Том 56, номер 1, 2022

Е. В. Богословская, Г. А. Шипулин

ОБЗОРЫ Нарушения эпигенетической регуляции экспрессии генов при болезнях импринтинга Д. В. Залетаев, М. В. Немцова, В. В. Стрельников 3 МикроРНК как потенциальные регуляторы инфицирования SARS-CoV-2 и модификаторы клинической картины COVID-19 А. Н. Кучер, Ю. А. Королёва, А. А. Зарубин, М. С. Назаренко 35 Мутагенная активность дезаминаз AID/APOBEC в противовирусной защите и канцерогенезе О. Н. Шилова, Д. Л. Цыба, Е. С. Шилов 55 Молекулярные механизмы взаимодействия митохондрий и эндоплазматического ретикулума: новый взгляд на обеспечение важных клеточных функций В. С. Сухоруков, А. С. Воронкова, Т. И. Баранич, А. А. Гофман, А. В. Брыдун, Л. А. Князева, В. В. Глинкина 69 Генно-инженерные системы для изучения вирусных патогенов человека из семейства Coronaviridae С. О. Галкин, А. Н. Анисенко, О. А. Шадрина, М. Б. Готтих 83 ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА Взаимодействие MxyR Mycobacterium tuberculosis с ксиланами: необычные лиганды транскрипционных регуляторов семейства MarR 103 S. Mauran, N. T. Perera, I. C. Perera Структурный анализ 5'-фланкирующей области гена, кодирующего альфа-фетопротеин человека C. Zhang, H. J. Zhao, J. Wang, W. Y. Zhou, T. J. Zhang, C. B. Zhang 118 Минорный Т-аллель однонуклеотидного полиморфизма rs13360222 снижает активность энхансера гена HAVCR2 в клеточной модели макрофагов человека А. Н. Уварова, А. С. Устюгова, Н. А. Митькин, А. М. Шварц, К. В. Корнеев, Д. В. Купраш 126 МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ Изменение экспрессии селенопротеинов эндоплазматического ретикулума и маркеров апоптоза при воздействии селенита натрия и дитиотреитола на клетки линии MCF7 рака молочной железы В. Н. Мальцева, М. В. Голтяев, С. В. Новоселов, Е. Г. Варламова 135 Низкий титр лентивирусного вектора, содержащего ген $TRIM5\alpha$ -HRH, обусловлен экспрессией TRIM5α-HRH в клетках-продуцентах и влиянием промотора Efla Ф. А. Урусов, Д. В. Глазкова, Г. М. Цыганова, Д. В. Поздышев,

147

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

Изучение множественного ферментативного встраивания модифицированных нуклеотидов пуриновой и пиримидиновой природы в растущую цепь ДНК

С. А. Лапа, О. С. Волкова, В. Е. Кузнецова, А. С. Заседателев, А. В. Чудинов

БИОИНФОРМАТИКА

Конструирование *in silico* новой мультиэпитопной кандидатной пептидной вакцины против Q-лихорадки

S. Jabarzadeh, A. Samiminemati, M. Zeinoddini

168

157

———— ОБЗОРЫ ———

УДК 577.218

НАРУШЕНИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ БОЛЕЗНЯХ ИМПРИНТИНГА

© 2022 г. Д. В. Залетаев^{а, b, *}, М. В. Немцова^{а, b}, В. В. Стрельников^b

^аПервый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991 Россия ^bМедико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия *e-mail: zalnem@mail.ru

Поступила в редакцию 13.04.2021 г. После доработки 13.05.2021 г. Принята к публикации 13.05.2021 г.

Эпигенетическая регуляция — наследственные и ненаследственные изменения экспрессии конкретного гена без каких-либо соответствующих структурных изменений в его нуклеотидной последовательности. Геномный импринтинг — эпигенетический механизм регуляции экспрессии гомологичных генов в зависимости от родительского происхождения, которые в диплоидной клетке млекопитающих экспрессируются моноаллельно. Генетически импринтированный только материнский или только отцовский геном не в состоянии обеспечить нормальное эмбриональное развитие. Одну из основных ролей в обеспечении процессов импринтинга играет специфическое метилирование цитозина в составе СрG-динуклеотидов. Все известные импринтированные гены содержат области дифференциального метилирования ДНК на гомологичных родительских хромосомах, что обязательно для их моноаллельной экспрессии. Однако сегодня известно, что правильное функционирование импринтированных генов в организме человека обеспечивают не только метилирование ДНК, но и ремоделирование хроматина, и модификации гистонов, и некодирующие РНК. Структурные и функциональные нарушения эпигенетических механизмов приводят к так называемым болезням импринтинга.

Ключевые слова: экспрессия генов, эпигенетическая регуляция, аномальное метилирование ДНК, дифференциальное метилирование, центры импринтинга, эпимутации, однородительская дисомия, болезни импринтинга

DOI: 10.31857/S0026898421060148

введение

Геномный импринтинг относится к эпигенетическим событиям, так как изменения в экспрессии генов обусловлены их родительским происхождением, а не структурной перестройкой генетического материала. Таким образом, можно говорить, что геномный импринтинг — это эпигенетический механизм регуляции экспрессии гомологичных генов в процессе развития организма в зависимости от родительского происхождения гена, хромосомы или генома. Дифференциальная экспрессия импринтированных генов зависит от их материнского или отцовского происхождения, т.е. в диплоидной клетке млекопитающих они экспрессируются только с одного аллеля. Генетически импринтированный только материнский или только отцовский геном не в состоянии обеспечить нормальное эмбриональное развитие, поскольку геном отца определяет развитие плаценты, в то время как геном матери — раннее развитие эмбриональных структур [1, 2]. В то же время геномный импринтинг наблюдается не только у млекопитающих (сумчатых и плацентарных), но и у цветковых растений, и некоторых групп насекомых, что свидетельствует об эволюционной консервативности геномного импринтинга, возникшего в результате конвергентной эволюции [3].

К основным механизмам геномного импринтинга, обеспечивающего специфическую маркировку родительских аллелей, приводящую к их моноаллельной экспрессии, относят аллель-специфическое метилирование ДНК — наиболее

Сокращения: днРНК – длинная некодирующая РНК; ОРД – однородительская дисомия; AS-IC – центр импринтинга синдрома Ангельмана; ВР – Break Point (точки разрыва при делециях хромосомы); DMR – Differentially Methylated Regions (дифференциально метилированные районы); GOM – Gain of Methylation (приобретенное/новое метилирование); IC – Imprinting Centre (центр импринтинга); LOM – Loss of Methylation (потеря метилирования); MLID – Multi-locus Imprinting Disturbances (множественные аномалии метилирования импринтированных районов); PWS-IC – центр импринтинга синдрома Прадера–Вилли; мяРНК – малая ядрышковая РНК; miPHK – микроPHK.

изученную эпигенетическую модификацию, которой отводят основную роль в процессах импринтинга. Все известные импринтированные гены содержат области различного (дифференциального) метилирования на двух родительских хромосомах. причем эти различия обязательны для их моноаллельной экспрессии [4]. Дифференциально метилированные районы (differentially methylated regions – DMR), как правило, соответствуют так называемым регуляторным центрам импринтинга (Imprinting Centre - IC). Функциональная активность импринтированных генов определяется не только метилированием, но и в значительной степени структурной организацией хроматина [5, 6]. Практически все дифференциально метилированные импринтированные районы перекрываются с участками ДНК, с которых транскрибируются некодируюшие и антисмысловые РНК. осуществляющие регуляторные функции в импринтированных районах [7-10].

К основным механизмам, приводящим к аномальному функционированию импринтированных генов и районов относятся: 1) мутации генов; 2) структурные перестройки хромосом, представленные, как правило, делециями и дупликациями; 3) однородительская дисомия (ОРД) по определенным хромосомам или их участкам; 4) собственно аномалии импринтинга, вызванные эпимутациями [11] и 5) функциональные аномалии эпитранскриптома, представленные нарушением функционирования некодирующих РНК [10].

В настоящее время известно около 150 импринтированных генов человека, имеющих тканеспецифическую моноаллельную экспрессию, хотя предполагают, что их может быть не менее 200 [4, 12, 13]. При этом насчитывается примерно 17 синдромов, связанных с аномальной работой импринтированных генов. Особый интерес вызывают несиндромальные состояния, связанные с множественными аномалиями метилирования импринтированных районов и генов (multilocus imprinting disturbances – MLID). По-видимому, в эпитранскриптоме существует система реципрокного контроля, которая связывает работу некодирующих РНК импринтированных районов, что в ряде случаев приводит к перекрыванию фенотипических проявлений болезней импринтинга [9, 14]. Кроме того, у пациентов с несиндромальной патологией часто обнаруживают материнскую или отцовскую ОРД как сегментную, так и хромосомную [15, 16]. А в ряде случаев перекрывание фенотипических проявлений зависит от MLID, вызванных мутациями в генах, устанавливающих или поддерживающих специфическое аллельное метилирование в регуляторных районах, подверженных импринтингу [17, 18].

Практически каждая хромосома человека содержит гены или районы, дифференциально метилированные и экспрессируемые моноаллельно в той или иной ткани и/или в том или ином периоде онтогенетического развития. Известно, что метилирование генов в гаметах, плаценте и на самых ранних этапах эмбрионального развития значительно отличается от метилирования и экспрессии в тканях взрослого организма. В настоящем обзоре основное внимание уделено дифференциально метилированным и моноаллельно экспрессируемым импринтированным генам и хромосомным районам, нарушение которых (как структурное, так и функциональное), приводит к определенным патологическим состояниям, называемым синдромами, или болезнями импринтинга.

ИМПРИНТИРОВАННЫЕ ХРОМОСОМНЫЕ РАЙОНЫ И ГЕНЫ, ПАТОЛОГИЯ КОТОРЫХ ПРИВОДИТ К БОЛЕЗНЯМ ИМПРИНТИНГА

Импринтированный район хромосомы 6q24.2 и транзиторный неонатальный сахарный диабет

Транзиторный неонатальный сахарный диабет (ОМІМ #601410) — редкое заболевание новорожденных с рядом определенных клинических признаков (табл. 1) [19]. Транзиторный неонатальный сахарный диабет типа 1 возникает в результате аномальной экспрессии импринтированного гена PLAGL1, локализованного в районе хромосомы 6024.2. Обнаружение нескольких спорадических случаев транзиторного неонатального сахарного диабета с отцовской ОРД по хромосоме 6 позволило предположить, что заболевание связано либо с экспрессией двойной дозы отцовских импринтированных генов, либо с отсутствием их экспрессии на материнской хромосоме. В небольшом числе описанных семейных случаев выявлено исключительно отцовское наследование, ассоциированное с дупликацией района хромосомы 6q24 [20]. Наименьший размер дупликаций, определенный с помощью молекулярного анализа таких семей, составил 500 т.п.н. [21].

Ген *PLAGL1* регулирует транскрипцию и является геном-супрессором опухолевого роста [22]. Белок, кодируемый этим геном, имеет мотив цинкового пальца и индуцирует транскрипцию гена *PACAP₁-R (ADCYAP1R1)*, который кодирует рецептор полипептида, активирующего аденилатциклазу гипофиза, усиливает секрецию инсулина и регулирует работу β -клеток поджелудочной железы. Сверхэкспрессия *PLAGL1* приводит к аномальному функционированию этих клеток [23]. *PLAGL1* состоит из 12 экзонов и экспрессируется с четырех различных промоторов, в результате чего образуются четыре изоформы белка. Транскрипты с промоторов 2, 3 и 4 синтезиру-

НАРУШЕНИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Синдром/	Основные клинические признаки	Молекулярная патология,
заболевание	и частота в популяции	частота выявления

Таблица 1. Импринтированные районы хромосом человека, основные клинические признаки и молекулярная патология, приводящая к болезням импринтинга

Импринтированный район хромосомы 6q24.2

Транзиторный нео- натальный сахарный диабет (ОМІМ #601410)	В раннем неонатальном периоде выявляются: гипергликемия, глюкозурия, дегидратация орга- низма и задержка развития. Необходимость инсу- линотерапии исчезает в течение 6 недель, но у пациентов остается предрасположенность к раз- витию сахарного диабета типа 2 во взрослой жизни. Частота составляет 1 : 300000–500000 новорожденных	 Отцовская ОРД хромосомы - 35-40%; Отцовская дупликация 6q24 - 30-40%; Потеря метилирования IC <i>PLAGL1</i> материнского аллеля - 20-30%; Мутации <i>ZFP57</i> и других генов, приводящих к MLID - 30-50%
---	--	---

Импринтированный район хромосомы 8q24.3

Синдром Бирка– Барела (OMIM #612292)	Тяжелая гипотония новорожденных, проявляю- щаяся снижением подвижности, вялостью, сла- бым плачем, серьезными трудностями при вскармливании в результате плохого сосания, преходящая гипогликемия, контрактуры суста- вов, долихоцефалия, битемпоральное сужение, расщелина неба, микроретрогнатия, короткий фильтр, нависающая верхняя губа, задержка раз- вития и умственная отсталость различной степени выраженности. Дисфагия от твердой пищи может сохраняться до полового созревания. Частота неизвестна	Миссенс-мутации материнского аллеля <i>КСNК9/ТАSК3</i>

Импринтированный район хромосомы 11р15.5

Синдром Беквита-	Гигантизм (средняя масса тела при рождении	 Потеря метилирования в IC2
Видеманна	более 3900 г), пупочная грыжа, макроглоссия	(KCNQ10T1) - 50%;
(OMIM #130650)	гипоплазия средней трети лица и верхней челю-	2) Отцовская мозаичная сегментная
	сти, гемангиомы на лбу, прогнатизм, вертикаль-	ОРД хромосомы 11 – 20%;
	ные складки/бороздки на мочках, полулунные	3) Нарушение метилирования IC1,
	вдавления на задней поверхности завитков ушных	приволяшее к метилированию <i>H19</i>
	раковин, пигментные невусы на коже лица и	на материнской хромосоме и биал-
	затылка, долихоцефалия, гипогликемия новорож-	лельной экспрессии <i>IGF2</i> — 5—10% [.]
	денных, умственная отсталость в 15% случаев.	4) Материнские мутации инактиви-
	Висцеромегалия и повышенная предрасположен-	pytoutike $CDKN1C = 5 = 10\%$
	ность к возникновению опухолей: нефробла-	$5) Y_{\text{POMOCOVILLA HAPPCTPOUVL}}$
	стомы – 59%, карциномы надпочечников – 15%,	5) хромосомные перестроики
	гепатобластомы – 2%, гемигипертрофия – 12.5%,	(дупликации, транслокации, инвер-
	а у пациентов с новообразованиями — почти в	сии, делеции) Пр15.5 – 1%;
	50%. Частотота составляет 1 : 10000-15000 ново-	6) MLID – 25%
	рожденных	

Синдром/ заболевание	Основные клинические признаки и частота в популяции	Молекулярная патология, частота выявления
Синдром Рассела— Сильвера (ОМІМ #180860)	Карликовость, псевдогидроцефалия (визуальное преобладание мозговой части черепа над лице- вой), треугольный контур лица с высоким лбом и мелкими чертами, асимметрия лица, опущенные углы рта, микрогнатия и микрогения, голубые склеры, клинодактилия мизинцев и синдактилия II и III пальца, гемигипертрофия конечностей, тенденция к развитию злокачественных опухолей: гепатоклеточной карциномы, семиномы, кранио- фарингеомы и опухоли Вильмса. Отмечаются реци- дивирующие гипогликемические состояния и инсулинорезистентность в зрелом возрасте. Частота составляет 1 : 75 000—100 000 новорожденных	 Потеря метилирования IC1 на отцовской хромосоме, что приводит к биаллельной экспрессии H19 – 40– 60%; Материнская OPД 11p15 – редко; Точковые мутации в генах <i>CDKN1C, IGF2, HMGA2, PLAG1</i> – единичные случаи; Метилирования IC2 на отцовской хромосоме – редко; MLID – 7–10%; Изодисомия/материнская дупли- кация и гетеродисомия материн- ского происхождения хромосомы 7 – 5–10%
Синдром задержки внутриутробного раз- вития, метафизарной дисплазии, врожден- ной гипоплазии над- почечников и аномалий половых органов — IMAGe (OMIM #614732)	Сходный с синдромом Рассела—Сильвера фено- тип, метафизарная дисплазия, врожденная гипо- плазия надпочечников с надпочечниковой недостаточностью, часто выявляются двусторон- ний крипторхизм, микропенис и гипогонадотроп- ный гипогонадизм. Частота неизвестна	Миссенс-мутации в материнском аллеле гена <i>CDKN1C</i>

Таблица 1. Продолжение

Ретинобластома (ОМІМ #180200)	Злокачественная опухоль сетчатки глаза, составляющая 3% всех опухолей детского возраста. Опухоль возникает из клеток-предшественников колбочек с частотой 1 : 16000—18000 новорожденных и характеризуется высокой степенью злокачественности, инвазивностью и способностью быстро метастазировать в соседние органы и ткани. Причина — биаллельная инактивация генасупрессора <i>RB1</i> в клетках опухоли. При спорадической ретинобластоме, которая составляет 60% случаев, обе мутации являются соматическими; эта форма, как правило, односторонняя и диагностируется после 2 лет. Наследственная ретинобластома манифестирует, в среднем, до 1 года и носит в большинстве случаев мультифокальный и билатеральный характер. Заболевание наследуется аутосомно-доминантно с пенетрантностью более 90%. У носителей герминальной мутации повышен риск развития других первичных опухолей различной локализации	 Метилирование импринтированного района в интроне 2 <i>RB1</i> на материнском аллеле; Экспрессия альтернативного транскрипта RB1 с неметилированного отцовского аллеля

-		
Синдром/ заболевание	Основные клинические признаки и частота в популяции	Молекулярная патология, частота выявления
	Импринтированный район хромосомы 140	132.2
Синдром Темпл (OMIM #616222)	Пренатальная и постнатальная задержка роста, гипотония, трудности вскармливания, задержка моторного развития, слабость суставов, ожире- ние нижней части туловища, признаки дисморфо- генеза (широкий лоб, короткий нос с широким кончиком, микроакрия), раннее начало полового созревания. Частота неизвестна	 Материнская ОРД по хромосоме 14 – 72–78%; Изолированная потеря метилиро- вания в районе <i>MEG3</i>-DMR – 12– 20%; Делеции 14q32.2 отцовского про- исхождения – 10%
Синдром Кагами— Огата (ОМІМ #608149)	Крупные размеры плода, многоводие, плаценто- мегалия, сниженный/отсутствующий сосатель- ный рефлекс и гиповентиляция в неонатальном периоде, дефекты брюшной стенки, начиная от омфалоцеле до диастаза прямой кишки, специфи- ческие признаки дисэмбриогенеза (полные щеки, вдавленная переносица, микрогнатия, короткая складчатая шея и выступающий фильтр), малень- кая колоколообразная грудная клетка (патогно- моничный признак) с ребрами, похожими на вешалку для одежды, и различной степени выра- женности задержка развития и умственная отста- лость. Повышенный риск развития гепатобластомы. Неонатальная смертность до 20– 25%. Частота неизвестна	 Отцовская ОРД по хромосоме 14– 65%; Микроделеции импринтирован- ного района 14q32.2 на материнской хромосоме – 20%; Гиперметилирование <i>MEG3</i>-DMR на материнской хромосоме – 15%

Таблица 1. Продолжение

Импринтированный район хромосомы 15(q11.2-q13)

Синдром Прадера— Вилли (OMIM #176 270)	Ожирение, неконтролируемая гиперфагия, мышечная гипотензия, низкий рост, гипогона- дизм, умственная отсталость различной степени выраженности, гипопигментация, признаки дис- эмбриогенеза (долихоцефалия, миндалевидный разрез глазных щелей, гипертелоризм, эпикант, микрогнатия, рыбообразный рот, высокое небо, диспластичные ушные раковины, акромикрия, аномалии дерматоглифики и др.), широкий кли- нический полиморфизм. Частота составляет 1 : 10000–25000 новорожденных	 Протяженные делеции отцовской хромосомы 15(q11.2-q13) – 65-75%; Материнская ОРД – 20-30%; Эпимутации в результате микро- делеций IC или невозможность пере- ключения импринта в гаметогенезе – 1-2.5%
Синдром Ангельмана (ОМІМ #105 830)	Микробрахицефалия с уплощенным затылком, большая нижняя челюсть, приоткрытый рот с выступающим языком, макростомия, редко рас- тущие зубы, гипопигментация. Из неврологиче- ских нарушений наиболее характерны задержка умственного и моторного развития, атаксия, гипотензия, судорожная готовность, гиперре- флексия и гиперкинезия (приступы неконтроли- руемого смеха, хлопанье в ладоши и специфическое выражение лица). Частота состав- ляет 1 : 12000–20000	 Протяженные делеции материн- ской хромосомы 15(q11.2-q13) – 65-75%; Отцовская ОРД – 3-7%; Эпимутации в результате микро- делеций IC или невозможность пере- ключения импринта в гаметогенезе – 2-5%; Мутации UBE3A материнского аллеля – 10-15%

Синдром/ заболевание	Основные клинические признаки и частота в популяции	Молекулярная патология, частота выявления
Синдром Шаафа— Янга (ОМІМ #615547)	Синдром характеризуется гипотонией новорожден- ных, задержкой развития и умственной отстало- стью, гипогонадизмом, аутистическим поведением и контрактурами суставов, типичные проявления синдрома Прадера—Вилли, такие как гиперфагия и ожирение, обычно отсутствуют и фенотипическое сходство с синдромом Прадера—Вилли ограничива- ется неонатальным периодом. Частота неизвестна	Нонсенс- и миссенс-мутации отцов- ского аллеля гена <i>MAGEL2</i>
Синдром централь- ного преждевремен- ного полового созревания типа 2 (OMIM #615346)	Гонадотропинзависимое преждевременное поло- вое созревание (до 6-летнего возраста у девочек и 8-летнего — у мальчиков) характеризуется преж- девременной активацией репродуктивной оси, ранним развитием молочных желез или увеличе- нием яичек, ускоренным ростом и увеличенным костным возрастом. Частота неизвестна	Гетерозиготные инактивирующие мутации отцовского аллеля гена <i>MKRN3/ZFP127</i>
	Импринтированный район хромосомы 200	13.2
Псевдогипопарати- реоз типа 1А (OMIM #103580)	Генерализованная гормонорезистентность раз- личной степени, умственная отсталость, ожире- ние, связанное со снижением энергетических затрат в состоянии покоя, наследственная остео- дистрофия Олбрайт проявляющаяся низкоросло- стью, округлым лицом, подкожными оссификатами, брахидактилией и другими скелет- ными аномалиями. Частота неизвестна	Мутации с потерей функции в мате- ринском аллеле гена <i>GNAS</i> — 100%
Псевдогипопарати- реоз типа 1В (ОМІМ #603233)	Изолированная почечная резистентность к парат- гормону и, в некоторых случаях, к тиреотропному гормону. У таких пациентов редко обнаружива- ется фенотип остеодистрофии Олбрайт. Частота неизвестна	 Потеря метилирования в GNAS A/B DMR- 2%, всех DMR - 42.5%; Отцовская ОРД хромосомы 20q13.2 - 2.5-10%; Дупликации и делеции в локусе GNAS - редко; Материнские делеции 20q13.2 - (8.5%); MLID - 12.5%
Псевдопсевдогипопа- ратиреоз (OMIM #612463)	Фенотип остеодистрофии Олбрайт без сопутству- ющих эндокринных нарушений. Частота неиз- вестна	Мутации с потерей функции в отцов- ском аллеле гена <i>GNAS</i> – 100%
Прогрессирующая костная гетероплазия (OMIM#166350)	Подкожная оссификация, появляющаяся в детском возрасте и прогрессирующая с возрастом, с вовлече- нием подкожных и более глубоких соединительных тканей. Остеодистрофия Олбрайт или гормонорези- стентность отсутствуют. Частота неизвестна	Мутации с потерей функции в отцов- ском аллеле гена <i>GNAS</i> – 100%
Синдром Мулчан- дани–Божж–Конлин (OMIM #617352)	Пренатальная и постнатальная задержка роста, экстремальные сложности вскармливания, вызванные невозможностью сосания в первые годы жизни, микроцефалия, признаки дисморфо- генеза, напоминающие синдром Рассела—Силь- вера, задержка умственного развития. Частота неизвестна	Материнская ОРД 20—100%

Таблица 1. Окончание

ются биаллельно, только с отцовского аллеля экспрессируется транскрипт с промотора 1 (P1), который перекрывается с DMR и центром импринтинга (IC) [24]. Кроме того, *PLAGL1* регулирует работу ряда импринтированных и не импринтированных генов, таких как *IGF2*, *H19*, *SLC2A4*, *CDKN1C* и *PPAR* γ 1, вовлеченных в процессы клеточного роста и метаболизма [25].

Еще один ген этого локуса – *HYMAI* – кодирует длинную некодирующую PHK (днРНК). Ген *HYMAI* состоит из одного экзона и имеет перекрывающийся с транскриптом гена *PLAGL1* сайт старта транскрипции в IC/P1. Поэтому статус метилирования IC/P1 регулирует как экспрессию *HYMAI*, так и определенных транскриптов *PLAGL1*. DMR/IC, метилированный на материнской хромосоме и неметилированный на отцовской хромосоме, регулирует оба импринтированных гена – *PLAGL1* и *HYMAI*, которые активно экспрессируются в поджелудочной железе [26].

Обычно отцовский IC/P1 гипометилирован, а материнский гиперметилирован, следовательно, транскрипты HYMAI и PLAGL1, регулируемые IC/P1, экспрессируются с отцовского аллеля. Поэтому транзиторный неонатальный сахарный диабет типа 1 возникает в результате отцовской ОРД хромосомы 6 в 35–40% случаев, дупликации 6q24 – в 35–40%, и аномалий метилирования IC (эпимутация) материнского аллеля в 6q24 – в 20–28% случаев. Потеря метилирования материнского аллеля у пациентов с таким диабетом сопровождается повышенным индексом массы тела [19].

Еще одна причина развития транзиторного неонатального сахарного диабета — мутации гена *ZFP57*, расположенного в районе хромосомы 6p22.1 и кодирующего фактор транскрипции, участвующий в поддержании корректного метилирования в импринтированных локусах; эти мутации встречаются редко, они описаны в 14 случаях транзиторного неонатального сахарного диабета [27]. Более подробно функции и роль *ZFP57* рассмотрены в разделе "Множественные аномалии метилирования импринтированных регуляторных районов".

Известно не более 20 случаев ОРД материнского происхождения по хромосоме 6. Эти ОРД не сопровождались какими-либо характерными патологическими признаками, за исключением внутриутробной задержки развития [28].

Импринтированный локус PEG13-KCNK9 в районе хромосомы 8q24.3 и синдром Бирка—Барела

В хромосомном районе 8q24.3 картирован импринтированный локус *PEG13–KCNK9*, содержащий два импринтированных гена, которые экспрессируются преимущественно в головном мозге – *PEG13* и *KCNK9*. Ген *PEG13*, локализованный в интроне неимпринтированного гена ТКАРРС9, экспрессируется с отцовского аллеля с образованием длинного некодирующего транскрипта, который начинается в районе DMR материнского аллеля. Этот DMR связывает комплекс СТСF-когезин, который выполняет функцию метилчувствительного блокатора энхансеров на неметилированном отцовском аллеле [29]. Ген KCNK9/TASK3 экспрессируется с материнского аллеля, кодирует белок подсемейства калиевых каналов с двумя поровыми доменами. Этот белок представлен в различных тканях, особенно в головном мозге, где участвует в миграции кортикальных пирамидных нейронов [30]. Реципрокная экспрессия этих генов регулируется материнским DMR, расположенным внутри PEG13. Также обнаружены петли хроматина с классической модификацией гистонов (H3K4me1, H3K27ac) для энхансерных районов между энхансерной областью, расположенной в интроне 17 гена ТКАРРС9, и промоторными районами KCNK9 и PEG13 в тканях мозга, свидетельствующих о взаимной регуляции аллельной экспрессии транскриптов PEG13 и КСNК9 [29, 31].

Синдром Бирка–Барела (ОМІМ #612292) характеризуется множественными признаками дисэмбриогенеза и задержкой умственного и физического развития (табл. 1) [32]. Это заболевание, как правило, вызвано материнской специфической миссенс-мутацией (с.770G> А или 770G> С, p.Gly236Arg) [33]. Но недавно была описана новая мутация с.710С > А: p.Ala237Asp в материнской копии гена *КСNК9* [34]. Кроме того, выявлена полная потеря материнского аллеля гена в результате комплексной структурной перестройки хромосомы 8 с вовлечением импринтированного района [35].

Молекулярная организация импринтированного района хромосомы 11p15.5 и гены, вовлеченные в формирование фенотипических признаков синдромов Беквита-Видеманна, Рассела-Сильвера и IMAGe

Хромосомный район 11р15.5 содержит кластер импринтированных генов, перемежающихся неимпринтированными. Несколько импринтированных генов и их регуляторные районы вносят принципиальный вклад в формирование фенотипов синдрома Беквита—Видеманна и синдрома Рассела—Сильвера.

Ген *CDKN1C/P57^{KIP2}* кодирует ингибитор циклинзависимой киназы, относящейся к семейству CIP регуляторов клеточного цикла. Ген служит негативным регулятором клеточного цикла, он экспрессируется с материнской хромосомы, а его сверхэкспрессия может останавливать клеточный цикл на границе G₁ [36, 37].

Ген *KCNQ1* кодирует калиевый канал, экспрессируется практически во всех тканях с материнского аллеля, а биаллельно — только в сердечной мышце. Известны четыре изоформы его транскриптов. Первая форма транскрибируется только с материнского аллеля (она обнаружена в большинстве тканей), вторая транскрибируется биаллельно в сердечной мышце, а третья и четвертая формы не транслируются [38].

В интроне 10 гена *KCNQ1* обнаружен ген *KCNQ10T1/LIT1*, экспрессирующийся с антисмысловой цепи отцовской хромосомы и кодирующий днРНК [39]. Эта днРНК может взаимодействовать с хроматином, обогащенным триметилированными остатками лизина в положении 9 и 27 (НЗК9 и НЗК27), а также с НЗК9- и НЗК27специфическими гистон-метилтрансферазами G9a, EHMT2 и репрессирующим комплексом polycomb-2. *KCNQ10T1* может приводить к специфической инактивации транскрипции соседних генов посредством рекрутирования комплексов ремоделирования хроматина и поддерживать такое состояние в течение нескольких клеточных делений [40, 41].

Ген *IGF2* кодирует фетальный ростовой фактор, который служит митогеном практически для всех типов клеток, но специфически модулирует рост и дифференцировку мышечных клеток. *IGF2* содержит 9 экзонов, из которых только экзоны 7–9 кодирующие, имеет пять промоторных областей (P1, P0, P2, P3 и P4), расположенных в экзонах 1, 2, 4, 5 и 6 соответственно, и четыре СрG-островка, последний из которых перекрывает кодирующую область экзона 9. И в эмбриональных, и в зрелых тканях он экспрессируется только с отцовской хромосомы [42].

Ген *H19* экспрессируется с материнской хромосомы и кодирует днРНК, которая связана с подавлением роста, задержкой роста плаценты, регуляцией клеточного цикла, канцерогенезом и метастазированием [43]. Изучение метилирования гена в ходе эмбриогенеза выявило его биаллельный паттерн до 10 недели беременности, после чего оно становится исключительно материнским и не влияет на аллель-специфичность или уровень экспрессии *IGF2* [44].

Структурно-функциональная организация центров импринтинга IC1 и IC2 хромосомного района 11p15.5

Гены *H19* и *IGF2* тесно сцеплены, а их экспрессию регулирует общий энхансер, расположенный в 3'-области *H19* [45]. Общий энхансер регулирует транскрипцию днРНК H19 и внутригенной микроРНК miR-675 на материнской хромосоме, *IGF2* и внутригенной miR-483 — на отцовской хромосоме. IC1 — DMR *H19–IGF2*, содержит тандемные повторы и связывает факторы транскрипции CTCF, POU5F1 и SOX2, которые

поддерживают материнский аллель в неметилированном состоянии, что способствует инактивации экспрессии IGF2. В то же время ZFP57 поддерживает метилированное состояние IC1 отцовского аллеля и, соответственно, он не способен связывать СТСГ и не препятствует возможной активации IGF2 энхансером на отцовской хромосоме [4, 45]. Белок СТСГ блокирует передачу сигналов от энхансеров к промоторным районам генов, он необходим для нормального функционирования эпигенетической метки [46]. Кроме того, IC1 характеризуется различным состоянием хроматина на родительских хромосомах – присутствием репрессирующих меток гистонов 3 и 4 (H3K9me2, H3K9me3 и H4K20me3) на метилированном аллеле и активированным состоянием хроматина, ди- и три-метилированными остатками лизина гистона 3 и 4 (Н3К4те2 и Н3К4те3) на неметилированном аллеле [47]. Вторичные DMR – промотор *H19*, *IGF2* DMR0 и *IGF2* DMR2 – метилированы на отцовской хромосоме [4, 42]. IGF2 DMR0 метилирован на отцовской хромосоме и обладает свойствами сайленсера, который в активном состоянии блокирует экспрессию IGF2 на материнской хромосоме в тканях мезодермального происхождения, исключая мышцы. Если делеция этого района унаследована от матери, то блокирующий IGF2 эффект отсутствует - ген экспрессируется биаллельно, происходит потеря импринтинга. Если делеция имеет отцовское происхождение, то транскрипция отцовского аллеля *IGF2* не нарушена. В районе локализации miR-483 в *IGF2* имеется еще один регуляторный элемент, обладающий свойствами сайленсера -DMR2. В результате его делеции на материнской хромосоме возникает биаллельная экспрессия IGF2 преимущественно в мышцах особенно в мышцах языка, что приводит к макроглоссии. Делеция DMR2 на отцовской хромосоме не изменяет степень экспрессии IGF2 [48].

Второй регуляторный район – ІС2, представленный DMR, расположен в интроне 10 гена *КСNQ1* перед сайтом старта транскрипции *КСNQ10T1/LIT1*, который транскрибируется с антисмысловой цепи только отцовского аллеля [49]. Показано, что днРНК КСNQ1ОТ1 подавляет экспрессию кодирующих генов in cis в этом районе, т.е. инактивирует экспрессию генов KCNQ1 и *P57КІР*, которые экспрессируются с материнского аллеля [50]. Метилирование ІС2 и инактивация промотора КСNQ10T1 на материнской хромосоме поддерживается за счет связывания с ZFP57 [4]. В результате эпимутации наблюдается аномальная экспрессия КСNQ10T1 с материнской хромосомы, что приводит к биаллельной инактивации KCNQ1 и P57KIP и патологическому фенотипу [51]. Таким образом, импринтированный район хромосомы 11р15.5 содержит два IC, находящихся на расстоянии порядка 600 т.п.н., а на-

11

рушение их функционирования приводят к синдромам Беквита-Видеманна или Рассела-Сильвера.

Синдром Беквита-Видеманна (ОМІМ #130650) – распространенное заболевание с характерным фенотипом и частотой 1 : 10000–15000 новорожденных (табл. 1) [51, 52].

Молекулярно-генетические и эпигенетические нарушения удается выявить у 80-85% индивидов с синдромом Беквита-Видеманна. Не менее 50% случаев этого синдрома связаны с потерей метилирования (loss of methylation – LOM) материнского аллеля IC2 (IC2-LOM), что приводит к снижению экспрессии CDKN1C и KCNO1. IC2-LOM обычно является спорадической первичной эпигенетической аномалией, однако описаны редкие семейные случаи, когда мутации вызывали вторичное гипометилирование [51, 53, 54]. В последнее время растет доля пациентов с IC2-LOM, у которых нарушено метилирование других импринтированных локусов, что приводит к появлению дополнительных фенотипических признаков [55] (см. раздел "Множественные аномалии метилирования импринтированных регуляторных районов").

Отцовская сегментная ОРД хромосомы 11, в том числе и мозаичная, встречается не менее чем в 20% случаев заболевания и приводит к нарушению экспрессии обоих кластеров генов: IC2-LOM и приобретенное/новое метилирование (gain of methylation – GOM) в IC1 (IC1-GOM), инактивирующее H19 на материнской хромосоме. Полная ОРД хромосомы 11 обнаруживается достаточно часто и связана с высоким риском развития опухолей [54, 56].

Нарушение метилирования IC1-GOM приводит к биаллельной экспрессии гена *IGF2*, который в норме экспрессируется только с отцовской хромосомы, и отсутствию экспрессии гена *H19* с материнской хромосомы. IC1-GOM выявляется у 5-10% пациентов с синдромом Беквита–Видеманна, а микроделеции, захватывающие сайт связывания OCT4/SOX2, локализованный внутри IC1, приводят к развитию синдрома Беквита– Видеманна, наследуемому по материнской линии [51, 53, 54]. У мышей с делецией *H19* возникает эпигенетическое нарушение регуляции экспрессии гена *IGF2*, которое выражается в увеличении размеров тела и экзомфалозе [57, 58].

Мутации, инактивирующие функцию *CDKN1C* и ответственные за передачу синдрома Беквита– Видеманна по материнской линии, составляют 5–10% всех случаев этого заболевания. Мутации этого гена обнаруживают почти в 40% семейных случаев синдрома Беквита–Видеманна, а в спорадических – не более чем в 5% [53, 59].

Около 1% случаев синдрома Беквита-Видеманна связаны с перестройками (дупликации, транслокации, инверсии, делеции) хромосомного района 11p15.5, что приводит к вторичному нарушению метилирования в IC – IC2-LOM и IC1-GOM [60]. Около 15% клинически диагностированных случаев синдрома Беквита—Видеманна не имеют никакой установленной молекулярной патологии, которую можно выявить с помощью обычных молекулярно-генетических методов. Однако при использовании новых методов секвенирования и анализе других тканей (буккальный эпителий, фибробласты кожи) все чаще обнаруживается низкий уровень соматического мозаицизма указанных аномалий метилирования [53].

Молекулярные подтипы синдрома Беквита-Видеманна характеризуются градиентом вероятности развития опухолей и отображают различные гистотипы, позволяющие дифференцировать протоколы наблюдения в соответствии с эпигенотипом. Это особенно важно для раннего обнаружения опухолей, ассоциированных с синдромом Беквита-Видеманна [51]. Биаллельную экспрессию IGF2 часто обнаруживают в нефробластомах, рабдомиосаркомах, карциномах кортикального слоя надпочечников и других эмбриональных опухолях, характерных для синдрома Беквита-Видеманна. Сверхэкспрессия этого гена у трансгенных мышей вызывает увеличение размеров тела, макроглоссию, органомегалию и появление опухолей [57, 61]. Действительно, установлено, что в 20% опухолей присутствует ОРД и аномалии метилирования IC1 и IC2. Изолированная IC1-GOM *H19* отмечена у 7% больных, а изолированная IC2-LOM *КСNQ10T1* зарегистрирована в 55% случаев. В последней группе больных опухоли не обнаружены, тогда как пациенты с IC1-GOM или отцовской ОРД в 33% случаев имели новообразования, характерные для синдрома [54].

Синдром Рассела—Сильвера (ОМІМ #180860) принадлежит к категории относительно распространенных наследственных болезней, его частота в различных популяциях достигает 1 : 75000— 1 : 100000 новорожденных. Основные диагностические признаки синдрома Рассела—Сильвера: малые размеры и относительная макроцефалия при рождении, признаки дисморфогенеза и др. (табл. 1) [62, 63].

Поскольку синдром характеризуется признаками дисэмбриогенеза, задержкой умственного и физического развития, первым шагом в поиске его причин стал хромосомный анализ. Действительно, в ряде случаев обнаружены различные неспецифические хромосомные аномалии: транслокации и инверсии, частичные трисомии длинного плеча хромосомы 1q42, делеция 8(q11–q12), 13(q22–q32), 18р и др. [64]. Описано несколько случаев кольцевой хромосомы 15 с делецией района 15q26.3, в котором картирован ген *IGF1R*. Изолированные делеции этого гена сопровождаются сильным отставанием в росте, формированием треугольного лица, клинодактилией, микрогнатией, микроцефалией и умственной отсталостью, но мутации гена при синдроме Рассела— Сильвера не обнаружены [65]. У пациентов с фенотипом, сходным с синдромом Рассела—Сильвера, выявлено несколько сбалансированных транслокаций с одной из точек разрыва в хромосоме 17(q24—q25). В этом районе расположен кластер генов гормона роста; их делеции обнаружены у пациентов без явных синдромальных нарушений [64, 66].

До тех пор, пока не были описаны две материнские микродупликации хромосомного района 11р15.5 с контрастирующими фенотипами, никто не предполагал, что изменения этой области могут быть причиной еще одного синдрома. В первом случае инвертированная дупликация материнской хромосомы 11р15 размером 1.2 млн.п.н. привела к синдрому Рассела-Сильвера. Дупликация включала весь кластер импринтированных генов 11р15.5, наблюдалось также гиперметилирование СрG по всей области IC2. Во втором случае унаследованная от матери инвертированная дупликация размером 160 т.п.н. включала только IC2 и 20 т.п.н. 5'-района КСNQ10T1, что привело к появлению фенотипа синдрома Беквита-Видеманна у пяти человек в двух поколениях [67].

Тщательный молекулярный анализ выявил у ряда пациентов гипометилирование отцовского аллеля гена *H19*, обусловленное эпимутацией т.е. ген начинает экспрессироваться биаллельно. Это связано с тем, что на отцовской хромосоме IC1 не подвергается метилированию (обнаружено v 40-60% больных) и связывает белок СТСГ, что приводит к биаллельной инактивации IGF2 [53, 62]. В частности, показано, что у этих больных DMR в 5'-районе IGF2 на отцовской хромосоме также гипометилирован. Поскольку молекулярные нарушения в области 11p15.5 при синдроме Рассела-Сильвера являются зеркальными по отношению к синдрому Беквита-Видеманна, то отмечен вклад IC2 (KCNQ10T1) в фенотип синдрома Рассела—Сильвера, хотя и незначительный. Описано несколько случаев метилирования de novo IC2 на отцовской хромосоме [53, 57, 68].

В клетках ряда пациентов с синдромом Рассела—Сильвера аномалии метилирования *H19* регистрируют с частотой 0—35%. Это означает, что только часть клеток теряет метилирование *H19* на отцовской хромосоме [69]. Мозаичная этиология аномалий импринтинга показывает, что нарушения возникают на уровне первых делений дробления, а значит, основная масса случаев заболевания имеет спорадический характер.

Молекулярная причина может быть определена приблизительно у 60% пациентов с клиническим диагнозом синдром Рассела—Сильвера. Второй по

частоте этиологическим фактор – материнская ОРД по хромосоме 7, обнаруживается в 5-10% случаев [70, 71]. Систематический анализ дифференциального метилирования хромосомы 7 при ОРД как материнского, так и отцовского происхождения, показал, что 65% DMR на материнской хромосоме гипометилированы [72]. Район короткого плеча 7 (р11.2-р13) содержит импринтированный ген GRB10, кодирующий цитоплазматический адаптерный белок, который служит негативным регулятором сигналинга тирозинкиназных рецепторов. Отцовская экспрессия этого гена установлена в головном и спинном мозге, материнская - в скелетных мышцах, а во всех остальных тканях ген экспрессируется биаллельно. Поиск мутаций и аномалий метилирования в регуляторной области гена *GRB10* у больных с синдромом Рассела-Сильвера оказался безуспешным [73]. Гены в импринтированных локусах длинного плеча хромосомы 7 (SGCE/PEG10 и PEG/MEST) также не имели каких-либо структурных и функциональных нарушений, способных вызывать развитие синдрома Рассела-Сильвера [74]. Поэтому сложно сказать, какой именно ген на хромосоме 7 вносит решающий вклад в формирование фенотипа синдрома Рассела-Сильвера [62, 75]. В то же время отцовсая ОРД по хромосоме 7 не имеет явных фенотипических проявлений [72].

В нескольких семьях у пациентов с синдромом Рассела—Сильвера описаны мутации *CDKN1C* материнского происхождения [76—78] и отцовские инактивирующие мутации *IGF2* в других случаях [79, 80]. Кроме того, при синдроме Рассела—Сильвера выявлены варианты двух не импринтированных генов: варианты *HMGA2* описаны в трех семьях и трех спорадических случаях [81], а изменения *PLAG1* – в трех семьях и в одном спорадическом случае [53, 70, 82].

Фактор транскрипции PLAG1 содержит семь канонических доменов цинковых пальцев для связывания ДНК и С-конец, обогащенный остатками серина, который может активировать транскрипцию. PLAG1 связывает промотор P3 *IGF2*, увеличивая тем самым его экспрессию, что необходимо для нормального эмбрионального роста, а инактивация гена может приводить к пренатальной и постнатальной задержке роста и развития [83].

Необходимо учитывать, что при синдроме Рассела—Сильвера возможны множественные аномалии метилирования DMR в импринтированных районах других хромосом (MLID), что приводит к частичному перекрыванию фенотипических признаков. В частности, если не выявлены структурнофункциональные нарушения хромосомы 11p15 и материнская ОРД по хромосоме 7, то следует исследовать материнскую ОРД по хромосомам 6, 16, 20, а также статус метилирования двух DMR на хромосоме 14 [53, 84].

Синдром ІМАGe (ОМІМ #614732) характеризуется задержкой внутриутробного развития, комплексом признаков дисэмбриогенеза (табл. 1) и возникает в результате миссенс-мутаций в гене CDKN1C, который подавляет клеточную пролиферацию [85]. Все известные однонуклеотидные варианты, ассоциированные с синдромом IMAGe, расположены в высококонсервативной "горячей точке" в PCNA-связывающем домене CDKN1C между кодонами 272-279 и нарушают связывание PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток). Наиболее часто выявляют мутации p.Asp274Asn, p.Lys278Glu или p.Arg279Leu. Эти мутации вызывают большую стабильность и усиление функции белка и, как результат, подавление роста [86, 87]. Механизм этого не установлен, но он может быть связан со сниженной деградацией CDKN1C, что приводит к продолжительной репрессии клеточного цикла и отставанию перехода к S-фазе. CDKN1C экспрессируется только с материнского аллеля, поэтому очевидно, что синдром возникает только при наследовании мутации от матери [88].

Импринтированный район гена RB1 в локусе хромосомы 13q14.1

Давно известно, что ген ретинобластомы может быть инактивирован в различных типах опухолей в результате метилирования промоторного района. Функциональная инактивация одного или обоих аллелей *RB1* в опухолевом материале ретинобластомы выявляется достаточно часто [89], а инактивация гена в результате герминальной эпимутации – событие достаточно редкое. Описан мозаичный случай метилирования CpG 106 промоторного района гена у пациента с ретинобластомой, свидетельствующий, что эпимутация произошла в материнском аллеле на раннем этапе эмбрионального развития [90].

Более подробный молекулярно-генетический анализ промоторного района и CpG-островков гена позволил выявить ряд особенностей. В гене *RB1* обнаружен импринтированный участок (1.2 т.п.н.) – СрG-островок, расположенный во втором интроне гена, который дифференциально метилирован в зависимости от родительского происхождения аллеля – СрG 85 метилирован на материнской хромосоме и неметилирован на отцовской. Кроме того, *RB1* содержит еще два CpGостровка: CpG 106, захватывающий промотор и экзон 1, неметилирован и обеспечивает биаллельную экспрессию основного транскрипта, кодирующего белок RB, а CpG 42, расположенный в интроне 2 гена, метилирован на обеих хромосомах и не обладает регуляторной активностью [91].

Установлено, что CpG 85 входит в состав 5'-укороченного процессированного псевдогена, который образовался из белоккодирующего

гена КІАА0649, расположенного на хромосоме 9, и интегрировал в *RB1* в обратной ориентации. СрG 85 выступает в качестве промотора для альтернативного транскрипта RB1, который экспрессируется только с неметилированной отцовской хромосомы [91]. Несмотря на ожидаемо более высокий общий уровень экспрессии мРНК транскриптов с отцовского аллеля (по сравнению с материнским), уровень экспрессии с отцовского аллеля в 2–3 раза ниже за счет интерференции транскрипции, вызванной совместной экспрессией регулярного и альтернативного транскриптов. Интерференция транскрипции – механизм, при котором транскрипция одного гена подавляет транскрипцию другого. Так, транскрипционный комплекс альтернативного транскрипта гена *RB1*. который связывается с неметилированным островком СрG 85 на отцовской хромосоме, выступает в качестве блока для транскрипционного комплекса основного транскрипта на том же аллеле, что приводит к уменьшению уровня экспрессии на отцовской хромосоме [91, 92]. Это свидетельствует об эпигенетической регуляции экспрессии гена *RB1* в зависимости от родительского происхождения аллеля.

При наследственной ретинобластоме (ОМІМ **#180200)** (табл. 1), обнаруживаемой в 40% случаев этой опухоли, герминальная мутация в одном из аллелей гена RB1 обуславливает предрасположенность к заболеванию и его семейную передачу, а развитие ретинобластомы инициируется соматической мутацией в другом аллеле гена в клетке сетчатки, которая возникает внутриутробно или в раннем детстве. В некоторых семьях с ретинобластомой с двумя и более носителями одинаковой герминальной мутации в родословной, возможен более мягкий фенотип с неполной пенетрантностью, при которой у части носителей герминальной мутации заболевание не развивается, и вариабельной экспрессивностью, когда одна и та же мутация у разных членов семьи может проявляться уни- или билатеральной формой заболевания. Фенотипическое проявление наследственной ретинобластомы зависит от функционального типа герминальной мутации в гене *RB1* [93]. В свою очередь, молекулярные механизмы, лежащие в основе вариабельного фенотипического проявления одинаковой мутации у разных членов одной семьи объясняются эффектом родительского происхождения мутации RB1. В частности, низкопенетрантные герминальные мутации *RB1*, унаследованные от отца, приводят к развитию ретинобластомы чаше и в более тяжелой форме, чем мутации, полученные от матери. Считается, что при наследовании низкопенетрантной мутации по материнской линии супрессорной активности pRB достаточно для предотвращения развития ретинобластомы. Напротив, при передаче мутантного аллеля от отца низкая остаточная активность белка будет (за счет более низкой экспрессии) имитировать мутацию, приводящую к отсутствию белка, что приведет к развитию заболевания [94, 95].

