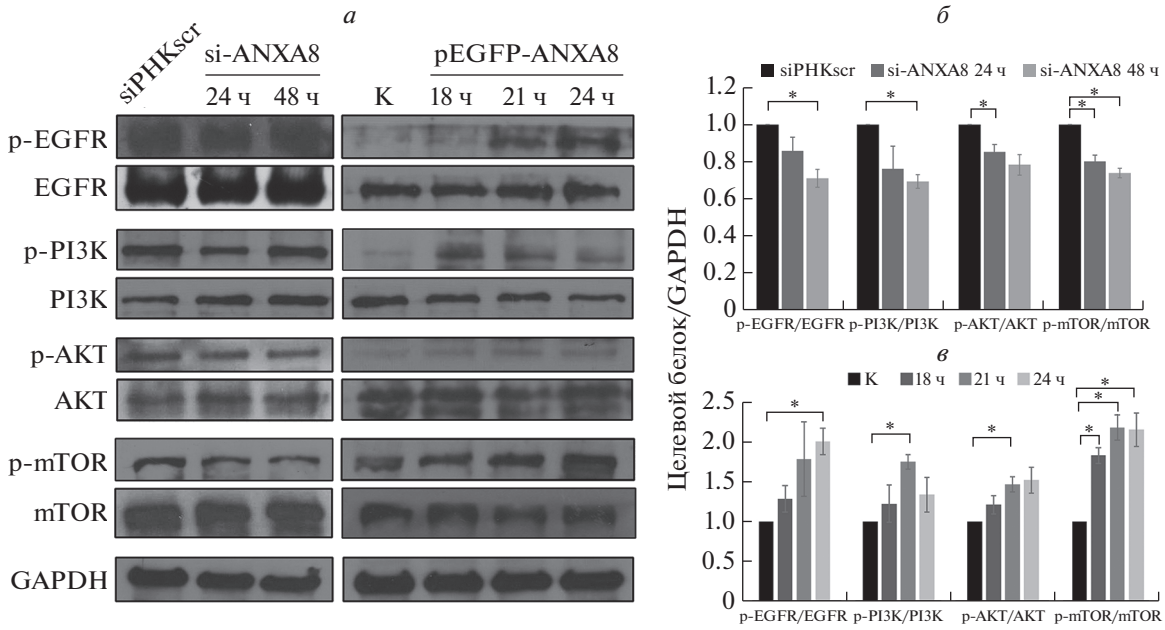

Рис. 6. ANXA8 регулирует сигнальный путь EGFR/Akt/mTOR в клетках A549. Клетки трансфицировали siPHK A2 или плазмидой pEGFP-ANXA8, после чего представленность факторов сигнального пути EGFR/Akt/mTOR анализировали иммуноблотингом (*а*). Статистически обработанные данные иммуноблотинга на клетках, трансфицированных siPHK A2 (*б*) или плазмидой pEGFP-ANXA8 (*в*). В качестве внутреннего контроля использовали GAPDH.

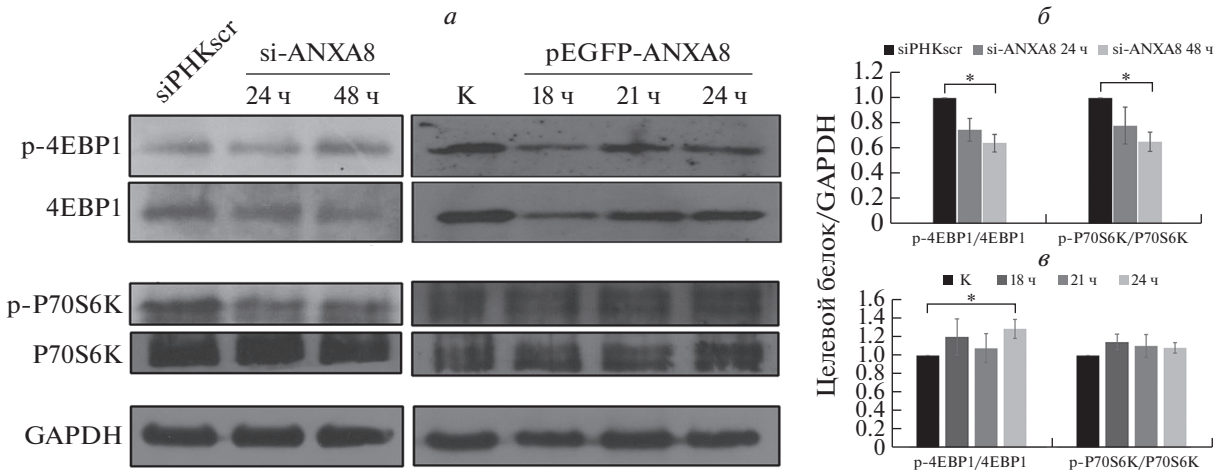

Рис. 7. Анализ содержания белков p70S6K и 4EBP1 и их фосфорилированных форм методом иммуноблотинга в зависимости от экспрессии гена *ANXA8* в клетках A549. ANXA8 регулирует экспрессию этих двух факторов из нижележащего каскада сигнального пути mTOR (*а*). Статистически обработанные данные иммуноблотинга на клетках, трансфицированных siPHK A2 (*б*) или плазмидой pEGFP-ANXA8 (*в*). В качестве внутреннего контроля использовали GAPDH.

фазу, что может ускорять деление клеток эндометрия [10]. На основании этих результатов авторы предположили вовлеченность ANXA8 в регуляцию клеточного цикла в раковых клетках. По данным проведенного нами иммуноблотинга, трансфекция клеток A549 плазмидой pEGFP-ANXA8 сопровождалась повышением уровня циклина E1 (одного из участников клеточного цикла). Предполагается, что циклин E1 способствует пролиферации клеток A549. Но конкретную роль ANXA8 в этом процессе еще предстоит выяснить.

Ранее Goebeler и соавт. [23] обнаружили, что ANXA8 вовлечен в лизосомную рециркуляцию комплекса EGFR–лиганд, а обеднение по ANXA8 приводит к более продолжительной активации сигнального пути EGFR на стадии связывания с лигандом. В этом исследовании мы продолжили изучение взаимосвязи между ANXA8 и EGFR на примере раковых клеток линии A549. Из литературы известно, что EGF индуцирует активность множества сигнальных каскадов, включая путь PI3K/Akt [24]. Активация PI3K происходит непосредственно за счет связывания с фосфорилированными по тирозину белками семейства EGFR [25]. Активированная PI3K может далее фосфорилировать PI(4)P и $PI(4,5)P_2$, превращая их в $PI(3,4)P_2$ и $PI(3,4,5)P_3$ соответственно, которые далее привлекают фосфоинозитидзависимую киназу-1 (PDK1) и киназы семейства Akt к плазматической мембране, что приводит к их активации. Такой путь передачи сигнала, инициируемый PI3K, называется сигнальным путем PI3K/PDK1/Akt. Нами проанализированы изменения в этом сигнальном пути, вызванные сайленсингом или сверхэкспрессией гена *ANXA8*, и установлено, что ANXA8 может активировать сигнальный путь EGFR/Akt и позитивно регулировать экспрессию EGFR, PI3K и Akt в клетках линии A549.

Белок mTOR, нижележащая в сигнальном пути PI3K/Akt серин/треониновая киназа, часто активирован при различных видах неоплазий. Akt и mTOR играют роль “переключателей” в раковых клетках, контролируя клеточный цикл, что имеет большое значение при изучении ангиогенеза в опухолях [26]. В этом исследовании мы проанализировали уровень экспрессии mTOR и регулируемых этой киназой факторов: p70S6K и 4EBP1 – в клетках A549, трансфицированных siPHK к мРНК ANXA8 или плазмидой pEGFP-ANXA8. Выявлена зависимость активации сигнального пути mTOR/p70S6K/4EBP1 от экспрессии *ANXA8*. Фактически фосфорилирование p70S6K и 4EBP1 необходимо для рекрутирования рибосом на мРНК на этапе инициации трансляции. Ингибирование mTOR блокирует инициацию трансляции и прогрессию клеточного цикла из-за снижения фосфорилирования p70S6K и 4EBP1, что влияет на деление клеток [27]. Нами показано, что экспрессия ANXA8 влияет на уровень фосфорилирования p70S6K и 4EBP1 и тем самым на пролиферацию и миграцию клеток линии A549.

В результате проведенного исследования показано, что ANXA8 может эффективно активировать сигнальный путь EGFR/Akt/mTOR, который в свою очередь оказывает влияние на пролиферацию и миграцию клеток линии A549 немелкоклеточного рака легкого.

Работа поддержана грантами на фундаментальные исследования от Хэнаньского технологического университета (the Fundamental Research Funds for the Henan Provincial Colleges and

Universities in Henan University of Technology; грант № 2018RCJH17), Национального фонда естественных наук Китая (the National Natural Science Foundation of China; грант № U1704112) и Хэнаньского плана по развитию науки и технологий Китая (Science and Technology Planning Project of Henan Province; грант № 182102310270).