Импринтированный район хромосомы 14q32.2 и однородительская дисомия по хромосоме 14

Район хромосомы 14q32.2 содержит кластер импринтированных генов: часть которых экспрессируется с отцовской хромосомы – DLK1, RTL1 и DIO3, а другие – гены днРНК MEG3/GTL2, MEG8, *RTL1as*, мяРНК и miPHK – с материнской [96]. DLK1, известный как фактор 1 преадипоцитов, или фетальный антиген 1, кодирует EGF-подобный мембраносвязанный белок, участвующий в сигнальном пути Notch и регулирующий дифференцировку преадипоцитов, экспрессируется в нейроэндокринных тканях, особенно в корковом слое надпочечников [97]. Ряд структурных нарушений гена обнаружен у пациентов с центральным преждевременным половым созреванием (табл. 1). При этом метаболический фенотип, включающий повышенную частоту ожирения, раннюю непереносимость глюкозы, сахарный диабет типа 2 и гиперлипидемию, оказался более распространенным у пациентов с мутациями DLK1 по сравнению с пациентами, имеющими мутации в других генах [98].

Ретротранспозон-подобный ген *RTL1* экспрессируется в плаценте и позднем фетальном периоде. RTL1 считается ответственным за фетальную патологию мышц, характерную для синдромов Кагами-Огата и Темпл, а также играет важную роль в ЦНС, так как его аномальная экспрессия может приводить к нарушению иннервации двигательных нейронов скелетных мышц и функционирования комплекса гиппокамп-миндалевидное тело [99]. DIO3 активно экспрессируется в развивающемся и взрослом мозге, инактивирует тиреоидные гормоны и играет важную роль в предотвращении неврологических аномалий, вызванных чрезмерным действием этих гормонов. Изменения в экспозиции гормонов щитовидной железы в ходе развития могут приводить к некоторым фенотипическим особенностям, связанным с ОРД хромосомы 14 [100]. *MEG3* кодирует днРНК, которая координирует широкий спектр различных клеточных процессов, требующих эпигенетической регуляции генов и взаимодействия с ключевыми сигнальными белками. Его интронный DMR содержит два сайта связывания белка СТСГ, что предопределяет регуляторные функции [101]. Возможно, что связывание СТСГ активирует все гены, экспрессирующиеся с материнской хромосомы, которые представляют собой единую транскрипционную единицу. Одновременно с этим возможна инактивация всех отцовских генов в результате нарушения ацетилирования гистонов [102]. Функции RTL1as и MEG8, помимо регуляторных, неизвестны. Паттерны экспрессии

генов, зависящие от родительского происхождения, регулируются межгенными DMR, имеющими герминальное происхождение (MEG3/DLK1 DMR), и DMR, функционирующим уже после оплодотворения (MEG3-DMR). Оба DMR метилированы на отцовской хромосоме в норме [102, 103]. Отсутствие экспрессии *DLK1* в сочетании с *RTL1* и *DIO3*, обусловленное материнской ОРД, приводит к развитию синдрома Темпл [104].

Синдром Темпл (ОМІМ #616222) характеризуется набором клинических признаков (табл. 1), часть из которых наблюдается при синдромах Прадера–Вилли и Рассела–Сильвера [9, 62].

К механизмам, приводящим к нарушению гемизиготности импринтированных генов района 14q32 и клиническим фенотипическим аномалиям, относятся: 1) материнская ОРД по хромосоме 14 (72–78%); 2) изолированная потеря метилирования (эпимутация) в районе MEG3-DMR (12– 20%); 3) делеции 14q32 отцовского происхождения (10%) [104, 105].

Синдром Кагами—Огата (ОМІМ #608149), еще одно заболевание, имеющее ряд признаков дисморфогенеза и пороков развития (табл. 1), среди которых патогномоничной является маленькая колоколообразная грудная клетка с ребрами, похожими на одежную вешалку. Некоторые неспецифические фенотипические признаки сходны с проявлениями синдрома Беквита— Видеманна [106].

Причиной синдрома могут быть три различных молекулярных события: 1) отцовская ОРД по хромосоме 14 (65% случаев); 2) микроделеции, повреждающие импринтированный район 14q32.2 на материнской хромосоме (20%); 3) гиперметилирование *MEG3*-DMR на материнской хромосоме (15%) [107]. Если отцовская ОРД 14 и гиперметилирование *MEG3* возникают спорадически, то микроделеции могут привести к заболеванию, наследуемому по материнской линии. Показано, что делеции импринтированного района не обязательно включают DMR, поэтому нормальный паттерн метилирования не исключает возможности синдрома [108].

Гипометилирование домена *DLK1/MEG3* приводит к снижению экспрессии импринтированных генов, таких как *IGF2*, *SNURF* и *IPW*, а также ряда других неимпринтированных генов, участвующих в стимулировании роста. Изменения в экспрессии могут отражать, прямо или косвенно, участие днРНК MEG3 и MEG8 в этом процессе; днРНК регулируют экспрессию генов как *in cis*, так и *in trans* посредством ассоциации с модификаторами хроматина [7]. Сверхэкспрессия или инактивация экспрессии MEG3 и MEG8 в культурах нормальных фибробластов может быть связана с нарушением регуляции импринтированных генов в области 11p15.5 и 15(q11-q13). В частности, установлено что: 1) сверхэкспрессия MEG3 связана со снижением уровня транскриптов IPW; 2) сверхэкспрессия MEG8 ассоциирована с более низким уровнем транскрипта SNURF и 3) совместная сверхэкспрессия MEG3 и MEG8 определяет снижение уровня транскриптов IGF2. Это свидетельствует о том, что MEG3 и MEG8 могут регулировать *in trans* экспрессию других импринтированных генов [9]. Ранее установили, что сверхэкспрессия IPW может подавлять экспрессию MEG3 [109]. Таким образом, вполне вероятно, что в эпитранскриптоме может существовать система реципрокного контроля, которая связывает работу днРНК импринтированных районов, а это, в свою очередь, может способствовать клиническому перекрыванию фенотипических проявлений синдромов Прадера-Вилли, Беквита-Видеманна и Рассела-Сильвера [14].

Молекулярная организация импринтированного хромосомного района 15(q11.2–q13) и гены, участвующие в формировании фенотипа синдромов Прадера-Вилли, Ангельмана, Шаафа-Янга и центрального преждевременного полового созревания. В хромосомном районе 15(q11.2-q13) расположен один из наиболее протяженных импринтированных районов, содержащий кластер импринтированных генов. Структурная и функциональная патология этих генов приводит к развитию хорошо известных синдромов Прадера-Вилли (ОМІМ #176270), Ангельмана (ОМІМ #105830) и менее известным редким синдромам Шаафа-Янга (ОМІМ #615547) и центрального преждевременного полового созревания типа 2 (ОМІМ #615346). Фенотипические признаки, частоты заболеваний и варианты молекулярной патологии приведены в табл. 1.

"Критический район" хромосомы 15(q11.2q13) — наиболее часто подверженный делециям (5-7 млн.п.н.) участок в геноме человека. Формально его можно подразделить на четыре фрагмента: 1) проксимальный район, содержащий неимпринтированные гены (TUBGCP5, CYPFIP1, NIPA2 и NIPA1); 2) импринтированный район, содержащий гены, экспрессирующиеся моноаллельно только с отцовской хромосомы – белоккодирующие (MKRN3/ZNF127, MAGEL2, NECDIN, NPAP1/C15orf2, SNURF-SNRPN), кодирующие нетранслируемые РНК (MKRN3-AS/ZNF127-AS, *IPW*, *UBE3A-ATS*), и кластер генов, кодирующих мяРНК (SNORD116 – 29 копий, SNORD115 – 48 копий, SNORD64, SNORD107, SNORD108, SNORD109А и SNORD109В): 3) район, в котором показана моноаллельная экспрессия на материнской хромосоме белоккодирующего гена UBE3A и биаллельно экспрессирующегося ATP10C; 4) дистальный район содержит биаллельно экспрессирующиеся гены — OCA2, ответственный за альбинизм типа 2, ген *HERC2* и три гена рецептора гамма-аминомасляной кислоты (GABA) [110-112].

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

Делеции возникают в результате негомологичной рекомбинации. обусловленной блоками низкокопийных повторов с высокой гомологией, расположенных в районах точек разрыва (break point – BP) BP1–BP5. BP1 и BP2 локализуются проксимальнее *MKRN3*, а BP3, 4 и 5 в теломерной области импринтированного района. Выделяют два класса делеций: делеции класса 1 составляют 40%, они локализуются в ВР1-ВР3; делеции класса 2 составляют 50% и находятся между ВР2 и ВРЗ. В редких случаях (менее 10%) положение делеции может не совпадать со стандартными точками разрыва, а быть много меньше или простираться за BP4 и BP5 [113-117]. Дистальный кластер точек разрыва локализован "теломернее" гена *HERC2*. Такие делеции включают кластер из генов-рецепторов GABA - GABRB3, GABRA5 и GABRG3. Наиболее частые точки разрыва BP1, BP2 и BP3 фланкированы низкокопийными повторами, происходящими из дуплицированных фрагментов гена *HERC2*, первоначальная копия которого располагается в ВРЗ. ВР4 и ВР5 тоже содержат низкокопийные повторы, но не имеюют гомологии с HERC2. Делеции возникают в результате внутри- или межхромосомного кроссинговера, происходят de novo, благодаря образованию большой (4-5 млн.п.н.) петли и только в редких случаях - обусловлены структурной перестройкой [114, 118]. Кроме того, описано большое количество случаев с вовлечением района 15(q11.2-q13) не только в делеции, но и в инвертированные дупликации (тетрасомия), дупликации (трисомия), несбалансированные (моносомия) и сбалансированные транслокации, а также в инверсии.

Центральными в импринтированном районе являются ген SNURF/SNRPN, некодирующий кластер генов SNORD и ген днРНК UBE3A-ATS, которые экспрессируются с неметилированного отцовского аллеля. Это сложно устроенный комплексный генный локус SNHG14 (Small Nucleolar RNA Host Gene 14), покрывающий 465-600 т.п.н. и содержащий не менее 148 экзонов, подверженных альтернативному сплайсингу [119, 120]. SNURF-SNRPN – бицистронный ген, кодирующий два разных белка. В его 5'-области расположен СрG-островок, включающий промотор, первые экзон и интрон-регуляторный район, называемый PWS-IC, протяженностью в 4.3 т.п.н. Минимальная промоторная область SNRPN, включающая 71 п.н. 5'-НТР и первые 51 п.н. экзона 1 SNURF-SNRPN, является важной частью IC [121, 122] и имеет решающее значение для регуляции всего импринтированного района [123]. Импринтинг осуществляется за счет родительского аллель-специфического метилирования остатков CpG, которое устанавливается либо в ходе, либо уже после гаметогенеза и поддерживается на протяжении всего эмбриогенеза. Район PWS-IC неметилирован на отцовской хромосоме и метилирован на материнской [124].

Основная функция PWS-IC заключается в активации транскрипции генов отцовского аллеля, включая *MKRN3*, *MAGEL2*, *NECDIN*, *NPAP1*, *SNURF-SNRPN*, *IPW* и *UBE3A–ATS*. Экспрессия *UBE3A-ATS* приводит к инактивации *UBE3A* на отцовском аллеле в результате транскрипционной интерференции [125].

На самом деле ІС состоит из двух частей – PWS-IC и AS-IC [126]. AS-IC, расположенный на 35 т.п.н. проксимальнее, состоит из 880 п.н., содержит альтернативный 5'-некодирующий экзон SNRPN, который экспрессируется только в ооцитах [127]. Именно ооцит-специфичная транскрипция приводит к метилированию и транскрипционной инактивации материнского, но не отцовского аллеля. AS-IC имеет решающее значение для инактивации импринтированных генов на материнском аллеле. Отсутствие экспрессии UBE3A-ATS на материнском аллеле необходимо для экспрессии UBE3A в норме [128, 129]. Структурная патология AS-IC приводит к отсутствию метилирования в материнском промоторе SNRPN и активации генов, импринтированных на материнском аллеле [130].

Прямое назначение PWS-IC – установление активной транскрипции генов на отцовской хромосоме в гаметогенезе и поддержание в соматических тканях. В случае наследования структурной патологии или эпимутации PWS-IC от отца возникает фенотип синдрома Прадера-Вилли, происходит биаллельная экспрессия UBE3A и, как следствие, инактивации UBE3A-ATS на отцовской хромосоме. Роль AS-IC сводится к отмене функции PWS-IC в оогенезе и сдерживанию тех процессов, которые реализуются под контролем PWS-IC в сперматогенезе. Именно поэтому в случае делеции или эпимутации материнского аллеля AS-IC становится невозможной инактивация отцовских генов на материнской хромосоме, в том числе UBE3A-ATS, что приводит к биаллельной инактивации гена UBE3A [131-133].

Мутации или эпимутации, влияющие на функцию PWS-IC, приводят к нарушению профиля метилирования вторичных DMR генов NDN и MKRN3 и отсутствию аллельной экспрессии всего импринтированного района, что указывает на PWS-IC как на основной регулятор импринтинга этого района в соматических тканях [134].

Первые три экзона SNURF-SNRPN соответствуют SNURF и кодируют небольшой ядерный белок с неизвестной функцией [135], экзоны 4–10 соответствуют участку SNRPN и кодируют белок SmN, необходимый для образования сплайсосом, которые отвечают за альтернативный сплайсинг различных мРНК [136]. Дистальнее расположены шесть генов мяРНК, которые экспрессируются

как единый длинный транскрипт, регулируются экспрессией SNURF-SNRPN и не кодируют белки [120, 137, 138]. Среди них пять однокопийных генов мяРНК (SNORD64, SNORD107, SNORD108, SNORD109А и SNORD109В) и два гена, SNORD115 и SNORD116, которые включают кластеры повторяющихся последовательностей, кодирующих мяРНК, содержащие C/D-box. Эти мяРНК расположены в интронах "материнского" локуса SNHG14, который кодирует нетранслируемый транскрипт, экспрессирующийся с отцовской хромосомы, наиболее активно в мозге [139]. Класс С/D мяРНК участвует в регуляции 2'-О-метилирования рРНК в результате привлечения рибонуклеопротеиновых комплексов, включая фибрилларин, который катализирует метилирование [140].

У человека SNORD115 экспрессируется исключительно в нейронах и участвует в PHK-редактировании рецептора 5HTR2C [141]. SNORD116 локализуется в ядрышке и может участвовать в сплайсинге, модификации PHK и посттранскрипционной регуляции, хотя его точная роль в геноме еще не определена [112, 142]. Изолированные делеции SNORD116 как у человека, так и у мыши, приводят к появлению фенотипа синдрома Прадера–Вилли [110, 112, 143]. мяPHK, процессированные из интронов SNORD116 и SNORD115, называемые 116HG и 115HG, локализуются в форме PHK-"облака" в районах их собственной транскрипции в ядре нейронов и могут регулировать функционирование многих генов [112, 144, 145].

UBE3A-ATS входит в состав днРНК SNHG14 и экспрессируется с промотора SNRPN на отцовской хромосоме [119]. На основе тканеспецифичных паттернов транскрипции SNHG14 человека можно разделить на две функциональные единицы [119]. Проксимальная часть транскрипта SN-*HG14/SNRPN* включает две мРНК, кодирующие белки SNURF и SNRPN; две днРНК с 5'-концами мяРНК и полиаденилированными 3'-концами, названные SPA1 и SPA2 и участвующие в связывании белков и альтернативном сплайсинге мРНК [146, 147]; некодирующий "материнген нескольких мяРНК, содержащих ский" С/D-бокс (SNORD109A, SNORD107, SNORD108 и SNORD116) [119], и IPW, кодирующий полиаденилированную днРНК [148], являются экзонами проксимальной части SNHG14, которая транскрибируется во всех тканях [149, 150].

Показано, что днРНК SPA2 и IPW могут участвовать в регуляции экспрессии других генов. В частности, днРНК IPW участвует в регуляции импринтированной области *DLK1-DIO3* и экспрессии импринтированного гена *MEG3* на хромосоме 14. Некоторые клинические особенности синдрома Прадера—Вилли могут быть вызваны аномальной экспрессией материнских аллелей генов в области *DLK1-DIO3* [109].

Дистальная часть SNHG14, которая включает еще один "материнский" некодирующий ген, содержащий мяРНК (SNORD115 и SNORD109В), и некодирующий UBE3A-ATS, транскрибируется почти исключительно в головном мозге [119, 120, 151]. Район, разделяющий экспрессирующуюся проксимальную часть SNHG14 и инактивированную дистальную часть, включает участок слабых сайтов полиаденилирования и консервативные последовательности в последнем экзоне IPW, а также кластер сайтов связывания СТСГ внутри и вокруг еще одного экзона SNHG14 – PWAR1/PAR1. Хотя оба элемента вносят вклад в разделительную функцию, IPW играет большую роль и необходим для полной остановки транскрипции в ненейрональных клетках [152]. Это подтверждает, что *UBE3A-ATS* инактивирует отцовский аллель **UBE3A** посредством транскрипционной интерференции.

Импринтированные гены проксимального района (*MKRN3*, *MAGEL2*, *NECDIN*, *PWRN1*, *NPAP1/ C15orf2*) метилированы на материнской хромосоме и экспрессируются с отцовской.

Ген *MKRN3* представлен одним экзоном, экспрессируется во всех тканях и кодирует белок, содержащий мотивы цинковых пальцев (подробнее в разделе "Центральное преждевременное половое созревание типа 2").

Ген *MAGEL2* также представлен одним экзоном, он кодирует MAGEL2, принадлежащий семейству белков MAGE, а мутации в нем приводят к возникновению фенотипа, сходного с фенотипом синдрома Прадера—Вилли (подробнее в разделе "Синдром Шаафа—Янга"). Белки MAGE взаимодействуют с Е3-убиквитин-лигазами, содержащими мотив RING-цинкового пальца, с убиквитинспецифическими протеазами (деубиквитиназами) и влияют на убиквитинирование белков субстратов [153, 154].

Ген *NDN* содержит один экзон, кодирует белок NECDIN, также принадлежащий к семейству MAGE, участвует в дифференцировке и созревании нейронов, а также супрессирует рост практически всех постмитотических нейронов в мозгу [155].

Ген *PWRN1* (Prader–Willi Region Non-Protein Coding RNA 1) кодирует днРНК, которая биаллельно экспрессируется в семенниках и почках, моноаллельно – в головном мозге, и представляет собой альтернативный 5'-район *SNURF–SNRPN*. Предполагается, что роль *PWRN1* может заключаться в поддержании открытой конформации хроматина на отцовском аллеле и обеспечении доступа факторов транскрипции [156].

Ген *NPAP1/C15orf2* кодирует белок, ассоциированный с ядерными порами; он входит в состав комплекса ядерных пор, основная функция которого связана с регуляцией транспорта макромо-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

лекул между ядром и цитоплазмой, а также с регуляцией экспрессии генов, биогенезом мРНК и контролем клеточного цикла. Ген содержит один экзон, экспрессируется биаллельно в семенниках взрослого организма и моноаллельно в мозге плода, включая гипоталамус, что может быть связано с некоторыми эндокринными особенностями синдрома Прадера—Вилли [157, 158].

Единственный импринтированный ген в дистальной части импринтированного района — это *UBE3A*. Ген *UBE3A* экспрессируется моноаллельно с материнского аллеля в головном мозге, тогда как отцовский аллель импринтирован. Инактивация экспрессии отцовского аллеля *UBE3A* вызвана экспрессией нейрон-специфичного антисмыслового транскрипта UBE3A-ATS отцовского аллеля [119, 159].

Ген *UBE3A*, состоящий из 16 экзонов, кодирует E6-AP-убиквитин-протеин-лигазу [160]. Этот ген экспрессируется биаллельно во всех тканях, только в ряде структур мозга *UBE3A* активен лишь на материнской хромосоме [161]. У мышей ген *Ube3a* моноаллельно экспрессируется в клетках Пуркинье коры мозжечка, нейронах гиппокампа и обонятельной луковицы [162]. Структурная или функциональная инактивация материнского аллеля *UBE3A* приводит к фенотипу синдрома Ангельмана.

В 200 т.п.н. дистальнее гена *UBE3A* расположен ген, кодирующий аминофосфолипидтранспортирующую ATPa3y ATP10C. Изначально предполагалось, что он экспрессируется преимущественно с материнского аллеля в фибробластах и различных структурах мозга, а его функция состоит в поддержании контактов между клеточными мембранами и передаче сигналов в ЦНС, однако оказалось, что этот ген не подвержен импринтингу [163]. Вполне вероятно, что отсутствие экспрессии гена в мозге при делеционных формах синдрома Ангельмана может приводить к более тяжелым симптомам, связанным с тяжелой формой аутизма.

Патогенез эпилептических припадков при синдроме Ангельмана связывают с кластером GABA-рецепторных генов, которые попадают в область частых делеций. Один из этих генов -*GABRB3* – кодирует β3-субъединицу GABA-рецептора [164]. У экспериментальных мышей, несущих гомозиготную делецию гена Gabrb3, отмечают нарушения памяти, неспособность к обучению, судорожные припадки и моторные нарушения. сходные с симптомами синдрома Ангельмана. У животных, гетерозиготных по этой делеции, неврологические расстройства менее выражены [165]. Следовательно, в случае протяженной делеции клинические проявления синдрома Ангельмана могут быть обусловлены гаплонедостаточностью гена *GABRB3* [166].

В область делеций при синдромах Ангельмана и Прадера—Вилли попадает также ген *OCA2*, кодирующий трансмембранный белок меланосомы. Потеря обоих аллелей этого гена приводит к альбинизму, а у гетерозиготных носителей мутации наблюдается незначительное снижение пигментации. Действительно, гипопигментация кожи при синдромах Прадера—Вилли и Ангельмана возникает только в случае протяженных делеций критического района, но отсутствует у пациентов с ОРД, мутациями IC и точковыми мутациями в гене *UBE3A* [118, 167].

Молекулярная патология, вызывающая синдромы Прадера—Вилли и Ангельмана

Наиболее распространенная причина возникновения синдромов Прадера-Вилли и Ангельмана – протяженная делеция в критическом районе 15(q11.2-q13). Эту делецию обнаруживают у 65-75% пациентов, а в популяции ее частота составляет 0.67-1.0 на 10000 новорожденных. Таким образом, делеция критического района на отцовской хромосоме 15 приводит к развитию синдро-Прадера-Вилли, ма тогда как синдром Ангельмана возникает в случае делеции той же области на ее материнском гомологе [168-170]. У ряда пациентов с диагнозом синдром Прадера-Вилли выявлены микроделеции кластера SNORD116 протяженностью около 400 т.п.н. [110, 171]. Наименьшая микроделеция ограничена кластером SNORD116, частью IPW и транскриптом SPA2. Эти микроделеции показывают, что область между SNRPN и UBE3A, в частности кластер SNORD116, могут иметь решающее значение для формирования ключевых фенотипических проявлений синдрома Прадера-Вилли [172]. Поскольку этот импринтированный район имеет большую гомологию с соответствующим районом мыши, создано несколько моделей с делецией SNORD116. У мышей с делецией наблюдались фенотипические признаки, характерные для синдрома Прадера-Вилли, такие как проблемы с моторным обучением, плохая память, гиперфагия, задержка роста и повышенная тревожность [110].

Вторая наиболее частая причина развития синдромов Прадера–Вилли и Ангельмана – ОРД. Материнская ОРД регистрируется в 20–30% случаев синдрома Прадера–Вилли. У большинства больных с синдромом Прадера–Вилли, имеющих ОРД, определяют гетеродисомию, обусловленную нерасхождением материнских хромосом в первом делении мейоза, реже – изодисомию в результате нерасхождения материнских хромосом во втором делении мейоза или сегментную дисомию в результате патологии кроссинговера [170, 173]. Это можно объяснить большей выживаемостью зигот с трисомией по хромосоме 15 и ранней гибелью моносомных зигот. Отцовская ОРД становится причиной заболевания у 3-7% пациентов с синдромом Ангельмана; ОРД при этом синдроме, как правило, манифестирует изодисомией, обусловленной нерасхождением отцовских хромосом во втором делении мейоза, и возникает путем коррекции моносомии до дисомии или, что более вероятно, в результате постзиготических событий [111, 173, 174]. Так как зиготы, несущие моно- или трисомию по хромосоме 15, нежизнеспособны, удвоение единственной хромосомы при моносомии и потерю лишней хромосомы при трисомии можно считать "аварийными" мерами, после которых возможным становится дальнейшее развитие эмбриона. Потерю лишней хромосомы в трисомной клетке, по-видимому, можно рассматривать как событие, более вероятное, чем удвоение хромосомы в моносомной клетке на ранней стадии развития, что может объяснить разную частоту ОРД при синдромах Прадера-Вилли и Ангельмана.

Патология импринтинга при синдромах Прадера-Вилли и Ангельмана составляет не более 1 и 3%, соответственно, и может быть представлена либо трудно определяемой структурной патологией в IC, либо эпигенетическими изменениями, влияющими на метилирование и экспрессию генов во всем импринтированном районе [175]. В обоих случаях пациенты наследуют хромосому 15 от каждого из родителей. Если на материнской хромосоме отсутствует метилирование в PWS-IC, то это приведет к биаллельной экспрессии SNHG14 и инактивации материнского UBE3A. Патология импринтинга в 10–15% случаев связана с небольшой делецией, затрагивающей AS-IC, который регулирует установление и поддержание импринтинга на материнской хромосоме [176]. Более 85% патологии импринтинга при синдроме Ангельмана вызываются именно эпимутацией без изменений на уровне ДНК. В таких случаях материнская хромосома, несущая эпимутацию – неправильный отцовский эпигенотип/импринт (совокупность модификаций ДНК и гистоновых белков, которые маркируют родительские аллели и обеспечивают моноаллельный характер экспрессии импринтированных генов), может быть унаследована от деда или бабушки по материнской линии. Патология импринтинга вызвана ошибкой в установлении/переключении импринта в гаметогенезе или в результате неспособности его сохрания на самых ранних стадиях эмбрионального развития [131]. Достаточно часто при синдроме Ангельмана выявляют соматический мозаицизм по эпимутации, что свидетельствует о том, что она может происходить уже после оплодотворения на первых стадиях дробления [177].

Патология импринтинга при синдроме Прадера-Вилли представлена аномальным метилированием PWS-IC, в результате чего прекращается экспрессия импринтированных генов на отцовской хромосоме; 10–15% из них представлены микроделециями PWS-IC как унаследованными, так и возникшими во время сперматогенеза или после оплодотворения. Основная масса случаев представлена эпимутациями, которые считаются случайными ошибками в процессе установления отцовского импринта или в результате невозможности переключить материнский импринт на отцовский во время сперматогенеза, или невозможности его поддержания в раннем эмбриогенезе, если выявлен соматический мозаицизм [131, 175].

Мутации в гене UBE3A установлены в 10-15% случаев синлрома Ангельмана и прелставляют собой мутации материнского аллеля с преждевременной терминацией синтеза белка. Большинство известных мутаций нарушают домен НЕСТлигазы. Около 29% мутаций наследуются от матери и 71% возникает de novo. Преобладают мутации со слвигом рамки считывания и нонсенс-мутании. Миссенс-мутации, по-видимому, не нарушают существенно функцию белкового продукта, и фенотип таких пациентов отличается от фенотипа, характерного для синдрома Ангельмана. Мутации гена UBE3A на отцовской хромосоме фенотипически не проявляются [169, 178-181]. Атипичные делеции UBE3A или редкие типы структурных перестроек, нарушающих критический район, зарегистрированы только у небольшого количества пациентов с синдромом Ангельмана [182, 183].

Дефицит материнской копии гена в клетках Пуркинье может объяснить атаксию и тремор, возникающие при синдроме Ангельмана, а эпилептические припадки и невозможность обучения таких больных могут быть связаны с отсутствием экспрессии этого гена в нейронах гиппокампа [162].

Синдром Шаафа—Янга (ОМІМ #615547), сходный с синдромом Прадера—Вилли (табл. 1), обусловлен нонсенс- и миссенс-мутациями в гене *MAGEL2*, который импринтирован на материнской хромосоме, а экспрессируется с отцовской [184, 185]. Фенотипические проявления варьируют от тяжелой фетальной акинезии до легкой степени выраженности, включая умственную отсталость и контрактуры пальцев [186].

МАGEL2 регулирует убиквитинирование, необходимое для утилизации белков [187, 188]. Интересно, что мутации, определяющие появление укороченного белкового продукта гена *MAGEL2*, вызывают синдром Шаафа—Янга, тогда как делеция всего гена приводит лишь к незначительно выраженному клиническому фенотипу или к полному отсутствию симптомов. Поскольку *MAGEL2* содержит только один экзон, мутации могут приводить к образованию укороченного белка с доминантно-негативным эффектом. Вполне вероятно, что делеция всей отцовской копии гена, включая промотор, может привести к частичному восстановлению экспрессии материнского метилированного аллеля [189, 190].

Еще одно заболевание — центральное преждевременное половое созревание типа 2 (ОМІМ #615346), также известное, как гонадотропинзависимое преждевременное половое созревание (табл. 1) [191, 192].

Наиболее часто при этом заболевании выявляют мутации потери функции гена MKRN3. Этот ген кодирует белок из 507 аминокислот с мотивом цинкового пальца RING (C3HC4) и множеством мотивов цинкового пальца СЗН, что предопределяет функцию связывания РНК MKRN3. Ген представлен одним экзоном, экспрессируется во всех типах тканей с образованием транскрипта около 3 т.н. Вся кодирующая последовательность и 5'-СрG-островок перекрывают второй ген, ZNF127AS, который транскрибируется с антисмысловой цепи с другим паттерном экспрессии и размером транскрипта. Антисмысловая РНК ZNF127AS с неизвестной функцией, вероятно, регулирует экспрессию MKRN3. Аллельспецифичный анализ показал, что ген MKRN3 экспрессируется только с отцовского аллеля, а материнский аллель импринтирован [193]. Поэтому все пациенты с семейной формой заболевания наследуют мутации MKRN3 от своих отцов [194].

В настоящее время идентифицировано множество мутаций в кодирующей области гена *MKNR3* – делеции, нонсенс- и миссенс-мутации, мутации со сдвигом рамки считывания, приводящие к потере функции [195, 196]. Кроме того, опубликованы сообщения о мутациях промоторного района и сайта начала транскрипции, нарушающих нормальную экспрессию гена *MKNR3* [197].

MKRN3 может снижать пульсирующую секрецию GnRH и регулировать начало полового созревания. Уровень MKRN3 снижается в период полового созревания и отрицательно коррелирует с уровнем гонадотропинов у девочек в препубертате. Его уровень в крови снижается во время полового созревания у здоровых мальчиков, но точный механизм его действия еще предстоит выяснить [198].

Еще одна причина центрального преждевременного полового созревания типа 2 — мутации гена *DLK1*, расположенного в импринтированном районе хромосомы 14q32.2. Экспрессируется (как и у гена *MKRN3*) только отцовский аллель гена *DLK1*, тогда как материнский импринтирован (более подробно рассмотрено в разделе "Импринтированный район хромосомы 14q32.2"). Предполагается возможность участия импринтированного гена *KCNK9* (отцовский аллель), полиморфные варианты которого описаны в связи с ранним возрастом менархе, в патогенезе центрального преждевременного полового созревания типа 2 [199].

Следует, также упомянуть еще об одном состоянии — дупликации импринтированного района хромосомы 15q(11.2-q13.1) (ОМІМ #608636). У носителей дупликации импринтированного района материнского происхождения наблюдается гипотония и задержка моторного развития, задержка физического и умственного развития, судороги, аутизм и другие поведенческие аномалии, в частности, психозы. Причем тяжесть этих симптомов значительно различаются даже у лиц с одинаковым генотипом. Пациенты с изодицентрической хромосомой материнского происхождения (тетрасомия импринтированного района), как правило, страдают более серьезно, чем пациенты с интерстициальной дупликацией. Подобная патология отповского происхождения фенотипически не проявляется [200-203].

Импринтированный локус хромосомы 20q13.2 и ряд заболеваний, связанных с патологией гена GNAS

Локус *GNAS*, картированный на хромосоме 20q13.2, представляет собой сложно организованный импринтированный район, в котором возможна отцовская, материнская или биаллельная экспрессия транскриптов в различных тканях. Gs α (альфа-стимулирующая субъединица G-белка), кодируемая экзонами 1–13, не имеет DMR и экспрессируется биаллельно в большинстве тканей за исключением проксимальных почечных канальцев, неонатальной бурой жировой ткани, щитовидной железы, гонад, паравентрикулярного ядра гипоталамуса и гипофиза, где он экспрессируется с материнского аллеля, хотя промотор отцовского аллеля не метилирован [204, 205].

Три альтернативных первых экзона этого локуса (A/B, XLas и NESP55) сплайсируются с экзонами 2–13 с образованием различных транскриптов. В непосредственной близости от альтернативных экзонов расположены DMR, что приводит к экспрессии NESP55 только с материнской хромосомы (его DMR метилирован на отцовской хромосоме), а XLas, экзон A/B и антисмысловой транскрипт NESP55AS/GNAS-AS1 экспрессируются с отцовской хромосомы, так как материнские DMR метилированы [205–207].

Более протяженный вариант белка Gsa - XLas - синтезируется преимущественно в нейроэндокринных тканях и нервной системе; известны также укороченные нейральные транскрипты <math>Gsa u XLas, называемые GsaN1 u XLN1, которые преждевременно терминируются перед экзоном 4. Оба белка отличаются только N-концевой областью. Другой продукт гена GNAS - NESP55 -хромогранинподобный нейроэндокринный секреторный белок. Как и XLas, альтернативный экзон сплайсируется с экзонами 2–13, но NESP55 не имеет гомологии с белком Gsa, поскольку содержит терминирующий кодон. Два других транскрипта — A/B и AS1, у которых есть свои собственные экзоны, не перекрываются ни с одним из других экзонов, экспрессируются во всех тканях с отцовской хромосомы, но не транслируются [206–208].

В локусе *GNAS* обнаружены два регуляторных района, представляющие собой IC. Один из них, расположенный в интроне 4 гена *STX16*, контролирует установление дифференциального метилирования только в районе альтернативного промотора *GNAS A/B*. Второй IC, расположенный в районе экзонов 3–4 антисмыслового транскрипта *GNAS-AS1*, контролирует установление импринтинга по всему локусу [209].

Ген STX16, кодирующий синтаксин 16, участвующий в межклеточных взаимодействиях, картирован в 220 т.п.н. центромернее локуса GNAS. Очевидно, что этот ген не может быть вовлечен в патогенез заболевания, но у всех пациентов с материнской делецией наблюдается потеря метилирования в районе экзона A/B; она нарушает *cis*-действующий элемент, контролирующий импринтинг, который устанавливает и/или поддерживает метилированный статус DMR экзона А/В на материнской хромосоме [205]. В большинстве случаев выявляются два варианта делеций: делеция 3 т.п.н. с потерей экзонов 4–6 или 4.4 т.п.н. – с потерей экзонов 2-4. Наименьший район перекрывания делеций содержит СрG-обогащенный участок, который не подвержен дифференциальному метилированию. Делеции STX16 не ограничены только этим районом, описаны большие делеции и делеции всего гена [210, 211].

В нескольких случаях патологии импринтинга локуса *GNAS* обнаружены материнские делеции в экзонах 3 и 4 или микроделеции 40 и 33 п.н. в интронах 4 и 3 *GNAS-AS1*, что привело к потере метилирования в четырех DMR и появлению биаллельного метилирования DMR экзона *NESP55*. Эти делеции полностью уничтожают материнский импринт локуса *GNAS*, приводя к биаллельной экспрессии *XL*, *A/B* и антисмыслового транскрипта, указывая на то, что в районе антисмысловых экзонов 3 и 4 содержится еще один регуляторный элемент, необходимый для полноценного метилирования *GNAS* [207, 212, 213].

Молекулярно-генетическая и эпигенетическая патология локуса *GNAS* обуславливает возникновение гетерогенной группы эндокринопатий, объединяемой термином псевдогипопаратиреоз, которые характеризуются почечной резистентностью к паратгормону, вызывающей гипокальциемию, гиперфосфатемию и повышением уровня циркулирующего паратгормона. Помимо повышенного уровня паратгормона, у больных часто развивается резистентность к другим гормонам, таким как тиреотропный, действие которых опосредуется через рецепторы, связанные с Gsα. В зависимости от молекулярных нарушений псевдогипопаратиреоз включает другие эндокринные патологии, связанные с резистентностью к воздействию ряда гормонов и некоторыми неэндокринными особенностями. В целом, распространенность псевдогипопаратиреоза оценивается как 1.1 на 100000. Возникновение клинически гетерогенных фенотипов связано со структурными и функциональными изменениями гена *GNAS* [209].

Псевдогипопаратиреоз типа 1А (OMIM #103580), обусловленный мутациями с потерей функции в материнском аллеле гена *GNAS*, имеет характерные клинические признаки (табл. 1) [206, 214].

Потеря функции Gsa на отцовском аллеле вызывает псевдопсевдогипопаратиреоз (OMIM #612463). Тубулярные клетки почки экспрессируют преимущественно материнский аллель GNAS, поэтому мутация, унаследованная от отца, приводит к нормальному ответу почки на паратгормон (табл. 1) [215]. Отцовские мутации с потерей функции могут приводить к прогрессирующей костной гетероплазии (ОМІМ#166350) (табл. 1) [216]. При псевдопсевдогипопаратиреозе и прогрессирующей костной гетероплазии экспрессия Gsα в эритроцитах снижена в 2 раза, хотя в норме GNAS экспрессируется биаллельно. Фенотип наследственной остеодистрофии Олбрайт может быть вызван гаплонедостаточностью Gsa в тканях, где GNAS экспрессируется с обоих аллелей.

Напротив, псевдогипопаратиреоз типа 1В (ОМІМ #603233) характеризуется изолированной почечной резистентностью к паратгормону, а в некоторых случаях резистентностью к тиреотропному гормону. У таких пациентов редко встречается фенотип наследственной остеодистрофии Олбрайт (табл. 1) [209, 215, 217].

Все пациенты с псевдогипопаратиреозом типа 1В имеют по крайней мере потерю метилирования материнского аллеля DMR GNAS A/B, что приводит к биаллельной экспрессии А/В-транскрипта и снижению экспрессии транскрипта GNAS-Gsα в тканях, подверженных импринтингу; гормональная резистентность обусловлена потерей метилирования материнского аллеля [204]. В основной массе спорадических случаев псевдогипопаратиреоза типа 1В, сопровождающихся нарушением импринтинга как DMR экзона A/B, так и всех DMR локуса GNAS. При отсутствии делеций в районе STX16, DMR NESP55 и отцовской ОРД можно предполагать существование молекулярных нарушений в других отдаленных регуляторных районах, которые еще требуется определить. Если у пациентов с псевдогипопаратиреозом типа 1А обнаруживают, как правило, мутации в GNAS, то у пациентов с псевдогипопаратиреозом типа 1В такие мутации до сих пор не обнаружены. Поскольку при заболевании нарушается экспрессия $G_{S\alpha}$, правильное метилирование на материнской хромосоме экзона A/B, располагающегося в непосредственной близости от промотора $Gs\alpha$, — необходимое условие экспрессии этого белка, по крайней мере, в проксимальных почечных канальцах [209]. Около 20% случаев псевдогипопаратиреоза типа 1В наследуются и вызываются делециями в IC, в то время как остальные 80% являются спорадическими и связаны с аномалиями метилирования, охватывающими весь локус GNAS [211, 215].

Полная или сегментная отцовская ОРД по хромосоме 20 может достигать 24% и сопровождается фенотипом спорадического псевдогипопаратиреоза типа 1В [218].

Материнская ОРД по хромосоме 20 (табл. 1) возникает, как правило, в результате редукции трисомии, произошедшей при нерасхождения хромосом во время второго деления мейоза, до дисомии и формирует клинические признаки синдрома Мулчандани–Божж–Конлин (ОМІМ #617352) [219, 220].

Множественные аномалии метилирования импринтированных регуляторных районов (MLID)

С 2006 г. начали обсуждать вопрос о новой болезни импринтинга, обусловленной материнским гипометилированием различных импринтированных локусов – MLID (multi-locus imprinting disturbances) [221]. Описана семья (близкородственный брак), в которой две дочери имели фенотипические признаки транзиторного неонатального сахарного диабета с некоторыми симптомами синдрома Беквита-Видеманна. Изучение статуса метилирования импринтированных районов показало, что потеря метилирования произошла не только в импринтированном районе *PLAGL1* (6q24), но и в районах KCNQ10T1 (11p15.5), GRB10 (7p11.2-p12), PEG3 (19q13), PEG1/MEST (7q32) и NESP55AS (20q13). Предположили, что в этой семье существовал некий аутосомно-рецессивный дефект, приводящий к нарушению механизмов метилирования у потомства, или был нарушен процесс установления импринтинга в ооцитах [222].

В результате исследований у пациентов с транзиторным неонатальным сахарным диабетом и MLID обнаружили мутации в гене ZFP57 [223]. Описаны 14 семей, в ZFP57 у которых выявлены миссенс- и нонсенс-мутации. Все пациенты имели очень похожие паттерны метилирования импринтированных DMR: полное гипометилирование DMR PLAGL1 и комбинации мозаичного гипометилирования GRB10, PEG3, MEST, NAP1L5 и GNAS [27].

ZFP57 кодирует репрессор транскрипции, который содержит Kruppel-ассоциированный боксдомен (KRAB), кодируемый экзонами 4 и 5, и семь мотивов цинковых пальцев в экзоне 6. Основная функция белка заключается в поддержании метилирования ДНК в герминальных DMR посредством связывания метилированного гексануклеотида TGC^{met}CGC [224]. ZFP57 формирует комплекс с белком-корепрессором КАР1 (КRАВ-ассоциированный белок-1). КАР1 действует как каркас инактивирующего комплекса. который включает гистон-лизин-метилтрансферазу (SETDB1), комплекс ремоделирования нуклеосом и деацетилирования (NuRD), белок 1 гетерохроматина (HP-1), DNMT1 и UHRF1, необходимые для поддерживающего метилирования ДНК. Белки, содержащие мотивы цинковых пальцев и KRAB-домен, действуют как репрессоры транскрипции посредством индукции КАР1 гетерохроматина и метилирования ДНК в ранних эмбриональных клетках [225]. Таким образом, этот белковый комплекс играет огромную роль в регуляции и поддержании метилирования ДНК в различных импринтированных DMR [226]. Поэтому гетерозиготные мутации ZFP57, приводящие к потере или появлению дефектного белка, нарушают метилирование различных ІС, что приводит к потере импринтинга [27, 227, 228].

ZFP57 связывается с метилированными IC в ходе преимплантационного развития, защищая их от деметилирования и сохраняя родительскую идентичность. Сайт связывания ZFP57 обнаружен в 17 из 31 импринтированного DMR, а в результате его мутаций наиболее часто нарушается метилирование *PEG3*, *PLAGL1*, *INPPF5*, *NAP1L5* и *GRB10* [228].

Профиль экспрессии еще одного члена семейства белков с мотивом цинкового пальца, ZNF445, его устойчивость к мутациям с потерей функции, возможность связываться с КАР1 и формировать гетерохроматин в районах ІС говорит о его важной роли в поллержании метилирования на ранних этапах развития эмбриона. Нокдаун гена приводит к невозможности связывания КАР1 и метилирования Н3К9те3, следовательно, увеличивается экспрессия генов, происходит потеря метилирования в IC, включая H19. Все это подтверждает, что ZNF445, как и ZFP57, может связываться с ІС, привлекать КАР1 и запускать метилирование H3K9me3 [229]. В то же время эти два гена экспрессируются не одновременно сначала ZNF445, а затем ZFP57, поэтому они рекрутируют КАР1 по очереди. ZNF445 связывается с 13 импринтированными DMR – DIRAS3, ZDBF2, MEST, PEG 13, H19, KCNQ10T1, MEG3-DLK1, MEG3, NET, GNAS-NESP55, GNAS-AS1, GNAS-XL и SNU13. Эти два белка работают в унисон, чтобы сохранить импринты (метилирование) DMR во время раннего эмбрионального развития [228].

Еще один ген, *ZNF202*, связывает только четыре импринтированных DMR (*FAM50B*, *PLAGL1*, *KCNQ10T1* и *L3MBTL1*), однако можно предполагать, что он выполняет аналогичную функцию [228].

Белок с мотивом цинкового пальца – ZFP42, являющийся маркером стволовых клеток и активно экспрессирующийся в преимплантационном эмбрионе, выполняет функцию защиты от метилирования обычно неметилированных аллелей импринтированных DMR, в частности *Peg3* и *Gnas* [230]. У одного пациента с синдромом Рассела–Сильвера и MLID с потерей метилирования *H19/IGF2* – 11p15.5 и MEST – 7q32.2, выявлена мутация этого гена, унаследованная от отца [55].

Мутации в "материнских генах", кодирующих белки субкортикального комплекса ооцита, могут вызывать репродуктивные проблемы на эпигенетическом уровне [231]. Этот комплекс играет важную роль на раннем этапе эмбрионального развития и содержит не менее семи белков (NLRP2, NLRP5, NLRP7, PADI6, KHDC3L, TLE6 и ООЕР). Эти белки экспрессируются исключительно материнским геномом в ооцитах и на ранних этапах развития эмбриона, а затем инактивируются, когда геном эмбриона начинает функционировать самостоятельно [231]. Гены NLRP2, NLRP5, NLRP7, кодирующие небольшое подсемейство цитоплазматических белков, содержащих пирин-домены, активно экспрессируются в растущих ооцитах и необходимы для созревания ооцита, регуляции метилирования на ранних стадиях эмбриогенеза и поддержания плоидности в раннем эмбрионе [231]. Патогенные варианты этих белков обнаружены у матерей детей с MLID. Эти женщины имели репродуктивные проблемы (привычное невынашивание и пузырный занос). Так, например, материнская мутация NLRP2 обнаружена у двух детей с синдромом Беквита-Видеманна и MLID. В результате мутаций NLRP5 и материнские, и отцовские импринтированные DMR теряют метилирование, что приводит к MLID. NLRP7 вовлечен в установление ооцитспецифичного метилирования, а мутации в нем приводят к рецидивирующему пузырному заносу с обширной потерей материнского метилированного импринта, в то время как отцовские метилированные DMR не изменяются [17, 232]. Мутации в генах NLRP2, NLRP5, NLRP7 сопровождаются фенотипами синдрома Беквита-Видеманна, синдрома Рассела-Сильвера и транзиторного неонатального диабета; в генах ООЕР – транзиторного неонатального сахарного диабета, UHRF1 - синдрома Рассела-Сильвера. ZAR1 – синдрома Беквита-Видеманна [17]. Мутации в гене PADI6 вызывают потерю метилирования в импринтированных DMR: KCNQ10T1, PLAGL1, GRB10, MEST, H19/IGF2, GNAS-AS1, GNAS-XL, MEG3, SNURF и могут приводить к формированию фенотипов синдромов Рассела-Сильвера, Беквита-Видеманна и Темпл [17, 233].

Другие гены субкортикального комплекса ооцитов – KHDC3L, TLE6, OOEP, UHRF1 и ZAR1, также вносят свой вклад (не столь значительный) в развитие MLID [17, 232, 233]. Молекулярно-генетические исследования позволили обнаружить MLID у части пациентов с болезнями импринтинга, вызванными эпимутациями. Частоты вклада MLID в фенотипические проявления болезней импринтинга значительно варьируют в различных исследованиях. Так, например, транзиторный неонатальный сахарный диабет с потерей метилирования PLAGL1-DMR в результате MLID по разным оценкам составляет 30-70%; синдром Рассела-Сильвера с потерей метилирования в *H19*-DMR может быть обусловлен MLID в 7-30%: синдром Беквита-Видеманна с потерей метилирования в *КСNQ10T1* или биаллельным метилированием в H19-DMR в результате MLID может составлять 20-50%. На счет MLID можно отнести 6.3-12.5% случаев псевдогипопаратиреоза типа 1В, вызванного потерей метилирования в GNAS-A/B DMR. При синдромах Прадера-Вилли и Ангельмана практически не наблюдаются нарушения метилирования, обусловленные MLID [4, 17, 18, 234].

У значительного количества пациентов с нарушениями импринтинга уже обнаружены множественные аномалии метилирования ДНК в импринтированных DMR генома. У пациентов с MLID выявлены проявления специфического "классического" фенотипа определенной болезни импринтинга, однако у некоторых из них развивается комплекс симптомов, характерных для разных синдромов, обусловленных аномалиями импринтинга, что показано выше. Кроме того, MLID часто бывают мозаичными, так как патология возникает в ограниченном количестве клеток на самых ранних этапах развития эмбриона. Поэтому очень сложно определить конкретные корреляции между эпи-/генотипом и фенотипическими проявлениями у пациентов с MLID.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последнее десятилетие достигнут большой прогресс в изучении эпигенетической регуляции экспрессии генов. Изучение структурной организации, специфического аллельного метилирования и определенной аллельной структуры хроматина в регуляторных районах, цис- и транс-взаимодействия днРНК с первичными/ герминальными (PLAGL1, H19/IGF2, PEG13, IGF2-DMR0, KCNQ10T1, RB1, MEG3/DLK1, SNURF, GNAS-AS1, GNAS-XL, GNAS A/B) и вторичными/соматическими (IGF2-DMR2, DLK1, GTL2, MEG8, MAGEL2, NDN, SNRPN, SNORD116, GNAS-*NESP*) регуляторными районами (DMR) на различных этапах онтогенеза позволяет понять, как функционирует эпигеном в норме и при патологии. Нарушения концерта этих структурных и функциональных составляющих генома могут приводить к патологическим состояниям, таким как болезни импринтинга, несиндромальные формы нарушений умственного и физического развития, многофакторные заболевания, в том числе онкологические, аутоиммунные и другие.