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

Авторы заявляют об отсутствии финансовых/коммерческих конфликтов интересов, имеющих отношение к этой статье.

GZZ спланировал эксперименты и написал манускрипт. YHS и YYS поставили эксперименты и проанализировали данные. LQC, QZ и GCS участвовали в обсуждении данных и в редактировании манускрипта. Все авторы ознакомились и подтвердили финальную версию манускрипта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scholer S., Pajonczyk D., Rescher U. (2018) Annexins in translational research: hidden treasures to be found. *Int. J. Mol. Sci.* **19**(6), 1781.
2. Sun R., Liu Z., Qiu B., Chen T., Li Z., Zhang X., Xu Y., Zhang Z. (2019) Annexin10 promotes extrahepatic cholangiocarcinoma metastasis by facilitating EMT *via* PLA2G4A/PGE2/STAT3 pathway. *EBioMedicine.* **47**, 142–155.
3. Xiu D., Liu L., Qiao F., Yang H., Cui L., Liu G. (2016) Annexin A2 coordinates STAT3 to regulate the invasion and migration of colorectal cancer cells *in vitro. Gastroent. Res. Pract.* **31**, 1–10.
4. Dong Z., Yao M., Zhang H., Wang L., Huang H., Yan M., Wu W., Yao D. (2014) Inhibition of annexin A2 gene transcription is a promising molecular target for hepatoma cell proliferation and metastasis. *Oncol. Lett.* **7**, 28–34.
5. Lima K.M., Vago J.P., Caux T.R., Negreiros-Lima G.L., Sugimoto M.A., Tavares L.P., Arribada R.G., Carmo A.A.F., Galvao I., Costa B.R.C., Soriani F.M., Pinho V., Solito E., Perretti M., Teixeira M.M., Sousa L.P. (2017) The resolution of acute inflammation induced by cyclic AMP is dependent on annexin A1. *J. Biol. Chem.* **292**, 13758–13773.
6. Fungbun N., Tungmahasuk D., Terashima R., Kurusu S., Kawaminami M. (2018) Annexin A1 is a novel target gene of gonadotropin-releasing hormone in LβT2 gonadotrope cells. *J. Vet. Med. Sci.* **80**, 116–124.
7. Seidel S., Neymeyer H., Kahl T., Röschel T., Mutig K., Flower R., Schnermann J., Bachmann S., Paliege A. (2012) Annexin A1 modulates macula densa function by inhibiting cyclooxygenase 2. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* **303**, F845–F854.
8. Wang X., Zhang S., Zhang J., Lam E., Liu X., Sun J., Feng L., Lu H., Yu J., Jin H. (2013) Annexin A6 is down-regulated through promoter methylation in gastric cancer. *Am. J. Transl. Res.* **5**, 555–562.
9. Yuan H.F., Li Y., Zhao Q., Fan L.Q., Tan B.B., Ye W.H. (2014) Expression of annexin A7 and its clinical significance in differentiation and metastasis of gastric carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 6567–6574.
10. Jiang X., Xue S., Kang T., Liu H., Ren H., Hua R., Ni D., Lei M. (2019) Annexin A8 (ANXA8) regulates proliferation of porcine endometrial cells *via* Akt signaling pathway. *Reprod Domest. Anim.* **54**, 3–10.
11. Lueck K., Carr A.F., Stampoulis D., Gerke V., Rescher U., Greenwood J., Moss S.E. (2017) Regulation of retinal pigment epithelial cell phenotype by Annexin A8. *Sci. Rep.* **7**, 4638.
12. Heitzig N., Brinkmann B.F., Koerdt S.N., Rosso G., Shahin V., Rescher U. (2017) Annexin A8 promotes VEGF-A driven endothelial cell sprouting. *Cell Adh. Migr.* **11**, 275–287.
13. Gou R., Zhu L., Zheng M., Guo Q., Hu Y., Li X., Liu J., Lin B. (2019) Annexin A8 can serve as potential prognostic biomarker and therapeutic target for ovarian cancer: based on the comprehensive analysis of Annexins. *J. Transl. Med.* **17**, 275.
14. Oka R., Nakashiro K., Goda H., Iwamoto K., Tokuzen N., Hamakawa H. (2016) Annexin A8 is a novel molecular marker for detecting lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* **7**, 4882–4889.
15. Hata H., Tatemichi M., Nakadate T. (2014) Involvement of annexin A8 in the properties of pancreatic cancer. *Mol. Carcinog.* **53**, 181–191.
16. Zhou G.Z, Cao F.K., Du S.W. (2015) The apoptotic pathways in the curcumin analog MHMD-induced lung cancer cell death and the essential role of actin polymerization during apoptosis. *Biomed. Pharmacother.* **71**, 128–134.
17. Zhou G.Z., Sun G.C., Zhou Y.H., Wang Q.Q. (2017) Transcriptomic analysis of human non-small lung cancer cells A549 treated by one synthetic curcumin derivative MHMD. *Cell. Mol. Biol.* **63**, 35–39.
18. Nicholson R.I., Gee J.M.W., Harper M.E. (2001) EGFR and cancer prognosis. *Eur. J. Cancer.* **37**, 9–15.
19. Prenzel N., Fischer O.M., Streit S., Hart S., Ullrich A. (2001) The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr. Relat. Cancer.* **8**, 11–31.
20. Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
21. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
22. Seshacharyulu P., Ponnusamy M.P., Haridas D., Jain M., Ganti A.K., Batra S.K. (2012) Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Exp. Opin. Therap. Targets.* **16**, 15–31.
23. Goebeler V., Poeter M., Zeuschner D., Gerke V., Rescher U. (2008) Annexin A8 regulates late endosome organization and function. *Mol. Biol. Cell.* **19**, 5267–5278.
24. Navolanic P.M., Seelman L.S., McCubrey J.A. (2003) EGFR family signaling and its association with breast

cancer development and resistance to chemotherapy. *Inter. J. Oncol.* **22**, 237–252.

25. Ram T.G., Hosick H.L., Ethier S.P. (2000) Heregulin-beta is especially potent in activating phosphatidylinositol 3-kinase in nontransformed human mammary epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* **183**, 301–313.
26. Lionello M., Lovato A., Staffieri A., Blandamura S., Turato C., Giacomelli L., Staffieri C., Marioni G. (2014) The EGFR-mTOR pathway and laryngeal cancer angiogenesis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **271**, 757–764.
27. Wang C., Yan Y., Hu L., Zhao L., Yang P., Moorhead J.F., Varghese Z., Chen Y.X., Ruan X.Z. (2014) Rapamycin-mediated CD36 translational suppression contributes to alleviation of hepatic steatosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **447**, 57–63.

ANXA8 REGULATES PROLIFERATION OF HUMAN NON-SMALL LUNG CANCER CELLS A549 VIA EGFR-AKT-mTOR SIGNALING PATHWAY

G.-Z. Zhou[1, *], Y.-H. Sun[1], Y.-Y. Shi[1], Q. Zhang[2], L. Zhang[1], L.-Q. Cui[1], and G.-C. Sun[3]

[1]*College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, 450001 China*

[2]*Henan Academy of Fishery Sciences, Zhengzhou, 450044 China*

[3]*College of Chemistry and Chemical Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou, 450001 China*

**e-mail: gzzhou@163.com*

Annexin A8 (ANXA8) is a member of the annexin family, which had been reported to regulate multiple cancer cellular processes including proliferation, metastasis and inflammation. However, the specific role of ANXA8 in lung cancer cell biology remains unknown. Our previous transcriptome study revealed that ANXA8 mRNA was downregulated in curcumin analog (MHMD)-treated human non-small lung cancer cells (A549 cell line). Here, we continued to study the ANXA8 expression in A549 cells using reverse transcription-quantitative PCR and Western blotting, compared with that in human normal bronchial epithelium cells (BE-AS-2B cell line). Overexpression of *ANXA8* via transfection of pEGFP-ANXA8 recombinant vector contributed to the proliferation and migration of A549 cells. Moreover, the cell cycle protein cyclin E1 was upregulated in ANXA8-transfected A549 cells. Knockdown of *ANXA8* using an RNA interference technique decreased A549 cell viability and restrained their migration *in vitro*. The expression levels of multiple cellular factors, including EGFR, PI3K, Akt, mTOR, p70S6K and 4EBP1, in the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway were also altered by *ANXA8* knockdown or overexpression in A549 cells, which confirmed the activation of the EGFR/Akt/mTOR signaling pathway by ANXA8. The present results provided evidence to support further investigation of the functional identification of ANXA8 in lung cancer cells in the future.

Keywords: annexin A8, human non-small lung cancer cells, proliferation, metastasis, EGFR