Геномный импринтинг играет ключевую роль в ряде онтогенетических этапов, и контролируется комплексом генов, которые моноаллельно экспрессируются в определенных тканях или типах клеток. Поэтому роль импринтированных генов в процессах развития остается наиболее активно исследуемой областью эпигенетики. Современные методы молекулярно-генетического анализа позволяют определять полнохромосомную и сегментную ОРД, где могут располагаться импринтированные гены [235-237], проводить полногеномный анализ метилирования [238, 239] или исследовать эпитранскриптом и моноаллельную экспрессию, в том числе в единичной клетке [15, 240]. В результате таких исследований количество импринтированных генов и DMR постоянно увеличивается. Следующим этапом должно стать выяснение роли этих генов в онтогенезе и вклада патологии метилирования в фенотипические проявления. Справедливо полагать, что причиной ряда синдромальных состояний и неспецифических форм внутриутробной/постнатальной задержки развития, где молекулярный дефект еще неизвестен, станут эпигенетические нарушения, представленные аномальным метилированием ДНК, нарушенной структурой хроматина и изменениями в экспрессии днРНК. Также нельзя не учитывать и структурные нарушения генов, участвующих в установлении и поддержании моноаллельной экспрессии генов как в герминативных клетках, так и на ранних этапах развития эмбриона. Мутации в таких генах могут приводить к феномену MLID, а это, в свою очередь, будет требовать разработки диагностических протоколов, позволяющих определить молекулярно-генетическую патологию и избежать фенотипических проблем у потомства. Современные достижения молекулярной биологии и генетики вселяют оптимизм, что в следующем десятилетии закономерности функционирования и взаимодействия генома и эпигенома позволят не только проводить высокотехнологичную молекулярно-генетическую диагностику заболеваний, в основе которых лежат нарушения эпигенетической регуляции, но и разработать эффективные способы лечения подобных заболеваний.

Авторы выражают благодарность И.В. Буре за помощь в подготовке рукописи.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-14-50138.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- McGrath J., Solter D. (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell.* 37, 179–183.
- Surani M.A., Barton S.C., Norris M.L. (1984) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*. 308, 548–550.
- 3. Саженова Е.А., Лебедев И.Н. (2021) Эволюционные аспекты геномного импринтинга. *Молекуляр. биология*. **55**, 3–19.
- 4. Monk D., Mackay D.J.G., Eggermann T., Maher E.R., Riccio A. (2019) Genomic imprinting disorders: lessons on how genome, epigenome and environment interact. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 235–248.
- Singh P., Wu X., Lee D.-H., Li A.X., Rauch T.A., Pfeifer G.P., Mann J.R., Szabó P.E. (2011) Chromosome-wide analysis of parental allele-specific chromatin and DNA methylation. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1757–1770.
- Sanli I., Feil R. (2015) Chromatin mechanisms in the developmental control of imprinted gene expression. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 67, 139–147.
- Kota S.K., Llères D., Bouschet T., Hirasawa R., Marchand A., Begon-Pescia C., Sanli I., Arnaud P., Journot L., Girardot M., Feil R. (2014) ICR noncoding RNA expression controls imprinting and DNA replication at the Dlk1–Dio3 domain. *Dev. Cell.* 31, 19–33.
- Kanduri C. (2016) Long noncoding RNAs: lessons from genomic imprinting. *Biochim. Biophys. Acta.* 1859, 102–111.
- Abi Habib W., Brioude F., Azzi S., Rossignol S., Linglart A., Sobrier M-L., Giabicani É., Steunou V., Harbison M.D., Le Bouc Y., Netchine I. (2019) Transcriptional profiling at the DLK1/MEG3 domain explains clinical overlap between imprinting disorders. *Sci. Adv.* 5, eaau9425.
- MacDonald W.A., Mann M.R.W. (2020) Long noncoding RNA functionality in imprinted domain regulation. *PLoS Genet.* 16, e1008930.
- 11. Horsthemke B. (2014) In brief: genomic imprinting and imprinting diseases. *J. Pathol.* **232**, 485–487.
- Barlow D.P., Bartolomei M.S. (2014) Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6(2), a018382. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018382
- Tucci V., Isles A.R., Kelsey G., Ferguson-Smith A.C., Erice Imprinting Group. (2019) Genomic imprinting and physiological processes in mammals. *Cell.* 176, 952–965.
- 14. Patten M.M., Cowley M., Oakey R.J., Feil R. (2016) Regulatory links between imprinted genes: evolutionary predictions and consequences. *Proc. Biol. Sci.*

283(1824), 20152760.

https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2760

- Jadhav B., Monajemi R., Gagalova K.K., Ho D., Draisma H.H.M., van de Wiel M.A., Franke L., Heijmans B.T., van Meurs J., Jansen R., GoNL Consortium, BIOS Consortium, 't Hoen PAC, Sharp A.J., Kiełbasa S.M. (2019) RNA-Seq in 296 phased trios provides a high-resolution map of genomic imprinting. *BMC Biol.* 17, 50.
- Chaves T.F., Oliveira L.F., Ocampos M., Barbato I.T., de Luca G.R., Barbato Filho J.H., de Camargo Pinto L.L., Bernardi P., Maris A.F. (2019) Long contiguous stretches of homozygosity detected by chromosomal microarrays (CMA) in patients with neurodevelopmental disorders in the South of Brazil. *BMC Med. Genomics.* 12, 50.
- Elbracht M., Mackay D., Begemann M., Kagan K.O., Eggermann T. (2020) Disturbed genomic imprinting and its relevance for human reproduction: causes and clinical consequences. *Hum. Reprod. Update.* 26, 197– 213.
- Cerrato F., Sparago A., Ariani F., Brugnoletti F., Calzari L., Coppedè F., De Luca A., Gervasini C., Giardina E., Gurrieri F., Lo Nigro C., Merla G., Miozzo M., Russo S., Sangiorgi E., Sirchia S.M., Squeo G.M., Tabano S., Tabolacci E., Torrente I., Genuardi M., Neri G., Riccio A. (2020) DNA methylation in the diagnosis of monogenic diseases. *Genes* (Basel). 11(4), 355.

https://doi.org/10.3390/genes11040355

- Temple I.K., Mackay D.J. (1993) Diabetes mellitus, 6q24-related transient neonatal. In: *GeneReviews*®. Eds Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A., Wallace S.E., Bean L.J., Mirzaa G., Amemiya A. Seattle (WA): Univ. Washington, Seattle; 1993–2021. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1534/
- Temple I.K., Gardner R.J., Robinson D.O., Kibirige M.S., Ferguson A.W., Baum J.D., Barber J.C., James R.S., Shield J.P. (1996) Further evidence for an imprinted gene for neonatal diabetes localised to chromosome 6q22–q23. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1117–1121.
- Gardner R.J., Mackay D.J., Mungall A.J., Polychronakos C., Siebert R., Shield J.P., Temple I.K., Robinson D.O. (2000) An imprinted locus associated with transient neonatal diabetes mellitus. *Hum. Mol. Genet.* 9, 589–596.
- 22. Su H.-C., Wu S.-C., Yen L.-C., Chiao L.-K., Wang J.-K., Chiu Y.-L., Ho C.-L., Huang S.-M. (2020) Gene expression profiling identifies the role of Zac1 in cervical cancer metastasis. *Sci. Rep.* **10**, 11837.
- 23. Hoffmann A., Spengler D. (2015) Role of ZAC1 in transient neonatal diabetes mellitus and glucose metabolism. *World J. Biol. Chem.* **6**, 95–109.
- Iglesias-Platas I., Court F., Camprubi C., Sparago A., Guillaumet-Adkins A., Martin-Trujillo A., Riccio A., Moore G.E., Monk D. (2013) Imprinting at the PLAGL1 domain is contained within a 70-kb CTCF/cohesin-mediated non-allelic chromatin loop. *Nucl. Acids Res.* 41, 2171–2179.
- 25. Varrault A., Dantec C., Le Digarcher A., Chotard L., Bilanges B., Parrinello H., Dubois E., Rialle S., Severac D., Bouschet T., Journot L. (2017) Identification of Plagl1/Zac1 binding sites and target genes estab-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

lishes its role in the regulation of extracellular matrix genes and the imprinted gene network. *Nucl. Acids Res.* **45**, 10466–10480.

- Mackay D.J.G., Coupe A.-M., Shield J.P.H., Storr J.N.P., Temple I.K., Robinson D.O. (2002) Relaxation of imprinted expression of ZAC and HY-MAI in a patient with transient neonatal diabetes mellitus. *Hum. Genet.* 110, 139–144.
- Touati A., Errea-Dorronsoro J., Nouri S., Halleb Y., Pereda A., Mahdhaoui N., Ghith A., Saad A., Perez de Nanclares G., H'mida Ben Brahim D. (2019) Transient neonatal diabetes mellitus and hypomethylation at additional imprinted loci: novel ZFP57 mutation and review on the literature. *Acta Diabetol.* 56, 301– 307.
- Kerr E.R., Stuhlmiller G.M., Maha G.C., Ladd M.A., Mikhail F.M., Koester R.P., Hurst A.C.E. (2018) Maternal uniparental isodisomy for chromosome 6 discovered by paternity testing: a case report. *Mol. Cytogenet.* 11, 60.
- Court F., Camprubi C., Garcia C.V., Guillaumet-Adkins A., Sparago A., Seruggia D., Sandoval J., Esteller M., Martin-Trujillo A., Riccio A., Montoliu L., Monk D. (2014) The PEG13-DMR and brain-specific enhancers dictate imprinted expression within the 8q24 intellectual disability risk locus. *Epigenetics Chromatin.* 7, 5.
- Ruf N., Bähring S., Galetzka D., Pliushch G., Luft F.C., Nürnberg P., Haaf T., Kelsey G., Zechner U. (2007) Sequence-based bioinformatic prediction and QUASEP identify genomic imprinting of the *KCNK9* potassium channel gene in mouse and human. *Hum. Mol. Genet.* 16, 2591–2599.
- Liang Z.S., Cimino I., Yalcin B., Raghupathy N., Vancollie V.E., Ibarra-Soria X., Firth H.V., Rimmington D., Farooqi I.S., Lelliott C.J., Munger S.C., O'Rahilly S., Ferguson-Smith A.C., Coll A.P., Logan D.W. (2020) Trappc9 deficiency causes parentof-origin dependent microcephaly and obesity. *PLoS Genet.* 16, e1008916.
- Zadeh N., Graham J.M. (1993) KCNK9 imprinting syndrome. In: GeneReviews®. Eds Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A., Wallace S.E., Bean L.J., Mirzaa G., Amemiya A. Seattle (WA): Univ. Washington, Seattle; 1993–2021. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK425128/
- Graham J.M., Zadeh N., Kelley M., Tan E.S., Liew W., Tan V., Deardorff M.A., Wilson G.N., Sagi-Dain L., Shalev S.A. (2016) *KCNK9* imprinting syndrome-further delineation of a possible treatable disorder. *Am. J. Med. Genet. A.* 170, 2632–2637.
- 34. Šedivá M., Laššuthová P., Zámečník J., Sedláčková L., Seeman P., Haberlová J. (2020) Novel variant in the *KCNK9* gene in a girl with Birk Barel syndrome. *Eur. J. Med. Genet.* 63, 103619.
- Kashevarova A.A., Nikitina T.V., Mikhailik L.I., Belyaeva E.O., Vasilyev S.A., Lopatkina M.E., Fedotov D.A., Fonova E.A., Zarubin A.A., Sivtsev A.A., Skryabin N.A., Nazarenko L.P., Lebedev I.N. (2020) 46,XY,r(8)/45,XY,-8 mosaicism as a possible mechanism of the imprinted Birk–Barel syndrome: a case study. *Genes* (Basel). 11(12), 1473. https://doi.org/10.3390/genes11121473

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

- Besson A., Dowdy S.F., Roberts J.M. (2008) CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev. Cell.* 14, 159–169.
- Creff J., Besson A. (2020) Functional versatility of the CDK inhibitor p57Kip2. *Front. Cell. Dev. Biol.* 8, 584590.
- Neyroud N., Richard P., Vignier N., Donger C., Denjoy I., Demay L., Shkolnikova M., Pesce R., Chevalier P., Hainque B., Coumel P., Schwartz K., Guicheney P. (1999) Genomic organization of the *KCNQ1* K+ channel gene and identification of C-terminal mutations in the long-QT syndrome. *Circ. Res.* 84, 290–297.
- Mitsuya K., Meguro M., Lee M.P., Katoh M., Schulz T.C., Kugoh H., Yoshida M.A., Niikawa N., Feinberg A.P., Oshimura M. (1999) LIT1, an imprinted antisense RNA in the human KvLQT1 locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1209–1217.
- Pandey R.R., Mondal T., Mohammad F., Enroth S., Redrup L., Komorowski J., Nagano T., Mancini-Dinardo D., Kanduri C. (2008) Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol. Cell.* 32, 232–246.
- 41. Kanduri C. (2011) Kcnq1ot1: a chromatin regulatory RNA. *Semin Cell Dev Biol.* **22**, 343–350.
- 42. Monk D., Sanches R., Arnaud P., Apostolidou S., Hills F.A., Abu-Amero S., Murrell A., Friess H., Reik W., Stanier P., Constância M., Moore G.E. (2006) Imprinting of IGF2 P0 transcript and novel alternatively spliced INS-IGF2 isoforms show differences between mouse and human. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1259–1269.
- 43. Ghafouri-Fard S., Esmaeili M., Taheri M. (2020) H19 IncRNA: roles in tumorigenesis. *Biomed. Pharmacother.* **123**, 109774.
- 44. Jinno Y., Ikeda Y., Yun K., Maw M., Masuzaki H., Fukuda H., Inuzuka K., Fujishita A., Ohtani Y., Okimoto T. (1995) Establishment of functional imprinting of the *H19* gene in human developing placentae. *Nat. Genet.* 10, 318–324.
- Higashimoto K., Jozaki K., Kosho T., Matsubara K., Fuke T., Yamada D., Yatsuki H., Maeda T., Ohtsuka Y., Nishioka K., Joh K., Koseki H., Ogata T., Soejima H. (2014) A novel *de novo* point mutation of the OCTbinding site in the *IGF2/H19*-imprinting control region in a Beckwith–Wiedemann syndrome patient. *Clin. Genet.* 86, 539–544.
- 46. Hark A.T., Schoenherr C.J., Katz D.J., Ingram R.S., Levorse J.M., Tilghman S.M. (2000) CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature*. **405**, 486–489.
- Nativio R., Sparago A., Ito Y., Weksberg R., Riccio A., Murrell A. (2011) Disruption of genomic neighbourhood at the imprinted IGF2-H19 locus in Beckwith– Wiedemann syndrome and Silver–Russell syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1363–1374.
- Lopes S., Lewis A., Hajkova P., Dean W., Oswald J., Forné T., Murrell A., Constância M., Bartolomei M., Walter J., Reik W. (2003) Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of

DMRs suggesting long-range chromatin interactions. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 295–305.

- 49. Lee M.P., DeBaun M.R., Mitsuya K., Galonek H.L., Brandenburg S., Oshimura M., Feinberg A.P. (1999) Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith–Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 5203–5208.
- Mancini-Dinardo D., Steele S.J.S., Levorse J.M., Ingram R.S., Tilghman S.M. (2006) Elongation of the Kcnq1ot1 transcript is required for genomic imprinting of neighboring genes. *Genes Dev.* 20, 1268–1282.
- Brioude F., Kalish J.M., Mussa A., Foster A.C., Bliek J., Ferrero G.B., Boonen S.E., Cole T., Baker R., Bertoletti M., Cocchi G., Coze C., De Pellegrin M., Hussain K., Ibrahim A., Kilby M.D., Krajewska-Walasek M., Kratz C.P., Ladusans E.J., Lapunzina P., Le Bouc Y., Maas S.M., Macdonald F., Õunap K., Peruzzi L., Rossignol S., Russo S., Shipster C., Skórka A., Tatton-Brown K., Tenorio J., Tortora C., Grønskov K., Netchine I., Hennekam R.C., Prawitt D., Tümer Z., Eggermann T., Mackay D.J.G., Riccio A., Maher E.R. (2018) Expert consensus document: clinical and molecular diagnosis, screening and management of Beckwith–Wiedemann syndrome: an international consensus statement. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 229–249.
- 52. Wang K.H., Kupa J., Duffy K.A., Kalish J.M. (2019) Diagnosis and management of Beckwith–Wiedemann syndrome. *Front. Pediatr.* **7**, 562.
- 53. Eggermann T., Brück J., Knopp C., Fekete G., Kratz C., Tasic V., Kurth I., Elbracht M., Eggermann K., Begemann M. (2020) Need for a precise molecular diagnosis in Beckwith–Wiedemann and Silver–Russell syndrome: what has to be considered and why it is important. J. Mol. Med. (Berl). 98, 1447–1455.
- Papulino C., Chianese U., Nicoletti M.M., Benedetti R., Altucci L. (2020) Preclinical and clinical epigenetic-based reconsideration of Beckwith–Wiedemann syndrome. *Front. Genet.* 11, 563718.
- 55. Fontana L., Bedeschi M.F., Maitz S., Cereda A., Faré C., Motta S., Seresini A., D'Ursi P., Orro A., Pecile V., Calvello M., Selicorni A., Lalatta F., Milani D., Sirchia S.M., Miozzo M., Tabano S. (2018) Characterization of multi-locus imprinting disturbances and underlying genetic defects in patients with chromosome 11p15.5 related imprinting disorders. *Epigenetics.* 13, 897–909.
- 56. Немцова М.В., Стрельников В.В., Бабенко С.В., Землякова В.В., Залетаев Д.В. (2005) Молекулярная диагностика эпигенетических нарушений при синдроме Видеманна-Беквита. *Мед. генети*ка. 4, 33–38.
- Chang S., Bartolomei M.S. (2020) Modeling human epigenetic disorders in mice: Beckwith–Wiedemann syndrome and Silver–Russell syndrome. *Dis. Model. Mech.* 13(5), dmm044123. https://doi.org/10.1242/dmm.044123
- Yamaguchi Y., Tayama C., Tomikawa J., Akaishi R., Kamura H., Matsuoka K., Wake N., Minakami H., Kato K., Yamada T., Nakabayashi K., Hata K. (2019) Placenta-specific epimutation at H19-DMR among

common pregnancy complications: its frequency and effect on the expression patterns of H19 and IGF2. *Clin. Epigenetics.* **11**, 113.

- 59. Brioude F., Netchine I., Praz F., Le Jule M., Calmel C., Lacombe D., Edery P., Catala M., Odent S., Isidor B., Lyonnet S., Sigaudy S., Leheup B., Audebert-Bellanger S., Burglen L., Giuliano F., Alessandri J-L., Cormier-Daire V., Laffargue F., Blesson S., Coupier I., Lespinasse J., Blanchet P., Boute O., Baumann C., Polak M., Doray B., Verloes A., Viot G., Le Bouc Y., Rossignol S. (2015) Mutations of the imprinted *CD-KN1C* gene as a cause of the overgrowth Beckwith– Wiedemann syndrome: clinical spectrum and functional characterization. *Hum. Mutat.* 36, 894–902.
- 60. Eggermann T., Begemann M., Pfeiffer L. (2021) Unusual deletion of the maternal 11p15 allele in Beckwith–Wiedemann syndrome with an impact on both imprinting domains. *Clin. Epigenetics.* **13**, 30.
- Sun F.L., Dean W.L., Kelsey G., Allen N.D., Reik W. (1997) Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith–Wiedemann syndrome. *Nature*. 389, 809– 815.
- Wakeling E.L., Brioude F., Lokulo-Sodipe O., O'Connell S.M., Salem J., Bliek J., Canton A.P.M., Chrzanowska K.H., Davies J.H., Dias R.P., Dubern B., Elbracht M., Giabicani E., Grimberg A., Grønskov K., Hokken-Koelega A.C.S., Jorge A.A., Kagami M., Linglart A., Maghnie M., Mohnike K., Monk D., Moore G.E., Murray P.G., Ogata T., Petit I.O., Russo S., Said E., Toumba M., Tümer Z., Binder G., Eggermann T., Harbison M.D., Temple I.K., Mackay D.J.G., Netchine I. (2017) Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 105–124.
- Lokulo-Sodipe O., Ballard L., Child J., Inskip H.M., Byrne C.D., Ishida M., Moore G.E., Wakeling E.L., Fenwick A., Mackay D.J.G., Davies J.H., Temple I.K. (2020) Phenotype of genetically confirmed Silver– Russell syndrome beyond childhood. *J. Med. Genet.* 57, 683–691.
- 64. Tümer Z., López-Hernández J.A., Netchine I., Elbracht M., Grønskov K., Gede L.B., Sachwitz J., den Dunnen J.T., Eggermann T. (2018) Structural and sequence variants in patients with Silver–Russell syndrome or similar features – curation of a disease database. *Hum. Mutat.* **39**, 345–364.
- 65. Forbes B.E., Blyth A.J., Wit J.M. (2020) Disorders of IGFs and IGF-1R signaling pathways. *Mol. Cell. En- docrinol.* **518**, 111035.
- 66. Dörr S., Midro A.T., Färber C., Giannakudis J., Hansmann I. (2001) Construction of a detailed physical and transcript map of the candidate region for Russell–Silver syndrome on chromosome 17q23–q24. *Genomics.* **71**, 174–181.
- 67. Chiesa N., De Crescenzo A., Mishra K., Perone L., Carella M., Palumbo O., Mussa A., Sparago A., Cerrato F., Russo S., Lapi E., Cubellis M.V., Kanduri C., Cirillo Silengo M., Riccio A., Ferrero G.B. (2012) The *KCNQ10T1* imprinting control region and non-coding RNA: new properties derived from the study of Beckwith–Wiedemann syndrome and Silver–Russell syndrome cases. *Hum. Mol. Genet.* 21, 10–25.

26

- Cytrynbaum C., Chong K., Hannig V., Choufani S., Shuman C., Steele L., Morgan T., Scherer S.W., Stavropoulos D.J., Basran R.K., Weksberg R. (2016) Genomic imbalance in the centromeric 11p15 imprinting center in three families: further evidence of a role for IC2 as a cause of Russell–Silver syndrome. *Am. J. Med. Genet A.* **170**, 2731–2739.
- Gicquel C., Rossignol S., Cabrol S., Houang M., Steunou V., Barbu V., Danton F., Thibaud N., Le Merrer M., Burglen L., Bertrand A-M., Netchine I., Le Bouc Y. (2005) Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver–Russell syndrome. *Nat. Genet.* 37, 1003–1007.
- Inoue T., Nakamura A., Iwahashi-Odano M., Tanase-Nakao K., Matsubara K., Nishioka J., Maruo Y., Hasegawa Y., Suzumura H., Sato S., Kobayashi Y., Murakami N., Nakabayashi K., Yamazawa K., Fuke T., Narumi S., Oka A., Ogata T., Fukami M., Kagami M. (2020) Contribution of gene mutations to Silver–Russell syndrome phenotype: multigene sequencing analysis in 92 etiology-unknown patients. *Clin. Epigenet.* 12, 86.
- Saal H.M., Harbison M.D., Netchine I. (1993) Silver–Russell syndrome. In: *GeneReviews*®. Eds Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A., Wallace S.E., Bean L.J., Mirzaa G., Amemiya A. Seattle (WA): Univ. Washington, Seattle; 1993–2021. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1324/
- Hannula-Jouppi K., Muurinen M., Lipsanen-Nyman M., Reinius L.E., Ezer S., Greco D., Kere J. (2014) Differentially methylated regions in maternal and paternal uniparental disomy for chromosome 7. *Epigenetics.* 9, 351–365.
- Hitchins M.P., Monk D., Bell G.M., Ali Z., Preece M.A., Stanier P., Moore G.E. (2001) Maternal repression of the human *GRB10* gene in the developing central nervous system; evaluation of the role for *GRB10* in Silver–Russell syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 9, 82–90.
- Schöherr N., Jäger S., Ranke M.B., Wollmann H.A., Binder G., Eggermann T. (2008) No evidence for isolated imprinting mutations in the PEG1/MEST locus in Silver–Russell patients. *Eur. J. Med. Genet.* 51, 322–324.
- Su J., Wang J., Fan X., Fu C., Zhang S., Zhang Y., Qin Z., Li H., Luo J., Li C., Jiang T., Shen Y. (2017) Mosaic UPD(7q)mat in a patient with Silver–Russell syndrome. *Mol. Cytogenet.* 10, 36.
- Brioude F., Oliver-Petit I., Blaise A., Praz F., Rossignol S., Jule M.L., Thibaud N., Faussat A-M., Tauber M., Bouc Y.L., Netchine I. (2013) *CDKN1C* mutation affecting the PCNA-binding domain as a cause of familial Russell–Silver syndrome. *J. Med. Genet.* 50, 823– 830.
- Sabir A.H., Ryan G., Mohammed Z., Kirk J., Kiely N., Thyagarajan M., Cole T. (2019) Familial Russell–Silver syndrome like phenotype in the PCNA domain of the *CDKN1C* gene, a further case. *Case Rep. Genet*. 2019, **1398250**.

https://doi.org/10.1155/2019/1398250

78. Binder G., Ziegler J., Schweizer R., Habhab W., Haack T.B., Heinrich T., Eggermann T. (2020) Novel mutation points to a hot spot in *CDKN1C* causing Silver–Russell syndrome. *Clin. Epigenetics.* **12**, 152.

- Rockstroh D., Pfäffle H., Le Duc D., Rößler F., Schlensog-Schuster F., Heiker J.T., Kratzsch J., Kiess W., Lemke J.R., Abou Jamra R., Pfäffle R. (2019) A new p.(Ile66Serfs*93) IGF2 variant is associated with pre- and postnatal growth retardation. *Eur. J. Endocrinol.* 180, K1–13.
- Masunaga Y., Inoue T., Yamoto K., Fujisawa Y., Sato Y., Kawashima-Sonoyama Y., Morisada N., Iijima K., Ohata Y., Namba N., Suzumura H., Kuribayashi R., Yamaguchi Y., Yoshihashi H., Fukami M., Saitsu H., Kagami M., Ogata T. (2020) IGF2 mutations. J. Clin. Endocrinol. Metabolism. 105, 116–125.
- Hübner C.T., Meyer R., Kenawy A., Ambrozaityte L., Matuleviciene A., Kraft F., Begemann M., Elbracht M., Eggermann T. (2020) HMGA2 variants in Silver– Russell syndrome: homozygous and heterozygous occurrence. J. Clin. Endocrinol. Metabolism. 105, 2401– 2407.
- Vado Y., Pereda A., Llano-Rivas I., Gorria-Redondo N., Díez I., Perez de Nanclares G. (2020) Novel variant in PLAG1 in a familial case with Silver–Russell syndrome suspicion. *Genes.* 11, 1461.
- Akhtar M., Holmgren C., Göndör A., Vesterlund M., Kanduri C., Larsson C., Ekström T.J. (2012) Cell type and context-specific function of PLAG1 for IGF2 P3 promoter activity. *Intern. J. Oncol.* 41, 1959–1966.
- Hara-Isono K., Matsubara K., Fuke T., Yamazawa K., Satou K., Murakami N., Saitoh S., Nakabayashi K., Hata K., Ogata T., Fukami M., Kagami M. (2020) Genome-wide methylation analysis in Silver–Russell syndrome, Temple syndrome, and Prader–Willi syndrome. *Clin. Epigenet.* 12, 159.
- Vilain E., Le Merrer M., Lecointre C., Desangles F., Kay M.A., Maroteaux P., McCabe E.R. (1999) IMAGe, a new clinical association of intrauterine growth retardation, metaphyseal dysplasia, adrenal hypoplasia congenita, and genital anomalies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 4335– 4340.
- 86. Borges K.S., Arboleda V.A., Vilain E. (2015) Mutations in the PCNA-binding site of CDKN1C inhibit cell proliferation by impairing the entry into S phase. *Cell Div.* **10**, 2.
- Suntharalingham J.P., Ishida M., Buonocore F., Del Valle I., Solanky N., Demetriou C., Regan L., Moore G.E., Achermann J.C. (2019) Analysis of CD-KN1C in fetal growth restriction and pregnancy loss. *F1000Res.* 8, 90.
- Eggermann T., Binder G., Brioude F., Maher E.R., Lapunzina P., Cubellis M.V., Bergadá I., Prawitt D., Begemann M. (2014) CDKN1C mutations: two sides of the same coin. *Trends Mol Med.* 20, 614–622.
- Бабенко О.В., Землякова В.В., Саакян С.В., Бровкина А.Ф., Стрельников В.В., Залетаев Д.В., Немцова М.В. (2002) Функциональная патология генов *RB1* и *CDKN2A*, приводящая к развитию ретинобластомы. *Молекуляр. биология*. **36**(5), 777–783.
- Gelli E., Pinto A.M., Somma S., Imperatore V., Cannone M.G., Hadjistilianou T., De Francesco S., Galimberti D., Currò A., Bruttini M., Mari F., Renieri A., Ariani F. (2019) Evidence of predisposing epimutation in retinoblastoma. *Hum. Mutat.* 40, 201– 206.

- Kanber D., Berulava T., Ammerpohl O., Mitter D., Richter J., Siebert R., Horsthemke B., Lohmann D., Buiting K. (2009) The human retinoblastoma gene is imprinted. *PLoS Genet.* 5(12), e1000790. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000790
- Buiting K., Kanber D., Horsthemke B., Lohmann D. (2010) Imprinting of RB1 (the new kid on the block). *Brief Funct. Genomics.* 9, 347–353.
- Taylor M., Dehainault C., Desjardins L., Doz F., Levy C., Sastre X., Couturier J., Stoppa-Lyonnet D., Houdayer C., Gauthier-Villars M. (2007) Genotypephenotype correlations in hereditary familial retinoblastoma. *Hum. Mutat.* 28, 284–293.
- 94. Eloy P., Dehainault C., Sefta M., Aerts I., Doz F., Cassoux N., Lumbroso le Rouic L., Stoppa-Lyonnet D., Radvanyi F., Millot G.A., Gauthier-Villars M., Houdayer C. (2016) A parent-of-origin effect impacts the phenotype in low penetrance retinoblastoma families segregating the c.1981C>T/p.Arg661Trp mutation of RB1. *PLoS Genet.* 12, e1005888.
- 95. Алексеева Е.А., Бабенко О.В., Козлова В.М., Ушакова Т.Л., Казубская Т.П., Саакян С.В., Танас А.С., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. (2019) Эффект родительского происхождения мутации в гене *RB1* при наследственной ретинобластоме с низкой пенетрантностью. *Мед. генетика.* 18(8), 21–28.
- 96. Kagami M., Sekita Y., Nishimura G., Irie M., Kato F., Okada M., Yamamori S., Kishimoto H., Nakayama M., Tanaka Y., Matsuoka K., Takahashi T., Noguchi M., Tanaka Y., Masumoto K., Utsunomiya T., Kouzan H., Komatsu Y., Ohashi H., Kurosawa K., Kosaki K., Ferguson-Smith A.C., Ishino F., Ogata T. (2008) Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nat. Genet.* 40, 237– 242.
- Falix F.A., Aronson D.C., Lamers W.H., Gaemers I.C. (2012) Possible roles of DLK1 in the Notch pathway during development and disease. *Biochim. Biophys. Acta* (BBA) – *Mol. Basis Disease*. 1822, 988–995.
- Gomes L.G., Cunha-Silva M., Crespo R.P., Ramos C.O., Montenegro L.R., Canton A., Lees M., Spoudeas H., Dauber A., Macedo D.B., Bessa D.S., Maciel G.A., Baracat E.C., Jorge A.A.L., Mendonca B.B., Brito V.N., Latronico A.C. (2019) DLK1 is a novel link between reproduction and metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 104, 2112–2120.
- Kitazawa M., Sutani A., Kaneko-Ishino T., Ishino F. (2021) The role of eutherian-specific RTL1 in the nervous system and its implications for the Kagami–Ogata and Temple syndromes. *Genes Cells.* 26, 165–179.
- Martinez M.E., Cox D.F., Youth B.P., Hernandez A. (2016) Genomic imprinting of DIO3, a candidate gene for the syndrome associated with human uniparental disomy of chromosome 14. *Eur. J. Hum. Genet.* 24, 1617–1621.
- 101. Hamilton S., de Cabo R., Bernier M. (2020) Maternally expressed gene 3 in metabolic programming. *Biochim. Biophys. Acta – Gene Regul. Mech.* 1863, 194396.
- Kagami M., O'Sullivan M.J., Green A.J., Watabe Y., Arisaka O., Masawa N., Matsuoka K., Fukami M.,

Matsubara K., Kato F., Ferguson-Smith A.C., Ogata T. (2010) The IG-DMR and the MEG3-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers. *PLoS Genet.* **6**, e1000992.

- 103. da Rocha S.T., Edwards C.A., Ito M., Ogata T., Ferguson-Smith A.C. (2008) Genomic imprinting at the mammalian Dlk1-Dio3 domain. *Trends Genet.* 24, 306–316.
- 104. Ioannides Y., Lokulo-Sodipe K., Mackay D.J.G., Davies J.H., Temple I.K. (2014) Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. J. Med. Genet. 51, 495–501.
- 105. Kagami M., Nagasaki K., Kosaki R., Horikawa R., Naiki Y., Saitoh S., Tajima T., Yorifuji T., Numakura C., Mizuno S., Nakamura A., Matsubara K., Fukami M., Ogata T. (2017) Temple syndrome: comprehensive molecular and clinical findings in 32 Japanese patients. *Genet. Med.* **19**, 1356–1366.
- 106. Ogata T., Kagami M. (2016) Kagami–Ogata syndrome: a clinically recognizable upd(14)pat and related disorder affecting the chromosome 14q32.2 imprinted region. J. Hum. Genet. 61, 87–94.
- 107. Soellner L., Begemann M., Mackay D.J.G., Grønskov K., Tümer Z., Maher E.R., Temple I.K., Monk D., Riccio A., Linglart A., Netchine I., Eggermann T. (2017) Recent advances in imprinting disorders. *Clin. Genet.* **91**, 3–13.
- 108. van der Werf I.M., Buiting K., Czeschik C., Reyniers E., Vandeweyer G., Vanhaesebrouck P., Lüdecke H-J., Wieczorek D., Horsthemke B., Mortier G., Leroy J.G., Kooy R.F. (2016) Novel microdeletions on chromosome 14q32.2 suggest a potential role for non-coding RNAs in Kagami–Ogata syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 24, 1724–1729.
- Stelzer Y., Sagi I., Yanuka O., Eiges R., Benvenisty N. (2014) The noncoding RNA IPW regulates the imprinted DLK1–DIO3 locus in an induced pluripotent stem cell model of Prader–Willi syndrome. *Nat. Genet.* 46, 551–557.
- 110. Cavaillé J. (2017) Box C/D small nucleolar RNA genes and the Prader–Willi syndrome: a complex interplay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 8(4). https://doi.org/10.1002/wrna.1417
- 111. Wang T.-S., Tsai W.-H., Tsai L.-P., Wong S.-B. (2020) Clinical characteristics and epilepsy in genomic imprinting disorders: Angelman syndrome and Prader–Willi syndrome. *Ci Ji Yi Xue Za Zhi.* **32**, 137–144.
- 112. Mendiola A.J.P., LaSalle J.M. (2021) Epigenetics in Prader–Willi syndrome. *Front. Genet.* **12**, 624581.
- Christian S. (1999) Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader–Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11–q13). *Hum. Mol. Genet.* 8, 1025–1037.
- 114. Nicholls R.D., Knepper J.L. (2001) Genome organization, function, and imprinting in Prader–Willi and Angelman syndromes. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2**, 153–175.
- 115. Kim S.-J., Miller J.L., Kuipers P.J., German J.R., Beaudet A.L., Sahoo T., Driscoll D.J. (2012) Unique and atypical deletions in Prader–Willi syndrome re-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

veal distinct phenotypes. *Eur. J. Hum. Genet.* **20**, 283–290.

- Chung M.S., Langouët M., Chamberlain S.J., Carmichael G.G. (2020) Prader–Willi syndrome: reflections on seminal studies and future therapies. *Open Biol.* 10, 200195.
- 117. Butler M.G. (2020) Imprinting disorders in humans: a review. *Curr. Opin. Pediatr.* **32**, 719–729.
- 118. Cheon C.K. (2016) Genetics of Prader–Willi syndrome and Prader–Will-like syndrome. *Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **21**, 126–135.
- Runte M., Hüttenhofer A., Gross S., Kiefmann M., Horsthemke B., Buiting K. (2001) The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2687–2700.
- Galiveti C.R., Raabe C.A., Konthur Z., Rozhdestvensky T.S. (2014) Differential regulation of non-protein coding RNAs from Prader–Willi syndrome locus. *Sci. Rep.* 4, 6445.
- 121. Maina E.N., Webb T., Soni S., Whittington J., Boer H., Clarke D., Holland A. (2007) Analysis of candidate imprinted genes in PWS subjects with atypical genetics: a possible inactivating mutation in the SNURF/SNRPN minimal promoter. J. Hum. Genet. 52, 297–307.
- 122. Green Finberg Y., Kantor B., Hershko A.Y., Razin A. (2003) Characterization of the human *SNRPN* minimal promoter and cis elements within it. *Gene.* 304, 201–206.
- Cassidy S.B., Schwartz S., Miller J.L., Driscoll D.J. (2012) Prader–Willi syndrome. *Genet. Med.* 14, 10–26.
- 124. Geuns E., De Rycke M., Van Steirteghem A., Liebaers I. (2003) Methylation imprints of the imprint control region of the *SNRPN*-gene in human gametes and preimplantation embryos. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2873– 2879.
- 125. Meng L., Person R.E., Huang W., Zhu P.J., Costa-Mattioli M., Beaudet A.L. (2013) Truncation of Ube3a-ATS unsilences paternal Ube3a and ameliorates behavioral defects in the Angelman syndrome mouse model. *PLoS Genet.* 9, e1004039.
- 126. Smith E.Y., Futtner C.R., Chamberlain S.J., Johnstone K.A., Resnick J.L. (2011) Transcription Is required to establish maternal imprinting at the Prader– Willi syndrome and Angelman syndrome locus. *PLoS Genet.* 7(12), e1002422. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002422
- 127. Buiting K., Lich C., Cottrell S., Barnicoat A., Horsthemke B. (1999) A 5-kb imprinting center deletion in a family with Angelman syndrome reduces the shortest region of deletion overlap to 880 bp. *Hum. Genet.* **105**, 665–666.
- 128. Lewis M.W., Brant J.O., Kramer J.M., Moss J.I., Yang T.P., Hansen P.J., Williams R.S., Resnick J.L. (2015) Angelman syndrome imprinting center encodes a transcriptional promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**, 6871–6875.
- Lewis M.W., Vargas-Franco D., Morse D.A., Resnick J.L. (2019) A mouse model of Angelman syndrome imprinting defects. *Hum. Mol. Genet.* 28, 220–229.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

- Wu M.-Y., Tsai T.-F., Beaudet A.L. (2006) Deficiency of Rbbp1/Arid4a and Rbbp111/Arid4b alters epigenetic modifications and suppresses an imprinting defect in the PWS/AS domain. *Genes Dev.* 20, 2859–2870.
- Buiting K., Gross S., Lich C., Gillessen-Kaesbach G., el-Maarri O., Horsthemke B. (2003) Epimutations in Prader–Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 571–577.
- Ohta T., Gray T.A., Rogan P.K., Buiting K., Gabriel J.M., Saitoh S., Muralidhar B., Bilienska B., Krajewska-Walasek M., Driscoll D.J., Horsthemke B., Butler M.G., Nicholls R.D. (1999) Imprinting-mutation mechanisms in Prader–Willi syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 397–413.
- 133. Saitoh S., Buiting K., Cassidy S.B., Conroy J.M., Driscoll D.J., Gabriel J.M., Gillessen-Kaesbach G., Glenn C.C., Greenswag L.R., Horsthemke B., Kondo I., Kuwajima K., Niikawa N., Rogan P.K., Schwartz S., Seip J., Williams C.A., Nicholls R.D. (1997) Clinical spectrum and molecular diagnosis of Angelman and Prader–Willi syndrome patients with an imprinting mutation. *Am. J. Med. Genet.* 68, 195–206.
- 134. Bielinska B., Blaydes S.M., Buiting K., Yang T., Krajewska-Walasek M., Horsthemke B., Brannan C.I. (2000) *De novo* deletions of *SNRPN* exon 1 in early human and mouse embryos result in a paternal to maternal imprint switch. *Nat. Genet.* 25, 74–78.
- 135. Gray T.A., Saitoh S., Nicholls R.D. (1999) An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96, 5616–5621.
- 136. Glenn C.C., Saitoh S., Jong M.T., Filbrandt M.M., Surti U., Driscoll D.J., Nicholls R.D. (1996) Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human *SNRPN* gene. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 335–346.
- 137. de los Santos T., Schweizer J., Rees C.A., Francke U. (2000) Small evolutionarily conserved RNA, resembling C/D box small nucleolar RNA, is transcribed from PWCR1, a novel imprinted gene in the Prader– Willi deletion region, which Is highly expressed in brain. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 1067–1082.
- 138. Gallagher R.C., Pils B., Albalwi M., Francke U. (2002) Evidence for the role of PWCR1/HBII-85 C/D box small nucleolar RNAs in Prader–Willi syndrome. Am. J. Hum. Genet. 71, 669–678.
- Bortolin-Cavaille M.-L., Cavaille J. (2012) The SNORD115 (H/MBII-52) and SNORD116 (H/MBII-85) gene clusters at the imprinted Prader–Willi locus generate canonical box C/D snoRNAs. Nucl. Acids Res. 40, 6800–6807.
- Bratkovič T., Božič J., Rogelj B. (2020) Functional diversity of small nucleolar RNAs. *Nucl. Acids Res.* 48, 1627–1651.
- 141. Raabe C.A., Voss R., Kummerfeld D-M., Brosius J., Galiveti C.R., Wolters A., Seggewiss J., Huge A., Skryabin B.V., Rozhdestvensky T.S. (2019) Ectopic expression of Snord115 in choroid plexus interferes with editing but not splicing of 5-Ht2c receptor premRNA in mice. *Sci. Rep.* 9, 4300.

- 142. Leung K.N., Vallero R.O., DuBose A.J., Resnick J.L., LaSalle J.M. (2009) Imprinting regulates mammalian snoRNA-encoding chromatin decondensation and neuronal nucleolar size. Hum. Mol. Genet. 18, 4227-4238.
- 143. Bieth E., Eddiry S., Gaston V., Lorenzini F., Buffet A., Conte Auriol F., Molinas C., Cailley D., Rooryck C., Arveiler B., Cavaillé J., Salles J.P., Tauber M. (2015) Highly restricted deletion of the SNORD116 region is implicated in Prader-Willi syndrome. Eur. J. Hum Genet. 23, 252-255.
- 144. Powell W.T., Coulson R.L., Crary F.K., Wong S.S., Ach R.A., Tsang P., Alice Yamada N., Yasui D.H., Lasalle J.M. (2013) A Prader-Willi locus lncRNA cloud modulates diurnal genes and energy expenditure. Hum. Mol. Genet. 22, 4318-4328.
- 145. Coulson R.L., Yasui D.H., Dunaway K.W., Laufer B.I., Vogel Ciernia A., Zhu Y., Mordaunt C.E., Totah T.S., LaSalle J.M. (2018) Snord116-dependent diurnal rhythm of DNA methylation in mouse cortex. Nat. Commun. 9, 1616.
- 146. Wu H., Yin Q.-F., Luo Z., Yao R.-W., Zheng C.-C., Zhang J., Xiang J.-F., Yang L., Chen L.-L. (2016) Unusual processing generates SPA lncRNAs that sequester multiple RNA binding proteins. Mol. Cell. 64, 534-548.
- 147. Yin Q.-F., Yang L., Zhang Y., Xiang J.-F., Wu Y.-W., Carmichael G.G., Chen L.-L. (2012) Long noncoding RNAs with snoRNA ends. Mol. Cell. 48, 219-230.
- 148. Wevrick R., Kerns J.A., Francke U. (1994) Identification of a novel paternally expressed gene in the Prader-Willi syndrome region. Hum. Mol. Genet. 3, 1877-1882.
- 149. Cavaillé J., Buiting K., Kiefmann M., Lalande M., Brannan C.I., Horsthemke B., Bachellerie J.P., Brosius J., Hüttenhofer A. (2000) Identification of brainspecific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 14311-14316.
- 150. Castle J.C., Armour C.D., Löwer M., Haynor D., Biery M., Bouzek H., Chen R., Jackson S., Johnson J.M., Rohl C.A., Raymond C.K. (2010) Digital genomewide ncRNA expression, including snoRNAs, across 11 human tissues using polyA-neutral amplification. PLoS One. 5, e11779.
- 151. Chamberlain S.J., Chen P.-F., Ng K.Y., Bourgois-Rocha F., Lemtiri-Chlieh F., Levine E.S., Lalande M. (2010) Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107, 17668-17673.
- 152. Hsiao J.S., Germain N.D., Wilderman A., Stoddard C., Wojenski L.A., Villafano G.J., Core L., Cotney J., Chamberlain S.J. (2019) A bipartite boundary element restricts UBE3A imprinting to mature neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 116, 2181-2186.
- 153. Wijesuriya T.M., De Ceuninck L., Masschaele D., Sanderson M.R., Carias K.V., Tavernier J., Wevrick R. (2017) The Prader–Willi syndrome proteins MAGEL2 and necdin regulate leptin receptor cell surface abundance through ubiquitination pathways. Hum. Mol. Genet. 26, 4215-4230.

- 154. Tacer K.F., Potts P.R. (2017) Cellular and disease functions of the Prader-Willi syndrome gene MA-GEL2. Biochem. J. 474, 2177-2190.
- 155. Pagliardini S., Ren J., Wevrick R., Greer J.J. (2005) Developmental abnormalities of neuronal structure and function in prenatal mice lacking the Prader-Willi syndrome gene necdin. Am. J. Pathol. 167, 175-191.
- 156. Wawrzik M., Spiess A.-N., Herrmann R., Buiting K., Horsthemke B. (2009) Expression of SNURF-SN-RPN upstream transcripts and epigenetic regulatory genes during human spermatogenesis. Eur. J. Hum. Genet. 17, 1463-1470.
- 157. Buiting K., Nazlican H., Galetzka D., Wawrzik M., Groß S., Horsthemke B. (2007) C15orf2 and a novel noncoding transcript from the Prader-Willi/Angelman syndrome region show monoallelic expression in fetal brain. Genomics. 89, 588-595.
- 158. Neumann L.C., Markaki Y., Mladenov E., Hoffmann D., Buiting K., Horsthemke B. (2012) The imprinted NPAP1/C15orf2 gene in the Prader-Willi syndrome region encodes a nuclear pore complex associated protein. Hum. Mol. Genet. 21, 4038-4048.
- 159. Rougeulle C., Cardoso C., Fontés M., Colleaux L., Lalande M. (1998) An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript. Nat. Genet. 19, 15-16.
- 160. Kishino T., Wagstaff J. (1998) Genomic organization of the UBE3A/E6-AP gene and related pseudogenes. Genomics. 47, 101-107.
- 161. Rougeulle C., Glatt H., Lalande M. (1997) The Angelman syndrome candidate gene, UBE3A/E6-AP, is imprinted in brain. Nat. Genet. 17, 14-15.
- 162. Dindot S.V., Antalffy B.A., Bhattacharjee M.B., Beaudet A.L. (2008) The Angelman syndrome ubiquitin ligase localizes to the synapse and nucleus, and maternal deficiency results in abnormal dendritic spine morphology. Hum. Mol. Genet. 17, 111-118.
- 163. DuBose A.J., Johnstone K.A., Smith E.Y., Hallett R.A.E., Resnick J.L. (2010) Atp 10a, a gene adjacent to the PWS/AS gene cluster, is not imprinted in mouse and is insensitive to the PWS-IC. Neurogenetics. 11, 145-151.
- 164. Mohamad F.H., Has A.T.C. (2019) The α5-containing GABAA receptors-a. Brief summary. J. Mol. Neurosci. 67, 343-351.
- 165. DeLorey T.M., Sahbaie P., Hashemi E., Homanics G.E., Clark J.D. (2008) Gabrb3 gene deficient mice exhibit impaired social and exploratory behaviors, deficits in non-selective attention and hypoplasia of cerebellar vermal lobules: a potential model of autism spectrum disorder. Behav. Brain Res. 187, 207-220.
- 166. Delahanty R.J., Zhang Y., Bichell T.J., Shen W., Verdier K., Macdonald R.L., Xu L., Boyd K., Williams J., Kang J.-Q. (2016) Beyond epilepsy and autism: disruption of GABRB3 causes ocular hypopigmentation. Cell Repts. 17, 3115-3124.
- 167. Buiting K., Williams C., Horsthemke B. (2016) Angelman syndrome - insights into a rare neurogenetic disorder. Nat. Rev. Neurol. 12, 584-593.
- 168. Землякова В.В., Ермакова М.А., Залетаев Д.В., Немцова М.В. (2009) Молекулярная диагностика

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ 2022 том 56 Nº 1

синдромов Прадера-Вилли и Энжельмена. Мед. генетика. 8, 16-20.

- Bird L.M. (2014) Angelman syndrome: review of clinical and molecular aspects. *Appl. Clin. Genet.* 7, 93– 104.
- Butler M.G., Miller J.L., Forster J.L. (2019) Prader– Willi syndrome – clinical genetics, diagnosis and treatment approaches: an update. *Curr. Pediatr. Rev.* 15, 207–244.
- 171. Anderlid B.-M., Lundin J., Malmgren H., Lehtihet M., Nordgren A. (2014) Small mosaic deletion encompassing the snoRNAs and SNURF-SNRPN results in an atypical Prader–Willi syndrome phenotype. *Am. J. Med. Genet. A.* **164A**, 425–431.
- 172. de Smith A.J., Purmann C., Walters R.G., Ellis R.J., Holder S.E., Van Haelst M.M., Brady A.F., Fairbrother U.L., Dattani M., Keogh J.M., Henning E., Yeo G.S.H., O'Rahilly S., Froguel P., Farooqi I.S., Blakemore A.I.F. (2009) A deletion of the HBII-85 class of small nucleolar RNAs (snoRNAs) is associated with hyperphagia, obesity and hypogonadism. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3257–3265.
- 173. Fridman C., Koiffmann C.P. (2000) Origin of uniparental disomy 15 in patients with Prader–Willi or Angelman syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **94**, 249–253.
- 174. Robinson W.P., Christian S.L., Kuchinka B.D., Peñaherrera M.S., Das S., Schuffenhauer S., Malcolm S., Schinzel A.A., Hassold T.J., Ledbetter D.H. (2000) Somatic segregation errors predominantly contribute to the gain or loss of a paternal chromosome leading to uniparental disomy for chromosome 15. *Clin. Genet.* 57, 349–358.
- 175. Beygo J., Buiting K., Ramsden S.C., Ellis R., Clayton-Smith J., Kanber D. (2019) Update of the EMQN/ACGS best practice guidelines for molecular analysis of Prader–Willi and Angelman syndromes. *Eur. J. Hum. Genet.* **27**, 1326–1340.
- 176. Beygo J., Grosser C., Kaya S., Mertel C., Buiting K., Horsthemke B. (2020) Common genetic variation in the Angelman syndrome imprinting centre affects the imprinting of chromosome 15. *Eur. J. Hum. Genet.* **28**, 835–839.
- 177. Le Fevre A., Beygo J., Silveira C., Kamien B., Clayton-Smith J., Colley A., Buiting K., Dudding-Byth T. (2017) Atypical Angelman syndrome due to a mosaic imprinting defect: case reports and review of the literature. *Am. J. Med. Genet. A.* **173**, 753–757.
- 178. Ермакова М.А., Бабенко О.В., Залетаев Д.В., Немцова М.В. (2010) Анализ мутаций в гене *UBE3A* у пациентов с синдромом Энжельмена. *Med. генетика.* **9**(5), 18–23.
- 179. Eggermann T., Perez de Nanclares G., Maher E.R., Temple I.K., Tümer Z., Monk D., Mackay D.J.G., Grønskov K., Riccio A., Linglart A., Netchine I. (2015) Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. *Clin. Epigenetics.* 7, 123.
- 180. Buiting K., Clayton-Smith J., Driscoll D.J., Gillessen-Kaesbach G., Kanber D., Schwinger E., Williams C., Horsthemke B. (2015) Clinical utility gene card for: Angelman syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 23(2). https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.93

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

- 181. Beasley S.A., Kellum C.E., Orlomoski R.J., Idrizi F., Spratt D.E. (2020) An Angelman syndrome substitution in the HECT E3 ubiquitin ligase C-terminal lobe of E6AP affects protein stability and activity. *PLoS One.* 15, e0235925.
- 182. Aguilera C., Viñas-Jornet M., Baena N., Gabau E., Fernández C., Capdevila N., Cirkovic S., Sarajlija A., Miskovic M., Radivojevic D., Ruiz A., Guitart M. (2017) Novel intragenic deletions within the UBE3A gene in two unrelated patients with Angelman syndrome: case report and review of the literature. BMC Med. Genet. 18, 137.
- 183. Bossuyt S.N.V., Punt A.M., de Graaf I.J., van den Burg J., Williams M.G., Heussler H., Elgersma Y., Distel B. (2021) Loss of nuclear UBE3A activity is the predominant cause of Angelman syndrome in individuals carrying UBE3A missense mutations. Hum. Mol. Genet. 30(6), 430–442. https://doi.org/10.1093/hmg/ddab050
- 184. McCarthy J.M., McCann-Crosby B.M., Rech M.E., Yin J., Chen C.-A., Ali M.A., Nguyen H.N., Miller J.L., Schaaf C.P. (2018) Hormonal, metabolic and skeletal phenotype of Schaaf–Yang syndrome: a comparison to Prader–Willi syndrome. J. Med. Genet. 55, 307– 315.
- 185. Negishi Y., Ieda D., Hori I., Nozaki Y., Yamagata T., Komaki H., Tohyama J., Nagasaki K., Tada H., Saitoh S. (2019) Schaaf–Yang syndrome shows a Prader–Willi syndrome-like phenotype during infancy. Orphanet. J. Rare Dis. 14, 277.
- 186. Chen X., Ma X., Zou C. (2020) Phenotypic spectrum and genetic analysis in the fatal cases of Schaaf–Yang syndrome: two case reports and literature review. *Medicine*. **99**, e20574.
- 187. Schaaf C.P., Gonzalez-Garay M.L., Xia F., Potocki L., Gripp K.W., Zhang B., Peters B.A., McElwain M.A., Drmanac R., Beaudet A.L., Caskey C.T., Yang Y. (2013) Truncating mutations of *MAGEL2* cause Prader–Willi phenotypes and autism. *Nat. Genet.* 45, 1405–1408.
- Carias K.V., Zoeteman M., Seewald A., Sanderson M.R., Bischof J.M., Wevrick R. (2020) A MAGEL2-deubiquitinase complex modulates the ubiquitination of circadian rhythm protein CRY1. *PLoS One.* 15, e0230874.
- 189. Patak J., Gilfert J., Byler M., Neerukonda V., Thiffault I., Cross L., Amudhavalli S., Pacio-Miguez M., Palomares-Bralo M., Garcia-Minaur S., Santos-Simarro F., Powis Z., Alcaraz W., Tang S., Jurgens J., Barry B., England E., Engle E., Hess J., Lebel R.R. (2019) MA-GEL2-related disorders :a study and case series. *Clin. Genet.* 96, 493–505.
- 190. Ahn H., Seo G.H., Oh A., Lee Y., Keum C., Heo S.H., Kim T., Choi J., Kim G.-H., Ko T.-S., Yum M.-S., Lee B.H., Choi I.H. (2020) Diagnosis of Schaaf– Yang syndrome in Korean children with developmental delay and hypotonia. *Medicine* (Baltimore). **99**, e23864.
- Roberts S.A., Kaiser U.B. (2020) Genetics in endocrinology: genetic etiologies of central precocious puberty and the role of imprinted genes. *Eur. J. Endocrinol.* 183, R107–117.

- 192. Seraphim C.E., Canton A.P.M., Montenegro L., Piovesan M.R., Macedo D.B., Cunha M., Guimaraes A., Ramos C.O., Benedetti A.F.F., de Castro Leal A., Gagliardi P.C., Antonini S.R., Gryngarten M., Arcari A.J., Abreu A.P., Kaiser U.B., Soriano-Guillén L., Escribano-Muñoz A., Corripio R., Labarta J.I., Travieso-Suárez L., Ortiz-Cabrera N.V., Argente J., Mendonca B.B., Brito V.N., Latronico A.C. (2021) Genotype-phenotype correlations in central precocious puberty caused by *MKRN3* mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 106, 1041–1050.
- 193. Jong M.T.C., Gray T.A., Ji Y., Glenn C.C., Saitoh S., Driscoll D.J., Nicholls R.D. (1999) A novel imprinted gene, encoding a ring zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader–Willi syndrome critical region. *Hum. Mol. Genet.* 8, 783–793.
- 194. Latronico A.C., Brito V.N., Carel J.-C. (2016) Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **4**, 265–274.
- 195. Valadares L.P., Meireles C.G., De Toledo I.P., Santarem de Oliveira R., Gonçalves de Castro L.C., Abreu A.P., Carroll R.S., Latronico A.C., Kaiser U.B., Guerra E.N.S., Lofrano-Porto A. (2019) *MKRN3* mutations in central precocious puberty: a systematic review and meta-analysis. *J. Endocrine Soc.* 3, 979–995.
- 196. Maione L., Naulé L., Kaiser U.B. (2020) Makorin RING finger protein 3 and central precocious puberty. *Curr. Opin. Endocrine Metab. Res.* 14, 152–159.
- 197. Fanis P., Skordis N., Toumba M., Papaioannou N., Makris A., Kyriakou A., Neocleous V., Phylactou L.A. (2019) Central precocious puberty caused by novel mutations in the promoter and 5'-UTR region of the imprinted *MKRN3* gene. *Front. Endocrinol.* **10**, 677.
- 198. Abreu A.P., Macedo D.B., Brito V.N., Kaiser U.B., Latronico A.C. (2015) A new pathway in the control of the initiation of puberty: the *MKRN3* gene. J. Mol. Endocrinol. 54, R131–139.
- 199. Perry J., Day F., Elks C., et Collaborators (2014) Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. *Nature*. **514**, 92–97. https://doi.org/10.1038/nature13545
- 200. Li H., Du J., Li W., Cheng D., He W., Yi D., Xiong B., Yuan S., Tu C., Meng L., Luo A., Lin G., Lu G., Tan Y.-Q. (2018) Rare partial octosomy and hexasomy of 15q11–q13 associated with intellectual impairment and development delay: report of two cases and review of literature. *Mol. Cytogenet.* 11, 15.
- 201. Lu Y., Liang Y., Ning S., Deng G., Xie Y., Song J., Zuo N., Feng C., Qin Y. (2020) Rare partial trisomy and tetrasomy of 15q11–q13 associated with developmental delay and autism spectrum disorder. *Mol. Cytogenet.* **13**, 21.
- 202. Yang L., Zhan G.D., Ding J.J., Wang H.J., Ma D., Huang G.Y., Zhou W.H. (2013) Psychiatric illness and intellectual disability in the Prader–Willi syndrome with different molecular defects – a meta analysis. *PLoS One.* 8(8), e72640.
 - https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072640
- 203. Dykens E.M., Roof E., Hunt-Hawkins H., Dankner N., Lee E.B., Shivers C.M., Daniell C., Kim S.-J. (2017) Diagnoses and characteristics of autism spectrum disorders in children with Prader–Willi syndrome. *J. Neurodevelop. Disord.* 9, 18.

- 204. Linglart A., Maupetit-Méhouas S., Silve C. (2013) GNAS-related loss-of-function disorders and the role of imprinting. *Horm. Res. Paediatr.* 79, 119–129.
- 205. Turan S., Bastepe M. (2013) The *GNAS* complex locus and human diseases associated with loss-of-function mutations or epimutations within this imprinted gene. *Horm. Res. Paediatr.* **80**, 229–241.
- 206. Lemos M.C., Thakker R.V. (2015) *GNAS* mutations in pseudohypoparathyroidism type 1a and related disorders. *Hum. Mutat.* **36**, 11–19.
- 207. Mantovani G., Elli F.M. (2019) Inactivating PTH/PTHrP signaling disorders. *Front. Horm. Res.* **51**, 147–159.
- 208. Turan S., Bastepe M. (2013) The GNAS complex locus and human diseases associated with loss-of-function mutations or epimutations within this imprinted gene. *Horm. Res. Paediatr.* **80**, 229–241.
- 209. Mantovani G., Bastepe M., Monk D., de Sanctis L., Thiele S., Usardi A., Ahmed S.F., Bufo R., Choplin T., De Filippo G., Devernois G., Eggermann T., Elli F.M., Freson K., García Ramirez A., Germain-Lee E.L., Groussin L., Hamdy N., Hanna P., Hiort O., Jüppner H., Kamenický P., Knight N., Kottler M.-L., Le Norcy E., Lecumberri B., Levine M.A., Mäkitie O., Martin R., Martos-Moreno G.Á., Minagawa M., Murray P., Pereda A., Pignolo R., Rejnmark L., Rodado R., Rothenbuhler A., Saraff V., Shoemaker A.H., Shore E.M., Silve C., Turan S., Woods P., Zillikens M.C., Perez de Nanclares G., Linglart A. (2018) Diagnosis and management of pseudohypoparathyroidism and related disorders: first International Consensus Statement. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 476–500.
- 210. Yang Y., Chu X., Nie M., Song A., Jiang Y., Li M., Xia W., Xing X., Wang O. (2020) A novel long-range deletion spanning *STX16* and *NPEPL1* causing imprinting defects of the GNAS locus discovered in a patient with autosomal-dominant pseudohypoparathyroidism type 1B. *Endocrine*. **69**, 212–219.
- Kiuchi Z., Reyes M., Jüppner H. (2020) Preferential maternal transmission of *STX16-GNAS* mutations responsible for autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type Ib (PHP1B): another example of transmission ratio distortion. *J. Bone Miner. Res.* **36**(4), 696–703. https://doi.org/10.1002/jbmr.4221
- 212. Rezwan F.I., Poole R.L., Prescott T., Walker J.M., Karen Temple I., Mackay D.J. (2015) Very small deletions within the *NESP55* gene in pseudohypoparathyroidism type 1b. *Eur. J. Hum. Genet.* 23, 494–499.
- 213. Takatani R., Molinaro A., Grigelioniene G., Tafaj O., Watanabe T., Reyes M., Sharma A., Singhal V., Raymond F.L., Linglart A., Jüppner H. (2016) Analysis of multiple families with single individuals affected by pseudohypoparathyroidism type Ib (PHP1B) reveals only one novel maternally inherited *GNAS* deletion: only one novel maternally inherited *GNAS* deletion among multiple PHP1B patients. *J. Bone Miner. Res.* **31**, 796–805.
- 214. Swieringa F., Solari F.A., Pagel O., Beck F., Huang J., Feijge M.A.H., Jurk K., Körver-Keularts I.M.L.W., Mattheij N.J.A., Faber J., Pohlenz J., Russo A., Stumpel C.T.R.M., Schrander D.E., Zieger B., van der Meijden P.E.J., Zahedi R.P., Sickmann A.,

32

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

Heemskerk J.W.M. (2020) Impaired iloprost-induced platelet inhibition and phosphoproteome changes in patients with confirmed pseudohypoparathyroidism type Ia, linked to genetic mutations in GNAS. *Sci. Rep.* **10**, 11389.

- 215. Jüppner H. (2021) Molecular definition of pseudohypoparathyroidism variants. J. Clin. Endocrinol. Metabolism. 106(6), 1541–1552. https://doi.org/10.1210/clinem/dgab060
- 216. Bastepe M. (2018) GNAS mutations and heterotopic ossification. *Bone*. **109**, 80–85.
- 217. Turan S., Bastepe M. (2018) GNAS complex locus. In: *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Ed. Choi S. Cham: Springer Internat. Publ., 2173–2185. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_101631
- 218. Colson C., Decamp M., Gruchy N., Coudray N., Ballandonne C., Bracquemart C., Molin A., Mittre H., Takatani R., Jüppner H., Kottler M.-L., Richard N. (2019) High frequency of paternal iso or heterodisomy at chromosome 20 associated with sporadic pseudohypoparathyroidism 1B. *Bone.* **123**, 145–152.
- Mulchandani S., Bhoj E.J., Luo M., Powell-Hamilton N., Jenny K., Gripp K.W., Elbracht M., Eggermann T., Turner C.L.S., Temple I.K., Mackay D.J.G., Dubbs H., Stevenson D.A., Slattery L., Zackai E.H., Spinner N.B., Krantz I.D., Conlin L.K. (2016) Maternal uniparental disomy of chromosome 20: a novel imprinting disorder of growth failure. *Genet. Med.* 18, 309–315.
- 220. Eggermann T., Oehl-Jaschkowitz B., Dicks S., Thomas W., Kanber D., Albrecht B., Begemann M., Kurth I., Beygo J., Buiting K. (2017) The maternal uniparental disomy of chromosome 6 (upd(6)mat) "phenotype": result of placental trisomy 6 mosaicism? *Mol. Genet. Genom. Med.* **5**, 668–677.
- 221. Mackay D.J.G., Boonen S.E., Clayton-Smith J., Goodship J., Hahnemann J.M.D., Kant S.G., Njølstad P.R., Robin N.H., Robinson D.O., Siebert R., Shield J.P.H., White H.E., Temple I.K. (2006) A maternal hypomethylation syndrome presenting as transient neonatal diabetes mellitus. *Hum. Genet.* 120, 262–269.
- 222. Boonen S.E., Pörksen S., Mackay D.J., Oestergaard E., Olsen B., Brondum-Nielsen K., Temple I.K., Hahnemann J.M. (2008) Clinical characterisation of the multiple maternal hypomethylation syndrome in siblings. *Eur. J. Hum. Genet.* 16, 453–461.
- 223. Mackay D.J.G., Callaway J.L.A., Marks S.M., White H.E., Acerini C.L., Boonen S.E., Dayanikli P., Firth H.V., Goodship J.A., Haemers A.P., Hahnemann J.M.D., Kordonouri O., Masoud A.F., Oestergaard E., Storr J., Ellard S., Hattersley A.T., Robinson D.O., Temple I.K. (2008) Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nat. Genet.* **40**, 949–951.
- 224. Quenneville S., Verde G., Corsinotti A., Kapopoulou A., Jakobsson J., Offner S., Baglivo I., Pedone P.V., Grimaldi G., Riccio A., Trono D. (2011) In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Mol. Cell.* 44, 361–372.

- 225. Ecco G., Imbeault M., Trono D. (2017) KRAB zinc finger proteins. *Development*. **144**, 2719–2729.
- 226. Farhadova S., Gomez-Velazquez M., Feil R. (2019) Stability and lability of parental methylation imprints in development and disease. *Genes (Basel)*. **10**(12), 999. https://doi.org/10.3390/genes10120999
- 227. Baglivo I., Esposito S., De Cesare L., Sparago A., Anvar Z., Riso V., Cammisa M., Fattorusso R., Grimaldi G., Riccio A., Pedone P.V. (2013) Genetic and epigenetic mutations affect the DNA binding capability of human ZFP57 in transient neonatal diabetes type 1. *FEBS Lett.* 587, 1474–1481.
- 228. Monteagudo-Sánchez A., Hernandez Mora J.R., Simon C., Burton A., Tenorio J., Lapunzina P., Clark S., Esteller M., Kelsey G., López-Siguero J.P., de Nanclares G.P., Torres-Padilla M.-E., Monk D. (2020) The role of ZFP57 and additional KRAB-zinc finger proteins in the maintenance of human imprinted methylation and multi-locus imprinting disturbances. *Nucl. Acids Res.* **48**, 11394–11407.
- 229. Takahashi N., Coluccio A., Thorball C.W., Planet E., Shi H., Offner S., Turelli P., Imbeault M., Ferguson-Smith A.C., Trono D. (2019) ZNF445 is a primary regulator of genomic imprinting. *Genes Dev.* **33**, 49–54.
- Kim J.D., Kim H., Ekram M.B., Yu S., Faulk C., Kim J. (2011) Rex1/Zfp42 as an epigenetic regulator for genomic imprinting. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1353–1362.
- Monk D., Sanchez-Delgado M., Fisher R. (2017) NLRPs, the subcortical maternal complex and genomic imprinting. *Reproduction*. 154, R161–170.
- Begemann M., Rezwan F.I., Beygo J., Docherty L.E., Kolarova J., Schroeder C., Buiting K., Chokkalingam K., Degenhardt F., Wakeling E.L., Kleinle S., González Fassrainer D., Oehl-Jaschkowitz B., Turner C.L.S., Patalan M., Gizewska M., Binder G., Bich Ngoc C.T., Chi Dung V., Mehta S.G., Baynam G., Hamilton-Shield J.P., Aljareh S., Lokulo-Sodipe O., Horton R., Siebert R., Elbracht M., Temple I.K., Eggermann T., Mackay D.J.G. (2018) Maternal variants in NLRP and other maternal effect proteins are associated with multilocus imprinting disturbance in offspring. *J. Med. Genet.* 55, 497–504.
- 233. Eggermann T., Kadgien G., Begemann M., Elbracht M. (2020) Biallelic PADI6 variants cause multilocus imprinting disturbances and miscarriages in the same family. *Eur. J. Hum. Genet.* **29**(4), 575–580. https://doi.org/10.1038/s41431-020-00762-0
- 234. Mackay D.J.G., Eggermann T., Buiting K., Garin I., Netchine I., Linglart A., de Nanclares G.P. (2015) Multilocus methylation defects in imprinting disorders. *Biomol. Concepts.* 6, 47–57.
- 235. Nakka P., Pattillo Smith S., O'Donnell-Luria A.H., McManus K.F., Mountain J.L., Ramachandran S., Sathirapongsasuti J.F., Agee M., Auton A., Bell R.K., Bryc K., Elson S.L., Fontanillas P., Furlotte N.A., Hicks B., Hinds D.A., Jewett E.M., Jiang Y., Lin K-H., McCreight J.C., Huber K.E., Kleinman A., Litterman N.K., McIntyre M.H., Noblin E.S., Northover C.A.M., Pitts S.J., Poznik G.D., Shelton J.F., Shringarpure S., Tian C., Tung J.Y., Vacic V., Wang X. (2019) Characterization of prevalence and health consequences of uniparental disomy in four million indi-

viduals from the general population. Am. J. Hum. Genet. 105, 921–932.

- 236. Yauy K., de Leeuw N., Yntema H.G., Pfundt R., Gilissen C. (2020) Accurate detection of clinically relevant uniparental disomy from exome sequencing data. *Genet. Med.* 22, 803–808.
- 237. Scuffins J., Keller-Ramey J., Dyer L., Douglas G., Torene R., Gainullin V., Juusola J., Meck J., Retterer K. (2021) Uniparental disomy in a population of 32,067 clinical exome trios. *Genet Med.* 23(6), 1101–1107. https://doi.org/10.1038/s41436-020-01092-8
- Gigante S., Gouil Q., Lucattini A., Keniry A., Beck T., Tinning M., Gordon L., Woodruff C., Speed T.P.,

Blewitt M.E., Ritchie M.E. (2019) Using long-read sequencing to detect imprinted DNA methylation. *Nucl. Acids Res.* **47**, e46–e46.

- 239. Klobučar T., Kreibich E., Krueger F., Arez M., Pólvora-Brandão D., von Meyenn F., da Rocha S.T., Eckersley-Maslin M. (2020) IMPLICON: an ultra-deep sequencing method to uncover DNA methylation at imprinted regions. *Nucl. Acids Res.* **48**, e92–e92.
- 240. Santoni F.A., Stamoulis G., Garieri M., Falconnet E., Ribaux P., Borel C., Antonarakis S.E. (2017) Detection of imprinted genes by single-cell allele-specific gene expression. *Am. J. Hum. Genet.* **100**, 444–453.

EPIGENETIC REGULATION DISTURBANCES ON GENE EXPRESSION IN IMPRINTING DISEASES

D. V. Zaletaev^{1, 2, *}, M. V. Nemtsova^{1, 2}, and V. V. Strelnikov²

¹Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

²Research Centre for Medical Genetics named after academician N.P. Bochkov, Moscow, 115522 Russia *e-mail: zalnem@mail.ru

Epigenetic regulation – hereditary and non-hereditary changes in the expression of a particular gene without any corresponding structural changes in its nucleotide sequence. Genomic imprinting is an epigenetic mechanism for regulating the expression of homologous genes depending on parental origin, i.e., they are expressed monoallelically in the mammalian diploid cell. Being genetically imprinted, only the maternal or only the paternal genome is unable to ensure normal embryonic development. The most studied epigenetic modification, which is assigned one of the main roles in the maintenance of imprinting processes, is the specific methylation of cytosine in the CpG- dinucleotides. All known imprinted genes contain differential DNA methylation regions on homologous parent chromosomes, which are necessary for their monoallelic expression. However, it is now known that not only DNA methylation, but chromatin remodeling, histone modifications, and non-coding RNAs as well ensure the proper functioning of imprinted genes in the human body. Structural and functional disturbances of epigenetic mechanisms lead to imprinting diseases.

Keywords: epigenetic regulation of gene expression, abnormal DNA methylation, differentially methylated regions, imprinting center, epimutations, uniparental dysomy, imprinting diseases

Acknowledgments: The reported study was funded by RFBR, project number 20-14-50138.

———— ОБЗОРЫ ———

УДК 577.218:578.834.1

МикроРНК КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ИНФИЦИРОВАНИЯ SARS-CoV-2 И МОДИФИКАТОРЫ КЛИНИЧЕСКОЙ КАРТИНЫ COVID-19¹

© 2022 г. А. Н. Кучер^{*a*}, Ю. А. Королёва^{*a*}, А. А. Зарубин^{*a*}, М. С. Назаренко^{*a*}, *

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

*e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru Поступила в редакцию 09.03.2021 г. После доработки 14.05.2021 г. Принята к публикации 25.05.2021 г.

Пандемия, вызванная вирусом SARS-CoV-2, определила актуальность выявления факторов, способных влиять как на риск инфицирования, так и на тяжесть течения COVID-19. Среди этих факторов особый интерес представляют микроPHK, обладающие широким регуляторным потенциалом. В представленном обзоре обсуждается возможная роль микроPHK человека и генома/микроPHK SARS-CoV-2 в инфицировании и определении клинической картины COVID-19. Обобщена информация о SARS-CoV-2-специфичных микроPHK человека, уровне их экспрессии в различных органах (клетках) в норме и при развитии заболеваний, которые являются факторами риска тяжелого течения COVID-19. Обсуждается возможное участие SARS-CoV-2 в развитии клинической картины COVID-19, в том числе и посредством подавления микроPHK и PHK-связывающих белков человека, изменения уровня экспрессии генов в инфицированных клетках, возможных эпигенетических модификаций генома человека с участием микроPHK коронавирусного происхождения.

Ключевые слова: микроРНК, SARS-CoV-2, COVID-19 **DOI:** 10.31857/S0026898422010049

введение

В 2020 году распространение респираторной инфекции COVID-19, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, привело к возникновению пандемии. COVID-19 поражает людей любого возраста, а клиническая картина данного заболевания варьирует от бессимптомного течения до тяжелого и критического состояния [1, 2]. В систематических обзорах, обобщающих данные о факторах риска, клинических признаках и симптомах COVID-19. отмечено, что тяжелое течение заболевания и повышенный риск летального исхода характерны для пациентов старше 60 лет, а также для лиц с такими сопутствующими заболеваниями, как артериальная гипертензия, сахарный диабет, сердечно-сосудистые и хронические респираторные заболевания [3, 4]. Кроме того, COVID-19 выступает в качестве фактора риска развития ряда патологий – вирусной пневмонии, дыхательной и острой почечной недостаточности, сепсиса [5], воспалительного поражения сосудов, повреждения миокарда, аритмии [6], тромботических осложнений (таких как острая ишемия конечностей, тромбоз брюшной и грудной аорты, инфаркт миокарда, венозная тромбоэмболия, острое нарушение мозгового кровообращения, диссеминированное внутрисосудистое свертывание) [7], неврологических нарушений [8]. В этой связи актуальным представляется поиск эндогенных факторов, способствующих инфицированию и/или неблагоприятному течению заболевания, вызванному SARS-CoV-2. Особый интерес в качестве маркеров функционального состояния организма и молекул с потенциальным терапевтическим эффектом вызывают микроPHK [9, 10].

МикроРНК – это некодирующие РНК длиной около 19–24 н. [11, 12]. В зависимости от того, из какого именно участка двухцепочечного предшественника-шпильки (3' либо 5') происходит зрелая одноцепочечная последовательность, микроРНК обозначают miR-3p, либо miR-5p [11, 13]. Механизм действия микроРНК заключается в комплементарном связывании с мРНК-мишенями, что приводит к торможению трансляции или разрушению мРНК [14].

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898422010049 для авторизованных пользователей.

МикроРНК вовлечены в регуляцию экспрессии более 60% всех белоккодирующих генов млекопитающих, они участвуют во всех основных биологических и патологических процессах, в том числе и в противовирусном ответе [12, 15]. К настоящему времени накоплен большой объем данных, свидетельствующих о том, что спектр и уровень экспрессии микроРНК зависят от функционального состояния организма и изменяется при развитии заболеваний [16, 17]. Имеются данные о том, что микроРНК клеток могут связываться с кодирующими регионами геномов РНК-содержащих вирусов (таких как ВИЧ, вирусы гепатита С, лихорадки денге и гриппа), тем самым оказывая противовирусное действие [2, 12, 14, 18]. Коронавирусы также относятся к РНК-содержащим вирусам, поэтому нельзя исключать, что среди множества факторов, влияющих на риск инфицирования и характер течения инфекции при сопутствующих коморбидных состояниях, определенную роль могут играть такие малые биомолекулы, как микроРНК.

Вирус SARS-CoV-2 — возбудитель COVID-19, принадлежит к роду бета-коронавирусов, включающему также вирусы SARS-CoV (возбудитель тяжелого острого респираторного синдрома) и MERS-CoV (возбудитель ближневосточного респираторного синдрома). Вспышки инфекций, вызванных SARS-CoV и MERS-CoV, произошли в 2002—2003 и 2012 гг. соответственно, но они не приобрели характера пандемии. Филогенетический анализ выявил до 79% сходства между геномами SARS-CoV-2 и SARS-CoV и до 50% — между геномами SARS-CoV-2 и MERS-CoV [18, 19].

Геном SARS-CoV-2 представлен одноцепочечной РНК положительной полярности. Длина референсной последовательности этой РНК, представленной в базе данных NCBI (NC 045512.2), составляет порядка 29.9 т.н. Около двух третей генома с 5'-конца заняты генами полипротеинов (ORF1a и ORF1b). Полипротеины вируса расщепляются протеазами на неструктурные белки (Nsp), которые формируют репликационно-транскрипционный комплекс. В состав оставшейся трети генома SARS-CoV-2 входят гены структурных белков гликопротеина шиповидных отростков (S-белка, или белка шипа, от spike – шип), белков мембраны (M, membrane), оболочки (E, envelope) и нуклеокапсида (N, nucleocapsid). Также геномная РНК SARS-CoV-2 включает нетранслируемые области: 5'-UTR и 3'-UTR [12, 19-22].

S-белок способствует проникновению вируса в клетку, связываясь для этого с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) [21]. Белок Е формирует оболочку вируса и участвует в образовании гидрофильных пор в клеточных мембранах, белок М определяет форму оболочки вируса и служит центральным организатором сборки коронавируса [15, 23]. Белок N связан с геномной РНК коронавируса, а также с Nsp3 – неструктурным белком репликационно-транскрипционного комплекса, помогающим упаковке генома в вирионы [20].

Вирус SARS-CoV-2 относится к внутриклеточным патогенам, и для обеспечения своего функционирования и репликации использует клеточную машинерию организма-хозяина. Поэтому успешность инфицирования будет зависеть от функционального состояния клетки-хозяина (соотношения факторов, благоприятных и неблагоприятных для этого процесса) и возможности быстро "перестроить" молекулярную физиологию клетки и организма в целом так, чтобы обеспечить размножение и распространение вируса (например, возможность "уйти" от иммунного контроля организма). Подавлению входа SARS-CoV-2 в клетку и ограничению его репликации может способствовать повышенный уровень микроРНК, мишенью которых служат гены S, M, N, Eи ORF1ab, в то время как низкий уровень этих микроРНК создает благоприятные условия для инфицирования клетки и репликации коронавируса [15]. Однако в патогенезе COVID-19 могут участвовать микроРНК не только клеток человека, но и SARS-CoV-2: геном этого коронавируса потенциально способен продуцировать микроРНК, которые могут участвовать в эпигенетических процессах в инфицированных клетках [19]. Кроме того, микроРНК человека могут вызывать разнонаправленные эффекты – как подавлять инфицирование, так и выступать в роли провирусных факторов [19, 24], а инфицирование клеток SARS-CoV-2 приводит к изменению экспрессии микроРНК в клетках человека [11]. Более высокий уровень инфицирования SARS-CoV-2 по сравнению с другими коронавирусами позволяет предположить, что именно различия в структуре специфичных участков генома коронавирусов определяют их влияние как на риск заражения, так и на течение COVID-19. Особенности структуры генома коронавирусов также могут приводить к формированию различных мишеней, связывающих микроРНК человека и, соответственно, определять "сценарии" течения болезни при наличии сопутствующих патологий. вызывающих изменение спектра и уровня экспрессии микроРНК в организме.

В обзоре рассмотрены различные аспекты роли микроРНК в патогенезе COVID-19. В качестве источника информации использованы база PubMed и интернет-ресурсы, содержащие данные об экспрессии микроРНК в тканях и клетках человека, и их значимости в развитии различных заболеваний человека (TissueAtlas [25], FANTOM5 [26] и Human MicroRNA Disease Database – HMDD [16]).
МикроРНК ЧЕЛОВЕКА, СПЕЦИФИЧНЫЕ ДЛЯ ГЕНОМА SARS-CoV-2

На основании поискового запроса с использованием различных комбинаций терминов microRNA, miRNA, SARS-CoV-2 и COVID-19 в базе данных PubMed на конец 2020 года выявлены 16 публикаций, в которых представлена информация о микроРНК, потенциально способных связываться с геномом SARS-CoV-2. Число таких микроРНК (по данным разных исследователей) варьировало от трех до более 1000, что связано с использованием разных баз данных, аналитических инструментов, а также с различиями в числе привлеченных микроРНК и последовательностей генома SARS-CoV-2 (табл. S1, см. Приложение на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/ 2022/1/supp Kucher rus.pdf). Некоторые микроРНК, имеющие мишени в геноме SARS-CoV-2, также способны связываться с геномами SARS-CoV и MERS-CoV, а в отдельных случаях и с геномами низкопатогенных коронавирусов, вызывающих легкие формы острой респираторной инфекции. Эти микроРНК были исключены из дальнейшего анализа, чтобы провести поиск микроРНК, которые могут определять высокую патогенность именно SARS-CoV-2. Кроме того, критерием включения SARS-CoV-2-специфичных микроРНК в анализ было их упоминание в качестве специфичных в двух и более публикациях (с целью снижения вероятности ошибочного описания потенциально значимых для инфицирования клеток микроРНК). В итоге отобраны 39 микроРНК, отвечающих указанным критериям (табл. 1).

Необходимо отметить, что разные последовательности зрелых микроРНК, происходящих из общего предшественника, могут отличаться способностью связываться с геномами разных коронавирусов. Так, hsa-miR-195-3р способна связываться только с геномом SARS-CoV-2, в то время как hsa-miR-195-5р может связываться также с геномами как SARS-CoV, так и других коронавирусов [2, 34]. Поэтому в дальнейшем (во всех возможных случаях) внимание уделяли именно той последовательности микроРНК (-3р или -5р), которую изучали в привлеченных к рассмотрению исследованиях. Тем не менее, работы, в которых последовательность микроРНК не была конкретизирована (-3р или -5р), также включали в рассмотрение (далее микроРНК приведены в том виде, в котором они указаны в оригинальных публикациях).

Участки генома SARS-CoV-2 различаются по числу микроPHK, способных с ними связываться: больше всего микроPHK (22) описано для *ORF1ab*, а также для генов, кодирующих S- и Nбелок (табл. 1), что, в целом, согласуется с размерами соответствующих генов (хотя размер гена,

кодирующего S-белок, в несколько раз больше гена, кодирующего белок нуклеокапсида) [35]. В качестве мишеней отдельных микроРНК описаны от одного до трех генов SARS-CoV-2, но в ряде случаев локализация мишеней микроРНК авторами исследований не указана (см. табл. 1). На настоящий момент неизвестно, может ли влиять на ограничение инфицирования то, какой именно ген SAR-CoV-2 служит мишенью для микроРНК клеток организма-хозяина, но можно предположить, что наличие нескольких мишеней для разных микроРНК благоприятствует защите человека от инфекции. Это связано со способностью генома SARS-CoV-2 мутировать, что может приводить как к потере, так и к появлению новых мишеней для одной и той же микроРНК или к возникновению мишеней для других микроРНК, которые ранее не имели мишеней на геноме коронавируса. Такая ситуация наблюдалась, в частности, при сравнении профилей связывания 24 микроРНК человека с 67 различными геномами SARS-CoV-2, выявленными на территории 24 стран [19]. В их число входили и четыре микроРНК, привлеченные к анализу в нашей работе: hsa-miR-23b-5p, -378c, -549a-3p и -12119, мишени которых "потеряны" в 2, 1, 11 и 2 геномах SARS-CoV-2 соответственно. Примечательно, что некоторые кластеры микроРНК, выделенные на основании профилей связывания с геномом SARS-CoV-2, оказались ассоциированными с повышенной смертностью от COVID-19 в странах, где они были выявлены [19], что свидетельствует о значимости как микроРНК хозяина, так и особенностей генома коронавируса для клинической картины COVID-19. С этой точки зрения наиболее уязвимым геном SARS-CoV-2 является ORF1ab, поскольку с ним потенциально может связываться наибольшее число микроРНК, а самый заметный защитный эффект могут оказывать hsa-miR-1910-3р и hsa-miR-3190-3р, имеющие не менее трех генов-мишеней в геноме данного коронавируса (табл. 1).

Способность защищать клетки хозяина зависит не только от наличия мишеней в геноме SARS-CoV-2, но и от уровня экспрессии микроРНК. В клетках органов, через которые вирус проникает в организм, уровень экспрессии микроРНК может влиять на защиту от SARS-CoV-2, в других органах — на риск развития осложнений. Известно, что для экспрессии микроРНК характерны тканевая и клеточная специфичность, чувствительность к воздействию средовых факторов и зависимость от функционального состояния организма. Поэтому мы проанализировали данные из общедоступных баз по экспрессии микроРНК в органах (и клетках) здоровых индивидов (TissueAtlas [25], FANTOM5 [26]), а затем обобщили информацию об изменении уровня экспрессии этих микроРНК при некоторых заболе-

микроРНК	MIMAT, номера miRBase*	Гены-мишени	Источник
hsa-miR-16-2-3p	MIMAT0000069	Не указаны	[2, 11]
hsa-miR-23b-5p		ORF8	[15, 19]
	MIMA10004587	Не указаны	[27]
hsa-miR-34c-3p	MIMAT0004677	Не указаны	[2, 14]
1	NUMAT0004602	Ген S-белка	[19]
hsa-m1R-125a-3p	MIMAI 0004602	Не указаны	[2, 11]
haa miD 141 2m	NUMAT0000422	ORF1ab	[28]
hsa-m1R-141-3p	MINIAI 0000432	Не указаны	[2, 11]
hsa-miR-142-3p	MIMAT0000434	Не указаны	[9, 11]
here $miD_{102h} 5n$	MIMAT0004767	Ген М-белка	[28]
lisa-lilik-1950-5p	WINNAT 0004707	Не указаны	[11]
hee miD 105 2n	MIMAT0004615	ORF1ab, S	[28]
hsa-m1R-195-3p	MINIAI 0004613	Не указаны	[2, 11, 29]
		Nsp3, ORF1a	[30]
hsa-miR-197-5p	MIMAT0022691	ORF1ab	[19]
		Не указаны	[11]
here miP_{2030} 5n	MIMAT0031800	Ген S-белка	[28]
nsa-m1R-203a-5p	MIMA10031890	Не указаны	[2, 14]
	MIMAT0026474	Ген N-белка	[15, 19]
hsa-miR-208a-5p		ORF1ab	[28]
		Не указаны	[2]
$h_{sa}-miR_{-208h_{-}5n}$	MIMAT0026474	ORF1ab	[28]
nsa-mix-2000-5p		Не указаны	[2, 14]
hsa-miR-325	MIMAT0000771	Ген М-белка	[15]
		ORF1ab	[28]
		Не указаны	[2]
$h_{sa}-miR_{-378c}$	MIMAT0016847	ORF1ab	[19]
115a-1111K-3/00		Не указаны	[2, 27, 31]
hsa-miR-548ag	MIMAT0018969	ORF1ab	[15, 28]
		Ген S-белка	[15]
		Не указаны	[2]
hsa-miR-549a-3p	MIMAT0003333	ORF1ab	[19, 28]
		ORF3a	[15]
		Не указаны	[2]
here miP_{605} 5n	MIMAT0003273	ORF1ab	[28]
nsu mix-005-5p		Не указаны	[2, 28]
hsa-miR-628-3n	MIMAT0004809	ORF1ab	[19, 28]
nsu mix-020-3p		Не указаны	[2]
hsa-miR-668-3n	MIMAT0003881	5'-UTR	[18]
пза ппк-000-эр	WHWA10003001	Не указаны	[2, 14]

Таблица 1. МикроРНК человека, потенциально способные связываться с различными генами коронавируса SARS-CoV-2

Таблица 1. Окончание

микроРНК	MIMAT, номера miRBase*	Гены-мишени	Источник
hsa-miR-1246	MIN AT0005000	ORF3a	[15]
	MIMAI 0005898	Не указаны	[11]
hsa-miR-1293		3'-UTR	[22]
	MIMAT0005883	ORF1ab	[28]
		Не указаны	[2, 11]
1 'D 1010 2		<i>ORF1ab/ORF7a</i> /ген N белка	[15]
hsa-m1K-1910-3p	MIMAI 0026917	Не указаны	[11]
hsa-miR-2392	MIMAT0019043	ORF8	[15, 19]
her m:D 2120 5r		ORF1ab	[19]
nsa-m1K-3120-3p	MIMA10019198	Не указаны	[31]
hea miD 2122	MIMAT0014007	ORF3a	[19]
IISA-IIIIK-3132	MIIMAI 0014997	Не указаны	[11]
hsa-miR-3135b	MIMAT0018985	ORF7a	[15, 19]
hea miD 3155a	MIMAT0015020	Ген N-белка	[15, 19]
IISa-IIII K -5155a	WIIWAT 0015029	Не указаны	[2]
		ORF1ab	[15, 19]
hea miP 2100 2n	MIMAT0022839	ORF8	[15]
lisa-iiii x -3190-3p	WIIWAI 0022839	Ген S-белка	[28]
		Не указаны	[2]
hea miP 3014	MIMAT0018188	ORF1ab	[19, 28]
115a-1111K-3714		Не указаны	[31]
hsa mi R 1510	MINAT0010047	ORF3a	[15]
115a-1111 X-4 510	NIINIAI 0019047	Ген S-белка	[19]
	MIMAT0019770	ORF7a	[19]
hsa-miR-4684-3p		Ген N-белка	[28]
		Не указаны	[2]
hsa_miR_5087	MIMAT0021079	ORF1ab	[28]
IISa-IIIIK-3087		Не указаны	[2, 32]
		ORF7a	[15]
hsa-miR-5590-3p	MIMAT0022300	ORF1ab	[28]
		Не указаны	[2]
hsa-miR-6736-5p	MIMAT0027373	ORF1ab	[19]
		Не указаны	[11]
hsa-miR-6741-5p	MIMAT0027383	Ген N-белка	[15]
		ORF1ab	[19]
		Не указаны	[29]
hsa-miR-6751-5p	MIMAT0027402	ORF3a	[15, 19]
hsa-miR-6837-3p	MIMAT0027577	ORF1ab	[19]
		5'-UTR	[18]
		Не указаны	[2]
hsa-mi R -8066	MIMAT0030993	Ген N-белка	[15, 19]
		Не указаны	[12, 31]
hsa-miR-12110	MIMAT0049013	ORF1ab	[15]
115a-1111 N- 12119	1911191231 0072013	Ген N-белка	[19]

* Данные взяты из базы miRBase [33].



Рис. 1. Теплокарта, отражающая экспрессию микроРНК, потенциально способных связываться с геномом вируса SARS-CoV-2, в тканях различных органов человека (согласно TissueAtlas [25]). Использованы значения логарифма квантильно нормированного уровня экспрессии микроРНК – log₂(QNE).

ваниях, значимых для определения клинической картины COVID-19 (PubMed, Human MicroRNA Disease Database [16]).

ЭКСПРЕССИЯ микроРНК, ПОТЕНЦИАЛЬНО СПОСОБНЫХ СВЯЗЫВАТЬСЯ С ГЕНОМОМ ВИРУСА SARS-CoV-2, В ТКАНЯХ И КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

При выборе тканей, органов и типов клеток, в которых анализировали микроРНК, потенциально способные связываться с геномом SARS-CoV-2, учитывали результаты эпидемиологических исследований их чувствительности к воздействию данного коронавируса и/или поражаемость при COVID-19 [3–8]. Всего проанализировали 16 тканей (рис. 1) и 20 типов клеток (рис. 2) различных органов.

Имеющиеся данные об уровне экспрессии микроРНК в тканях и органах здорового человека весьма немногочисленны: в TissueAtlas [25] представлены результаты анализа образцов, полученных от одного индивида, умершего естественной смертью. Экспрессия 22 из 39 рассмотренных микроРНК выявлена в тканях легкого, различных отделов го-

ловного мозга, желудочно-кишечного тракта, сердца, артерий, почек и предстательной железы (всего 16 органов) (рис. 1). Выделены три кластера микроРНК: в первый входят пять микроРНК с относительно высоким уровнем экспрессии в тканях всех органов (hsa-miR-197-5p, -1246,-3135b, -2392 и -125а-3p), во второй — семь микроРНК со средним уровнем экспрессии (hsa-miR-3132, -605-5p, -142-3p, -193b-5p, -3190-3p, -195-3p, -141-3p), и в третий – 12 микроРНК с низким уровнем экспрессии. Зарегистрирована экспрессия лишь одной из двух микроРНК, имеющих наибольшее число мишеней на геноме SARS-CoV-2 – hsa-miR-3190-3р (табл. 1), но ее уровень был относительно невысоким (ниже средних значений) (рис. 1). Однако уровень экспрессии микроРНК в пределах кластеров также характеризуется тканевой специфичностью. В зависимости от уровня экспрессии микроРНК ткани органов также группируются в три кластера (рис. 1). В ткани легкого на наиболее высоком уровне экспрессируются hsa-miR-197-5p, -1246, -3135b (>10 log₂(квантильно нормализованного уровня экспрессии микроРНК – QNE)), и эти микроРНК могут рассматриваться в качестве потенциально значимых для ограничения инфицирования SARS-CoV-2.



Рис. 2. Теплокарта, отражающая экспрессию микроРНК, потенциально способных связываться с геномом вируса SARS-CoV-2, в первичных культурах клеток человека (согласно атласу FANTOM5 [26]). Использован логарифм уровня экспрессии микроРНК, нормализованного по количеству прочтений на миллион – или log₂(CPM); *n* – число образцов, информация по которым представлена в базе FANTOM5.

Поскольку ткани имеют гетерогенную клеточную структуру, на втором этапе проанализированы особенности экспрессии 39 отобранных микроРНК в различных типах клеток, информация по которым представлена в базе FANTOM5 [26], в том числе – в эпителиальных клетках разных органов, в клетках крови и др. (рис. 2). Информация об уровне экспрессии в выбранных для рассмотрения клетках была доступна для 36 из 39 микроРНК. Экспрессия 11 из 36 этих микроРНК не выявлена в анализируемых типах клеток (hsa-miR-3135b, -8066, -6741-5p, -6736-5p, -5590-3p, -5087, -4684-3р, -3914, -3132, -208а-5р и -208b-5р – данные по этим микроРНК не представлены на рис. 2), экспрессия еще шести микроРНК (hsa-miR-548ag, -3120-5р, -4510, -1246, -2392, -6751-5р) регистрировалась на очень низком уровне ($<1.0 \log_2(CPM)$) в единичных типах клеток, а оставшиеся 19 микроРНК экспрессируются на более высоком уровне (>1.0 log₂(CPM)), который варьировал в разных типах клеток. Лишь hsa-miR-16-2-3р имеет средний (и примерно равный) уровень экспрессии во всех анализируемых типах клеток (5.71-7.91 log₂(CPM)). Ни одна из микроРНК, имеющих не менее трех мишеней в геноме SARS-CoV-2 (табл. 1), не относится к категории высоко экспрессирующихся в рассмотренных типах клеток (рис. 2).

Уровень экспрессии некоторых микроРНК был специфичным для разных типов клеток: hsamiR-142-3р имела высокий уровень экспрессии (>10 log₂(CPM)) в клетках крови и невысокий (или нулевой) в других типах клеток; hsa-miR-141-3р — высокий уровень экспрессии в эпителиальных клетках респираторного и пишеварительного тракта, предстательной железы, а также в В-лимфоцитах, средний уровень — в других типах клеток крови и низкий – во всех остальных типах клеток. Уровень экспрессии hsa-miR-125а-3р был низким в клетках крови и средним в других типах клеток. Уровень экспрессии других микроРНК также зависел от типа клеток, но в целом был невысоким (в большинстве случаев – $<4.0 \log_2(CPM)$). Исходя из приведенных данных об уровне экспрессии микроРНК в различных типах клеток в норме (рис. 2), можно заключить, что для участия в определении ответа организма на инфицирование SARS-CoV-2 и в клинической картине COVID-19 наиболее перспективны hsa-miR-16-2-3р, -125а-3р, -141-3р, -142-3р и, в меньшей степени, hsa-miR-378, -628-3p, -1293, -23b-5p, -34с-3p, -193b-5p, -668-3p и -195-3p. Эти микроРНК имеют мишени в геноме SARS-CoV-2, поэтому можно ожидать, что высокий уровень их экспрессии будет снижать риск инфицирования и/или тяжелого течения болезни. Особое место в этом ряду занимает hsa-miR-141-3p, характеризующаяся высоким уровнем экспрессии в эпителиальных клетках нижних дыхательных путей и пищеварительного тракта, которые служат первым барьером на пути инфицирования SARS-CoV-2.

ЭКСПРЕССИЯ микроРНК, ПОТЕНЦИАЛЬНО СПОСОБНЫХ СВЯЗЫВАТЬСЯ С ГЕНОМОМ ВИРУСА SARS-CoV-2, ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Поскольку уровень экспрессии микроРНК зависит от функционального состояния организма и может меняться при развитии патологий [16, 17], а ряд болезней и коморбидных состояний выступают в качестве фактора риска развития тяжелого течения COVID-19 [3, 4, 36], нами проанализированы изменения профилей микроРНК, специфичных для SARS-CoV-2, при различных заболеваниях. Такая информация доступна для 16 микроРНК (табл. 2), среди которых, к сожалению, отсутствовали выделенные на предыдущих этапах такие потенциально значимые для определения риска инфицирования SARS-CoV-2 и характера клинической картины COVID-19 микроРНК, как hsa-miR-1910-3p, hsa-miR-3190-3p (имеют не менее трех мишеней на геноме SARS-CoV-2 (табл. 1)), hsa-miR-3135b (высокий уровень экспрессии в различных органах (рис. 1)).

Согласно данным, представленным в базе HMDD [16], уровень большинства микроРНК, специфичных для SARS-CoV-2, изменяется в крови или пораженных органах при различных заболеваниях, в том числе при патологиях дыхательной и сердечно-сосудистой системы (особенно при артериальной гипертензии), при сахарном диабете и его осложнениях, аутоиммунных (табл. 2) и ряде других заболеваний. К сожалению, не во всех анализируемых публикациях указано, из какой цепи происходит микроРНК с измененным уровнем экспрессии, а иногда микроРНК рассматриваются лишь на уровне семейств, но они не были исключены из дальнейшего анализа.

Наибольший интерес представляют заболевания дыхательной системы, при которых изменяется уровень экспрессии микроРНК человека, специфичных для связывания с геномом SARS-CoV-2. Зарегистрировано изменение уровня экспрессии семи SARS-CoV-2-специфичных микроРНК человека при ХОБЛ, легочной гипертензии, бронхиальной астме и бактериальной пневмонии (табл. 2). Три из этих микроРНК (hsa-miR-125a-3p, -197-5р и -1246) относятся к категории высоко экспрессирующихся в тканях разных органов, в том числе и в ткани легкого (см. рис. 1).

Уровень специфичных для SARS-CoV-2 микроРНК определен в ткани легкого и/или в крови пациентов, либо модельных объектов (мышей) с разными заболеваниями легочной системы. В большинстве исследований при развитии патологии легких регистрировали снижение уровня различных микроРНК. Так, ни при одном из рассмотренных заболеваний дыхательной системы не выявлено увеличения SARS-CoV-2-специфичных микроРНК в ткани легкого человека (табл. 2).

Снижение уровня hsa-miR-203 зарегистрировано в клетках бронхиального эпителия при бронхиальной астме [43] и в ткани легкого у курящих пациентов с ХОБЛ по сравнению со здоровыми индивидами как курящими, так и не курящими [40]. Однако в крови этих же пациентов с ХОБЛ уровень hsa-miR-203 был выше, чем у некурящих, но несколько меньше (статистически незначимо), чем у курящих здоровых индивидов [40]. Можно предположить, что курение является значимым фактором, влияющим на уровень экспрессии hsa-miR-203, а увеличение у курящих уровня данной микроРНК может объяснять то, что некоторые исследователи не рассматривают курение как фактор риска COVID-19 [77].

Снижение уровня hsa-miR-203 в ткани легкого при ХОБЛ (в норме эта микроРНК экспрессируется в клетках дыхательного эпителия на невысоком уровне (рис. 2)) предположительно может быть неблагоприятным фактором в отношении COVID-19, но высокий уровень hsa-miR-203 в лейкоцитах крови может сдерживать распространение инфекционного процесса за пределы легкого. Благоприятствовать развитию COVID-19 должен также более низкий уровень hsa-miR-203 в эпителии бронхов при астме (табл. 2), но астму не рассматривают как фактор риска COVID-19 [78, 79].

В то же время увеличение экспрессии miR-203 в ткани легких наблюдали на модельных объектах при пневмонии, индуцированной воздействием липополисахарида (LPS) [44]. Повышение уровня hsa-miR-203 зарегистрировано также в образцах слизистой оболочки носа младенцев, инфицированных респираторно-синцитиальным вирусом [80]. Следует отметить, что у абсолютного большинства пациентов с COVID-19 выявляются сопутствующие инфекции бактериальной, вирусной или грибковой природы [81].

Интересными представляются также данные о связи снижения уровня hsa-miR-1246 в сыворотке с увеличением продолжительности заболевания ХОБЛ, причем у 3/4 пациентов с низким уровнем данной микроРНК регистрировалась эмфизема легких [39]. Снижение уровня этой микроРНК наблюдали также в лейкоцитах крови при легочной гипертензии [41]. Hsa-miR-1246 относится к категории микроРНК, высоко экспрессирующихся в различных органах (рис. 1), но ее уровень снижен в легочной ткани курильщиков. При этом has-miR-1246 регулирует экспрессию гена *ACE2*,

Патология	Источник микроРНК	МикроРНК	Изменение уровня микроРНК	Источ- ник
	Заболевания дыха	тельной сист	еемы	
ХОБЛ	Легочная артерия	miR-197	↓ по сравнению с некурящими	[37]
	Плазма крови	miR-628-3p	↓ по сравнению с курящими и с некурящими	[38]
	Сыворотка крови	miR-1246	↓ у пациентов через 10 лет; у 75% выявлена эмфизема	[39]
ХОБЛ, курильщики	Кровь	miR-203	↑ по сравнению с некурящими, но ниже (не значимо), чем у курильщиков	[40]
	Ткани легких	miR-203	↓ по сравнению как с куря- щими, так и с некурящими	
Легочная гипертензия	Лейкоциты крови	miR-1246	\downarrow	[41]
		miR-23b	\uparrow	
Тяжелая легочная гипертен- зия	Лейкоциты крови	miR-208b	↑ по сравнению с контролем и легочной гипертензией сред- ней степени тяжести	
Легочная гипертензия у мышей	Гипоксичная легочная ткань	miR-125a	Î↑	[42]
	Циркулирующие мик- poPHK	miR-125a	\downarrow	
Бронхиальная астма	Бронхиальный эпителий	miR-203	\downarrow	[43]
LPS-индуцированная пнев- мония у мышей	Ткани легких	miR-203	↑ повышается и достигает мак- симума через 5 дней	[44]
	Заболевания сердечно	-сосудистой с	системы	•
Гипертензия и сердечная недостаточность	Мононуклеарные клетки периферической крови	miR-208b	↑ по сравнению с гипертензией без сердечной недостаточности	[45]
Гипертензия с гипертро- фией левого желудочка	Плазма крови	miR-208	1	[46]
Гипертензия, в т.ч. с гипер- трофией левого желудочка	Мононуклеары перифе- рической крови	miR-208	1	[17, 47]
Гипертонический нефро- склероз	Ткани почек	miR-141	\uparrow	[48]
Сердечная недостаточ- ность, стадии С или D	Сыворотка крови	miR-197-5p	\uparrow	[49]
Сердечная недостаточность	Плазма крови	miR-193b- 5p	\downarrow	[50]
Сердечная недостаточность с уменьшенной фракцией выброса левого желудочка	Плазма крови	miR-193b- 5p	\downarrow	[50]
Ишемия во время хирурги- ческого вмешательства	Миокард правого пред- сердия	miR-195	\downarrow	[51]
Ишемическая и неишеми- ческая сердечная недоста- точность	Плазма крови	miR-195-3p	1	[52]

Таблица 2. Изменение уровня микроРНК, потенциально способных связываться с геномом вируса SARS-CoV-2, при различных заболеваниях

Патология	Источник микроРНК	МикроРНК	Изменение уровня микроРНК	Источ- ник
Ишемическая болезнь сердца	Плазма крови	miR-208a	1	[53]
Обструктивная ишемиче- ская болезнь сердца	Плазма крови	miR-3135b	1	[54]
Гипертрофия миокарда	Миокард левого желу-	miR-23	\uparrow	[55]
левого желудочка, мыши	дочка	miR-195	\uparrow	
Гипертрофия миокарда левого желудочка	Миокард левого желу- дочка	miR-195	1	[56]
Гипертрофическая кардио- миопатия, кошки	Сыворотка крови	miR-1246	\uparrow	[57]
Фибрилляция предсердий	Миокард предсердий	miR-208a	↓ по сравнению с синусовым ритмом	[58]
Хроническая фибрилляция предсердий	Миокард	miR-208b	1	[59]
Инфаркт миокарда	Плазма крови	miR-195-3p	↑ через 8 ч (максимальное значе- ние) и 12 ч после инфаркта	[60]
Инфаркт миокарда	Миокард	miR-208	\uparrow	[61]
Стенокардия	Плазма крови	miR-208a	↑ по сравнению с контролем и инфарктом миокарда	[62]
Диастолическая дисфунк- ция миокарда	Плазма крови	miR-1246	↑	[63]
Стабильная компенсиро- ванная дилатационная кар- диомиопатия (систолическая + диастоли- ческая дисфункция); деком- пенсированная застойная сердечная недостаточность, вторичная по отношению к дилатационной кардиомио- патии	Плазма крови	miR-142-3p	Ţ	[63]
Аневризма коронарной артерии у детей с болезнью Кавасаки	Экзосомы сыворотки крови	miR-1246	↓ по сравнению со здоровыми и инфицированными вирусами Эпштейна—Барр и болезни Ауески	[64]
Лица с высоким риском сердечно-сосудистой пато- логии	Сыворотка крови	miR-23b	1	[65]
	Сахарный диабет	и и его осложн	ения	
Сахарный диабет типа 2	Плазма крови	miR-197	\downarrow	[66]
Сахарный диабет типа 1 или 2	Периферическая кровь	miR-23b	\downarrow	[67]
Преддиабетическое состо- яние	Сыворотка крови	miR-193b	1	[68]

Таблица 2. Продолжение

Таблица 2. Окончание

Патология	Источник микроРНК	МикроРНК	Изменение уровня микроРНК	Источ- ник		
Диабетическая нефропатия	Экзосомы сыворотки крови	miR-1246	↑ по сравнению с контролем и с больными диабетом без нефро- патии	[69]		
Ишемическая диабетиче- ская кардиомиопатия	Миокард левого желу- дочка	miR-23b	\downarrow	[70]		
Пролиферативная диабети- ческая ретинопатия	Стекловидное тело	miR-142-3p	1	[71]		
	Аутоиммунные заболевания					
Язвенный колит, активная фаза	Воспаленная толстая кишка	miR-378c	↑ при проведении анти-TNF- терапии по сравнению с дру- гими видами терапии	[72]		
Системная красная вол- чанка	Ткани почек	miR-23b	\downarrow	[73]		
Ревматоидный артрит	Синовиальные ткани суставов	miR-23b	\downarrow	[73]		
Болезнь Крона, язвенный колит, активная фаза; рев- матоидный артрит	Сыворотка крови	miR-1246	↑ по сравнению с контролем и неактивной формой заболева- ния (для болезни Крона и язвен- ного колита)	[74]		
Кожная волчанка, подострое и дискоидальное поражение	Сыворотка крови	miR-1246	\downarrow	[75]		
Кожная волчанка, подострое поражение	Сыворотка крови	miR-23b	Ţ	[75]		
Болезнь Грейвса	Мононуклеары перифе- рической крови	miR-23b-5p	↑ в стадии ремиссии по сравне- нию с трудноизлечимыми паци- ентами	[76]		

Примечание. ↑ и ↓ – повышение и понижение уровня микроРНК по сравнению с контролем (если не указано иное) соответственно.

кодирующего один из ключевых рецепторов SARS-CoV-2 [21, 82]. Соответственно, низкий уровень hsa-miR-1246 может благоприятствовать инфицированию вирусом SARS-CoV-2 как лег-ких, так и других органов через усиление экспрессии *ACE2*.

Разнонаправленное влияние курения на SARS-CoV-2-специфичные микроPHK человека (в частности, miR-1246 и miR-203) свидетельствует о сложности установления причины изменения уровня экспрессии разных микроPHK (экзогенный фактор/патология) и, соответственно, выделения условий, определяющих как риск инфицирования, так и характер течения COVID-19. Кроме того, в некоторых случаях при одной и той же патологии наблюдали разнонаправленные изменения экспрессии микроPHK в разных тканях (табл. 2), как это показано и для miR-125a, уровень

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

которой при легочной гипертензии у мышей возрастал в ткани легкого, но снижался в крови [42].

Таким образом, выявлены изменения уровня экспрессии ряда SARS-CoV-2-специфичных микроРНК при заболеваниях дыхательной системы. Эти изменения могут быть разнонаправленными, иногда одна и та же микроРНК может экспрессироваться на разном уровне в разных тканях (легкие, кровь), они могут модифицироваться средовыми воздействиями (в частности, курением и бактериальной инфекцией).

Изменение уровня SARS-CoV-2-специфичных микроРНК человека при других заболеваниях может влиять на риск развития осложнений при COVID-19. Уровень экспрессии данных биомолекул при различных патологиях чаще определяли в клетках или в экзосомах крови, реже — в пораженных органах (табл. 2). Сердечно-сосудистые заболевания считаются фактором риска осложненного течения COVID-19 [3, 4, 83]. Однако в большинстве исследований отмечено увеличение уровня экспрессии SARS-CoV-2специфичных микроРНК (табл. 2), что должно защищать организм от развития COVID-19. В данном случае, следует принять во внимание несколько моментов.

Во-первых, увеличение уровня SARS-CoV-2специфичных микроРНК человека часто отражает тяжесть патологического процесса (табл. 2). Например, при сердечной недостаточности наблюдается повышение уровня hsa-miR-197-5p в сыворотке крови и корреляция уровня данной микроРНК с фиброзом миокарда и неблагоприятными сердечными событиями у пациентов [49]. Иными словами, более высокие уровни ряда микроРНК отражают тяжесть или позднюю стадию течения основного заболевания, и это может быть более значимым прогностическим фактором здоровья и/или исхода сопутствующего заболевания и COVID-19, чем возможность блокировать распространение в организме SARS-CoV-2.

Во-вторых, SARS-CoV-2 попадает в организм через дыхательную систему, и после инфицирования может меняться паттерн экспрессии генов (в том числе и генов микроРНК) как в легких, так и в других органах [9, 84].

В-третьих, лишь три микроРНК, уровень которых изменялся при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, относились к категории высоко экспрессирующихся (hsa-miR-197-5p, -3135, -1246), а одна (hsa-miR-141) экспрессировалась на среднем уровне (рис. 1, 2). В то же время уровень экспрессии микроРНК может иметь значение для подавления распространения коронавируса в организме на этапе виремии и, конечно, этот процесс будет зависеть от вирусной нагрузки на организм в целом.

При заболеваниях сердечно-сосудистой системы зарегистрировано снижение уровня экспрессии только пяти микроРНК (табл. 2): hsa-miR-193b-5p в плазме крови при сердечной недостаточности [50]; hsa-miR-195 в миокарде при ишемии во время хирургического вмешательства [51]; hsa-miR-208a в миокарде при фибрилляции предсердий [58]; hsamiR-142-3p в плазме крови при систолической и диастолической дисфункции, вторичной по отношению к дилатационной кардиомиопатии [63]; и hsa-miR-1246 — в экзосомах сыворотки крови при аневризме коронарной артерии у детей с болезнью Кавасаки [64].

Интересно, что у детей и взрослых, инфицированных SARS-CoV-2, иногда наблюдают мультисистемный воспалительный синдром, по клинической картине сходный с болезнью Кавасаки [85–87]. Не исключено, что снижение уровня hsamiR-1246 путем связывания с геномом SARS- CoV-2 может не только способствовать проникновению коронавируса в клетку посредством увеличения уровня экспрессии его рецептора (ACE2), но и изменять другие метаболические пути, определяющие патогенез каваски-подобного мультисистемного воспаления и ряда аутоиммунных заболеваний, что все чаще отмечается в эпидемиологических исследованиях [88]. Кроме того, в цельной крови пациентов со средним и тяжелым течением COVID-19 был снижен уровень hsamiR-142-3p. Эту микроPHK рассматривают в качестве одного из биомаркеров тяжелой формы COVID-19 и потенциальной терапевтической мишени, так как снижение ее уровня способствует развитию воспалительного процесса [9].

Изменения уровня экспрессии SARS-CoV-2специфичных микроРНК выявлены и при других заболеваниях (табл. 2), факторах риска тяжелого течения COVID-19, таких как сахарный диабет, патология печени и др. [89, 90]. Так, в плазме крови больных **сахарным диабетом** типа 2 наблюдали снижение уровней hsa-miR-197 [66] и hsa-miR-23b [67]. Снижение уровня последней микроРНК зарегистрировано и в миокарде левого желудочка при ишемической диабетической кардиомиопатии [70] (табл. 2), что можно рассматривать как фактор риска осложненного течения COVID-19 и согласуется с эпидемиологическими наблюдениями [3, 4, 36].

В то же время в сыворотке крови наблюдали увеличение экспрессии hsa-miR-1246 при диабетической нефропатии [69] и hsa-miR-193b у лиц с преддиабетическим состоянием [68]. В первом случае, как уже отмечалось, высокий уровень микроРНК и ее "нейтрализация" путем связывания с геном SARS-CoV-2 не может обладать защитным эффектом, так как низкий уровень этой микроРНК способствует увеличению уровня АСЕ2 и, тем самым, создает благоприятные условия для проникновения коронавируса в клетку. Что касается hsa-miR-193b, то, согласно [68], увеличение ее экспрессии наблюдали, во-первых, только при преддиабете, но не при развившемся диабете; во-вторых, это увеличение нестабильно, так как уровень данной микроРНК возвращается к исходному у лиц с преддиабетом и у мышей с непереносимостью глюкозы при воздействиях, приводящих к нормализации метаболических параметров (например, при регулярных физических упражнениях). Это еще раз указывает на то, что уровень микроРНК может модифицироваться различными факторами. В целом, можно предположить, что при сахарном диабете типа 2 низкий уровень hsa-miR-197 (высокий уровень экспрессии в разных органах в норме – рис. 1) и hsamiR-23b (низкий уровень экспрессии – рис. 1) могут способствовать осложненному течению COVID-19.

Анализ изменения уровня микроРНК при аутоиммунных заболеваниях представляет интерес для оценки риска инфицирования SARS-CoV-2, определения клинической картины COVID-19 и развития осложнений после COVID-19 в виде аутоиммунных заболеваний. Патофизиология аутоиммунных заболеваний кишечника (таких, как болезнь Крона, язвенный колит) и наличие SARS-CoV-2 в клетках кишечника создают условия, способствующие инфицированию SARS-CoV-2, но нет доказательств того, что у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника COVID-19 встречается чаще, чем в общей популяции, что может быть связано с особенностями терапии данных заболеваний [91]. Более того, обсуждается возможность использования препаратов, применяемых при аутоиммунных заболеваниях, в терапии COVID-19 [92]. Однако мнения о риске развития осложнений COVID-19 у пациентов с аутоиммунными заболеваниями противоречивы [93].

В пользу низкого риска развития COVID-19 и его осложнений при некоторых формах лечения аутоиммунных заболеваний свидетельствуют данные об увеличении экспрессии SARS-CoV-2-специфической hsa-miR-378с в воспаленных тканях толстого кишечника у лиц с язвенным колитом, принимающих ингибиторы TNF, по сравнению с принимающими другие лекарственные препараты пациентами и здоровыми лицами [72]. Уровень hsa-miR-1246 был увеличен также в сыворотке крови пациентов с активной фазой язвенного колита, болезни Крона и ревматоидного артрита [74], a hsa-miR-23b-5p — в мононуклеарных клетках крови пациентов с болезнью Грейвса в стадии ремиссии, по сравнению с пациентами с тяжелым течением болезни [76]. Возможно, именно тяжесть заболевания или степень ее компенсации будут определять риск тяжелого течения COVID-19 у пациентов с аутоиммунными заболеваниями.

С другой стороны, в сыворотке крови пациентов с различными формами системной красной волчанки выявлено снижение SARS-CoV-2-специфичных микроРНК — hsa-miR-1246 и hsa-miR-23b [75]. Показано, что после COVID-19 у пациентов могут развиться аутоиммунные заболевания, в том числе — системная красная волчанка и синдром Гийена—Барре [93]. Таким образом, разнонаправленные изменения уровня hsa-miR-1246, зарегистрированные при разных аутоиммунных заболеваниях, могут указывать на дифференцированный риск развития и течения коронавирусной инфекции в зависимости от конкретной нозологии.

Приведенные данные свидетельствуют о различиях в изменении экспрессии SARS-CoV-2специфичных микроРНК при различных заболеваниях человека. При этом следует принимать во внимание тот факт, что инфицирование SARS- CoV-2 также влияет на функциональное состояние клетки, в том числе и посредством изменения транскрипции генов.

SARS-CoV-2 КАК ИСТОЧНИК микроРНК И РЕГУЛЯТОР ЭКСПРЕССИИ микроРНК ОРГАНИЗМА-ХОЗЯИНА

Известно, что инфицирование вирусами может приводить к изменению экспрессии генов, включая гены микроРНК, в клетках организмахозяина [94–96]. Так, обнаружены различия в уровне экспрессии 20 микроРНК в сыворотке крови здоровых индивидов и больных гепатитом С, в том числе и в уровне hsa-miR-23b, специфично связывающейся с геномом SARS-CoV-2 (ее уровень снижен при гепатите С) [96].

In vitro показано, что энтеровирус человека типа 71 (HEV71), который рассматривается в качестве ведущей причины вирусного энцефалита у детей в большинстве азиатских стран, изменял экспрессию 69 микроРНК в клетках нейробластомы, среди которых – hsa-miR-1246 [94]. В этом же исследовании показано, что индуцируемая HEV71 hsa-miR-1246 регулирует уровень экспрессии гена *DLG3*, ассоциированного с неврологическими расстройствами [94]. Этот ген экспрессируется в разных тканях, в том числе в лобной коре головного мозга [97], он необходим для процессов обучения [98]. С учетом этого сделан вывод, что hsa-miR-1246 может быть вовлечена в патогенез вирусного энцефалита, вызванного HEV71 [94].

У пациентов с COVID-19 встречаются неврологические нарушения, такие как головная боль и головокружение, энцефалопатия и делирий, а также нарушение мозгового кровообращения, синдром Гийена–Барре, острый поперечный миелит и острый энцефалит [99]. Поэтому не исключено, что вирус SARS-CoV-2 сам "регулирует уровень" hsa-miR-1246, изменение экспрессии которой часто регистрируется при заболеваниях, в том числе влияющих на характер течения COVID-19 (табл. 2).

Интерес вызывают исследования, посвященные анализу влияния SARS-CoV-2 на экспрессию генов в инфицированных клетках. Показано, что заражение клеток бронхиального эпителия человека вирусом SARS-CoV-2 изменяет экспрессию 327 генов, продукты которых участвуют в воспалительном ответе и регуляции метаболизма [100].

Инфицирование первичных эпителиальных клеток легких человека вирусами MERS-CoV и SARS-CoV-2 вызвало изменение более чем в 2 раза экспрессии 127 и 50 генов (из 44556 проанализированных) соответственно, причем лишь восемь генов оказались общими для двух инфекций, а изменение их экспрессии — однонаправленным [101]. Это дополнительно указывает на специфичность

взаимоотношений SARS-CoV-2 с инфицированными клетками человека по сравнению с другими коронавирусами.

Изучение микроРНК в образцах крови пациентов со среднетяжелым и тяжелым течением COVID-19 позволило выделить четыре группы, различающихся уровнями экспрессии, которые, по-видимому, могут служить биомаркерами развития данного заболевания [9]. В первую группу вошли hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-21-5p и hsamiR-142-3p, которые постоянно подавляются; во вторую — микроРНК (включая hsa-miR-3605-3p), которые постоянно активируются; к третьей отнесены микроРНК, которые активируются только при тяжелой форме COVID-19 – в том числе hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-486-3p и hsa-miR-486-5p; в четвертую группу вошли микроРНК, подавляемые только при тяжелом течении инфекции – в том числе hsa-miR-181a-2-3p, hsa-miR-31-5p и hsa-miR-99a-5p. Четыре микроРНК – hsa-miR-146а-5р, hsa-miR-21-5р, hsa-miR-142-3р и hsamiR-15b-5p - авторами процитированного исслелования определены в качестве потенциальных участников патогенеза инфекционного заболевания, вызываемого SARS-CoV-2. Некоторые из этих результатов согласуются с наблюдениями других исследователей. Так, низкий уровень hsa-miR-146а-5р выявлен в крови пациентов, не отвечающих на лечение COVID-19 тоцилизумабом, а самый низкий уровень был у лиц с неблагоприятным исходом коронавирусной инфекции [84].

Среди микроРНК, уровень которых изменялся в крови пациентов с COVID-19 [9], одна – hsamiR-142-3р — отнесена к категории SARS-CoV-2 специфичных (табл. 1). Отмечены разнонаправленные изменения уровня этой микроРНК при заболеваниях (табл. 2). В частности, снижение уровня hsa-miR-142-3р зарегистрировано при некоторых патологиях сердца [63], а увеличение – при осложнениях сахарного диабета [71]. Отсюда следует, что если даже геном SARS-CoV-2 имеет мишени для микроРНК, то для оценки патогенетической значимости данных молекул важно принимать во внимание то, какую функцию выполняет эта микроРНК в организме и насколько создаваемые при ее участии условия благоприятны для инфицирования. Можно предположить, что именно низкий уровень hsa-miR-142-3р благоприятствует инфицированию SARS-CoV-2. Кроме того, нельзя исключать, что значение тех или иных микроРНК для развития COVID-19 (протективное/неблагоприятное/нейтральное) может изменяться в зависимости от стадии и клинической картины болезни.

Коронавирусы, в том числе и SARS-CoV-2, могут модифицировать профили микроРНК клеток организма-хозяина, действуя как губки для микроРНК человека, чтобы таким образом облегчить репликацию вируса и/или избегание иммунных ответов организма-хозяина [29, 102]. Такая возможность обусловлена не только комплементарностью генома SARS-CoV-2 и ряда микроРНК человека, но и высоким содержанием вирусной РНК в клетке (варьирует от 0.1 до 50% от общей клеточной РНК [102], тогда как доля микроРНК хозяина составляет всего около 0.01% (цитируется по [29]).

Помимо микроРНК человека, тем же путем (выступая в качестве своеобразной губки) геном SARS-CoV-2 может блокировать РНК-связывающие белки, играющие важную роль в посттрансляционных регуляторных сетях в клетках человека [100]. Существует также мнение, что путем соединения генома SARS-CoV-2 с РНК-связывающими белками клеток человека вирус уходит от действующих в клетках механизмов разрушения РНК, в том числе и с участием микроРНК человека [22]. Иными словами, геном SARS-CoV-2 посредством исключения из физиологических процессов инфицированной клетки микроРНК, мРНК и/или белковых молекул, потенциально значимых для определения ответа на инфицирование, создает благоприятные условия для размножения и распространения в организме человека. В частности, сверхэкспрессию гена CSF1 в альвеолярных и бронхиальных эпителиальных клетках человека после заражения SARS-CoV-2 объясняли тем, что геном коронавируса (и, в частности, ген S-белка) выступает в качестве РНК, конкурирующей с hsa-miR-1207-5p, имеющей сайты связывания на мРНК гена CSF1 [103]. Предполагается, что высокий уровень экспрессии CSF1 в эпителиальных клетках может способствовать неконтролируемому воспалению в наиболее тяжелых случаях COVID-19 [103].

РНК-содержащие вирусы способны формировать вирусные микроРНК (v-miRNA, обозначают также как малые вирусные РНК – svRNA) и, соответственно, принимать участие в эпигенетической регуляции функционирования генома зараженных клеток [10, 15, 19, 95, 104]. Происходящие из геномной области *nsp3* и гена, кодирующего N-белок, малые вирусные РНК SARS-CoV размером 18–22 н. (svRNA-N) обладали патогенетической значимостью, так как ингибирование *in vivo* svRNA-N значительно снижало степень поражения легких и экспрессию провоспалительных цитокинов у зараженных SARS-CoV мышей [95]. Примечательно, что биогенез данных вирусных РНК зависел от степени репликации вируса.

Накапливаются данные, полученные с использованием вычислительных подходов, о наличии в геноме SARS-CoV-2 участков, способных продуцировать микроРНК, потенциально значимых для эпигенетической регуляции генома человека. Так, по данным Khan M.A. и соавт. [19], геномы SARS-CoV и SARS-CoV-2 могут продуцировать 126 и 170 зрелых вирусных микроРНК вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 служат 5292 и 6369 генов человека соответственно, из которых только 2992 общие. МикроРНК SARS-CoV-2 имели мишени не только на генах, способствующих избеганию иммунного ответа хозяина, но и на генах, продукты которых участвуют в развитии сердца и головного мозга, в сигнальном пути инсулина и ряде других [19]. Предполагается, что это может определять особенности клинической картины у пациентов с коморбидными заболеваниями сердечно-сосудистой, эндокринной системы и т.д.

В другом исследовании [15] в геноме SARS-CoV-2 определены 29 последовательностей, потенциально выступающих в качестве предшественников вирусных микроРНК, мишенями которых могут быть 1367 генов человека. Среди генов-мишеней этих вирусных микроРНК оказались мРНК белков, участвующих в важнейших клеточных процессах, таких как транскрипция, метаболизм, система защиты, сигнальные пути Wnt и EGFR. Например, 96 генов-мишеней вирусных микроРНК участвуют в регуляции транскрипции генов в клетках человека. В число этих генов входят гены, кодирующие компоненты медиаторного комплекса (MED1, MED9, MED12L, MED19), основные факторы транскрипции (TAF4, TAF5, TAF7L) и сайт-специфические факторы транскрипции (STAT1) и др.

Только шесть предполагаемых вирусных микроРНК, имеющих мишени на генах, связанных с пролиферацией, дифференцировкой, передачей сигналов, старением клеток, а также вовлеченных в регуляцию иммунного ответа (TNF-сигнальный путь, путь передачи сигналов хемокинов), рассматриваются в качестве ключевых в развитии цитокинового шторма [10]. Высокий консерватизм, характерный для этих вирусных микроРНК, позволяет отнести их к числу перспективных для разработки вакцин.

Опубликованы экспериментальные исследования, свидетельствующие о возможности продукции зрелых микроРНК-подобных последовательностей SARS-CoV-2, способных влиять на экспрессию генов зараженных клеток. Так, Meriпо G.A. и соавт. [105] экспериментально (с помощью РНК-секвенирования) подтверждена экспрессия восьми таких последовательностей в культуре клеток рака легкого человека (линия Calu-3), инфицированных SARS-CoV-2. Примечательно, что эти вирусные микроРНК отличались по структуре от известных микроРНК человека, но потенциально имели мишени на 109 генах, дифференциально экспрессирующихся после заражения SARS-CoV-2, 28 из которых подавлялись в клетках, инфицированных вирусами.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

Таким образом, несмотря на непродолжительное время исследований, накапливаются данные об участии (как потенциальном, так и доказанном) микроРНК человека и генома/микроРНК SARS-CoV-2 в инфицировании и развитии клинической картины COVID-19. Эти данные свидетельствуют о сложности выявления микроРНК, критичных для данных процессов. Установлены десятки микроРНК, которые потенциально могут связываться с геномом SARS-CoV-2. Разнонаправленные изменения экспрессии этих микроРНК регистрируются при разных заболеваниях, в том числе и при патологиях, определяющих риск инфицирования SARS-CoV-2 и тяжесть течения COVID-19.

то же время изменения экспрессии B микроРНК при патологиях не всегда могут однозначно трактоваться как благоприятный или неблагоприятный фактор риска развития и определения характера течения COVID-19. В данном случае следует учитывать функциональную роль каждой отдельной микроРНК (в том числе, и с точки зрения создания благоприятных условий для инфицирования SARS-CoV-2), а также то, какой процесс они маркируют (нормальное физиологическое состояние, стадию патологического процесса, тяжесть течения, ответ на лекарственные препараты и т.д.). Важно принимать во внимание и то, что SARS-CoV-2 также может влиять на функционирование зараженных клеток и организма в целом, изменять уровень экспрессии генов в клетках, а также продуцировать вирусные микроРНК, которые могут участвовать в эпигенетической регуляции генома зараженных клеток.

Написание обзора не потребовало специального финансирования.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ejaz H., Alsrhani A., Zafar A., Javed H., Junaid K., Abdalla A.E., Abosalif K.O.A., Ahmed Z., Younas S. (2020) COVID-19 and comorbidities: deleterious impact on infected patients. *J. Infect. Publ. Hith.* 13(12), 1833–1839.
- Fulzele S., Sahay B., Yusufu I., Lee T.J., Sharma A., Kolhe R., Isales C.M. (2020) COVID-19 virulence in aged patients might be impacted by the host cellular microRNAs abundance/profile. *Aging Dis.* 11(3), 509–522.
- Callender L.A., Curran M., Bates S.M., Mairesse M., Weigandt J., Betts C.J. (2020) The impact of pre-existing comorbidities and therapeutic interventions on COVID-19. *Front. Immunol.* 11, 1991.

- Jutzeler C.R., Bourguignon L., Weis C.V., Tong B., Wong C., Rieck B., Pargger H., Tschudin-Sutter S., Egli A., Borgwardt K., Walter M. (2020) Comorbidities, clinical signs and symptoms, laboratory findings, imaging features, treatment strategies, and outcomes in adult and pediatric patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel. Med. Infect. Dis.* 37, 101825.
- Murk W., Gierada M., Fralick M., Weckstein A., Klesh R., Rassen J.A. (2021) Diagnosis-wide analysis of COVID-19 complications: an exposure-crossover study. *CMAJ*. 193(1), E10–E18.
- Chang W.T., Toh H.S., Liao C.T., Yu W.L. (2021) Cardiac Involvement of COVID-19: a comprehensive review. *Am. J. Med. Sci.* 361(1), 14–22.
- Avila J., Long B., Holladay D., Gottlieb M. (2021) Thrombotic complications of COVID-19. Am. J. Emerg. Med. 39, 213–218.
- 8. Collantes M., Espiritu A.I., Sy M., Anlacan V., Jamora R. (2021). Neurological manifestations in COVID-19 infection: a systematic review and meta-analysis. *Can. J. Neurol. Sci.* **48**(1), 66–76.
- Tang H., Gao Y., Li Z., Miao Y., Huang Z., Liu X., Xie L., Li H., Wen W., Zheng Y., Su W. (2020) The noncoding and coding transcriptional landscape of the peripheral immune response in patients with COVID-19. *Clin. Transl. Med.* 10(6), e200.
- Satyam R., Bhardwaj T., Goel S., Jha N.K., Jha S.K., Nand P., Ruokolainen J., Kamal M.A., Kesari K.K. (2021) miRNAs in SARS-CoV-2: a spoke in the wheel of pathogenesis. *Curr. Pharm. Des.* 27(13), 1628–1641.
- Chow J.T., Salmena L. (2020) Prediction and analysis of SARS-CoV2-targeting microRNA in human lung epithelium. *Genes.* 11(9), 1002.
- Jafarinejad-Farsangi S., Jazi M.M., Rostamzadeh F., Hadizadeh M. (2020) High affinity of host human microRNAs to SARS-CoV-2 genome: an *in silico* analysis. *Noncoding RNA Res.* 5(4), 222–231.
- Guo L., Yu J., Yu H., Zhao Y., Chen S., Xu C., Chen F. (2015) Evolutionary and expression analysis of miR-#-5p and miR-#-3p at the miRNAs/isomiRs levels. *Biomed. Res. Int.* 2015, 168358.
- Guterres A., de Azeredo Lima C.H., Miranda R.L., Gadelha M.R. (2020) What is the potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in COVID-19. *Infect. Genet. Evol.* 85, 104417.
- 15. Saçar Demirci M.D., Adan A. (2020) Computational analysis of microRNA-mediated interactions in SARS-CoV-2 infection. *Peer. J.* **8**, e9369.
- Huang Z., Shi J., Gao Y., Cui C., Zhang S., Li J., Zhou Y., Cui Q. (2019). HMDD v3.0: a database for experimentally supported human microRNA-disease associations. *Nucl. Acids Res.* 47(D1), D1013–D1017.
- Zhao X., Wang Y., Sun X. (2020) The functions of microRNA-208 in the heart. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 160, 108004.
- Chan A.P., Choi Y., Schork N.J. (2020) Conserved genomic terminals of SARS-CoV-2 as coevolving functional elements and potential therapeutic targets. *mSphere*. 5(6), e00754-20.
- 19. Khan M.A., Sany M., Islam M.S., Islam A. (2020) Epigenetic regulator miRNA pattern differences

among SARS-CoV, SARS-CoV-2, and SARS-CoV-2 world-wide isolates delineated the mystery behind the epic pathogenicity and distinct clinical characteristics of pandemic COVID-19. *Front. Genet.* **11**, 765.

- Abu-Izneid T., AlHajri N., Mohammed Ibrahim A., Noushad Javed M., Mustafa Salem K., Hyder Pottoo F., Amjad Kamal M. (2021) Micro-RNAs in the regulation of immune response against SARS-CoV-2 and other viral infections. J. Adv. Res. 30, 133–145.
- 21. Aydemir M.N., Aydemir H.B., Korkmaz E.M., Budak M., Cekin N., Pinarbasi E. (2021) Computationally predicted SARS-COV-2 encoded microRNAs target NFKB, JAK/STAT and TGFB signaling pathways. *Gene Rep.* 22, 101012.
- Mukherjee M., Goswami S. (2020) Global cataloguing of variations in untranslated regions of viral genome and prediction of key host RNA binding protein-microRNA interactions modulating genome stability in SARS-CoV-2. *PLoS One.* 15(8), e0237559.
- 23. Farshbaf A., Mohtasham N., Zare R., Mohajertehran F., Rezaee S.A. (2021) Potential therapeutic approaches of microRNAs for COVID-19: challenges and opportunities. *J. Oral. Biol. Craniofac. Res.* **11**(2), 132–137.
- 24. Girardi E., López P., Pfeffer S. (2018) On the importance of host microRNAs during viral infection. *Front. Genet.* 9, 439.
- Ludwig N., Leidinger P., Becker K., Backes C., Fehlmann T., Pallasch C., Rheinheimer S., Meder B., Stähler C., Meese E., Keller A. (2016) Distribution of miRNA expression across human tissues. *Nucl. Acids Res.* 44(8), 3865–3877.
- 26. de Rie D., Abugessaisa I., Alam T., Arner E., Arner P., Ashoor H., Åström G., Babina M., Bertin N., Burroughs A.M., Carlisle A.J., Daub C.O., Detmar M., Deviatiiarov R., Fort A., Gebhard C., Goldowitz D., Guhl S., Ha T.J., Harshbarger J., Hasegawa A., Hashimoto K., Herlyn M., Heutink P., Hitchens K.J., Hon C.C., Huang E., Ishizu Y., Kai C., Kasukawa T., Klinken P., Lassmann T., Lecellier C.H., Lee W., Lizio M., Makeev V., Mathelier A., Medvedeva Y.A., Mejhert N., Mungall C.J., Noma S., Ohshima M., Okada-Hatakeyama M., Persson H., Rizzu P., Roudnicky F., Sætrom P., Sato H., Severin J., Shin J.W., Swoboda R.K., Tarui H., Toyoda H., Vitting-Seerup K., Winteringham L., Yamaguchi Y., Yasuzawa K., Yoneda M., Yumoto N., Zabierowski S., Zhang P.G., Wells C.A., Summers K.M., Kawaji H., Sandelin A., Rehli M., FANTOM Consortium, Hayashizaki Y., Carninci P., Forrest A.R.R., de Hoon M.J.L. (2017). An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. Nat. Biotechnol. 35(9), 872-878.
- Sardar R., Satish D., Birla S., Gupta, D. (2020) Integrative analyses of SARS-CoV-2 genomes from different geographical locations reveal unique features potentially consequential to host-virus interaction, pathogenesis and clues for novel therapies. *Heliyon*. 6(9), e04658.
- Pierce J.B., Simion V., Icli B., Pérez-Cremades D., Cheng H.S., Feinberg M.W. (2020) Computational analysis of targeting SARS-CoV-2, viral entry proteins ACE2 and TMPRSS2, and interferon genes by host microRNAs. *Genes.* 11(11), 1354.

- Bartoszewski R., Dabrowski M., Jakiela B., Matalon S., Harrod K.S., Sanak M., Collawn J.F. (2020) SARS-CoV-2 may regulate cellular responses through depletion of specific host miRNAs. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 319(3), L444–L455.
- Hosseini Rad Sm A., McLellan A.D. (2020) Implications of SARS-CoV-2 mutations for genomic RNA structure and host microRNA targeting. *Int. J. Mol. Sci.* 21(13), 4807.
- Arisan E.D., Dart A., Grant G.H., Arisan S., Cuhadaroglu S., Lange S., Uysal-Onganer P. (2020) The prediction of miRNAs in SARS-CoV-2 genomes: hsamiR databases identify 7 key miRs linked to host responses and virus pathogenicity-related KEGG pathways significant for comorbidities. *Viruses.* 12(6), 614.
- Balmeh N., Mahmoudi S., Mohammadi N., Karabedianhajiabadi A. (2020) Predicted therapeutic targets for COVID-19 disease by inhibiting SARS-CoV-2 and its related receptors. *Inform. Med. Unlocked.* 20, 100407.
- Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucl. Acids Res.* 47(D1), D155–D162.
- Nersisyan S., Engibaryan N., Gorbonos A., Kirdey K., Makhonin A., Tonevitsky A. (2020) Potential role of cellular miRNAs in coronavirus-host interplay. *Peer J.* 8, e9994.
- Naqvi A., Fatima K., Mohammad T., Fatima U., Singh I.K., Singh A., Atif S.M., Hariprasad G., Hasan G.M., Hassan M.I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: structural genomics approach. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1866(10), 165878.
- Li J., Huang D.Q., Zou B., Yang H., Hui W.Z., Rui F., Yee N., Liu C., Nerurkar S.N., Kai J., Teng M., Li X., Zeng H., Borghi J.A., Henry L., Cheung R., Nguyen M.H. (2021). Epidemiology of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of clinical characteristics, risk factors, and outcomes. *J. Med. Virol.* 93(3), 1449–1458.
- Musri M.M., Coll-Bonfill N., Maron B.A., Peinado V.I., Wang R.S., Altirriba J., Blanco I., Oldham W.M., Tura-Ceide O., García-Lucio J., de la Cruz-Thea B., Meister G., Loscalzo J., Barberà J.A. (2018) MicroRNA dysregulation in pulmonary arteries from chronic obstructive pulmonary disease. relationships with vascular remodeling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 59(4), 490–499.
- Sundar I.K., Li D., Rahman I. (2019) Small RNA-sequence analysis of plasma-derived extracellular vesicle miRNAs in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease as circulating biomarkers. *J. Extracell. Vesicles.* 8(1), 1684816.
- Cazorla-Rivero S., Mura-Escorche G., Gonzalvo-Hernández F., Mayato D., Córdoba-Lanús E., Casanova C. (2020) Circulating miR-1246 in the progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in patients from the BODE cohort. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 15, 2727–2737.
- Shi L., Xin Q., Chai R., Liu L., Ma Z. (2015) Ectopic expressed miR-203 contributes to chronic obstructive pulmonary disease via targeting TAK1 and PIK3CA. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8(9), 10662–10670.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

- Wei C., Henderson H., Spradley C., Li L., Kim I.K., Kumar S., Hong N., Arroliga A.C., Gupta S. (2013) Circulating miRNAs as potential marker for pulmonary hypertension. *PLoS One.* 8(5), e64396.
- 42. Huber L.C., Ulrich S., Leuenberger C., Gassmann M., Vogel J., von Blotzheim L.G., Speich R., Kohler M., Brock M. (2015) Featured article: microRNA-125a in pulmonary hypertension: regulator of a proliferative phenotype of endothelial cells. *Ex. Biol. Med.* (Maywood). **240**(12), 1580–1589.
- Jardim M.J., Dailey L., Silbajoris R., Diaz-Sanchez D. (2012) Distinct microRNA expression in human airway cells of asthmatic donors identifies a novel asthma-associated gene. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 47(4), 536–542.
- Ke X.F., Fang J., Wu X.N., Yu C.H. (2014) MicroRNA-203 accelerates apoptosis in LPS-stimulated alveolar epithelial cells by targeting PIK3CA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450(4), 1297–1303.
- 45. Marketou M.E., Kontaraki J.E., Maragkoudakis S., Patrianakos A., Konstantinou J., Nakou H., Vougia D., Logakis J., Chlouverakis G., Vardas P.E., Parthenakis F.I. (2018) MicroRNAs in peripheral mononuclear cells as potential biomarkers in hypertensive patients with heart failure with preserved ejection fraction. *Am. J. Hypertens.* **31**(6), 651–657.
- 46. Huang X., Li Z., Bai B., Li X., Li Z. (2015) High expression of microRNA-208 is associated with cardiac hypertrophy via the negative regulation of the sex-determining region Y-box 6 protein. *Exp., Ther. Med.* **10**(3), 921–926.
- 47. Kontaraki J.E., Marketou M.E., Parthenakis F.I., Maragkoudakis S., Zacharis E.A., Petousis S., Kochiadakis G.E., Vardas P.E. (2015) Hypertrophic and antihypertrophic microRNA levels in peripheral blood mononuclear cells and their relationship to left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension. J. Am. Soc. Hypertens. 9(10), 802–810.
- Wang G., Kwan B.C., Lai F.M., Choi P.C., Chow K.M., Li P.K., Szeto C.C. (2010) Intrarenal expression of miRNAs in patients with hypertensive nephrosclerosis. *Am. J. Hypertens.* 23(1), 78–84.
- 49. Liu W., Zheng J., Dong J., Bai R., Song D., Ma X., Zhao L., Yao Y., Zhang H., Liu T. (2018) Association of miR-197-5p, a circulating biomarker for heart failure, with myocardial fibrosis and adverse cardiovascular events among patients with stage C or D heart failure. *Cardiology*. **141**(4), 212–225.
- 50. Wong L.L., Armugam A., Sepramaniam S., Karolina D.S., Lim K.Y., Lim J.Y., Chong J.P., Ng J.Y., Chen Y.T., Chan M.M., Chen Z., Yeo P.S., Ng T.P., Ling L.H., Sim D., Leong K.T., Ong H.Y., Jaufeerally F., Wong R., Chai P., Low A.F., Lam C.S., Jeyaseelan K., Richards A.M. (2015) Circulating microRNAs in heart failure with reduced and preserved left ventricular ejection fraction. *Eur. J. Heart Fail.* 17(4), 393–404.
- Hu Q., Luo W., Huang L., Huang R., Chen R. (2016) Apoptosis-related microRNA changes in the right atrium induced by remote ischemic perconditioning during valve replacement surgery. *Sci. Rep.* 6, 18959.
- He X., Ji J., Wang T., Wang M.B., Chen X.L. (2017) Upregulation of circulating miR-195-3p in heart failure. *Cardiology*. 138(2), 107–114.

- Liu H., Yang N., Fei Z., Qiu J., Ma D., Liu X., Cai G., Li S. (2016) Analysis of plasma miR-208a and miR-370 expression levels for early diagnosis of coronary artery disease. *Biomed. Rep.* 5(3), 332–336.
- 54. Liu W., Ling S., Sun W., Liu T., Li Y., Zhong G., Zhao D., Zhang P., Song J., Jin X., Xu Z., Song H., Li Q., Liu S., Chai M., Dai Q., He Y., Fan Z., Zhou Y.J., Li Y. (2015) Circulating microRNAs correlated with the level of coronary artery calcification in symptomatic patients. *Sci. Rep.* 5, 16099.
- van Rooij E., Sutherland L.B., Liu N., Williams A.H., McAnally J., Gerard R.D., Richardson J.A., Olson E.N. (2006) A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103(48), 18255–18260.
- Zhang X., Ji R., Liao X., Castillero E., Kennel P.J., Brunjes D.L., Franz M., Möbius-Winkler S., Drosatos K., George I., Chen E.I., Colombo P.C., Schulze P.C. (2018) MicroRNA-195 regulates metabolism in failing myocardium via alterations in sirtuin 3 expression and mitochondrial protein acetylation. *Circulation.* 137(19), 2052–2067.
- 57. Weber K., Rostert N., Bauersachs S., Wess G. (2015) Serum microRNA profiles in cats with hypertrophic cardiomyopathy. *Mol. Cell. Biochem.* **402**(1–2), 171– 180.
- Slagsvold K.H., Johnsen A.B., Rognmo O., Høydal M.A., Wisløff U., Wahba A. (2014) Mitochondrial respiration and microRNA expression in right and left atrium of patients with atrial fibrillation. *Physiol. Genomics.* 46(14), 505–511.
- Cañón S., Caballero R., Herraiz-Martínez A., Pérez-Hernández M., López B., Atienza F., Jalife J., Hove-Madsen L., Delpón E., Bernad A. (2016) miR-208b upregulation interferes with calcium handling in HL-1 atrial myocytes: Implications in human chronic atrial fibrillation. J. Mol. Cell. Cardiol. 99, 162–173.
- Long G., Wang F., Duan Q., Yang S., Chen F., Gong W., Yang X., Wang Y., Chen C., Wang D.W. (2012) Circulating miR-30a, miR-195 and let-7b associated with acute myocardial infarction. *PLoS One*. 7(12), e50926.
- 61. Boštjančič E., Brandner T., Zidar N., Glavač D., Štajer D. (2018) Down-regulation of miR-133a/b in patients with myocardial infarction correlates with the presence of ventricular fibrillation. *Biomed. Pharmacother.* **99**, 65–71.
- Li C., Fang Z., Jiang T., Zhang Q., Liu C., Zhang C., Xiang Y. (2013) Serum microRNAs profile from genome-wide serves as a fingerprint for diagnosis of acute myocardial infarction and angina pectoris. *BMC Med. Genomics.* 6, 16.
- 63. Nair N., Kumar S., Gongora E., Gupta S. (2013) Circulating miRNA as novel markers for diastolic dysfunction. *Mol. Cell. Biochem.* **376**(1–2), 33–40.
- 64. Wang Y.F., Lian X.L., Zhong J.Y., Su S.X., Xu Y.F., Xie X.F., Wang Z.P., Li W., Zhang L., Che D., Yu L., Huang P., Jia H.L., Gu X.Q. (2019) Serum exosomal microRNA let-7i-3p as candidate diagnostic biomarker for Kawasaki disease patients with coronary artery aneurysm. *IUBMB Life*. **71**(7), 891–900.

- He L.P., Zhao X.S., He L.P. (2018) Abnormally expressed miR-23b in Chinese Mongolian at high cardio-vascular risk may contribute to monocyte/macrophage inflammatory reaction in atherosclerosis. *Biosci. Rep.* 38(6), BSR20180673.
- Zampetaki A., Kiechl S., Drozdov I., Willeit P., Mayr U., Prokopi M., Mayr A., Weger S., Oberhollenzer F., Bonora E., Shah A., Willeit J., Mayr M. (2010) Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ. Res.* 107(6), 810–817.
- 67. Zhao B., Li H., Liu J., Han P., Zhang C., Bai H., Yuan X., Wang X., Li L., Ma H., Jin X., Chu Y. (2016) MicroRNA-23b targets Ras GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 2 to alleviate fibrosis and albuminuria in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**(9), 2597–2608.
- Párrizas M., Brugnara L., Esteban Y., González-Franquesa A., Canivell S., Murillo S., Gordillo-Bastidas E., Cussó R., Cadefau J.A., García-Roves P.M., Servitja J.M., Novials A. (2015) Circulating miR-192 and miR-193b are markers of prediabetes and are modulated by an exercise intervention. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100(3), E407–E415.
- 69. Kim H., Bae Y.U., Jeon J.S., Noh H., Park H.K., Byun D.W., Han D.C., Ryu S., Kwon S.H. (2019) The circulating exosomal microRNAs related to albuminuria in patients with diabetic nephropathy. *J. Transl. Med.* **17**(1), 236.
- Torella D., Ellison G.M., Torella M., Vicinanza C., Aquila I., Iaconetti C., Scalise M., Marino F., Henning B.J., Lewis F.C., Gareri C., Lascar N., Cuda G., Salvatore T., Nappi G., Indolfi C., Torella R., Cozzolino D., Sasso F.C. (2014) Carbonic anhydrase activation is associated with worsened pathological remodeling in human ischemic diabetic cardiomyopathy. J. Am. Heart Assoc. 3(2), e000434.
- Friedrich J., Steel D.H.W., Schlingemann R.O., Koss M.J., Hammes H.P., Krenning G., Klaassen I. (2020) microRNA expression profile in the vitreous of proliferative diabetic retinopathy patients and differences from patients treated with anti-VEGF therapy. *Transl. Vis. Sci. Technol.* 9(6), 16.
- 72. Dubois-Camacho K., Diaz-Jimenez D., De la Fuente M., Quera R., Simian D., Martínez M., Landskron G., Olivares-Morales M., Cidlowski J.A., Xu X., Gao G., Xie J., Chnaiderman J., Soto-Rifo R., González M.J., Calixto A., Hermoso M.A. (2019) Inhibition of miR-378a-3p by inflammation enhances IL-33 levels: a novel mechanism of alarmin modulation in ulcerative colitis. *Front. Immunol.* 10, 2449.
- Zhu S., Pan W., Song X., Liu Y., Shao X., Tang Y., Liang D., He D., Wang H., Liu W., Shi Y., Harley J.B., Shen N., Qian Y. (2012) The microRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB2, TAB3 and IKK-α. *Nat. Med.* 18(7), 1077–1086.
- Krissansen G.W., Yang Y., McQueen F.M., Leung E., Peek D., Chan Y.C., Print C., Dalbeth N., Williams M., Fraser A.G. (2015) Overexpression of miR-595 and miR-1246 in the sera of patients with active forms of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 21(3), 520–530.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

- Méndez-Flores S., Furuzawa-Carballeda J., Hernández-Molina G., Ramírez-Martinez G., Regino-Zamarripa N.E., Ortiz-Quintero B., Jiménez-Alvarez L., Cruz-Lagunas A., Zúñiga J. (2019) MicroRNA expression in cutaneous lupus: a new window to understand its pathogenesis. *Mediators Inflamm.* 2019, 5049245.
- Hiratsuka I., Yamada H., Munetsuna E., Hashimoto S., Itoh M. (2016) Circulating microRNAs in Graves' disease in relation to clinical activity. *Thyroid*. 26(10), 1431–1440.
- Tsigaris P., Teixeira da Silva J.A. (2020) Smoking prevalence and COVID-19 in Europe. *Nicotine Tob. Res.* 22(9), 1646–1649.
- Liu S., Cao Y., Du T., Zhi Y. (2020) Prevalence of comorbid asthma and related outcomes in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 9(2), 693–701.
- Wakabayashi M., Pawankar R., Narazaki H., Ueda T., Itabashi T. (2021) Coronavirus disease 2019 and asthma, allergic rhinitis: molecular mechanisms and hostenvironmental interactions. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 21(1), 1–7.
- Inchley C.S., Sonerud T., Fjærli H.O., Nakstad B. (2015) Nasal mucosal microRNA expression in children with respiratory syncytial virus infection. *BMC Infect. Dis.* 15, 150.
- Zhu X., Ge Y., Wu T., Zhao K., Chen Y., Wu B., Zhu F., Zhu B., Cui L. (2020) Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases. *Virus Res.* 285, 198005.
- Zhang H., Rostami M.R., Leopold P.L., Mezey J.G., O'Beirne S.L., Strulovici-Barel Y., Crystal R.G. (2020) Expression of the SARS-CoV-2 ACE2 receptor in the human airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 202(2), 219–229.
- Azevedo R.B., Botelho B.G., Hollanda J., Ferreira L., Junqueira de Andrade L.Z., Oei S., Mello T.S., Muxfeldt E.S. (2021) COVID-19 and the cardiovascular system: a comprehensive review. *J. Hum. Hypertens.* 35(1), 4–11.
- 84. Sabbatinelli J., Giuliani A., Matacchione G., Latini S., Laprovitera N., Pomponio G., Ferrarini A., Baroni S.S., Pavani M., Moretti M., Gabrielli A., Procopio A.D., Ferracin M., Bonafè M., Olivieri F. (2020) Decreased serum levels of the inflammaging marker miR-146a are associated with clinical response to tocilizumab in COVID-19 patients. *Mech. Ageing Dev.* 193, 111413.
- Kabeerdoss J., Pilania R.K., Karkhele R., Kumar T.S., Danda D., Singh S. (2021) Severe COVID-19, multisystem inflammatory syndrome in children, and Kawasaki disease: immunological mechanisms, clinical manifestations and management. *Rheumatol. Int.* 41(1), 19–32.
- Sokolovsky S., Soni P., Hoffman T., Kahn P., Scheers-Masters J. (2021) COVID-19 associated Kawasaki-like multisystem inflammatory disease in an adult. *Am. J. Emerg. Med.* **39**, 253.e1–253.e2.
- 87. Alsaied T., Tremoulet A.H., Burns J.C., Saidi A., Dionne A., Lang S.M., Newburger J.W., de Ferranti S., Friedman K.G. (2021) Review of cardiac involvement

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

in multisystem inflammatory syndrome in children. *Circulation*. **143**(1), 78–88.

- Galeotti C., Bayry J. (2020) Autoimmune and inflammatory diseases following COVID-19. *Nat. Rev. Rheumatol.* 16(8), 413–414.
- 89. Wolff D., Nee S., Hickey N.S., Marschollek M. (2021) Risk factors for Covid-19 severity and fatality: a structured literature review. *Infection*. **49** (1), 15–28.
- Zhou Y., Chi J., Lv W., Wang Y. (2021) Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Diabetes Metab. Res. Rev.* 37(2), e3377.
- 91. Monteleone G., Ardizzone S. (2020) Are patients with inflammatory bowel disease at increased risk for COVID-19 infection? *J. Crohns Colitis.* **14**(9), 1334–1336.
- Favalli E.G., Ingegnoli F., De Lucia O., Cincinelli G., Cimaz R., Caporali R. (2020) COVID-19 infection and rheumatoid arthritis: faraway, so close! *Autoimmun. Rev.* 19(5), 102523.
- 93. Liu Y., Sawalha A.H., Lu Q. (2021) COVID-19 and autoimmune diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.* **33**(2), 155–162.
- 94. Xu L.J., Jiang T., Zhao W., Han J.F., Liu J., Deng Y.Q., Zhu S.Y., Li Y.X., Nian Q.G., Zhang Y., Wu X.Y., Qin E.D., Qin C.F. (2014) Parallel mRNA and microRNA profiling of HEV71-infected human neuroblastoma cells reveal the up-regulation of miR-1246 in association with DLG3 repression. *PLoS One.* 9(4), e95272.
- Morales L., Oliveros J.C., Fernandez-Delgado R., tenOever B.R., Enjuanes L., Sola I. (2017) SARS-CoVencoded small RNAs contribute to infection-associated lung pathology. *Cell Host Microbe*. 21, 344–355.
- 96. El-Hefny M., Fouad S., Hussein T., Abdel-Hameed R., Effat H., Mohamed H., Abdel Wahab A.H. (2019) Circulating microRNAs as predictive biomarkers for liver disease progression of chronic hepatitis C (genotype-4) Egyptian patients. J. Med. Virol. 91(1), 93– 101.
- Bastian F.B., Roux J., Niknejad A., Comte A., Fonseca Costa S.S., de Farias T.M., Moretti S., Parmentier G., de Laval V.R., Rosikiewicz M., Wollbrett J., Echchiki A., Escoriza A., Gharib W.H., Gonzales-Porta M., Jarosz Y., Laurenczy B., Moret P., Person E., Roelli P., Sanjeev K., Seppey M., Robinson-Rechavi M. (2021) The Bgee suite: integrated curated expression atlas and comparative transcriptomics in animals. *Nucl. Acids Res.* 49(D1), D831–D847.
- UniProt Consortium (2021) UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. Nucl. Acids Res. 49(D1), D480–D489.
- 99. Ahmad I., Rathore F.A. (2020) Neurological manifestations and complications of COVID-19: a literature review. *J. Clin. Neurosci.* **77**, 8–12.
- 100. Srivastava R., Daulatabad S.V., Srivastava M., Janga S.C. (2020) Role of SARS-CoV-2 in altering the RNA-binding protein and miRNA-directed posttranscriptional regulatory networks in humans. *Int. J. Mol. Sci.* 21(19), 7090.
- 101. Jang Y., Seo S.H. (2020) Gene expression pattern differences in primary human pulmonary epithelial cells

infected with MERS-CoV or SARS-CoV-2. Arch. Vi-rol. 165(10), 2205–2211.

- 102. Blanco-Melo D., Nilsson-Payant B.E., Liu W.C., Uhl S., Hoagland D., Møller R., Jordan T.X., Oishi K., Panis M., Sachs D., Wang T.T., Schwartz R.E., Lim J.K., Albrecht R.A., tenOever B.R. (2020) Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell.* 181(5), 1036–1045.e9.
- 103. Bertolazzi G., Cipollina C., Benos P.V., Tumminello M., Coronnello C. (2020) miR-1207-5p can contribute to dysregulation of inflammatory response in

COVID-19 via targeting SARS-CoV-2 RNA. Front Cell Infect. Microbiol. 10, 586592.

- 104. Mishra R., Kumar A., Ingle H., Kumar H. (2020) The interplay between viral-derived miRNAs and host immunity during infection. *Front. Immunol.* 10, 3079.
- 105. Merino G.A., Raad J., Bugnon L.A., Yones C., Kamenetzky L., Claus J., Ariel F., Milone D.H., Stegmayer G. (2021) Novel SARS-CoV-2 encoded small RNAs in the passage to humans. *Bioinformatics*. **36**(24), 5571–5581.

MicroRNAs AS POTENTIAL REGULATORS OF SARS-CoV-2 INFECTION AND MODIFIERS OF THE COVID-19 CLINICAL FEATURES

A. N. Kucher¹, Yu. A. Koroleva¹, A. A. Zarubin¹, and M. S. Nazarenko^{1, *}

¹ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia *e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

The pandemic of coronavirus disease 2019 (COVID-19) has actualized the identification of factors that may determine both the risk and the severity of infection. Among these factors, there are microRNAs that have a wide regulatory potential and hence are particularly interesting. This review focuses on the potential role of human microRNAs and viral genome/microRNAs in the infection and clinical features of COVID-19. Here, we have summarized the information about human microRNAs which are considered to specifically binding to SARS-CoV-2 genome. We looked also into expression levels of these microRNAs in various organs (cells) in both health and disease states. We have briefly discussed potential mechanisms of SARS-CoV-2 infection pathogenesis, including blocking of human microRNAs and RNA-binding proteins, changes in gene expression in infected cells, and possible epigenetic modifications of the human genome with the participation of microRNAs of coronavirus origin.

Keywords: microRNA, SARS-CoV-2, COVID-19

———— ОБЗОРЫ ———

УДК 577.218

МУТАГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕЗАМИНАЗ AID/APOBEC В ПРОТИВОВИРУСНОЙ ЗАЩИТЕ И КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

© 2022 г. О. Н. Шилова^а, Д. Л. Цыба^{b, c}, Е. С. Шилов^{d, *}

^аИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

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

^сНаучно-технологический университет "Сириус", Сочи, 354340 Россия ^dБиологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия *e-mail: shilov_evgeny@inbox.ru Поступила в редакцию 28.12.2020 г. После доработки 23.04.2021 г.

Принята к публикации 01.06.2021 г.

Белки семейства AID/APOBEC способны дезаминировать цитидин в составе нуклеиновых кислот с образованием урацила. Эти ферменты используются клеткой для редактирования матричных PHK, защиты от вирусов, внесения точечных мутаций в ДНК в процессе соматического гипермутагенеза и переключения изотипов антител. Дезаминазы – мощные мутагены, поэтому регуляция их экспрессии, активности и специфичности происходит сразу по нескольким механизмам, что особенно характерно для AID – дезаминазы, способной перестраивать ядерный геном. В обзоре обсуждаются механизмы нарушения экспрессии и активации белков AID/APOBEC в опухолях человека, их роль в канцерогенезе и прогрессии опухолей. Также проанализировано диагностическое и потенциальное терапевтическое значение повышенной экспрессии AID/APOBEC в разных типах опухолей. Мы предполагаем, что в случае со́лидных опухолей повышенная экспрессия эндогенных дезаминаз может служить одним из маркеров ответа на иммунотерапию, так как множественные точечные мутации в ДНК хозяина приводят к аминокислотным заменам в последовательностях опухолевых белков и тем самым увеличивают вероятность возникновения неоэпитопов.

Ключевые слова: AID, APOBEC, мутагенез, опухоль, редактирование PHK, геномная нестабильность **DOI:** 10.31857/S0026898422010086

введение

AID/APOBEC (Activation Induced Deaminase/Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic polypeptide-like) – семейство Zn-зависимых цитидиндезаминаз, конвертирующих цитидин в составе РНК или одноцепочечной ДНК в уридин. В норме эти ферменты участвуют в редактировании клеточных мРНК. противовирусном иммунном ответе клетки и обеспечивают соматический гипермутагенез в генах иммуноглобулинов при созревании В-лимфоцитов. В клетках человека насчитывается 11 белков, принадлежащих к семейству AID/APOBEC, в том числе AID, APOBEC1, АРОВЕС2, АРОВЕС4 и 7 гомологов АРОВЕС3, нумеруемых от ЗА до ЗН с пропуском ЗЕ, профиль экспрессии и функции которых тканеспецифичны. Для доменов цитидиндезаминаз всех ферментов семейства AID/APOBEC характерно наличие консервативного Zn-содержащего мотива ZDD с

супервторичной структурой вида α-спиральβ-слой—α-спираль [1]. Выбор субстрата и регуляция каталитического дезаминирования контролируются длиной, составом и пространственным расположением белковых доменов, прилегающих к каталитическому центру. Нуклеиновые кислоты, узнаваемые дезаминазами AID/APOBEC, обычно имеют весьма короткие консенсусные последовательности. Например, AID узнает мотив WRC*H, APOBEC3A – TTC*A, APOBEC3B – ATC*A, APOBEC3F – TTC*W, APOBEC3G – YCC*H, АРОВЕСЗН – ТС*А (звездочками обозначен дезаминируемый цитозин) [2]. Спектр возможных мишеней с такими последовательностями чрезвычайно широк, поэтому нарушение регуляции экспрессии и мутации в генах АРОВЕС-дезаминаз вызывают внесение большого количества изменений в последовательности ДНК и мРНК, приводят к развитию ряда иммунологических нарушений (гипер-IgM-синдром), а также злокачественных новообразований (В-клеточные лимфомы, гепатоцеллюлярная карцинома и другие опухоли). Способность ферментов модифицировать нуклеиновые кислоты используется клеткой для изменения своего фенотипа на уровне редактирования ядерного генома или мРНК. Однако те же ферменты при недостаточной избирательности или неточной регуляции могут генерировать онкогенные мутации и способствовать злокачественному перерождению клетки. Данный обзор посвящен роли дезаминаз семейства AID/APOBEC в канцерогенезе и опухолевой прогрессии.

РОЛЬ ДЕЗАМИНАЗ AID/APOBEC В РЕДАКТИРОВАНИИ КЛЕТОЧНЫХ РНК И ДНК

Первым описанным представителем семейства стал фермент АРОВЕС1, который при участии кофакторов редактирует мРНК аполипопротеина В (ароВ) в клетках эпителия тонкой кишки, что и нашло отражение в названии семейства. В результате превращения цитидина в уридин в последовательности мРНК формируется стоп-кодон и итоговый белковый продукт оказывается в 2 раза короче полноразмерного. Обе формы ароВ обеспечивают всасывание, транспорт и потребление тканями триглицеридов и холестерина, хотя включаются в разные структуры. Укороченный вариант присутствует только в хиломикронах, транспортирующих липиды от кишечника к печени [3], поскольку АРОВЕС1 экспрессируется в тонком кишечнике, но не в гепатоцитах. В свою очередь полноразмерный белок служит структурной основой для всей липопротеидной частицы и сохраняется в ней в течение всего времени ее существования [4, 5]. АРОВЕС2 участвует в дифференцировке скелетной и сердечной мускулатуры [6-8] и вовлечен в регуляцию сигналинга трансформирующего фактора роста- β (TGF- β), определяющего латеральную асимметрию в ходе эмбрионального развития позвоночных, хотя его нокаут не приводит к летальности [9, 10]. Сообщалось о важности АРОВЕС2 для нормальной работы митохондрий в мышцах, однако молекулярный субстрат этого фермента до сих пор не идентифицирован и детальный механизм его работы неизвестен [11]. Дезаминазы АРОВЕСЗ экспрессируются в клетках, вовлеченных в противовирусный иммунный ответ, и редактируют одноцепочечные вирусные нуклеиновые кислоты, внося в них мутации. Белок АРОВЕС4 преимущественно экспрессируется в семенниках, однако его функция до сих пор неизвестна [12].

Дезаминаза AID изменяет фенотип клетки за счет внесения мутаций в геномную ДНК. Этот фермент участвует в соматическом гипермутагенезе, сопровождающем VDJ-рекомбинацию в иммуноглобулиновых локусах В-лимфоцитов, в переключении изотипа антител и в созревании аффинитета зрелых В-лимфоцитов [13]. Дезоксиуридин в составе ДНК образуется с помощью фермента AID в основном во время фазы G₁ клеточного цикла [14, 15]. в ней же распознается системами репарации. Во время S-фазы бо́льшая часть изменений последовательности ДНК сохраняется в виде транзиции и реже как трансверсия; при этом вероятность мутации в локусе, подверженном действию дезаминазы, возрастает с 10^{-9} до 10^{-3} на один нуклеотид за одно деление. В случае близкого расположения сайтов дезаминирования работа системы эксцизионной репарации может приводить к двухцепочечным разрывам ДНК. Затем происходит их репарация, которая приводит к перестройке локуса и смене изотипа кодируемого антитела [16]. К активации AID в В-клетке приводят такие события, как активация В-клеточного рецептора на фоне дополнительных сигналов от костимуляторной молекулы CD40, TLR, а также влияющих на выбор переключаемого класса антитела цитокинов: интерлейкина-4 (IL-4), TGF-β или интерферона-у (IFN-у) [17]. К основным транскрипционным факторам. запускающим экспрессию AID. относятся NF-кВ и HoxC4 [17]. Схематично регуляция активности этой дезаминазы показана на рис. 1.

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ AID/APOBEC

Работа многих ферментов регулируется не только за счет экспрессии кодирующих их генов, но и на посттрансляционном уровне, это касается и белков AID/APOBEC. К важным факторам регуляции активности цитидиндезаминаз относится их внутриклеточная локализация. Во время интерфазы белки АРОВЕСЗА, АРОВЕСЗС и АРОВЕСЗН распределяются в клетке более-менее равномерно, возможно за счет своего небольшого размера (~25 кДа), позволяющего неспецифическое проникновение через ядерные поры [18]. Белки АРОВЕСЗ, имеющие два дезаминазных домена и молекулярную массу около 50 кДа, во время интерфазы могут быть как ядерными (АРОВЕСЗВ), так и цитоплазматическими (APOBEC3D, APOBEC3F и APOBEC3G) [18]. AID, несмотря на небольшой размер, находится преимущественно в цитоплазме, поскольку удаляется из ядра экспортином CRM1, узнающим сигнал ядерного экспорта (NES) внутри С-концевого мотива, и для попадания в ядро требует активного, опосредованного сигналом ядерной локализации (NLS) импорта [19, 20]. Показано, что после переноса AID в ядро белок находится там недолго, порядка 30 минут, в остальное время дезаминаза находится преимущественно в цитоплазме [21]. Важный сигнал для изменения локализации AID – ее фосфорилирование протеинкиназой А: хроматинассоциированная форма AID



Рис. 1. Схема регуляции мутагенной активности цитидиндезаминаз на примере AID. Условные обозначения: TLRs – Toll-подобные рецепторы, ILRs – рецепторы интерлейкинов, BCR – В-клеточный рецептор, UNG – гликозилаза уридиновых нуклеотидов, MMR – репарация неспаренных оснований, miRNA – микроPHK.

преимущественно фосфорилирована по остатку Ser38 [22-24]. APOBEC1 также может перемещаться в ядро, но в отсутствие белка-партнера АСГ находится главным образом в цитоплазме [25, 26]. Интересно, что повреждения ДНК могут вызывать переход АРОВЕСЗС из цитоплазмы в ядро [27], а также перенос AID в том же направлении [28]. Цитоплазматическая локализация большинства АРОВЕСЗ, по-видимому, связана с редактированием цитоплазматических нуклеиновых кислот, включая вирусные. Еще один компартмент клетки, содержащий нуклеиновые кислоты, — митохондрии, однако данные о том, способны ли цитидиндезаминазы вносить мутации в митохондриальную ДНК, противоречивы. При раке носоглотки, индуцированном вирусом Эпштейна-Барр, обнаружена индукция АРОВЕСЗВ и APOBEC3F, коррелирующая с частотой транзиций G→A в митохондриальной ДНК [29]. Однако при анализе митохондриальных ДНК из линий Вклеточных лимфом с высокими уровнями экспрессии AID в ней практически не выявляют мутации, вызываемые цитидиндезаминазами [30]. Предполагается, что митохондриальная ДНК дезаминируется под действием цитидиндезаминаз исключительно в цитоплазме [31].

Механизмы, обеспечивающие избирательность AID в отношении генов иммуноглобулинов, изучены не до конца. Показано, что у мышей ключевую роль в привлечении AID к последовательностям тяжелой цепи иммуноглобулинов играют транскрипционные факторы ETS1 и PAX5, также в образовании комплекса участвуют белки E2A и IRF4 [32]. У мышей ETS1 экспрессируется во многих тканях в период эмбрионального и раннего постнатального развития, однако во взрослом организме мыши и человека экспрессия этого белка наблюдается преимущественно в органах иммунной системы: тимусе, селезенке и лимфоузлах. Интересно, что уровень ETS1 сравнительно высок в "покоящихся" стадиях развития В-клеток (пре-В-клетки, про-В-клетки, IgM⁺ В-клетки красного костного мозга, наивные В-лимфоциты и В-клетки памяти), но снижается при активации В-клеток: для В-клеток герминативных центров и плазматических клеток характерна низкая экспрессия ETS1, вплоть до полного ее отсутствия [33]. Сам ETS1

повышает экспрессию характерного для В-клеток транскрипционного фактора РАХ5, который также участвует в поддержании точной локализации AID. Снижение экспрессии ETS1 относится к необходимым условиям для дальнейшей дифференцировки В-клеток, так как ETS1 ингибирует фактор BLIMP-1, обеспечивающий развитие плазматических клеток [34]; в свою очередь, BLIMP-1 снижает экспрессию РАХ5 [35]. Таким образом, одновременно с уменьшением экспрессии AID в клетках герминативных центров снижается и экспрессия белков, определяющих избирательность дезаминазы в отношении генов иммуноглобулинов. Можно предположить, что в отсутствие белков, ограничивающих активность AID, количество случайно отредактированных участков генома увеличится. Однако неизвестно, насколько избирательны дезаминазы в отношении геновмишеней в случае их патологической активности. Скорее всего, выбор мишеней во многом случаен и определяется в первую очередь пространственной доступностью ДНК для дезаминазы внутри ядра. Так, используя секвенирование, F. Meng и др. [36] обнаружили, что последовательности, редактируемые AID в В-лимфоцитах мыши и человека, ассоциированы с областями активной транскрипции, а именно с участками, транскрибируемыми в обоих направлениях, в составе которых есть суперэнхансеры. J. Qian и соавт. [37], основываясь на результатах по иммунопреципитации хроматина, также показали, что участки ДНК, подверженные случайному редактированию AID, ассоциированы с активными областями суперэнхансеров, которые, в свою очередь, зависят от типа клеток.

ПРОТИВОВИРУСНАЯ ФУНКЦИЯ ДЕЗАМИНАЗ АРОВЕСЗ

Для большинства членов семейства AID/APOBEC либо не показано редактирование мРНК клетки, как в случае с АРОВЕС2 и АРОВЕС4, либо показано преимущественное редактирование вирусных нуклеиновых кислот, как в случае белков АРОВЕСЗ. Противовирусная активность дезаминаз наиболее подробно описана для APOBEC3G, а именно для взаимодействия АРОВЕСЗG с геномом ВИЧ. Белок АРОВЕСЗС попадает в пакующиеся вирусные капсиды, связывается с провирусной одноцепочечной минус-цепью ДНК и дезаминирует цитидин преимущественно в последовательностях 5'-СС-3' [4]. Впоследствии РНК-зависимая ДНК-полимераза распознает урацил как тимин, что приводит к замене гуанина на аденин при синтезе плюс-цепи ДНК в новой зараженной клетке. Связанный с этим гипермутагенез приводит к образованию преждевременных стоп-кодонов и накоплению других мутаций, препятствующих образованию новых вирусных частиц [38]. Таким образом, АРОВЕСЗС влияет на размножение вируса на следующем цикле репликации после проникновения в клетку. Также дезаминирование цитозина может снижать количество вирусной ДНК в зараженной клетке за счет распознавания и разрушения урацилсодержащей ДНК системами репарации [39]. Показано, что родственные белки: APOBEC3F, АРОВЕСЗД и АРОВЕСЗН - также участвуют в противодействии ретровирусам, создавая мутации в других сайтах вирусной ДНК (5'-ТС-3') [4]. В качестве альтернативного механизма ограничения репликации лентивирусов для белков семейства АРОВЕСЗ описано независимое от дезаминазной активности подавление обратной транскрипции [40], хотя в других работах эта гипотеза не подтверждена, так как лишенный каталитического домена белок АРОВЕСЗС не подавлял ВИЧ-инфекцию [41, 42].

В ходе коэволюции вирусов и хозяев некоторые вирусы приобрели устойчивость к клеточным системам защиты. Например, вирусы могут инактивировать дезаминазы, препятствуя их упаковке в вирион, и успешно продолжать инфекцию. Так, С-концевая последовательность белка нуклеокапсида Т-лимфотропного вируса человека содержит две короткие последовательности. которые в норме препятствуют попаданию молекул АРОВЕСЗС в новые вирионы и тем самым снижают чувствительность вируса к действию дезаминаз [43]. Пенистые вирусы (Spumaretrovirinae) полагаются на специальный белок Bet, который взаимодействует с APOBEC3G и APOBEC3F и препятствует упаковке этих белков в вирион, хотя и не снижает их содержание в цитоплазме зараженной клетки [44]. Наконец, самое радикальное решение проблемы дезаминаз выработано в результате эволюции ВИЧ-1. Вирусный белок Vif может связываться с белками APOBEC3C, D, F, G. Н и привлекать к ним специфическую E3-убиквитинлигазу. что приводит к деградации дезаминаз в протеасоме [4]. Однако Vif не способен уничтожить весь пул АРОВЕСЗ в зараженной клетке. На это указывают множественные G → А замены в специфических сайтах провирусов в геномах клеток, полученных от пациентов с острой и хронической ВИЧ-инфекцией, а также при вертикальной передаче ВИЧ новорожденным [45].

Анализ единичных аминокислотных замен позволил выявить ключевые участки APOBEC3G человека, необходимые для взаимодействия с Vif BИЧ-1: для связывания необходим остаток Asp128 и важны Pro129 и Asp130 [46]. Показано, что белки Vif других лентивирусов млекопитающих связываются в том же участке APOBEC3G, хотя ключевые остатки могут отличаться [47]. Для упаковки в вирионы важны аминокислоты 124–127 APOBEC3G, непосредственно прилегающие к сайту узнавания Vif [46]. Гены мутантных вариантов APOBEC3G используют в разработках по генотерапии ВИЧ-инфекции: в Т-клетки или стволовые клетки красного костного мозга, предназначенные для трансплантации, вводят последовательность белка APOBEC3G, устойчивого к Vif, чтобы усилить естественный механизм защиты клеток от ретровируса [48]. Как ни странно, лентивирусные векторы, одни из наиболее эффективных с точки зрения трансдукции и способные интегрировать ген резистентного Vif в геном клетки-мишени, повреждаются под действием APOBEC3G в клетках-продуцентах, из-за чего приходится использовать аденоассоциированный вирус [49] или применять самоактивируемые лентивирусные системы [50].

Несмотря на протективную роль дезаминаз АРОВЕСЗ дикого типа, вызванный ими мутагенез может служить источником мутаций, выгодных для вируса. Так, штаммы ВИЧ, несущие некоторые мутации Vif, снижающие его активность, чаще приобретают устойчивость к антиретровирусной терапии за счет более частых транзиций $G \rightarrow A$, в том числе в генах-мишенях лекарств [51]. По-видимому, в таком случае дезаминазы не могут полностью подавлять репликацию вируса, но обеспечивают высокий уровень мутагенеза. дающий материал для селекции более агрессивных штаммов. Кроме того, остаточная активность АРОВЕСЗ может затрагивать сайты, влияющие на связывание антигенных пептидов белков вируса с молекулами главного комплекса гистосовместимости [52]. В ходе дальнейшего изучения белков семейства АРОВЕСЗ накоплены данные по противовирусному действию этих ферментов в отношении ретровирусов, в том числе Т-лимфотропному вирусу человека [43], ретротранспозонам [53], вирусу иммунодефицита обезьян [54], вирусу инфекционной анемии лошадей [55], вирусу мышиной лейкемии [56], спумаретровирусу [57, 58], а также аденоассоциированному вирусу [53]. Изучение взаимодействия белков АРОВЕСЗ с ДНК ожидаемо привело к установлению роли этих белков в сдерживании инфекций, вызываемых ДНК-содержащими вирусами, такими как вирус гепатита В [59, 60] и парвовирусы [53]. Помимо способности дезаминировать однонитевую ДНК для дезаминаз APOBEC3 обнаружена способность редактировать РНК ВИЧ-1 [61], что позволило предположить такую активность в отношении других РНК-содержащих вирусов, не имеющих в цикле репликации стадии обратной транскрипции. Кроме того, опосредованное дезаминазами АРОВЕСЗ редактирование РНК обнаружено для активированных по М1-типу моноцитов и макрофагов [62], а также клеток рака молочной железы, причем в последнем случае интенсивность редактирования коррелировала с уровнем активации генов провоспалительных

белков и количеством мигрировавших в опухолевый очаг иммунных клеток [63].

Недавно показано, что АРОВЕС1 также может редактировать хромосомную ДНК [64], поэтому прежнее функциональное разделение ферментов на редактирующие только ДНК и редактирующие только РНК чисто условное. Действительно, для РНК-содержащих вирусов эпидемического паротита, кори и респираторно-синцитиального вируса было показано снижение эффективности заражения клеток, гиперэкспрессирущих АРОВЕСЗG [65]. Возможно, в данном случае свою роль также сыграли другие белки семейства АРОВЕС3. Так, заражение клеток респираторного эпителия коронавирусом HCoV-NL63 привело к повышенной экспрессии APOBEC3A, 3C, 3D, 3F, но не 3G, а экспрессия белков 3С, 3F и 3H в клетках линии LLC-MK2 снизила вирусную нагрузку на 2 порядка, причем протективный эффект наблюдался только в случае каталитически активных белков [66]. Большинство млекопитающих, включая грызунов, тем не менее, прекрасно обходится одной копией АРОВЕСЗ, хотя наличие у человека 7 разных паралогов может быть связано со специфичностью дезаминаз к нуклеиновым кислотам различных вирусов.

МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ AID/APOBEC В ОПУХОЛЯХ

Дезаминазы семейства AID/APOBEC - эндогенный источник мутаций в клетке, поэтому для раковой клетки это поставщики новых мутаций, которые затем подвергаются отбору на уровне опухолевых клонов. Анализ данных полногеномного секвенирования опухолей выявил характерные для АРОВЕС кластеры фокального гипермутагенеза в клетках многих типов рака, таких как плоскоклеточный рак легкого, рак мочевого пузыря, акральная меланома и некоторые саркомы, причем наличие этих кластеров положительно коррелирует с уровнем экспрессии АРОВЕСЗВ [67, 68]. Связь белков AID/APOBEC с формированием опухолевого клона может быть непосредственной — за счет мутаций в гене дезаминазы, ведущей к повышению ее активности. Так, выявлена роль мутаций генов АРОВЕСЗ (паралогов С, D, F, G и H) в патогенезе множественной миеломы [69]; при этом мутации в генах самих дезаминаз могут повышать их мутагенный потенциал в опухолях. Так, появление однонуклеотидных полиморфизмов и делеций в генах АРОВЕСЗ коррелирует с повышенным риском развития рака мочевого пузыря и молочной железы соответственно [70-72]. Однако чаще всего наблюдаются нарушения регуляторных механизмов, которые в норме поддерживают экспрессию дезаминаз на безопасном для клетки уровне. При рассмотрении отдельных представителей семейства можно заметить, что практически для всех из них есть сообщения либо о сверхэксспрессии, либо о мутациях в тех или иных опухолях.

Наиболее очевидна мутагенная активность дезаминазы AID. В норме она обеспечивает перестройку трех локусов (IGH, IGL, IGK), кодирующих тяжелые и легкие цепи антител; в случае нарушения этого процесса возникают В-клеточные лимфомы, например лимфома Беркита, появляющаяся в результате AID-зависимого слияния локусов IGH и MYC. Однако неспецифические перестройки могут возникать и в других участках генома, приводя к онкогенным мутациям [73, 74]. Конститутивная экспрессия AID у мышей ведет к возникновению Т-клеточных лимфом и опухолей легких [75]. Неудивительно поэтому, что повышенную экспрессию AID часто обнаруживают именно в малигнизированных лимфоцитах, например в опухолевых клетках В-клеточного лимфолейкоза. Повышенная экспрессия AID ассоциируется с неблагоприятным прогнозом для пациента [76, 77], причем совсем не обязательно коррелирует с наличием перестроек в генах тяжелых цепей иммуноглобулинов [76]. Возможно, на паттерн возникающих в малигнизированном лимфоците мутаций влияет экспрессия альтернативных сплайсоформ AID, которая часто наблюдается при хроническом лимфолейкозе [78]. Например, отсутствие перестроек в локусе тяжелой цепи чаще встречается в случае повышенной экспрессии сразу трех альтернативных сплайсоформ AID [79]. Сообщалось, что экспрессию AID наблюдали в некоторых опухолях желудка, легких, печени, яичника и молочной железы [80, 81].

Помимо лимфоцитов, белки семейства AID/ АРОВЕС могут экспрессироваться в норме во многих типах клеток в ответ на вирусную инфекцию. В таком случае под действием провоспалительных цитокинов в клетке повышается экспрессия и активность дезаминаз, подавляющих репликацию вируса, как уже описано выше. К ключевым внутриклеточным путям регуляции экспрессии АРОВЕСЗ относится сигнальный путь NF-кВ [82, 83], он же задействован в активации AID [84, 85]. Для APOBEC3A, APOBEC3F и АРОВЕСЗС также показано повышение экспрессии в ответ на INFα [86-88]. Однако высокая активность АРОВЕС не всегда позволяет клетке элиминировать вирус, а происходящий параллельно соматический мутагенез в сочетании с вирусным поражением способны привести к нарушению регуляции клеточного цикла клетки и ее злокачественному перерождению. Кроме того, на фоне воспаления может не только повышаться активность противовирусных белков семейства АРОВЕС, но и возникать аберрантная экспрессия AID. Повышенная экспрессия APOBEC описана в вирусассоциированных опухолях желудка, печени, шейки матки [89]. Некоторые вирусы могут самостоятельно стимулировать экспрессию белков АРОВЕС. Вирус Эпштейна-Барр кодирует белок LMP1, который запускает сигнальный путь CD40 вне зависимости от наличия лиганда, что приводит к активации NF-кВ и экспрессии AID [90, 91]. Заражение культивируемых клеток вирусом гепатита С также индуцирует экспрессию AID и, кроме того, ДНК-полимераз SOS-репарации: Сил. Одновременно с этим наблюдаются перестройки в иммуноглобулиновом локусе *IGH* и накопление мутаций в генах, кодирующих BCL-6, p53, β-катенин и β-глобин [92]. По крайней мере часть из этих мутаций вызвана активностью AID, поэтому можно предположить, что "работа" этого фермента вносит вклад в развитие неоплазий, ассоциированных с вирусом гепатита С, в том числе неходжкинских В-клеточных лимфом и олигоклональной пролиферации лимфоцитов [93]. Однако вирусная инфекция клетки – это далеко не единственный стимул, запускающий активацию NF-кВ. Сигнальные пути этой системы включают в себя рецепторы к TNF, липополисахариду и IL-1 (канонический путь), а также сигналы активации пролиферации лимфоцитов, такие как BAFFR, CD40, RANK и LT β R (неканонический путь) [94]. И поэтому нет ничего удивительного в том, что повышенная экспрессия белков семейства АРОВЕС выявлена во многих типах клеток в контексте воспалений разной этиологии.

Повышение экспрессии дезаминаз АРОВЕС в ответ на провоспалительные цитокины – это, повидимому, довольно распространенное явление, которое наблюдается в разных типах клеток. В клетках гемопоэтического ряда (Т-лимфоцитах, макрофагах, дендритных клетках) экспрессия большинства белков АРОВЕСЗ (за исключением АРОВЕСЗВ и АРОВЕСЗС) повышается под действием провоспалительных цитокинов: IFN-α, IFN-γ, IL-2, IL-15, TNFα [95]. Аналогичное повышение экспрессии АРОВЕСЗС в ответ на действие IFN-α, IFN-γ, IL-1 и TNFα было показано для нейрональных и астроцитарных клеток [96], а также для эпителиальных [97, 98]. Бактериальные патогены также вызывают повышение экспрессии белков семейства АРОВЕС через активацию NF-кВ. Известно, что штаммы *Helicobacter pylori*, содержащие факторы вирулентности cagPAI, не только провоцируют развитие гастрита и язвы желудка, но и вовлечены в патогенез рака желудка и лимфомы, происходящей из ассоциированной со слизистой лимфоидной ткани [99]. Одним из механизмов канцерогенеза, вызванного Н. руlori, может быть аберрантная экспрессия AID в клетках эпителия желудка, которую обнаружили в присутствии патогенных штаммов H. pylori, это приводит к накоплению мутаций в геноме эпителиоцитов, в том числе в гене опухолевого супрессора p53 [81]. В индукцию AID в этом случае вносят вклад сразу два механизма: непосредственная активация NF-кВ факторами вирулентности, которые бактерия вводит в эпителиальную клетку при помощи системы секреции IV типа, и запуск воспалительного ответа, опосредованного цитокинами [98].

Хроническое воспаление, не имеющее четкой связи с конкретным патогеном, также может вызывать аберрантную экспрессию AID/APOBEC, что способствует малигнизации. Воспаление кишечника, вызванное язвенным колитом или болезнью Крона, значительно повышает риск колоректального рака с вероятностью, коррелирующей с длительностью заболевания [100, 101]. В отсутствие инфекции и сигналов от микробиоты провоспалительные цитокины могут вырабатываться опухолевым микроокружением, способствуя накоплению мутаций и формированию субклонов внутри опухоли. Гиперэкспрессия АРОВЕС характерна для не ассоциированных с патогенами опухолей головы и шеи, легких, шейки матки, молочной железы, мочевого пузыря [102]. Считается, что в этих типах опухолей дезаминазы семейства АРОВЕС не относятся к онкогенам как таковым, но способствуют опухолевой прогрессии. Например, в клетках кишечного эпителия в ответ на Th2-цитокины IL-4 и IL-13 может запускаться экспрессия AID, приводящая к накоплению мутаций в гене опухолевого супрессора р53 [97]. В свою очередь, нарушение работы р53 может усиливать аберрантную экспрессию дезаминаз. Промоторные области генов АРОВЕСЗ содержат сайты связывания р53, в норме это обусловливает снижение экспрессии гена. В связи с этим мутации гена *ТР53*, либо блокировка его белкового продукта, например белками Е6/Е7 вируса папилломы человека (ВПЧ), приводят к снятию его ингибирующего действия и повышению экспрессии АРОВЕС [103]. Для ряда опухолей выявлена гиперэкспрессия белков АРОВЕС лишь на поздних этапах прогрессии - когда опухоль глубоко инвазирует в окружающие ткани и метастазирует [104]. Например, для аденокарцином легкого показано, что в первичном очаге опухоли профиль мутаций не соответствовал активностям АРОВЕС, в то время как в метастазах значительную часть мутаций можно объяснить действием дезаминаз [105]. Повышение экспрессии белков АРОВЕС может быть обусловлено снижением ингибирующего действия р53 и в случае вирусассоциированных опухолей. Так, некоторые вирусы (в частности ВПЧ) могут индушировать экспрессию АРОВЕС [106] путем снятия ингибирующего влияния белка р53. Это дополнительно усиливает экспрессию АРОВЕСЗА и АРОВЕСЗВ, первоначально вызванную активацией противовирусного иммунитета, что в итоге приводит к возникновению соматических мутаций и формированию опухолевого клона клеток, ухудшая течение заболевания и прогноз [107]. Повышенную экспрессию APOBEC3B и наличие единичных либо кластерных мутаций в последовательностях-мишенях выявляют при анализе клеток рака мочевого пузыря, шейки матки, легких, молочной железы и опухолей головы и шеи [67]. Наличие большого числа генетических перестроек должно приводить к активации систем репарации или гибели клетки путем апоптоза, однако в опухолевых клетках эти защитные механизмы нарушены, и повышенный мутагенез приводит к опухолевой прогрессии.

Повышенная экспрессия в опухолях обнаружена даже для тех членов семейства AID/APOBEC, чьи естественные мишени до сих пор неизвестны. Например, хотя данные о влиянии АРОВЕС1 на канцерогенез у человека отсутствуют, удалось обнаружить корреляцию между уровнем экспрессии АРОВЕС1 и числом инсерций/делеций в геномах раковых клеток [108]. АРОВЕС2 обычно рассматривают исключительно в свете эмбрионального развития поперечно-полосатой мышечной ткани, поскольку дефекты в молекуле этого фермента ассоциированы с миопатиями. Однако сейчас появились сообщения о связи аберрантной экспрессии АРОВЕС2 в гепатоцитах с развитием гепатоцеллюлярной карциномы на фоне гепатита В [109]. Предполагается, что инфицирование гепатоцитов вирусом гепатита В приводит к нарушению образования регуляторных РНК и повышению экспрессии промутагенной дезаминазы. Следует отметить, что экспрессия белков АРОВЕСЗ в опухолевых клетках может негативно регулироваться на посттранскрипционном уровне за счет связывания мРНК АРОВЕС с микроРНК в цитоплазме, что препятствует нормальному синтезу белкового продукта [110].

Точечные мутации в ДНК, вызываемые работой тандема цитидиндезаминаз и систем репарации, могут приводить к инактивации генов опухолевых супрессоров, активации протоонкогенов, накоплению нейтральных соматических мутации и возникновению раковых неоантигенов. В последнем случае высокая активность дезаминаз будет означать более вероятный ответ пациента на иммунотерапию опухоли и считается благоприятным прогностическим маркером [111]. На модели мышиной меланомы В16 это было подтверждено экспериментально: экспрессия АРОВЕСЗВ приводила к увеличению числа опухолевых неоэпитопов и повышала эффективность иммунотерапии [112]. Тем не менее нельзя говорить о положительном эффекте опосредованного дезаминазами мутагенеза. Определение мутационных профилей опухолей и выявление характерных наборов мутаций ("сигнатур") позволяет предсказывать клиническое течение заболевания. Так, в случае множественной миеломы высокий уровень АРОВЕСопосредованных транзиций дает неблагоприятный прогноз [113, 114]. Аналогичное наблюдение было сделано для APOBEC3B на когорте пациентов с карциномой надпочечников, выбранных из базы данных The Cancer Genome Atlas [115], и на когорте пациентов с раком яичников [116].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дезаминазы семейства AID/APOBEC используются клетками для редактирования собственных нуклеиновых кислот в ядре либо для внесения мутаций в вирусные нуклеиновые кислоты в цитоплазме. AID вносит изменения в геномную ДНК В-лимфоцитов, что приводит к соматическому гипермутагенезу или переключению изотипа антител. Ядерная локализация также характерна для АРОВЕС1, редактирующего мРНК ароВ. Белки АРОВЕСЗ работают в цитоплазме и редактируют в первую очередь вирусные нуклеиновые кислоты, подавляя репликацию вирусов. В норме их активность регулируется на нескольких уровнях: транскрипции, трансляции, внутриклеточной локализации, доступности мишени и активации в составе белковых комплексов. Тем не менее экспрессия этих генов может варьировать в широких пределах в процессе канцерогенеза. К основным механизмам, которые связывают индукцию или прогрессию опухолей с активностью дезаминаз AID/APOBEC, относятся следующие:

1) Транзиторная активация дезаминаз в ходе иммунного ответа на патоген, который не реплицируется непосредственно в этих клетках (как в случае рака желудка и *Helicobacter pylori*).

2) Хроническая активация APOBEC в клетках, зараженных онкогенными вирусами (такими как ВПЧ и вирус гепатита В); при этом активность белков AID/APOBEC, индуцированная непосредственно вирусной инфекцией или выделяемыми окружением цитокинами, может приводить к возникновению дополнительных мутаций в геномной ДНК.

3) Нарушение нормального соматического гипермутагенеза при созревании В-лимфоцитов и последующая конститутивная либо периодическая экспрессия дезаминазы AID.

В качестве дополнительного механизма вовлечения дезаминаз AID/APOBEC в канцерогенез можно предположить возникновение фенокопий мутаций онкогенов или опухолевых супрессоров. Поскольку для многих белков AID/APOBEC характерна способность узнавать и модфицировать PHK, можно предположить, что при редактировании мPHK создаются фенокопии мутаций в ДHK. В таком случае не будет возникать мутаций в ядерной ДHK и они не будут детектироваться при секвенировании, однако мутантный фенотип будет реализовываться на уровне редактирования транскриптов и функционирования транслиро-

ванных с этих мРНК белков. Этот механизм хорошо известен для дезаминаз семейства ADAR, которые конвертируют аленозин в инозин. Сверхэкспрессия ADAR и специфическое редактирование РНК характерны для широкого спектра опухолей и огромного числа генов-мишеней, включая гены микроРНК [117]. Более подробно роль РНК-редактирования в опухолях с помощью аденозиндезаминаз рассмотрена в обзоре Gallo и соавт. [118]. Для дезаминазы APOBEC1 подобный механизм идентифицирован в опухолях нервной ткани и мРНК онкосупрессора нейрофиброматоза NF1 [119, 120], для АРОВЕСЗ показано редактирование в опухолях мРНК многих опухолеассоциированных генов, в том числе ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, MDM2, KMT2A, MSH2, PTEN и *TSC2* [121, 122].

Тем не менее, несмотря на то, что для многих типов опухолей показана повышенная экспрессия или отличная от нормы локализация дезаминаз AID/APOBEC, в большинстве случаев их значимость для онкогенеза не установлена. Также неизвестно, насколько избирательны дезаминазы в отношении генов-мишеней при нарушении их нормальной локализации. Скорее всего, выбор редактируемой последовательности во многом случаен и определяется в первую очередь транскрипционной активностью клетки. Таким образом, дезаминазы вносят свой вклад в накопление мутаций, а отбор на онкогенность мутаций идет уже на уровне выживания и пролиферации клонов внутри опухоли.

Сами по себе дезаминазы AID/APOBEC относятся к компонентам генетической нестабильности, и направленная на модуляцию их активности терапия вряд ли будет иметь клиническое значение. Однако в качестве прогностического маркера, позволяющего оценить мутагенный потенциал опухолевых клеток и эффективность иммунотерапии, направленной против опухолевых неоантигенов, эти ферменты востребованы уже в настоящее время [111, 113, 116].

Работа поддержана грантом РФФИ №19-34-51014 и Стипендией Президента Российской Федерации СТ-5585.2018.4, выполнена с использованием инфраструктуры НТУ "Сириус".

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Betts L., Xiang S., Short S., Wolfenden R., Carter C., Jr. (1994) Cytidine deaminase. The 2.3 Å crystal structure of an enzyme: transition-state analog complex. *J. Mol. Biol.* 235(2), 635–656. https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1018

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

- Silvas T.V., Schiffer C.A. (2019) APOBEC3s: DNAediting human cytidine deaminases. *Protein Sci.* 28(9), 1552–1566. https://doi.org/10.1002/pro.3670
- Nakajima K., Nagamine T., Fujita M., Ai M., Tanaka A., Schaefer E. (2014) Apolipoprotein B-48: a unique marker of chylomicron metabolism. *Adv. Clin. Chem.* 64, 117–177.
- 4. Salter J.D., Bennett R.P., Smith H.C. (2016) The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends Biochem. Sci.* **41(7)**, 578–594.
- Smith H.C. (2017) RNA binding to APOBEC deaminases; not simply a substrate for C to U editing. *RNA Biol.* 14(9), 1153–1165. https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1259783
- 6. Liao W., Hong S.H., Chan B.H., Rudolph F.B., Clark S.C., Chan L. (1999) APOBEC-2, a cardiacand skeletal muscle-specific member of the cytidine deaminase supergene family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 398–404.
- 7. Etard C., Roostalu U., Strahle U. (2010) Lack of Apobec2-related proteins causes a dystrophic muscle phenotype in zebrafish embryos. *J. Cell Biol.* **189**, 527–539.
- 8. Sato Y., Probst H.C., Tatsumi R., Ikeuchi Y., Neuberger M.S., Rada C. (2010) Deficiency in APOBEC2 leads to a shift in muscle fiber type, diminished body mass, and myopathy. *J. Biol. Chem.* **285**, 7111–7118.
- Vonica A., Rosa A., Arduini B.L., Brivanlou A.H. (2011) APOBEC2, a selective inhibitor of TGFβ signaling, regulates left-right axis specification during early embryogenesis. *Dev. Biol.* **350**, 13–23. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.09.016
- Mikl M.C., Watt I.N., Lu M., Reik W., Davies S.L., Neuberger M.S., Rada C. (2005) Mice deficient in APOBEC2 and APOBEC3. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7270– 7277.
- Sato Y., Ohtsubo H., Nihei N., Kaneko T., Sato Y., Adachi S.I., Kondo S., Nakamura M., Mizunoya W., Iida H., Tatsumi R., Rada C., Yoshizawa F. (2018) Apobec2 deficiency causes mitochondrial defects and mitophagy in skeletal muscle. *FASEB J.* 32(3), 1428– 1439.

https://doi.org/10.1096/fj.201700493R

- 12. Rogozin I., Basu M., Jordan I., Pavlov Y., Koonin E. (2005) APOBEC4, a new member of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases predicted by computational analysis. *Cell Cycle.* **4**, 1281–1285.
 - https://doi.org/10.4161/cc.4.9.1994
- Pilzecker B., Jacobs H. (2019) Mutating for good: DNA damage responses during somatic hypermutation. *Front. Immunol.* 10, 438. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00438
- 14. Sharbeen G., Yee C., Smith A., Jolly C. (2012) Ectopic restriction of DNA repair reveals that UNG2 excites AID-induced uracils predominantly or exclusively during G1 phase. J. Exp. Med. 209, 965–974. https://doi.org/10.1084/jem20112379
- 15. Wang Q., Kieffer-Kwon K., Oliviera T., Mayer C., Yao K., Pai J., Cao Z., Dose M., Casellas R., Jan-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

kovic M., Nussenzweig M.C., Robbiani D.F. (2017) The cell cycle restricts activation-induced cytidine deaminase activity to early G1. *J. Exp. Med.* **214**, 49–58. https://doi.org/10.1084/jem20161649

- Yu K., Lieber M. (2019) Current insights into the mechanism of mammalian immunoglobulin class switch recombination. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 54(4), 333–351. https://doi.org/10.1080/10409238.2019.1659227
- 17. Zan H., Casali P. (2013) Regulation of Aicda expression and AID activity. *Autoimmunity*. **46**(2), 83–101.
- https://doi.org/10.3109/08916934.2012.749244
 18. Lackey L., Law E., Brown W., Harris R. (2013) Subcellular localization of the APOBEC3 proteins during mitosis and implications for genomic DNA deamination. *Cell Cycle*. 12(5), 762–772. https://doi.org/10.4161/cc.23713
- Patenaude A., Orthwein A., Hu Y., Campo V., Kavli B., Buschiazzo A., Di Noia J. (2009) Active nuclear import and cytoplasmic retention of activation-induced deaminase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16(5), 517–527. https://doi.org/10.1038/nsmb.1598
- Patenaude A., Di Noia J. (2010) The mechanisms regulating the subcellular localization of AID. *Nucleus.* 1(4), 325–331. https://doi.org/10.4161/nucl.1.4.12107
- Le Q., Maizels N. (2019) Activation-induced deaminase (AID) localizes to the nucleus in brief pulses.
 - *PLoS Genet.* **15**(2), e1007968. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007968
- Pasqualucci L., Kitaura Y., Gu H., Dalla-Favera R. (2006) PKA-mediated phosphorylation regulates the function of activation-induced deaminase (AID) in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**(2), 395–400. https://doi.org/10.1073/pnas.0509969103
- Basu U., Chaudhuri J., Alpert C., Dutt S., Ranganath S., Li G., Schrum J., Manis J., Alt F. (2005) The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature*. 438(7067), 508–511. https://doi.org/10.1038/nature04255
- 24. Cheng H., Vuong B., Basu U., Franklin A., Schwer B., Astarita J., Phan R.T., Datta A., Manis J., Alt F.W., Chaudhuri J. (2009) Integrity of the AID serine-38 phosphorylation site is critical for class switch recombination and somatic hypermutation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**(8), 2717–2722. https://doi.org/10.1073/pnas.0812304106
- Blanc V., Henderson J., Kennedy S, Davidson N. (2001) Mutagenesis of apobec-1 complementation factor reveals distinct domains that modulate RNA binding, protein-protein interaction with apobec-1, and complementation of C to U RNA-editing activity. *J. Biol. Chem.* 276(49), 46386–46393. https://doi.org/10.1074/jbc.M107654200
- Blanc V., Henderson J., Kennedy S, Davidson N. (2003) A novel nuclear localization signal in the auxiliary domain of apobec-1 complementation factor regulates nucleocytoplasmic import and shuttling. *J. Biol. Chem.* 278(42), 41198–41204. https://doi.org/10.1074/jbc.M302951200
- 27. Nowarski R., Wilner O.I., Cheshin O., Shahar O.D., Kenig E., Baraz L., Britan-Rosich E., Nagler A., Har-

ris R.S., Goldberg M., Willner I., Kotler M. (2012) APOBEC3G enhances lymphoma cell radioresistance by promoting cytidine deaminase-dependent DNA repair. *Blood.* **120**, 366–375.

https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-402123

- Brar S.S., Watson M., Diaz M. (2004) Activation-induced cytosine deaminase (AID) is actively exported out of the nucleus but retained by the induction of DNA breaks. *J. Biol. Chem.* 279, 26395–26401. https://doi.org/10.1074/jbc.M403503200
- Wakae K., Kondo S., Pham H.T., Wakisaka N., Que L., Li Y., Zheng X., Fukano K., Kitamura K., Watashi K., Aizaki H., Ueno T., Moriyama-Kita M., Ishikawa K., Nakanishi Y., Endo K., Muramatsu M., Yoshizaki T. (2020) EBV-LMP1 induces APOBEC3s and mitochondrial DNA hypermutation in nasopharyngeal cancer. *Cancer Med.* 9(20), 7663–7671. https://doi.org/10.1002/cam4.3357
- Wu H., Zhang K., Chen Y., Li J., Strout M.P., Gu X. (2020) Optimized high-fidelity 3DPCR to assess potential mitochondrial targeting by activation-induced cytidine deaminase. *FEBS Open Bio.* **10**(9), 1782–1792. https://doi.org/10.1002/2211-5463.12927
- Suspène R., Aynaud M.M., Guétard D., Henry M., Eckhoff G., Marchio A., Pineau P., Dejean A., Vartanian J.P., Wain-Hobson S. (2011) Somatic hypermutation of human mitochondrial and nuclear DNA by APOBEC3 cytidine deaminases, a pathway for DNA catabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(12), 4858–4863.

https://doi.org/10.1073/pnas.1009687108

32. Grundström C., Kumar A., Priya A., Negi N., Grundström T. (2018) S1 and PAX5 transcription factors recruit AID to Igh DNA. *Eur. J. Immunol.* **48**(10), 1687–1697.

https://doi.org/10.1002/eji.201847625

- Garrett-Sinha L.A. (2013) Review of Ets1 structure, function, and roles in immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**(18), 3375–3390. https://doi.org/10.1007/s00018-012-1243-7
- 34. John S.A., Clements J.L., Russell L.M., Garrett-Sinha L.A. (2007) Ets-1 regulates plasma cell differentiation by interfering with the activity of the transcription factor Blimp-1. J. Biol. Chem. 283(2), 951–962. https://doi.org/10.1074/jbc.M705262200
- 35. Shaffer A.L., Lin K.I., Kuo T.C., Yu X., Hurt E.M., Rosenwald A., Giltnane J.M., Yang L., Zhao H., Calame K., Staudt L.M. (2002) Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*. 17(1), 51–62. https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00335-7
- 36. Meng F.L., Du Z., Federation A., Hu J., Wang Q., Kieffer-Kwon K.R., Meyers R.M., Amor C., Wasserman C.R., Neuberg D., Casellas R., Nussenzweig M.C., Bradner J.E., Liu X.S., Alt F.W. (2014) Convergent transcription at intragenic super-enhancers targets AID-initiated genomic instability. *Cell.* 159(7), 1538–1548.

https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.014

 Qian J., Wang Q., Dose M., Pruett N., Kieffer-Kwon K.R., Resch W., Liang G., Tang Z., Mathé E., Benner C., Dubois W., Nelson S., Vian L., Oliveira T.Y., Jankovic M., Hakim O., Gazumyan A., Pavri R., Awasthi P., Song B., Liu G., Chen L., Zhu S., Feigenbaum L., Staudt L., Murre C., Ruan Y., Robbiani D.F., Pan-Hammarström Q., Nussenzweig M.C., Casellas R. (2014) B cell super-enhancers and regulatory clusters recruit AID tumorigenic activity. *Cell.* **159**(7), 1524–1537.

https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.013

- Mangeat B., Turelli P., Caron G., Friedli M., Perrin L., Trono D. (2003) Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*. 424(6944), 99–103.
- 39. Yang B., Chen K., Zhang C., Huang S., Zhang H. (2007) Virion-associated uracil DNA glycosylase-2 and apurinic/apyrimidinic endonuclease are involved in the degradation of APOBEC3G-edited nascent HIV-1 DNA. J. Biol. Chem. 282(16), 11667–11675. https://doi.org/10.1074/jbc.M606864200
- Bishop K., Verma M., Kim E., Wolinsky S., Malim M. (2008) APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog.* 4(12), e1000231. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000231
- Browne E.P., Allers C., Landau N.R. (2009) Restriction of HIV-1 by APOBEC3G is cytidine deaminase-dependent. *Virology*. 387(2), 313–321. https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.02.026
- Albin J.S., Brown W.L., Harris R.S. (2014) Catalytic activity of APOBEC3F is required for efficient restriction of Vif-deficient human immunodeficiency virus. *Virology.* 450–451, 49–54. https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.11.041
- Derse D., Hill S.A., Princler G., Lloyd P., Heidecker G. (2007) Resistance of human T cell leukemia virus type 1 to APOBEC3G restriction is mediated by elements in nucleocapsid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**(8), 2915–2920. https://doi.org/10.1073/pnas.0609444104

44. Russell R.A., Wiegand H.L., Moore M.D., Schäfer A.,

- McClure M.O., Cullen B.R. (2005) Foamy virus Bet proteins function as novel inhibitors of the APOBEC3 family of innate antiretroviral defense factors. *J. Virol.* **79**(14), 8724–8731. https://doi.org/10.1128/JVI.79.14.8724-8731.2005
- 45. Desimmie B.A., Delviks-Frankenberrry K.A., Burdick R.C., Qi D., Izumi T., Pathak V.K. (2014) Multiple APOBEC3 restriction factors for HIV-1 and one Vif to rule them all. J. Mol. Biol. 426(6), 1220–1245. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.033
- 46. Huthoff H., Malim M.H. (2007) Identification of amino acid residues in APOBEC3G required for regulation by human immunodeficiency virus type 1 Vif and virion encapsidation. J. Virol. 81(8), 3807–3815. https://doi.org/10.1128/JVI.02795-06
- Letko M., Silvestri G., Hahn B.H., Bibollet-Ruche F., Gokcumen O., Simon V., Ooms M. (2013) Vif proteins from diverse primate lentiviral lineages use the same binding site in APOBEC3G. J. Virol. 87(21), 11861–11871.

https://doi.org/10.1128/JVI.01944-13

 Smith J.L., Bu W., Burdick R.C., Pathak V.K. (2009) Multiple ways of targeting APOBEC3-virion infectivity factor interactions for anti-HIV-1 drug development. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**(12), 638–646. https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.09.006

- 49. Ao Z., Wang X., Bello A., Jayappa K.D., Yu Z., Fowke K., He X., Chen X., Li J., Kobinger G., Yao X. (2011) Characterization of anti-HIV activity mediated by R88-APOBEC3G mutant fusion proteins in CD4⁺ T cells, peripheral blood mononuclear cells, and macrophages. Hum. Gene Ther. 22(10), 1225-1237. https://doi.org/10.1089/hum.2010.012
- 50. Delviks-Frankenberry K.A., Ackerman D., Timberlake N.D., Hamscher M., Nikolaitchik O.A., Hu W.S., Torbett B.E., Pathak V.K. (2019) Development of lentiviral vectors for HIV-1 gene therapy with Vif-resistant APOBEC3G. Mol. Ther. Nucleic Acids. 18, 1023-1038.

https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.10.024

51. Fourati S., Malet I., Binka M., Boukobza S., Wirden M., Sayon S., Simon A., Katlama C., Simon V., Calvez V., Marcelin A.G. (2010) Partially active HIV-1 Vif alleles facilitate viral escape from specific antiretrovirals. AIDS. 24(15), 2313-2231. https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32833e515a

- 52. Kim E.Y., Lorenzo-Redondo R., Little S.J., Chung Y.S., Phalora P.K., Maljkovic Berry I., Archer J., Penugonda S., Fischer W., Richman D.D., Bhattacharva T., Malim M.H., Wolinsky S.M. (2014) Human APOBEC3 induced mutation of human immunodeficiency virus type-1 contributes to adaptation and evolution in natural infection. PLoS Pathog. 10(7), e1004281. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004281
- 53. Chen H., Lilley C., Yu Q., Lee D., Chou J., Narvaiza I., Landau N.R., Weitzman M.D. (2006) APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. Curr. Biol. 16(5), 480-485. https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.031
- 54. Yu Q., Chen D., König R., Mariani R., Unutmaz D., Landau N.R. (2004) APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of simian immunodeficiency virus replication. J. Biol. Chem. 279(51), 53379-53386. https://doi.org/10.1074/jbc.M408802200
- 55. Zielonka J., Bravo I.G., Marino D., Conrad E., Perković M., Battenberg M., Cichutek K., Münk C. (2009) Restriction of equine infectious anemia virus by equine APOBEC3 cytidine deaminases. J. Virol. 83, 7547-7559.

https://doi.org/10.1128/JVI.00015-09

56. Bishop K., Holmes R., Sheehy A., Davidson N., Cho S., Malim M.H. (2004) Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. Curr. Biol. 14(15), 1392-1396.

https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.057

- 57. Löchelt M., Romen F., Bastone P., Muckenfuss H., Kirchner N., Kim Y., Truyen U., Rösler U., Battenberg M., Saib A., Flory E., Cichutek K., Münk C. (2005) The antiretroviral activity of APOBEC3 is inhibited by the foamy virus accessory Bet protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102(22), 7982-7987. https://doi.org/10.1073/pnas.0501445102
- 58. Delebecque F., Suspène R., Calattini S., Casartelli N., Saïb A., Froment A., Wain-Hobson S., Gessain A., Vartanian J.P., Schwartz O. (2006) Restriction of foamy viruses by APOBEC cytidine deaminases. J. Virol. 80(2), 605-614. https://doi.org/10.1128/JVI.80.2.605-614.2006

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ 2022 том 56 **№** 1

59. Noguchi C., Ishino H., Tsuge M., Fujimoto Y., Imamura M., Takahashi S., Chayama K. (2005) G to A hypermutation of hepatitis B virus. Hepatology. 41(3), 626-633.

https://doi.org/10.1002/hep.20580

- 60. Suspène R., Guétard D., Henry M., Sommer P., Wain-Hobson S., Vartanian J.P. (2005) Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases in vitro and in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102, 8321-8326. https://doi.org/10.1073/pnas.0408223102
- 61. Bishop K., Holmes R., Sheehy A.M., Malim M.H. (2004) APOBEC-mediated editing of viral RNA. Science. 305(5684), 645. https://doi.org/10.1126/science.1100658
- 62. Sharma S., Patnaik S., Taggart T., Kannisto E., Enriquez S., Gollnick P., Baysal B. (2015) APOBEC3A cytidine deaminase induces RNA editing in monocytes and macrophages. Nat. Commun. 6, 6881. https://doi.org/10.1038/ncomms7881
- 63. Asaoka M., Ishikawa T., Takabe K., Patnaik S.K. (2019) APOBEC3-mediated RNA editing in breast cancer is associated with heightened immune activity and improved survival. Int. J. Mol. Sci. 20(22), 5621. https://doi.org/10.3390/ijms20225621
- 64. Caval V., Jiao W., Berry N., Khalfi P., Pitré E., Thiers V., Vartanian J.P., Wain-Hobson S., Suspène R. (2019) Mouse APOBEC1 cytidine deaminase can induce somatic mutations in chromosomal DNA. BMC Genomics. 20(1), 858.

https://doi.org/10.1186/s12864-019-6216-x

- 65. Fehrholz M., Kendl S., Prifert C., Weissbrich B., Lemon K., Rennick L., Duprex P.W., Rima B.K., Koning F.A., Holmes R.K., Malim M.H., Schneider-Schaulies J. (2012) The innate antiviral factor APOBEC3G targets replication of measles, mumps and respiratory syncytial viruses. J. Gen. Virol. 93(Pt 3), 565-576. https://doi.org/10.1099/vir.0.038919-0
- 66. Milewska A., Kindler E., Vkovski P., Zeglen S., Ochman M., Thiel V., Rajfur Z., Pyr K. (2018) APOBEC3mediated restriction of RNA virus replication. Sci. Rep. 8, 5960. https://doi.org/10.1038/s41598-018-24448-2
- 67. Burns M.B., Temiz N.A., Harris R.S. (2013) Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. Nat. Genet. 45(9), 977-983. https://doi.org/10.1038/ng.2701
- 68. Campbell P.J., Getz G., Korbel J.O., ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium. (2020) Pan-cancer analysis of whole genomes. Nature. **578**, 82–93. https://doi.org/10.1038/s41586-020-1969-6
- 69. Went M., Kinnersley B., Sud A., Johnson D.C., Weinhold N., Försti A., van Duin M., Orlando G., Mitchell J.S., Kuiper R., Walker B.A., Gregory W.M., Hoffmann P., Jackson G.H., Nöthen M.M., da Silva Filho M.I., Thomsen H., Broyl A., Davies F.E., Thorsteinsdottir U., Hansson M., Kaiser M., Sonneveld P., Goldschmidt H., Stefansson K., Hemminki K., Nilsson B., Morgan G.J., Houlston R.S. (2019) Transcriptome-wide association study of multiple myeloma identifies candidate susceptibility genes. Hum. Genomics.

66

13(1), 37.

https://doi.org/10.1186/s40246-019-0231-5

70. Nik-Zainal S., Wedge D.C., Alexandrov L.B., Petljak M., Butler A.P., Bolli N., Davies H.R., Knappskog S., Martin S., Papaemmanuil E., Ramakrishna M., Shlien A., Simonic I., Xue Y., Tyler-Smith C., Campbell P.J., Stratton M.R. (2014) Association of a germline copy number polymorphism of APOBEC3A and APOBEC3B with burden of putative APOBEC-dependent mutations in breast cancer. *Nat. Genet.* **46**(5), 487–491.

https://doi.org/10.1038/ng.2955

 Middlebrooks C., Banday A., Matsuda K., Udquim K.I., Onabajo O.O., Paquin A., Figueroa J.D., Zhu B., Koutros S., Kubo M., Shuin T., Freedman N.D., Kogevinas M., Malats N., Chanock S.J., Garcia-Closas M., Silverman D.T., Rothman N., Prokunina-Olsson L. (2016) Association of germline variants in the APOBEC3 region with cancer risk and enrichment with APOBECsignature mutations in tumors. *Nat. Genet.* 48(11), 1330–1338.

https://doi.org/10.1038/ng.3670

- Cortez L.M., Brown A.L., Dennis M.A., Collins C.D., Brown A.J., Mitchell D., Mertz T.M., Roberts S.A. (2019) APOBEC3A is a prominent cytidine deaminase in breast cancer. *PLoS Genet.* 15(12), e1008545. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008545
- 73. Yoshikawa K., Okazaki I.M., Eto T., Kinoshita K., Muramatsu M., Nagaoka H., Honjo T. (2002) AID enzyme-induced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts. *Science*. 296, 2033–2036. https://doi.org/10.1126/science.1071556
- 74. Kotani A., Okazaki I., Muramatsu M., Kinoshita K., Begum N.A., Nakajima T., Saito H., Honjo T. (2005) A target selection of somatic hypermutations is regulated similarly between T and B cells upon activationinduced cytidine deaminase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 4506–4511. https://doi.org/10.1073/pnas.0500830102
- Okazaki I., Hiai H., Kakazu N., Yamada S., Muramatsu M., Kinoshita K., Honjo T. (2003) Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J. Exp. Med.* 197, 1173–1181.

https://doi.org/10.1084/jem.20030275

 McCarthy H., Wierda W., Barron L., Cromwell C.C., Wang J., Coombes K.R., Rangel R., Elenitoba-Johnson K.S., Keating M.J., Abruzzo L.V. (2003) High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) and splice variants is a distinctive feature of poor-prognosis chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* **101**, 4903–4908.

https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2906

77. Heintel D., Kroemer E., Kienle D., Schwarzinger I., Gleiss A., Schwarzmeier J., Marculescu R., Le T., Mannhalter C., Gaiger A., Stilgenbauer S., Döhner H., Fonatsch C., Jäger U.; the German CLL Study Group. (2004) High expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA is associated with unmutated IGVH gene status and unfavourable cytogenetic aberrations in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 18, 756–762. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403294

- Wu X., Darce J., Chang S., Nowakowski G., Jelinek D. (2008) Alternative splicing regulates activation-induced cytidine deaminase (AID): implications for suppression of AID mutagenic activity in normal and malignant B cells. *Blood.* **112**(12), 4675–4682. https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-145995
- Marantidou F., Dagklis A., Stalika E., Korkolopoulou P., Saetta A., Anagnostopoulos A., Laoutaris N., Stamatopoulos K., Belessi C., Scouras Z., Patsouris E. (2010) Activation-induced cytidine deaminase splicing patterns in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells Mol. Dis.* 44(4), 262–267. https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2009.12.005
- Rebhandl S., Huemer M., Greil R., Geisberger R. (2015) AID/APOBEC deaminases and cancer. *Onco-science*. 2(4), 320–333. https://doi.org/10.18632/oncoscience
- Matsumoto Y., Marusawa H., Kinoshita K., Endo Y., Kou T., Morisawa T., Azuma T., Okazaki I.M., Honjo T., Chiba T. (2007) *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat. Med.* 13(4), 470–476. https://doi.org/10.1038/nm1566
- Maruyama W., Shirakawa K., Matsui H., Matsumoto T., Yamazaki H., Sarca A.D., Kazuma Y., Kobayashi M., Shindo K., Takaori-Kondo A. (2016) Classical NF-κB pathway is responsible for APOBEC3B expression in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478(3), 1466–1471. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.148
- Gao J., Choudhry H., Cao W. (2018) Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like family genes activation and regulation during tumorigenesis. *Cancer Sci.* 109(8), 2375–2382. https://doi.org/10.1111/cas.13658
- Maul R.W., Gearhart P.J. (2010) Aid and somatic hypermutation. *Adv. Immunol.* 105, 159–191. https://doi.org/10.1016/S0065-2776(10)05006-6
- Tilborghs S., Corthouts J., Verhoeven Y., Arias D., Rolfo C., Trinh X., van Dam P. (2017) The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **120**, 141–150. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.001
- Tanaka M., Marusawa H., Seno H., Matsumoto Y., Ueda Y., Kodama Y., Endo Y., Yamauchi J., Matsumoto T., Takaori-Kondo A., Ikai I., Chiba T. (2006) Anti-viral protein APOBEC3G is induced by interferonalpha stimulation in human hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341(2), 314–319. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.192
- Pillai S., Abdel-Mohsen M., Guatelli J., Skasko M., Monto A., Fujimoto K., Yukl S., Greene W.C., Kovari H., Rauch A., Fellay J., Battegay M., Hirschel B., Witteck A., Bernasconi E., Ledergerber B., Günthard H.F., Wong J.K. (2012) Role of retroviral restriction factors in the interferon-α-mediated suppression of HIV-1 *in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**(8), 3035–3040. https://doi.org/10.1073/pnas.1111573109
- Li Y., Xia Y., Han M., Chen G., Zhang D., Thasler W., Protzer U., Ning Q. (2017) IFN-α-mediated base excision repair pathway correlates with antiviral response

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

against hepatitis B virus infection. *Sci. Rep.* **7**, 12715. https://doi.org/10.1038/s41598-017-13082-z

- Bobrovnitchaia I., Valieris R., Drummond R., Lima J., Freitas H., Bartelli T., de Amorim M., Nunes D., Dias-Neto E., Silva I. (2020) APOBEC-mediated DNA alterations: a possible new mechanism of carcinogenesis in EBV-positive gastric cancer. *Int. J. Cancer.* 146(1), 181–191. https://doi.org/10.1002/ijc.32411
- He B., Raab-Traub N., Casali P., Cerutti A. (2003) EBV-encoded latent membrane protein 1 cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to induce T cell-independent Ig heavy chain class switching. *J. Immunol.* 171, 5215–5224. https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.10.5215
- 91. Li M., Maizels N. (1999) Activation and targeting of immunoglobulin switch recombination by activities induced by EBV infection. *J. Immunol.* **163**, 6659–6664.
- Machida K., Cheng K., Sung V., Shimodaira S., Lindsay L., Levine A., Lai M. (2004) Hepatitis C virus induces a mutator phenotype: enhanced mutations of immunoglobulin and protooncogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 4262–4267. https://doi.org/10.1073/pnas.0303971101
- 93. Kinoshita K., Nonaka T. (2006) The dark side of activation-induced cytidine deaminase: relationship with leukemia and beyond. *Int. J. Hematol.* 83(3), 201–207. https://doi.org/10.1532/IJH97.06011
- 94. Hoesel B., Schmid J. (2013) The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer.* 12, 86.

https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86

- 95. Siriwardena S., Chen K., Bhagwat A. (2016) The functions and malfunctions of AID/APOBEC family deaminases: the known knowns and the known unknowns. *Chem. Rev.* **116**(20), 12688–12710. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00296
- 96. Wang Y., Wang X., Zhang H., Zhou L., Liu S., Kolson D., Song L., Ye L., Ho W. (2009) Expression and regulation of antiviral protein APOBEC3G in human neuronal cells. *J. Neuroimmunol.* **206**(1–2), 14–21. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.10.003
- 97. Endo Y., Marusawa H., Kou T., Nakase H., Fujii S., Fujimori T., Kinoshita K., Honjo T., Chiba T. (2008) Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation and the development of colitis-associated colorectal cancers. *Gastroenterology*. **135**(3), 889–898, 898.e1-3.

https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.06.091

 Marusawa H., Chiba T. (2010) *Helicobacter pylori*-induced activation-induced cytidine deaminase expression and carcinogenesis. *Curr. Opin. Immunol.* 22(4), 442–447.

https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.06.001

- 99. Sugiyama T., Asaka M. (2004) *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Med. Electron. Microsc.* 37(3), 149–157. https://doi.org/10.1007/s00795-004-0250-7
- Eaden J., Abrams K., Mayberry J. (2001) The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.* 48, 526–535. https://doi.org/10.1136/gut.48.4.526

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

- 101. Jess T., Gamborg M., Matzen P., Munkholm P., Sorensen T. (2005) Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a metaanalysis of population-based cohort studies. *Am. J. Gastroenterol.* **100**, 2724–2729. https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2005.00287.x
- 102. Zou J., Wang C., Ma X., Wang E., Peng G. (2017) APOBEC3B, a molecular driver of mutagenesis in human cancers. *Cell Biosci.* 7, 29. https://doi.org/10.1186/s13578-017-0156-4
- 103. Periyasamy M., Singh A., Gemma C., Kranjec C., Farzan R., Leach D.A., Navaratnam N., Pálinkás H.L., Vértessy B.G., Fenton T.R., Doorbar J., Fuller-Pace F., Meek D.W., Coombes R.C., Buluwela L., Ali S. (2017) p53 controls expression of the DNA deaminase APOBEC3B to limit its potential mutagenic activity in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 45(19), 11056–11069. https://doi.org/10.1093/nar/gkx721
- 104. Kanu N., Cerone M.A., Goh G., Zalmas L.P., Bartkova J., Dietzen M., McGranahan N., Rogers R., Law E.K., Gromova I., Kschischo M., Walton M.I., Rossanese O.W., Bartek J., Harris R.S., Venkatesan S., Swanton C. (2016) DNA replication stress mediates APOBEC3 family mutagenesis in breast cancer. *Genome Biol.* **17**(1), 185. https://doi.org/10.1186/s13059-016-1042-9
- 105. Roper N., Gao S., Maity T., Banday R., Zhang X., Venugopalan A., Cultraro C.M., Patidar R., Sindiri S., Brown A.L., Goncearenco A., Panchenko A.R., Biswas R., Thomas A., Rajan A., Carter C.A., Kleiner D.E., Hewitt S.M., Khan J., Prokunina-Olsson L., Guha U. (2019) APOBEC mutagenesis and copy-number alterations are drivers of proteogenomic tumor evolution and heterogeneity in metastatic thoracic tumors. *Cell Reports.* 26(10), 2651–2666.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.028
- 106. Covino D.A., Gauzzi M.C., Fantuzzi L. (2018) Understanding the regulation of APOBEC3 expression: current evidence and much to learn. *J. Leukoc. Biol.* 103(3), 433–444. https://doi.org/10.1002/JLB.2MR0717-310R
- Warren C., Westrich J., Doorslaer K., Pyeon D. (2017) Roles of APOBEC3A and APOBEC3B in human papillomavirus infection and disease progression. *Viruses.* 9(8), 233. https://doi.org/10.3390/v9080233
- 108. Niavarani A., Shahrabi Farahani A., Sharafkhah M., Rassoulzadegan M. (2018) Pancancer analysis identifies prognostic high-APOBEC1 expression level implicated in cancer in-frame insertions and deletions. *Carcinogenesis*. **39**(3), 327–335. https://doi.org/10.1093/carcin/bgy005
- 109. Li A., Wu J., Zhai A., Qian J., Wang X., Qaria M.A., Zhang Q., Li Y., Fang Y., Kao W., Song W., Zhang Z., Zhang F. (2019) HBV triggers APOBEC2 expression through miR-122 regulation and affects the proliferation of liver cancer cells. *Int. J. Oncol.* 55(5), 1137–1148. https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4870
- Cao W., Wu W. (2018) Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like gene expression, RNA editing, and microRNAs regulation. *Methods Mol. Biol.* 1699, 75–81. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7435-1_5

- 111. Boichard A. Pham T., Yeerna H., Goodman A., Tamayo P., Lippman S., Frampton G.M., Tsigelny I.F., Kurzrock R. (2019) APOBEC-related mutagenesis and neo-peptide hydrophobicity: implications for response to immunotherapy. Oncoimmunology. 8(3), 1550341. https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1550341
- 112. Driscoll C.B., Schuelke M.R., Kottke T. (2020) APOBEC3B-mediated corruption of the tumor cell immunopeptidome induces heteroclitic neoepitopes for cancer immunotherapy. Nat. Commun. 11(1), 790. https://doi.org/10.1038/s41467-020-14568-7
- 113. Maura F., Petljak M., Lionetti M., Cifola I., Liang W., Pinatel E., Alexandrov L.B., Fullam A., Martincorena I., Dawson K.J., Angelopoulos N., Samur M.K., Szalat R., Zamora J., Tarpey P., Davies H., Corra-dini P., Anderson K.C., Minvielle S., Neri A., Avet-Loiseau H., Keats J., Campbell P.J., Munshi N.C., Bolli N. (2018) Biological and prognostic impact of APOBEC-induced mutations in the spectrum of plasma cell dyscrasias and multiple myeloma cell lines. Leukemia. 32(4), 1044-1048. https://doi.org/10.1038/leu.2017.345
- 114. Walker B.A., Wardell C.P., Murison A., Boyle E.M., Begum D.B., Dahir N.M., Proszek P.Z., Melchor L., Pawlyn C., Kaiser M.F., Johnson D.C., Qiang Y.W., Jones J.R., Cairns D.A., Gregory W.M., Owen R.G., Cook G., Drayson M.T., Jackson G.H., Davies F.E., Morgan G.J. (2015) APOBEC family mutational signatures are associated with poor prognosis translocations in multiple myeloma. Nat. Commun. 6, 6997.
- 115. Gara S.K., Tyagi M.V., Patel D.T., Gaskins K., Lack J., Liu Y., Kebebew E. (2020) GATA3 and APOBEC3B are prognostic markers in adrenocortical carcinoma and APOBEC3B is directly transcriptionally regulated by GATA3. Oncotarget. 11, 3354-3370. https://doi.org/10.18632/oncotarget.27703
- 116. Du Y., Tao X., Wu J., Yu H., Yu Y., Zhao H. (2018) APOBEC3B up-regulation independently predicts

ovarian cancer prognosis: a cohort study. Cancer Cell Int. 18, 78. https://doi.org/10.1186/s12935-018-0572-5

- 117. Han L., Diao L., Yu S., Xu X., Li J., Zhang R., Yang Y., Werner H.M.J., Eterovic A.K., Yuan Y., Li J., Nair N., Minelli R., Tsang Y.H., Cheung L.W.T, Jeong K.J., Roszik J., Ju Z., Woodman S.E., Lu Y., Scott K.L., Li J.B., Mills G.B., Liang H. (2015) The genomic landscape and clinical relevance of A-to-I RNA editing in human cancers. Cancer Cell. 28(4), 515-528. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.08.013
- 118. Galeano F., Tomaselli S., Locatelli F., Gallo A. (2012) A-to-I RNA editing: the "ADAR" side of human cancer. Semin. Cell Dev. Biol. 23(3), 244-250. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.09.003
- 119. Skuse G.R., Cappione A.J., Sowden M., Methenv L.J., Smith H.C. (1996) The neurofibromatosis type I messenger RNA undergoes base-modification RNA editing. Nucleic Acids Res. 24(3), 478-485. https://doi.org/10.1093/nar/24.3.478
- 120. Mukhopadhyay D., Anant S., Lee R.M., Kennedy S., Viskochil D., Davidson N.O. (2002) $C \rightarrow U$ editing of neurofibromatosis 1 mRNA occurs in tumors that express both the type II transcript and apobec-1, the catalytic subunit of the apolipoprotein B mRNA-editing enzyme. Am. J. Hum. Genet. 70(1), 38-50. https://doi.org/10.1086/337952
- 121. Sharma S., Patnaik S.K., Kemer Z., Baysal B.E. (2017) Transient overexpression of exogenous APOBEC3A causes C-to-U RNA editing of thousands of genes. RNA Biol. 14(5), 603-610. https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1184387
- 122. Baysal B.E., Sharma S., Hashemikhabir S., Jang S.C. (2017) RNA editing in pathogenesis of cancer. Cancer Res. 77(14), 3733-3739. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0520

MUTAGENIC ACTIVITY OF AID/APOBEC DEAMINASES IN ANTIVIRAL DEFENSE AND CARCINOGENESIS

O. N. Shilova¹, D. L. Tsyba^{2, 3}, and E. S. Shilov^{4, *}

¹ Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia ² Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, 197022 Russia

³ Sirius University of Science and Technology, Sochi, 354340 Russia

⁴ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: shilov evgeny@inbox.ru

Proteins of the AID/APOBEC family are capable of cytidine deamination in nucleic acids forming uracil. These enzymes are involved in mRNA editing, protection against viruses, introduction of point mutations into DNA during somatic hypermutagenesis, and antibody isotype switch. Since these deaminases, especially AID, are potent mutagens, their expression, activity and specificity are regulated by several intracellular mechanisms. In this review, we discuss the mechanisms of impaired expression and activation of AID/APOBEC proteins in human tumors, their role in carcinogenesis and tumor progression. Also, the diagnostic and potential therapeutic value of increased expression of AID/APOBEC in different types of tumors is analyzed. We assume that in the case of solid tumors, increased expression of endogenous deaminases can serve as one of the markers of the response to immunotherapy, since multiple point mutations in a host DNA could lead to amino acid substitutions in tumor proteins and thereby increase the frequency of neoepitopes.

Keywords: AID, APOBEC, mutagenesis, tumor, RNA editing, genomic instability

———— ОБЗОРЫ ———

УДК 576.344,577.29

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИТОХОНДРИЙ И ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА: НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА ОБЕСПЕЧЕНИЕ ВАЖНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ

© 2022 г. В. С. Сухоруков^{*a*}, А. С. Воронкова^{*a*}, Т. И. Баранич^{*a*, *b*, *, А. А. Гофман^{*b*}, А. В. Брыдун^{*a*, *b*}, Л. А. Князева^{*b*}, В. В. Глинкина^{*b*}}

^аНаучный центр неврологии, Москва, 125367 Россия ^bРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, 117997 Россия *e-mail: baranich_tatyana@mail.ru Поступила в редакцию 29.03.2021 г. После доработки 03.06.2021 г. Принята к публикации 11.06.2021 г.

Взаимодействию эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и митохондрий до недавнего времени уделялось мало внимания. Однако за последние годы показано, что нарушение контактов между ЭПР и митохондриями является важным звеном этиопатогенеза таких нейродегенеративных заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, боковой амиотрофический склероз. В свете этих данных детальное изучение механизмов взаимодействия ЭПР с митохондриями необходимо для разработки новых подходов к диагностике и терапии нейродегенеративных и других заболеваний, а также для углубления фундаментальных знаний о физиологии эукариотической клетки в целом. В настоящем обзоре рассмотрена работа мембран ЭПР, ассоциированных с митохондриями. Проанализированы данные о структурных элементах системы этих мембран, ее вкладе в жизнедеятельность клетки (гомеостаз кальция, липидов, аутофагия, регуляция числа митохондриями мембран ЭПР в патогенезе различных заболеваний.

Ключевые слова: эндоплазматический ретикулум, митохондрии, мембрана, кальций, шаперон, нейродегенеративные заболевания

DOI: 10.31857/S0026898422010098

введение

Представления о роли как митохондрий, так и эндоплазматического ретикулума (ЭПР) сложились настолько давно, что стали уже классическими. Однако за последние годы (во многом благодаря успехам молекулярной биологии) наши знания о функциональных задачах, выполняемых этими структурами, стремительно расширяются.

Так, митохондрии не только участвуют в продукции АТР, они вовлечены в процессы бета-окисления жирных кислот, в синтез активных форм кислорода (АФК), метаболизм кальция и железа, биосинтез гема, орнитиновый цикл (цикл Кребса– Хензелейта), регуляцию клеточной дифференцировки и пролиферации, апоптоза и распределения кальция в клетке, в синтез стероидов и противовирусный ответ. Понимание критической значимости полисистемных митохондриальных нарушений, обнаружение целого ряда генетически обусловленных митохондриальных болезней, активное развитие средств диагностики и лечения привели к созданию целого направления, объединяемого понятиями митохондриальная патология и "митохондриальная медицина" [1–7].

ЭПР выполняет ряд жизненно важных функций, основная из которых – фолдинг полипептидных цепочек, поступающих из цитозоля, и дальнейший транспорт готовых белков в аппарат Гольджи [8]. Кроме того, ЭПР ответственен за депонирование кальция, синтез гормонов, накопление и преобразование углеводов, метаболизм ядов и лекарственных средств [9, 10]. Наконец, ЭПР служит одним из первичных сенсоров внутриклеточных стрессовых сигналов. Нарушение пространственной структуры белков в условиях стресса запускает сигнальные каскады типового протеотоксического процесса, известного как стресс ЭПР [11]. На клеточном уровне стресс ЭПР, чаще всего приводящий к апоптозу, связан с развитием множества заболеваний: от сердечно-сосудистых или эндокринных до онкологических [12].

Таким образом, ЭПР и митохондрии — это органеллы, которые не только вовлечены в осуществление различных функций, но и регулируют баланс между гибелью клеток и их выживанием. Даже небольшое нарушение работы митохондрий или ЭПР может поставить под угрозу дальнейшее существование клетки.

МЕМБРАНЫ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С МИТОХОНДРИЯМИ

Для поддержания клеточного гомеостаза необходим непрерывный обмен сообщениями между ЭПР и митохондриями, которые "закодированы" в сигнальных молекулах и передаются посредством физического контакта между двумя органеллами. С помощью электронной микроскопии установлено, что мембраны ЭПР, непосредственно соприкасаясь с митохондриями, формируют специфический микродомен, получивший название МАМ (мембраны, ассоциированные с митохондриями; mitochondria-associated membranes) [13]. Комплекс МАМ служит платформой для жизненно важных сигналов и организации ряда каркасных белков и регуляторных факторов [14].

Физическое взаимодействие между митохондриями и ЭПР подтверждается возможностью выделения фракции МАМ. При этом совместно отделяются три несколько различающиеся субклеточные структуры: 1) связанные с митохондриями фрагменты мембран ЭПР (собственно МАМ), 2) ассоциированные с митохондриями фрагменты плазматической мембраны и 3) белковые комплексы, ответственные за непосредственный контакт ЭПР и митохондрий [15]. Эти особенности необходимо учитывать при прецизионном изучении физико-химических характеристик и функций МАМ. В данном обзоре мы постарались систематизировать информацию именно о мембранах ЭПР, ассоциированных с митохондриями, т.е. о собственно МАМ.

СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА МАМ

Контакты между ЭПР и митохондриями, определяющие существование комплекса МАМ и лежащие в его основе, получили общее название MERC (mitochondria-ER contacts, контакты митохондрий и ЭПР). Именно этим термином принято оперировать, если речь идет о молекулярной архитектонике или ультраструктурной организации таких контактов. Более общее понятие МАМ относится скорее к уже упомянутой получаемой экспериментально субклеточной фракции [16].

Структуру MERC изучают преимущественно с использованием в качестве модельного организма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Из клеток дрожжей выделены особые белковые комплексы ERMES (Endoplasmic Reticulum – Mitochondria Encounter Structures) и EMC (Endoplasmic reticulum–Membrane protein Complex). Все белки, входящие в состав этих комплексов, идентифицированы и достаточно хорошо изучены [17, 18]. Многие из этих белков не имеют гомологов в клетках млекопитающих, однако принцип организации MAM остается неизменным. Эти структуры содержат специфические трансмембранные молекулы с выраженными внешними доменами, которые служат молекулярными "якорями", физически удерживающими органеллы рядом друг с другом (на расстоянии 10–50 нм) [16, 19].

В клетках млекопитающих между мембранами ЭПР и митохондрий находится ряд белков, входящих, вероятно, в состав MERC [20]. Основными из них можно считать:

• ЭПР-локализованный митофузин 2, который образует гомо- и гетеротипические контакты с митохондриальными митофузинами первого и второго типов (MFN1, 2) [21];

• митохондриальные потенциалзависимые анионные каналы (VDAC), взаимодействующие через шаперон GRP75 с рецепторами инозитол-3-фосфата (IP3R), на мембранах ЭПР [22];

• локализованные в ЭПР молекулы ВАР31 (ассоциированный с рецепторами В-клеток белок 31), образующие связь с митохондриальным фактором деления 1 (FIS1) [23];

• ассоциированный с везикулами белок В (VAPB), который контактирует со вспомогательным белком митохондриальной тирозинфосфатазы 51 (PTPIP51) [24];

• описано также взаимодействие IP3R с митохондриальным белком FUNDC1 (FUN14 domain containing 1) в кардиомиоцитах. Кроме того, в нейронах найден структурный гомолог дрожжевого белка Mmm1 ERMES-комплекса – PDZD8 (PDZ Domain Containing 8) [25].

Роль перечисленных белков млекопитающих (в отличие от MERC дрожжей) все еще остается предметом дискуссий. Так, в некоторых экспериментах нокаут генов митофузинов и IP3R не влияет на контакт митохондрий и ЭПР [26, 27], а вза-имодействие FIS1–BAP31 описано только при апоптозе [20].

МАМ млекопитающих изучают уже более 10 лет. По-видимому, полный протеом этой структуры состоит из 900–1200 белков [28, 29], из которых лишь несколько упоминаются наиболее часто. Предполагается, что различные типы клеток имеют разные MERC-профили, формирующие определенное количество контактов со специфическими молекулярными и физическими характеристиками [16]. В клетках HeLa MERC занимает 5–20% площади митохондриальных мембран [30], в клетках печени мышей – 4–11% [31]. При этом площадь мембран, занимаемая MERC, зависит от энергетического статуса клетки и удваивается, когда дыхательная способность митохондрий уменьшается на 20% [31]. К примеру, в нейронах зубчатой извилины мозга мышей такие контакты и вовсе отсутствуют, либо пока не описаны. Эти сведения указывают на правомерность динамической модели МАМ, в которой их пластичность является фактором регуляции фундаментальных клеточных процессов.

КОМПЛЕКС МАМ И ТРАНСПОРТ КАЛЬЦИЯ

Одна из наиболее изученных функций МАМ – поддержание гомеостаза кальция – вторичного посредника, критически важного для функционирования любой клетки, особенно нервной [32].

В обычных условиях концентрация кальция в цитозоле поддерживается на относительно низком уровне, а основная его масса депонируется в ЭПР. Внутрь ЭПР кальций попадает с помощью насоса SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase). Возвращаться в цитозоль кальций может через рецепторы IP3R, активирующиеся в ответ на повышение концентрации инозитол-3фосфата [32, 33]. При недостаточности функции депонирования кальшия в ЭПР. что может случаться при нарушении физиологических условий в клетке, или, например, при мутации SERCA запускается апоптоз [34]. Важный механизм, помогающий не допустить развитие такого сценария, - транспорт излишков кальция в митохондрии, которые также обладают значительным потенциалом к депонированию (не говоря уже о перманентной базовой метаболической потребности митохондрии в этом ионе) [35].

Транспорт кальция через наружную мембрану митохондрий осуществляется через каналы VDAC, через внутреннюю – с помощью унипортера кальция (MCU, mitochondrial calcium uniporter), который, как ни странно, обладает низкой аффинностью к кальцию [36]. МАМ активно участвуют в этом процессе, создавая микродомен с повышенной (по сравнению с цитозолем) концентрацией кальция в непосредственной близости от наружной митохондриальной мембраны. Благодаря этому происходит эффективный квазисинаптический транспорт иона из ЭПР в митохондрии. Структуру MERC, состоящую из ЭПРлокализованного IP3R, VDAC1 наружной митохондриальной мембраны и связывающего их шаперона GRP75, часто называют "кальциевым мостом" [37].

Роль кальциевого моста в ЭПР-митохондриальном транспорте кальция подтверждают результаты, полученные на животных моделях с изменением активности соответствующих генов. Установлено, что сверхэкспрессия VDAC1 усиливает транспорт кальция и повышает его концентрацию в митохондриях [38]. Повышенная экспрессия Grp75 стабилизирует взаимодействие IP3R и VDAC1, что выражается в усилении индуцированного IP3R повышения уровня кальция в митохондриях [39]. Кроме того, в процесс кальциевого транспорта вовлечены, вероятно, ассоциированный с везикулами белок VAPB (Vesicle Associated Protein B) на ЭПР и контактирующий с тирозинфосфатазой белок PTPIP51 (Protein Tyrosine Phosphatase—Interacting Protein 51) на наружной мембране митохондрий. Делеция генов этих белков приводит к нарушению транспорта кальция [24].

Примечательная находка последних лет – обнаружение зависимости интенсивности кальциевого транспорта от физического расстояния между ЭПР и наружной митохондриальной мембраной. Уменьшение этого расстояния до 5 нм приводит к существенному снижению потока кальция. Согласно опубликованным данным, оптимальное расстояние между мембранами равно 15 нм [38]. Это соотносится с данными о дистанцировании пре- и постсинаптических мембран в VGCC-синапсах нейронов головного мозга (синапсах с потенциалзависимыми кальшиевыми каналами). Изучение этого вида пластичности показало, что у наиболее активных синапсов расстояние между мембранами составляет 14 нм [40]. Это совпадение может говорить о существовании межмембранных расстояний, универсальных для оптимальных ионных токов, что, впрочем, требует дальнейшего изучения.

КОМПЛЕКС МАМ И ДИНАМИКА МИТОХОНДРИЙ

Регуляция баланса кальция посредством МАМ включает не только перенос излишков кальция из ЭПР в митохондрии, но и более сложный процесс – контроль митохондриальной динамики.

Митохондрии находятся в динамическом балансе между слиянием и делением, а также постоянно перемещаются вдоль цитоскелета по клетке [7]. В общем случае свободный доступ к избытку необходимых митохондрии питательных веществ приводит к усилению деления органеллы, а их нехватка, наоборот, —к элонгации [41]. Считается, что за слияние наружной митохондриальной мембраны отвечают митофузины 1 и 2, трансформацию внутренней мембраны контролирует белок OPA1, а деление митохондрий регулирует фактор Drp1 [42].

MFN2, как упоминалось выше, находится не только на наружной мембране митохондрий, но и на мембранах ЭПР. При слиянии митохондрий, как и в случае МАМ, митофузины служат для закрепления органелл рядом друг с другом [38, 43]. По некоторым данным, митофузин 2 взаимодей-

ствует также с проапоптотическими Bak и Bax [44, 45]. Учитывая это, MFN2 можно рассматривать не только как фактор слияния митохондрий, но и как регулятор апоптоза: ведь сам кальций является одним из главных апоптотических посредников.

Фактор OPA1 локализуется в межмембранном пространстве митохондрий и участвует не только в слиянии митохондрий, но и в изменении формы крист [46]. В ответ на сигналы о недостатке питательных веществ в клетке кристы трансформируются и регулируют количество выбрасываемого свободного цитохрома c, концентрация которого в цитозоле во многом определяет, будет ли запущен апоптоз [1, 7, 46].

В отличие от мембранных белков MFN1, 2 и OPA1, фактор Drp1 располагается в цитозоле. На наружную митохондриальную мембрану он рекрутируется рецепторами Mff, MiD49/MIEF2 и MiD51/MIEF1 непосредственно перед началом деления [47]. Эти рецепторы находятся в нескольких точках, маркируя места кластеризации Drp1. Олигомеризующийся Drp1 запускает GTP-зависимый гидролиз мембраны, образуя перетяжку, в результате чего и происходит разделение органеллы на две новых [38, 47].

Интересно, что этот процесс может, судя по всему, индуцировать локализованный в ЭПР белок INF2 (INvertedFormin 2). INF2 отвечает в основном за связь ЭПР с актиновым цитоскелетом. Однако MAM способны в некоторых случаях активно экспрессировать этот белок на своей поверхности и формировать кольцеобразные структуры вокруг митохондрий. При этом наружная митохондриальная мембрана начинает рекрутировать Drp1, что приводит в итоге к делению органеллы [48].

Активность Drp1 регулируется также протеинкиназой A (ПКА), часто локализующейся на внешней мембране митохондрий. ПКА фосфорилирует Drp1 в различных сайтах, что может приводить к совершенно противоположным исходам. К примеру, фосфорилирование серина 656 (в клетках PC12) или серина 637 (в клетках HeLa) ингибирует деление митохондрий и делает их менее чувствительными к апоптотическим стимулам. Фосфорилирование же серина 600 (в бурых адипоцитах), напротив, усиливает фрагментацию митохондрий [49].

Помимо регуляции слияния и деления митохондрий, МАМ способны контролировать перемещение этих органелл по цитоскелету. Это перемещение происходит с помощью моторного белка кинезина 1, который закрепляется адапторами Trak1 и Trak2 на митохондриальной мембране. Высокие концентрации кальция препятствуют взаимодействию Trak1 и Trak2 с их рецепторами на наружной митохондриальной мембране, предотвращая перемещение органеллы [42]. Этот механизм активно используется, например, для аккумуляции митохондрий у мембраны синаптического окончания, где концентрация кальция всегда велика, с целью оптимизации энергообмена в этом регионе [50]. Вопрос о роли МАМ в контроле за перемещением митохондрий остается предметом дискуссий [42]. Однако, учитывая тесную взаимосвязь факторов динамики митохондрий и проапоптотических факторов, можно предполагать, что МАМ участвует также в контроле судьбы клетки.

КОМПЛЕКС МАМ И АУТОФАГИЯ

Впервые участие митохондрий в процессе аутофагии обнаружили всего 10 лет назад, когда Hailey D.W. и соавт. наблюдали транслокацию некоторых митохондриальных белков, например белка наружной митохондриальной мембраны, в аутофагосомы [51].

В дальнейшем выяснилось, что оболочки аутофагосом формируются не просто из мембран ЭПР, но происходит это в местах контактов ЭПР и митохондрий, т.е. в участках МАМ. Отделиться могут только те фрагменты ЭПР, которые насыщены фосфатидилинозит-3-фосфатом (PIP3). Для этого ЭПР-резилентный белок синтаксин 17 (STX17) рекрутирует PI3-киназу, связываясь с ее Atg14L-доменом [52]. Потеря STX17 препятствует накоплению PIP3 и замедляет ранние этапы аутофагии. Важно, что в нормальных условиях при достаточном количестве питательных веществ STX17 в основном связывается с Drp1 и способствует делению митохондрий. С Atg14L синтаксин начинает взаимодействовать только в условиях голодания, при этом Drp1 теряет свою активность, а митохондрии элонгируются. По мнению некоторых авторов, крупные митохондрии выгоднее клетке в стрессовых условиях, так как они более эффективно вырабатывают АТР. а также не могут поглощаться аутофагосомами [53].

Отделение от ЭПР изоляционных мембран будущих аутофагосом происходит не только с использованием описанного механизма, в нем так или иначе участвуют следующие факторы: ATG5 (Autophagy related protein 5), ATG14 (Autophagy related protein 14), DFCP1 (FYVE Domain Containing Protein 1), PACS2 (Phosphofurin Acidic Cluster Sorting Protein 2), RAB32 (Ras-related Protein Rab-32). Однако роль перечисленных белков в этом процессе не установлена, но известно, что их содержание в комплексах MAM значительно возрастает при инициации аутофагии [38, 42].

УЧАСТИЕ КОМПЛЕКСОВ МАМ В ПРОЦЕССАХ КЛЕТОЧНОЙ АДАПТАЦИИ

Для нормального функционирования ЭПР необходимо устойчивое состояние внутриклеточ-
ной среды. При голодании или гипоксии гомеостаз клетки нарушается, что немедленно реализуется, в частности, в виде так называемого стресса ЭПР – адаптационного клеточного ответа, в котором можно выделить два основных элемента: ответ на нарушение сворачивания белков (Unfolded Protein Response, UPR) и нарушение кальциевого баланса.

UPR-ответ запускается, когда незрелая полипептидная цепь не может подвергаться фолдингу или же формирует некорректную трехмерную структуру. В результате в ЭПР накапливается большое количество нефункциональных белков. В нормальных условиях с входящим в комплекс МАМ шапероном Grp75 соединяются три трансмембранных белка ЭПР: PERK (Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase), IRE1a (Inositol-Requiring Enzyme 1α) μ ATF6 (Activating Transcription Factor 6), и остаются в неактивном состоянии. При стрессе ЭПР в ответ на нарушение фолдинга белков Grp75 отсоединяется от этих трех молекул, что приводит к их активации [54, 55]. ATF6 попадает в ядро и инициирует транскрипцию генов белков, участвующих в UPR. Активированная PERK фосфорилирует ядерный фактор транскрипции 2 (NRF2) и эукариотический фактор инициации 2α (EIF2alpha). Фосфорилированный NRF2 транслоцируется в ядро и способствует экспрессии редокс-ассоциированных белков, чья функция заключается в нормализации окислительно-восстановительного потенциала. Фосфорилированный EIF2α может полностью ингибировать трансляцию мРНК, что, в свою очередь, приведет к снижению нагрузки на фолдинг белков в ЭПР. Фосфорилированный EIF2 избирательно активирует также экспрессию ATF4 (Activating Transcription Factor 4), известного регулятора апоптоза, способного воздействовать как на анти-, так и на проапоптотические белки [54]. Таким образом, изменения, происходящие в МАМ в ответ на патологические ситуации в клетке, могут иметь критические для нее последствия.

Следует отдельно упомянуть, что при UPR-ответе конформация дисульфидных связей в ЭПР изменяется таким образом, что уровень продукции АФК значительно увеличивается. АФК нарушают функционирование SERCA и активируют IP3R, а также рианодиновые рецепторы, повышая тем самым количество выбрасываемого в цитозоль кальция. Излишек кальция через МАМ поступает в митохондрии. Митохондрия обладает буферной емкостью, соответствующей нормальному кальциевому гомеостазу внутри клетки. Кальций, попадающий в значительных количествах в митохондрии при стрессе ЭПР, передает стрессовые сигналы, что изменяет активность митохондрий. Нарушение буферной емкости митохондриального кальция может быть важным

звеном патологических процессов, например, при нейродегенерации [55].

В процессах клеточной адаптации выделяют комплекс реакций так называемого контроля качества митохондрий (КМК) [54, 55], который представляет собой важнейший механизм поддержания количества митохондрий, их структурной и функциональной целостности и включает процессы трех уровней: молекулярного, субклеточного и клеточного. На молекулярном уровне КМК проявляется сокращением импорта белков в митохондрии, снижением в них уровня фолдинга и освобождением ресурса для элиминации неструктурированных белков. На субклеточном уровне основным механизмом улучшения качества функционирования митохондрий является митохондриальная динамика, включающая слияние, деление, митофагию и подвижность митохондрий. Как уже упоминалось, существует динамический баланс между слиянием и разделением митохондрий. При небольшом стрессе баланс сдвигается в сторону слияния. При сильном стрессе интенсифицируется деление митохондрий, что необходимо для удовлетворения резко возрастающих энергозатрат клетки. Если повреждения слишком велики, то на наружной мембране митохондрий экспонируется фосфорилированный Drp1. что служит сигналом к митофагии. Кроме того, митохондрии могут перемещаться внутри клетки, "выбирая" наиболее благоприятную микросреду. Когда стресс настолько серьезен, что его невозможно преодолеть на молекулярном и субклеточном уровнях КМК, запускается митохондриальный апоптотический каскад, т.е. регуляция переходит на третий, клеточный уровень.

На ранних стадиях стресса ЭПР количество МАМ увеличивается, что активирует транспорт кальция между ЭПР и митохондрией и, соответственно, приводит к повышению уровня АТР в клетке для запуска адаптационных процессов [56]. Регулируя численность МАМ (и кальциевых каналов в этих структурах), клетка может контролировать распространение стрессовых сигналов из ЭПР в митохондрии. Как отмечено выше, под влиянием стресса ЭПР в МАМ повышается уровень IRE1, что способствует ингибированию IP3R, стабилизации уровня кальция в митохондриях и выживанию клетки [57]. При этом шапероны кальнексин и кальретикулин обладают высоким сродством к кальцию и выполняют буферную функцию в МАМ, предотвращая кальциевую перегрузку митохондрий. Умеренно повышенный уровень кальция усиливает активность электронно-транспортной цепи и увеличивает продукцию АТР, что благоприятно сказывается на метаболизме митохондрий. Благодаря этому повышается активность энергозависимых шаперонов и протеаз, отвечающих за правильный фолдинг и элиминацию белков с нарушенной пространственной структурой. Таким образом, повышение количества МАМ при стрессе ЭПР через кальциевую сигнализацию, усиление синтеза АТР и регуляцию гомеостаза белков вносит свой вклад в систему КМК.

Высокое содержание АФК и перегрузка митохондрий кальцием способствуют фосфорилированию Drp1 и его накоплению на наружной митохондриальной мембране, что приводит в конечном итоге к активации деления митохондрий. Показано, что инициация деления митохондрий происходит даже без активации Drp1, необходимо лишь повышение уровня кальция в матриксе [58-60]. Поврежденные элементы митохондрий, остающиеся в цитоплазме после деления органелл, элиминируются с помощью митофагии. Происходит это благодаря белку PINK1 (PTEN-INducedKinase 1), который перемещается на наружную митохондриальную мембрану и рекрутирует фактор Parkin, инициирующий митофагию. После этого PINK1 может вернуться в МАМ. где он способствует связыванию ЭПР и митохондрии и формированию аутофагосомы [61, 62]. Таким образом, кальциевая сигнализация, опосредуемая МАМ, играет важную роль в регуляции слияния и деления митохондрий, а также в митофагии.

Клеточный уровень КМК также связан с активностью МАМ [63–66]. Сильный или длительный стресс ЭПР приводит к массированному выходу кальция из ЭПР в цитозоль, где он вызывает повышенный приток кальция в митохондрии через IP3R-VDAC1-каналы, что приводит к деполяризации митохондрий, олигомеризации Вах и Bak на ее наружной мембране, формированию транзиционной поры, высвобождению проапоптотических факторов и активации митохондриального пути апоптоза. Антиапоптотические белки семейства Bcl2 могут располагаться на MAM, они способствуют выживанию клеток за счет взаимодействия с IP3R и ингибирования его активности. При летальном стрессе критически повышается уровень фактора СНОР (C/EBP Homologous Protein), ингибирующего Bcl2, что активирует сигнальный путь апоптоза, опосредованный ЭПР. Более того, в ЭПР усиливается экспрессия кальциевой АТРазы, способствующей распространению кальциевого сигнала по пути PERK/EIF2alpha/ATF4. Таким образом, МАМ активно участвуют в поддержании динамического баланса про- и антиапоптотических факторов, определяя судьбу клетки при стрессе.

МАМ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

В настоящее время появляется все больше оснований считать, что МАМ регулируют ключевые процессы онкогенеза и ответа опухолевых клеток на лекарственные средства, моделируя активность онкогенов и опухолевых супрессоров, а также энергетические потребности опухолевых клеток. МАМ служат платформой для нескольких онкогенов и генов-супрессоров [67], наиболее важными среди которых считаются:

фосфатаза PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) – один из наиболее известных онкосупрессоров – обладает двойной специфичностью (к липидам и белкам). Мутации в этом белке часто встречаются при онкопатологиях. В МАМ PTEN регулирует транспорт кальция из ЭПР через IP3R по механизму ковалентной модификации (отщепления фосфатной группы);

■ белок промиелоцитарного лейкоза (Promyelocytic Leukemia Protein, PML) – онкосупрессор, образующий суперкомплекс с IP3R, Akt и протеинфосфатазой PP2A. Этот комплекс регулирует импорт кальция в митохондрию и апоптоз. PML необходим также для регуляции и аутофагии через сигнальный путь AMPK/mTOR/Ulk1;

■ P53 — фактор транскрипции, известный онкосупрессор. P53 взаимодействует с насосом SERCA и активирует выброс кальция в цитозоль, способствуя тем самым развитию апоптоза;

 онкоген Bcl-2 снижает экспорт кальция из ЭПР и препятствует апоптозу. Этот онкоген ингибирует олигомеризацию Bax/Bak на наружной мембране митохондрий;

■ Sig1R – регулирует экспрессию Bcl-2 по пути ROS/NF-kB;

 Akt – серин-треонин-специфичная киназа, фосфорилирующая IP3R на ЭПР. Активность Akt приводит к снижению экспорта кальция и предотвращает апоптоз;

■ H-Ras — онкоген, расположенный не только на MAM, но и на мембранах, ассоциированных с плазмалеммой. В опухолевых клетках H-Ras препятствует импорту кальция в митохондрии;

■ FATE (Fetal and Adult Testis Expressed protein) белок, сверхэкспрессия которого выявлена в клетках различных опухолей. FATE регулирует расстояние между ЭПР и митохондрией, импорт кальция в митохондрии и апоптоз.

Кроме того, экспрессия ассоциированного с везикулами белка В (VAPB), контактирующего со вспомогательным белком PTPIP51 и участвующего в формировании MAM, значительно повышена в опухолях молочной железы, обеспечивая, по-видимому, более стабильную ассоциацию митохондрий и ЭПР в опухолевых клетках [68] (табл. 1).

Могут ли другие митохондриальные регуляторные белки выполнять такие же функции, как p53, PTEN, Akt и PML? Ответ на этот вопрос пытаются получить в настоящее время. Учитывая механизмы, используемые этими белками для воздействия на метаболизм митохондрий и регуляцию апоптоза, они должны влиять на продук-

Белок МАМ	Функция в канцерогенезе	
PTEN	Регуляция транспорта кальция из ЭПР через IP3R по механизму ковалентной модификации (отщепления фосфатной группы)	[67]
PML	Регуляция импорта кальция в митохондрию; апоптоз; аутофагию через сигнальный путь AMPK/mTOR/Ulk1	
p53	Взаимодействие с SERCA и активация выброса кальция в цитозоль, что способ- ствует апоптозу	
Bcl-2	Снижение экспорта кальция из ЭПР и противодействие апоптозу. Подавление олигомеризации Bax/Bak на наружной митохондриальной мембране	
Sig1R	Регуляция экспрессии Bcl-2 по пути ROS/NF-kB	
Akt	Фосфорилирование IP3R на ЭПР, что приводит к снижению экспорта кальция и предотвращению апоптоза	
H-Ras	Препятствует импорту кальция в митохондрии в опухолевых клетках	
FATE	Регуляция расстояния между ЭПР и митохондрией, импорт кальция в митохон- дрию и апоптоз	
VAPB и PTPIP51	Обеспечение более стабильной ассоциации митохондрий и ЭПР в опухолевых клетках	[68]

Таблица 1. Участие белков МАМ в канцерогенезе

цию АФК и АТР в митохондриях, вероятно, модулируя содержание Ca²⁺ в этих органеллах. Одним из белков, играющих роль опухолевого супрессора, может быть митофузин-2, роль которого в формировании МАМ уже описана нами. Показано, что опухолевые клетки с высоким уровнем митофузина-2 более восприимчивы к апоптозу [69]. Кроме того, значительное снижение уровня митофузина-2 в клетках гепатоцеллюлярной карциномы коррелировало с более низкой общей выживаемостью. Сходные результаты получены на клетках рака молочной железы, эктопическая экспрессия митофузина-2 в которых приводит к проапоптотической и антипролиферативной передаче сигналов [69]. Таким образом, эти данные могут использоваться при разработке подходов к таргетной терапии опухолей.

МАМ И САХАРНЫЙ ДИАБЕТ ВТОРОГО ТИПА

Сахарный диабет второго типа обладает двумя патофизиологическими особенностями: системной резистентностью к инсулину и недостаточностью β-клеток поджелудочной железы. Первичной причиной дисфункции островков Лангерганса и развития сахарного диабета типа 2 считается избыток липидов и длительное отложение жира в тканях (так называемая липотоксичность) [70]. Как известно, одна из основных функций МАМ участие в распределении кальция, играющее решающую роль в синтезе и секреции инсулина β-клетками. Более того, МАМ участвуют в передаче сигналов инсулина благодаря расположенным на поверхности белкам Akt, mTORC2 и PTEN [71]. На клеточных и животных моделях показано, что целостность МАМ в клетках печени нарушается при индукции инсулинорезистентности пальмитатом [72]. Аномальное увеличение числа МАМ (сопутствующее перегрузке митохондрий кальцием и окислительному стрессу) выявлено в печени мышей, находящихся на высокожировой диете. Подтверждено и обратное: нарушение структуры МАМ путем генетического или фармакологического ингибирования МАМрезидентного белка циклофилина D приводит к резистентности животных к инсулину и к нарушению передачи сигналов инсулина в гепатоцитах человека. Кроме того, в β-клетках больных сахарным диабетом типа 2 снижено взаимодействие митохондрий и ЭПР [73]. Недавно на скелетных мышцах мышей, моделирующих ожирение и диабет второго типа, показано, что дисфункции митохондрий и резистентности к инсулину предшествует заметное нарушение взаимодействия ЭПР и митохондрий [74].

При этом передача сигналов и активность инсулина восстанавливались при регенерации структур МАМ [75, 76]. Так, повышение экспрессии митофузина-2, важного компонента МАМ, частично восстанавливало область контакта митохондрий и ЭПР и увеличивало чувствительность гепатоцитов, обработанных пальмитатом, к инсулину [77].

Известно, что повышенная чувствительность β -клеток к окислительному стрессу и дисфункции МАМ обусловлена некоторыми особенностями этих клеток. Во-первых, β -клетки метабо-

лически очень активны, но слабее защищены от оксидантов, чем другие клетки и ткани, за счет сравнительно низкой активности свободнорадикальных детоксифицирующих и редокс-регулирующих ферментов. Во-вторых, основным источником углерода в β-клетках служит глюкоза, причем до 80% ее окисляется, что выше, чем в клетках других типов. Кроме того, уровни лактатдегидрогенезы в β-клетках достаточно низкие, поэтому пируват в основном метаболизируется в цикле Кребса с образованием АТР в митохондриях [78]. Увеличенное образование АФК митохондриями вызывает и/или усугубляет стресс ЭПР в β-клетках. В свою очередь, стресс ЭПР увеличивает выработку АФК и усиливает метаболизм глюкозы, что приводит к повышению продукции АФК митохондриями. Следовательно, АФК, образующиеся в митохондриях, вызывают стресс ЭПР, который, в свою очередь, способствует образованию АФК, что приводит к порочному кругу и развитию длительного окислительного стресса. Кроме того, АФК повреждают липиды, белки и ДНК, запускают изменения транскрипции, которые способствуют развитию резистентности к инсулину. Таким образом, длительно сохраняющееся состояние окислительного стресса, накопление неструктурированных белков и дисфункция МАМ прогрессивно ухудшают функцию β-клеток с последующей активацией в них апоптотических путей и гибелью клеток [78].

РОЛЬ НАРУШЕНИЙ КОМПЛЕКСА МАМ В ПАТОГЕНЕЗЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Одна из причин повышенного внимания к комплексу МАМ — быстрый рост числа доказательств его серьезных нарушений при нейродегенеративных заболеваниях: боковом амиотрофическом склерозе, рассеянном склерозе, нейрональном цероидном липофусцинозе, а также при болезнях Альцгеймера, Паркинсона, Гентингтона и других [79–81].

С митохондриями и комплексом МАМ связаны многочисленные нарушения, такие как высокий уровень окислительного стресса и гиперпродукция АФК, стресс ЭПР, нарушение гомеостаза кальция, процессы аутофагии и белкового гомеостаза, эксайтотоксичность, воспаление нервной ткани, дефекты аксонального транспорта и др. Эти нарушения часто ассоциированы с пожилым возрастом, они встречаются при многих формах нейродегенеративных заболеваний [82, 83].

В контексте обсуждаемых проблем особое внимание привлекает тот факт, что белки паркин и гентингтин, повреждение которых лежит в основе наследственных форм болезней Паркинсона и Гентингтона, связаны с функциями митохондрий и ЭПР. Так, гентингтин локализуется в ЭПР, вли-

яет на морфологию этой органеллы, а его повышенная экспрессия связана с развитием стресса ЭПР [84-86]. Этот механизм включает нарушения регуляции белка Sig1R, который в норме препятствует образованию аномальных белковых скоплений, характерных и для других нейродегенеративных заболеваний (болезней Альцгеймера и Паркинсона, бокового амиотрофического склероза) [87, 88]. Недостаток Sig1R в двигательных нейронах вызывает стресс ЭПРи, следовательно, влияет на динамику и функционирование митохондрий. Воздействуя на IP3R, шаперон Sig1R, локализованный в МАМ, участвует также в экспорте липидов и передаче кальциевого сигнала. Мутации в гене SIGMAR1, кодирующем Sig1R, приводят к развитию бокового амиотрофического склероза у детей, сопровождающемся (как и в моделях с нефункциональным Sig1R) нарушениями ультраструктуры МАМ и локализации МАМрезидентного IP3R, а также снижением числа контактов ЭПР и митохондрий. Показано также снижение уровня Sig1R в спинном мозге пациентов с боковым амиотрофическим склерозом. У мышей с нокаутом Sig1R наблюдаются двигательные нарушения, мышечная слабость, дегенерация аксонов и гибель двигательных нейронов [89, 90].

Патогенез болезни Паркинсона включает нарушение функций как митохондрий [91–93], так и ЭПР [94]. Более того, альфа-синуклеин, патологические накопления которого считаются главным маркером этого заболевания, связан с комплексом МАМ и участвует в регуляции тока кальция и обмена холестерина. Следует отметить, что в очищенных МАМ содержание свободного холестерина в 7 раз выше, чем в микросомах. Истощение холестерина в МАМ значительно увеличивает число контактов митохондрий с ЭПР, а также влияет на энергетику и структуру митохондрий. Более того, в дегенерирующих нейронах уровни сфингомиелина, церамидов и сложных эфиров холестерина значительно повышены, что указывает на вовлеченность МАМ в регуляцию этого метаболического пути [95]. Мутации альфа-синуклеина приводят или к нарушению его связей с белками МАМ (мутация АЗОР) или к уменьшению его количества (A53T); все это в совокупности приводит к снижению эффективности взаимодействия митохондрий и ЭПР [96-98]. Белки паркин (продукт гена PARK2) и PINK1 (продукт гена PARK6) также влияют на состояние комплексов МАМ. При этом экспрессия паркина повышается при стрессе ЭПР (за счет связывания ATF4 с промотором *PARK2*), что, в свою очередь, способствует поддержанию функций митохондрий и сохранности сайтов МАМ. Нарушение функций паркина приводит к дефектам митохондрий и, как доказано, к гибели нейронов при болезни Паркинсона [99–102]. В регуляции комплексов МАМ участвует еще один продукт семейства *PARK* — белок DJ-1, кодируемый геном *PARK7*. Мутации в этом гене приводят к дисфункции митохондрий и клинически проявляются в виде редкой формы рано дебютирующей болезни Паркинсона [103–105]. В частности, DJ-1 вовлечен в процесс передачи кальция от ЭПР митохондриям, поэтому снижение уровня этого белка приводит к нарушению одной из ключевых функций MAM.

Одна из наиболее частых причин наследственных форм БАС – мутация в гене SOD1, кодирующем Cu/Zn-супероксиддисмутазу [106]. Этот фермент, хотя и не относится к МАМ-белкам, играет важную роль в функционировании этого комплекса. В астроцитах мышей с мутацией гена SOD1 наблюдается аномальное высвобождение кальция из ЭПР. Интересно, что в спинном мозге продукт мутантного гена SOD1 связывается с наружной мембраной митохондрий и препятствует ассоциации митохондрий с ЭПР. Кроме того, митохондриальная E3-убиквитинлигаза MARCH5 (также известная как MITOL), локализованная на МАМ, убиквитинирует SOD1 и регулирует таким образом образование фагосом [107]. Другой белок, повреждения которого могут быть связаны с развитием бокового амиотрофического склероза, – VAPB. Мутация или снижение экспрессии гена этого белка приводят к формированию клинической картины спинальной мышечной атрофии и бокового амиотрофического склероза [108]. В экспериментальных работах на мышах с боковым амиотрофическим склерозом установлено, что сверхэкспрессия VAPB в нейронах замедляет прогрессирование заболевания и увеличивает выживаемость [109, 110].

Серьезные доказательства нарушений в комплексе МАМ обнаружены и при рассеянном склерозе [111]. Эти нарушения особенно выражены в очагах острого повреждения белого вещества и характеризуются количественным нарастанием зон МАМ в нервных клетках, увеличением в этих зонах концентрации белков, входящих в состав МАМ, а также нарушениями распределения кальция и митохондриальной динамики. Связь нарушений МАМ с активностью патогенетических процессов при рассеянном склерозе настолько высока, что некоторые связанные с комплексом МАМ молекулы, такие как RAB32, предложено считать биомаркерами.

Еще одно нейродегенеративное заболевание, патогенез которого связан с МАМ, — болезнь Альцгеймера. На экспериментальных моделях показано, что на самых ранних стадиях болезни Альцгеймера в коре головного мозга возникает целый комплекс изменений в белках МАМ; эти изменения коррелируют с динамикой накопления бета-амилоида и клиническими проявлениями заболевания [112]. Как известно, наследственный вариант

болезни Альцгеймера может быть связан с повышением уровня кальция в митохондриях, ключевой причиной которой считается сверхэкспрессия пресенилина PS2, способствующего транспорту кальция из саркоплазматического ретикулума в эти органеллы [113]. Стоит отметить, что пресенилины PS1 и PS2 – достаточно универсальные клеточные белки, вовлеченные в систему МАМ, входят также в состав комплекса гамма-секретазы, обеспечивающей синтез бета-амилоидных белков [114]. Однако только пресенилин PS2 способствует физическому и функциональному взаимодействию митохондрий и ЭПР. Согласно недавним исследованиям, PS2 увеличивает число сайтов контакта между ЭПР и митохондрией, которые затем закрепляются митофузином [115, 116]. Вовлеченность МАМ в патогенез болезни Альцгеймера подтверждена при сравнении клеточных культур с мутациями пресенилина со здоровыми клетками и с фибробластами индивидов с болезнью Альцгеймера. В мутантных клетках, как и в клетках с болезнью Альшгеймера. наблюдалась повышенная активность МАМ [117]. Это повышение подтверждено двумя показателями:

1. Повышенная экспрессия гена ACAT1 (ацил-КоА-холестерол-ацилтрансфераза, превращающая холестерин в эфиры холестерина). Чем выше уровень экспрессии гена ACAT1, тем больше образуется липидных гранул. Кроме того, повышенная активность ACAT1 связана с синтезом бета-амилоидных белков.

2. Синтез фосфолипидов осуществляется клеткой двумя способами: *de novo* с помощью пути Кеннеди и по альтернативному пути с участием МАМ. В МАМ происходит синтез фосфатидилсерина, который затем поступает в митохондрию, где конвертируется в коламин с помощью фосфатидилсериндекарбоксилазы. Фосфатидилсериндекарбоксилазы интохондрий считается показателем интеграции между ЭПР и митохондрией [118].

Таким образом, повышение уровня холестерина и усиление метаболизма фосфолипидов в мутантных клетках по сравнению с контрольными культурами указывает на повышение уровня взаимодействия ЭПР и митохондрий и увеличения число контактов между этими органеллами. Исходя из этих данных логично предположить, что уменьшение взаимодействия между двумя органеллами может снижать интенсивность патологических процессов, лежащих в основе болезни Альцгеймера. И действительно, небольшое снижение содержания митофузина-2 приводит к снижению концентрации фосфолипидов и холестерина [119].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном обзоре рассмотрены полученные за последние годы данные о работе МАМ.

1. МАМ представляют собой образования, которые структурно и функционально объединяют две важные клеточные органеллы – ЭПР и митохондрии. ЭПР-митохондриальное взаимодействие обеспечивается за счет белковых комплексов ERMES и EMC.

2. МАМ участвуют в различных клеточных процессах, включая поддержание гомеостаза фосфолипидов, кальция, митохондриальных белков, воспаление, аутофагию, деление и слияние митохондрий, а также в процессах адаптации клеток к стрессирующим воздействиям и др.

3. МАМ играют важную роль в контроле качества митохондрий в условиях стресса. МАМ способствуют гомеостазу белка в митохондриях и регулируют динамику митохондрий, содействуя выживанию клеток в условиях небольшого клеточного стресса. При сильном стрессе ЭПР МАМ опосредуют митохондриальный путь апоптоза.

4. МАМ служат платформами для онкогенов и онкосупрессоров, они могут быть маркерами различных видов опухолей.

5. Стресс ЭПР и дисфункция митохондрий, связанные с нарушением работы МАМ, могут участвовать в патогенезе сахарного диабета типа 2 и многих нейродегенеративных заболеваний.

6. Дальнейшее изучение механизмов контроля качества митохондрий, регулирующихся МАМ в условиях стресса ЭПР, поможет выявить новые фармакологические мишени и разработать принципиально новые стратегии химиотерапии опухолей и лечения заболеваний, в том числе социально значимых (болезнь Альцгеймера или сахарный диабет типа 2).

Написание настоящего обзора не потребовало специального финансирования.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Skulachev V.P. (2006) Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis*. 11(4), 473– 485.
- 2. Сухоруков В.С. (2011) Очерки митохондриальной патологии. Москва: ИД "Медпрактика-М", 288.
- 3. Wallace D. (2010) Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ. Mol. Mutagen.* **51**(5), 440–450.
- 4. Царегородцев А.Д., Сухоруков В.С. (2012) Митохондриальная медицина: проблемы и задачи. *Рос. Вестн. Перинатологии, Педиатрии.* 4(2), 112–115.

- 5. Скулачев М.В., Скулачев В.П. (2014) Сведения о запрограммированности старения – медленного феноптоза. *Биохимия*. **10**, 1205–1224.
- 6. Hallberg B., Larsson N. (2014) Making proteins in the powerhouse. *Cell Metab.* **20**, 226–240.
- 7. Herst P., Rowe M., Carson G., Berridge M.V. (2017) Functional mitochondria in health and disease. *Front. Endocrinol.* (Lausanne). **8**, 296.
- Pinton P. (2018) Mitochondria-associated membranes (MAMs) and pathologies. *Cell. Death Dis.* 9, 413.
- 9. Hollien J. (2013) Evolution of the unfolded protein response. *Biochim. Biophys. Acta.* **1833**, 2458–2463.
- Bittremieux M., Parys J.B., Pinton P., Bultynck G. (2016) ER functions of oncogenes and tumor suppressors: modulators of intracellular Ca²⁺ signaling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1863, 1364–1378.
- Lai E., Teodoro T., Volchuk A. (2007) Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology*. 22, 193–201.
- 12. Stankov K., Stanimirov B., Mikov M. (2014) Cellular responses to endoplasmic reticulum stress. *Biol. Serb.* **35**, 15–23.
- Giorgi C., Missiroli S., Patergnani S., Duszynski J., Wieckowski M.R., Pinton P. (2015) Mitochondria-associated membranes: composition, molecular mechanisms, and physiopathological implications. *Antioxid. Redox Signal.* 22, 995–1019.
- Bononi A. (2012) Mitochondria-associated membranes (MAMs) as hotspot Ca²⁺ signaling units. *Adv. Exp. Med. Biol.* **740**, 411–437.
- 15. Schreiner B., Ankarcrona M. (2017) Isolation of mitochondria-associated membranes (MAM) from mouse brain tissue. *Methods Mol. Biol.* **1567**, 53–68.
- 16. Giacomello M., Pellegrini L. (2016) The coming of age of the mitochondria-ER contact: a matter of thickness. *Cell. Death Differ.* 23, 1417–1427.
- 17. Lahiri S. (2014) A conserved endoplasmic reticulum membrane protein complex (EMC) facilitates phospho-lipid transfer from the ER to mitochondria. *PLoS Biol.* **12**, e1001969.
- Kornmann B. (2009) An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*. 325, 477–481.
- Kerkhofs M., Bittremieux M., Morciano G. (2018) Emerging molecular mechanisms in chemotherapy: Ca²⁺ signaling at the mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes. *Cell. Death Dis.* 9, 334.
- 20. ShengnanW., Ming-Hui Z. (2019) Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in the heart. *Arch. Biochem. Biophys.* **662**, 201–212.
- De Brito O.M., Scorrano L. (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 456, 605–610.
- Szabadkai G., Bianchi K. (2006) Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. J. Cell Biol. 175, 901–911.
- 23. Iwasawa R., Mahul-Mellier A.L. (2011) Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J.* **30**, 556–568.
- Stoica R., De Vos K.J., Paillusson S., Mueller S., Sancho R.M., Lau K.F., Vizcay-Barrena G., Lin W.L., Xu Y., Lewis J., Dickson D.W., Petrucelli L.,

Mitchell J.C., Shaw C.E., Miller C. (2014) ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PT-PIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat. Commun.* **5**, 3996.

- Hirabayashi Y., Kwon S.K., Paek H., Pernice W.M., Paul M.A., Lee J., Efrani P., Raczkowski A., Petrey D.S., Pon L.A., Polleux F. (2017) PZD8 ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca²⁺ dynamics in mammalian neurons. *Science*. **358**, 623–630.
- Wang P.T., Garcin P.O., Wang P.T., Garcin P.O., Fu M., Masoudi M., St-Pierre P., Pante N., Nabi I.R. (2015) Distinct mechanisms controlling rough and smooth endoplasmic reticulum contacts with mitochondria. *J. Cell Sci.* 128, 2759–2765.
- Csordás G., Renken C., Varnai P., Walter L., Weaver D., Buttle K.F., Balla T., Manella C.A., Hajnoczky G. (2006) Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. J. Cell Biol. 174, 915–921.
- Zhang A., Williamson C.D., Wong D.S., Bullough M.D., Brown K.J., Hathout Y., Colberg-Poley A.M. (2011) Quantitative proteomic analyses of human cytomegalovirus-induced restructuring of endoplasmic reticulum-mitochondrial contacts at late times of infection. *Mol. Cell Proteomics.* 10, M111.009936.
- Poston C.N., Krishnan S.C., Bazemore-Walker C.R. (2013) In-depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM). *J. Proteomics.* 79, 219–230.
- Rizzuto R., Pinton P., Carrington W., Fay F., Fogarty K., Lifshitz L., Tuft R., Pozzan T. (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*. 280, 1763– 1766.
- Sood A., Jeyaraju D., Prudent J., Caron A., Lemieux P., McBride H., Laplante M., Toth K., Pellegrini L. (2014) A mitofusin-2-dependent inactivating cleavage of Opa1 links changes in mitochondria cristae and ER contacts in the postprandial liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, 16017–16022.
- 32. Bootman M.D. (2012) Calcium signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a011171.
- 33. Clapham D.E. (2007) Calcium signaling. *Cell.* **131**, 1047–1058.
- Tadini-Buoninsegni F., Smeazzetto S. (2018) Drug interactions with the Ca²⁺-ATPase from sarco(endo)plasmic reticulum (SERCA). *Front. Mol. Biosci.* 20, 123–136.
- Chemaly E.R., Troncone L., Lebeche D., Smeazzetto S., Gualdani R., Moncelli M. (2018) SERCA control of cell death and survival. *Cell Calcium*. 69, 46–61.
- Stefani D., Rizzuto R., Pozzan T. (2016) Enjoy the trip: calcium in mitochondria back and forth. *Annu. Rev. Biochem.* 85, 161–192.
- Bononi A., Missiroli S., Poletti F., Suski J., Agnoletto C., Bonora M., Marchi E., Giorgi C., Marchi S., Patergnani S., Wieckowski M., Pinton P. (2012) Mitochondria-associated membranes (MAMs) as hotspot Ca²⁺ signaling units. *Adv. Exp. Med. Biol.* **740**, 411– 437.
- Veeresh P., Kaur H., Sarmah D., Mounica L., Verma G., Kotian V., Kesharwani R., Kalia K., Borah A., Wang X., Dave K., Rodriguez AM, Yagaval D., Bhattacharya P. (2019) Endoplasmic reticulum-mitochondria cross-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

talk: from junction to function across neurological disorders. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1457**, 41–60.

- 39. Parys J.B., De Smedt H. (2012) Inositol 1,4,5-trisphosphate and its receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* **740**, 255–279.
- Fekete A., Nakamura Y., Yang Y., Herlitze S., Mark M., DiGregorio D., Wang L. (2019) Underpinning heterogeneity in synaptic transmission by presynaptic ensembles of distinct morphological modules. *Nat. Commun.* 10, 826.
- Mishra P., Chan D.C. (2016) Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *Cell Biol.* 212, 379–387.
- Tagaya M., Arasaki K. (2017) Regulation of mitochondrial dynamics and autophagy by the mitochondria-associated membrane. *Adv. Exp. Med. Biol.* **997**, 33–47.
- 43. Schrepfer E., Scorrano L. (2016) Mitofusins, from mitochondria to metabolism. *Mol. Cell.* **61**, 683–694.
- Zorzano A., Hernández-Alvarez M.I., Sebastian D., Munoz J.P. (2015) Mitofusin 2 as a driver that controls energy metabolism and insulin signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 22, 1020–1031.
- Dorn G.W., Song M., Walsh K. (2015) Functional implications of mitofusin 2-mediated mitochondrial-SR tethering. J. Mol. Cell Cardiol. 78, 123–128.
- 46. Anand R., Wai T., Baker M., Kladt N., Schauss A., Rugarli E., Langer T. (2014) The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. J. Cell Biol. 204, 919– 929.
- Richter V., Palmer C.S., Osellame L., Singh A., Elgass K., Stroud D., Sesaki H., Kvansakul M., Ryan M. (2014) Structural and functional analysis of MiD51, a dynamin receptor required for mitochondrial fission. *J. Cell Biol.* 204, 477–486.
- 48. Jin X., Wang J. (2017) Dysregulation of INF2-mediated mitochondrial fission in SPOP-mutated prostate cancer. *PLoS Genet.* **13**, e1006748.
- 49. Wikstrom J.D., Mahdaviani K., Liesa M., Sereda S.B., Si Y., Las G., Twig G., Petrovic N., Zingaretti C., Graham A., Cinti S., Corkey B., Cannon B., Nedergaard J., Shirihai O. (2014) Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. *EMBO* J. 33, 418–436.
- Sheng Z.H. (2017) The interplay of axonal energy homeostasis and mitochondrial trafficking and anchoring. *Trends Cell Biol.* 27, 403–416.
- Hailey D.W., Rambold A.S. (2010) Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell.* 141, 656–667.
- Hamasaki M., Furuta N., Matsuda A., Nezu A., Yamamoto A., Fujita N., Hiroko O., Noda T., Haraguchi T., Hiraoka Y., Amano A., Yoshimori T. (2013) Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. 495, 389–393.
- 53. Arasaki K., Shimizu H., Mogari H., Nishida N., Hirota N., Furuno A., Kudo Y., Baba M., Baba N., Cheng J., Furuta N., Matsuda A., Nezu A., Yamamoto A., Fujita N., Oomori H., Noda T., Haraguchi T., Hiraoka Y., Amono A., Yoshimori T. (2013) A role for the ancient SNARE syntaxin 17 in regulating mitochondrial division. *Dev. Cell.* 32, 304–317.
- 54. Walter P., Ron D. (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.* **334**, 1081–1086.

- 55. Lan B., He Y., Sun H., Zheng X., Gao Y., Li N. (2019) The roles of mitochondria-associated membranes in mitochondrial quality control under endoplasmic reticulum stress. *Life Sci.* **231**, 116587.
- 56. Glancy B., Balaban R.S. (2012) Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry*. **51**(14), 2959–2973. https://doi.org/10.1021/bi2018909
- 57. Son S.M., Byun J., Roh S.E., Kim S.J., Mook-Jung I. (2014) Reduced IRE1α mediates apoptotic cell death by disrupting calcium homeostasis via the InsP3 receptor. *Cell. Death Dis.* 5(4), 1188. https://doi.org/10.1038/cddis.2014.129
- Rambold A.S., Kostelecky B., Elia N., Lippincott-Schwartz J. (2011) Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108, 10190–10195.
- 59. Zhang Y., Ren S., Liu Y., Gao K., Liu Z., Zhang Z. (2017) Inhibition of starvation-triggered endoplasmic reticulum stress, autophagy, and apoptosis in ARPE-19 cells by taurine through modulating the expression of calpain-1 and calpain-2. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 23–24.
- Cui J., Li Z., Zhuang S., Qi S., Li L., Zhou J., Zhang W., Zhao Y. (2018) Melatonin alleviates inflammation-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via suppression of Ca²⁺-XO-ROS-Drp1-mitochondrial fission axis by activation of AMPK/SER-CA2a pathway. *Cell Stress Chaperones.* 23, 281–293.
- 61. Gelmetti V., De Rosa P., Torosantucci L., Marini E.S., Romagnoli A., Di Rienzo M., Arena G., Vignone D., Fimia G.M., Valente E.M. (2017) PINK1 and BECN1 relocalize at mitochondria-associated membranes during mitophagy and promote ER-mitochondria tethering and autophagosome formation. *Autophagy*. **13**(4), 654–669.
- Deniaud A., Sharaf el dein O., Maillier E., Poncet D., Kroemer G., Lemaire C., Brenner C. (2008) Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene.* 27, 285–299.
- Vervliet T., Clerix E., Seitaj B., Ivanova H., Monaco G., Bultynck G. (2017) Modulation of Ca²⁺ signaling by anti-apoptotic B-cell lymphoma 2 proteins at the endoplasmic reticulum-mitochondrial interface. *Front. Oncol.* 7, 75–76.
- 64. Oakes S.A., Scorrano L., Opferman J.T., Bassik M.C., Nishino M., Pozzan T., Korsmeyer S.J. (2005) Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 105–110.
- 65. Monaco G., Decrock E., Arbel N., van Vliet A.R., La Rovere R.M., De Smedt H., Parys J.B., Agostinis P., Leybaert L., Shoshan-Barmatz V., Bultynck G. (2015) The BH4 domain of anti-apoptotic Bcl-XL, but not that of the related Bcl-2, limits the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)-mediated transfer of proapoptotic Ca²⁺ signals to mitochondria. *J. Biol. Chem.* **290**, 9150–9161.
- 66. Banerjee J., Ghosh S. (2004) Bax increases the pore size of rat brain mitochondrial voltage-dependent anion channel in the presence of tBid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 310–314.

- Sassano M.L., van Vliet A.R., Agostinis P. (2017) Mitochondria-associated membranes as networking platforms and regulators of cancer cell fate. *Front. Oncol.* 7, 174.
- Dietel E., Brobeil A., Delventhal L., Tag C., Gattenlohner S., Wimmer M. (2019) Crosstalks of the PT-PIP51 interactome revealed in Her2 amplified breast cancer cells by the novel small molecule LDC3/Dynarrestin. *PLoS One.* 14(5), e0216642.
- Herrera-Cruz M.S., Simmen T. (2017) Cancer: untethering mitochondria from the endoplasmic reticulum? *Front. Oncol.* 7, 105.
- Janikiewicz J., Hanzelka K., Kozinski K., Kolczynska K., Dobrzyn A. (2015) Islet beta-cell failure in type 2 diabetes – within the network of toxic lipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 491–496.
- Szymański J., Janikiewicz J., Michalska B., Patalas-Krawczyk P., Perrone M., Ziółkowski W., Duszyński J., Pinton P., Dobrzyń A., Więckowski M. R. (2017) Interaction of mitochondria with the endoplasmic reticulum and plasma membrane in calcium homeostasis, lipid trafficking and mitochondrial structure. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1576.
- Tubbs E., Rieusset J. (2016) Metabolic signaling functions of ER-mitochondria contact sites: role in metabolic diseases. *Soc. Endocrinol.* 58, 87–R106.
- Thivolet C., Vial G., Cassel R., Rieusset J., Madec A.M. (2017) Reduction of endoplasmic reticulum- mitochondria interactions in beta cells from patients with type 2 diabetes. *PLoS One.* 12, e0182027.
- 74. Tubbs E., Chanon S., Robert M., Benridi N., Bidaux G., Chauvin M.A., Ji-Cao J., Durand C., Gayrit-Ramette D., Vidal H., Lefai E., Rieusset J. (2018) Disruption of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity contributes to muscle insulin resistance in mice and humans. *Diabetes.* 67, 636–650.
- 75. Tubbs E., Theurey P., Vial G., Bendridi N., Bravard A., Chauvin M.A., Ji-Cao J., Zoulim F., Bartosch B., Ovize M., Vidal H., Rieusset J. (2014) Mitochondriaassociated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes.* 63, 3279– 3294.
- Sasi U.S.S., Ganapathy S., Palayyan S.R., Gopal R.K. (2020) Mitochondria associated membranes (MAMs): emerging drug targets for diabetes. *Curr. Med Chem.* 27, 3362–3385.
- 77. Shinjo S., Jiang S., Nameta M., Suzuki T., Kanai M., Nomura Y., Goda N. (2017) Disruption of the mitochondria-associated ER membrane (MAM) plays a central role in palmitic acid-induced insulin resistance. *Exp. Cell Res.* 359, 86–93.
- Burgos-Moron E., Abad-Jimenez Z., Maranon A.M., Iannantuoni F., Escribano-Lopez I., Lopez-Domenech S., Salom C., Jover A., Mora V., Roldan I. (2019) Relationship between oxidative stress, ER stress, and inflammation in type 2 diabetes: the battle continues. *J. Clin. Med.* 8, 1385.
- Rodríguez-Arribas M., Yakhine-Diop S.M.S., Pedro J.M.B., Gomez-Suaga P., Gomez-Sanchez R., Martinez-Chacon G., Fuentes J.M., Gonzalez-Polo RA., Niso-Santano M. (2017) Mitochondria-associated membranes (MAMs): overview and its role in Parkinson's disease. *Mol. Neurobiol.* 54, 6287–6303.

- Haile Y., Deng X., Ortiz-Sandova C., Tahbaz N., Janowicz A., Lu J.-Q., Kerr B.J., Gutowski N.J., Holley J.E., Eggleton P., Giuliani F., Simmen T. (2017) Rab32 connects ER stress to mitochondrial defects in multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation.* 14, 19.
- Delfina L., Pera M., Gonnelli, Quintana–Cabrera R., Akman H.O, Guardia-Laquarta C., Velasco K.R., Area-Gomez E., Dal Bello F., Stefani D., Horvath R., Shy M., Schon M., Giacomello M. (2019) MFN2 mutations in Charcot–Marie–Tooth disease alter mitochondria-associated ER membrane function but do not impair bioenergetics. *Hum. Mol. Genetics.* 28, 1782–1800.
- Paillusson S., Stoica R., Gomez-Suaga P., Lau D.H.W., Mueller S., Miller T., Miller C.C.J. (2016) There's something wrong with my MAM; the ER-mitochondria axis and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 39, 146–157.
- 83. Manfredi G., Kawamata H. (2016) Mitochondria and endoplasmic reticulum crosstalk in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **90**, 35–42.
- Reijonen S., Putkonen N., Norremolle A., Lindholm D., Korhonen L. (2008) Inhibition of endoplasmic reticulum stress counteracts neuronal cell death and protein aggregation caused by N-terminal mutant Huntingtin proteins. *Exp. Cell Res.* 314, 950–960.
- Eysert F., Kinoshita P.F., Mary A., Vaillant-Beuchot L., Checler F., Chami M. (2020) Molecular dysfynctions of mitochondria-associated membranes (MAMs) in Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 21(24), 9521.
- Hyrskyluoto A., Pulli I., Tornqvist K., Ho TH., Korhonen L., Lindholm D. (2013) Sigma-1 receptor agonist PRE084 is protective against mutant Huntingtininduced cell degeneration: involvement of calpastatin and the NF-kappaB pathway. *Cell Death Dis.* 4, e646.
- Penke B., Fulop L., Szucs M., Frecska E. (2018) The role of sigma-1 receptor, an intracellular chaperone in neurodegenerative diseases. *Curr. Neuropharmacol.*16, 97.
- Ryskamp DA., Korban S., Zhemkov V., Kraskovskaya N., Bezprozvanny I. (2019) Neuronal sigma-1 receptors: signaling functions and protective roles in neurodegenerative diseases. *Front. Neurosci.* 13, 862.
- Hayashi T., Su T.P. (2007) Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival. *Cell.* 131, 596–610.
- 90. Zarei S., Carr K., Reiley L., Diaz K., Guerra O., Altamirano P.F., Pagani W., Lodin D., Orozco G., Chinea A. (2015) A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis. *Surg. Neurol. Int.* 6, 171.
- Ryan B.J., Hoek S., Fon EA., Wade-Martins R. (2015) Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem. Sci.* 40, 200–210.
- 92. Apicco D.J., Shlevkov E., Nezich C.L., Tran D.T., Guilmette E., Nicholatos J.W., Bantle C.M., Chen Y., Glajch K.E., Abraham N.A., Dang L.T., Kaynor G.C., Tsai E.A., Nguyen K.H., Groot J., Liu Y., Weihofen A., Hurt J.A., Runz H., Hirst W.D. (2021) The Parkinson's disease-associated gene ITPKB protects against α-synuclein aggregation by regulating ER-to-mitochondria calcium release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **118**(1), e2006476118.

- 93. Сухоруков В.С., Воронкова А.С., Литвинова Н.А., Баранич Т.И., Иллариошкин С.Н. (2020) Роль индивидуальных особенностей митохондриальной ДНК в патогенезе болезни Паркинсона. *Генетика.* **4**, 392–400.
- Ozcan L., Tabas I. (2012) Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu. Rev. Med.* 63, 317–328.
- Gómez-Suaga P., Pedro J.M., González-Polo R.A., Fuentes J., Niso-Santano M. (2018) ER-mitochondria signaling in Parkinson's disease. *Cell Death Dis.* 9, 337.
- Guardia-Laguarta C., Area-Gomez E., Rub C., Liu Y., Magrane J., Becker D., Voos W., Schon E.A., Przedborski S. (2014) Alpha-synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *J. Neuroscience*. 34, 249–259.
- Cali T., Ottolini D., Negro A., Brini M. (2012) Alphasynuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions. *J. Biol. Chem.* 287, 17914–17929.
- Sun X., Liu J., Crary J.F., Malagelada C., Sulzer D., Greene L.A., Levy O.A. (2013) ATF4 protects against neuronal death in cellular Parkinson's disease models by maintaining levels of parkin. *J. Neurosci.* 33, 2398– 2407.
- 99. Bouman L., Schlierf A., Lutz A.K., Shan J., Deinlein A., Kast J., Galehdar Z., Palmisano V., Patenge N., Berg D., Gasser T., Augustin R., Trumbach D., Irrcher I., Park D.S., Wurst W., Kilberg MS., Tatzelt J., Winklhofer K.F. (2011) Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress. *Cell Death Differ*. 18, 769–782.
- 100. Cali T., Ottolini D., Negro A., Brini M. (2013) Enhanced parkin levels favor ER-mitochondria crosstalk and guarantee Ca²⁺ transfer to sustain cell bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta.* 4, 495–508.
- 101. Wu S., Lei L., Song Y., Liu M., Lu S., Lou S., Shi Y., Wang Z., He D. (2018) Mutation of hop-1 and pink-1 attenuates vulnerability of neurotoxicity in *C. elegans*: the role of mitochondria-associated membrane proteins in Parkinsonism. *Exp. Neurology*. **309**, 67–78.
- 102. Ottolini D., Cali T., Negro A., Brini M. (2013) The Parkinson disease-related protein DJ-1 counteracts mitochondrial impairment induced by the tumour suppressor protein p53 by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria tethering. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2152–2168.
- 103. Gómez-Suaga P., Bravo-San Pedro J.M., González-Polo R.A., Fuentes JM., Nino-Santano M. (2018) ER-mitochondria signaling in Parkinson's disease. *Cell Death Dis.* 9, 337.
- 104. Sun D., Chen X., Gu G., Wang J., Zhang J. (2017) Potential roles of mitochondria-associated ER membranes (MAMs) in traumatic brain injury. *Cell. Mol. Neurobiol.* 37(8), 1349–1357.
- 105. Marchi S., Bittremieux M., Missiroli S., Morganti C., Patergnani S., Sbano L., Rimessi A., Kerkhofs M., Parys J.B., Bultynck G., Giorgi C., Pinton P. (2017) Endoplasmic reticulum-mitochondria communication through Ca²⁺ signaling: the importance of mitochondria-associated membranes (MAMs). *Adv. Exp. Med. Biol.* **997**, 49–67.

- 106. Watanabe S., Ilieva H., Tamada H., Nomura H., Komine O., Endo F., Jin S., Mancias P., Kiyama H., Yamanaka K. (2016) Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIG-MAR1-and SOD1-linked ALS. *EMBO Mol. Med.* 8, 1421–1437.
- 107. Yonashiro R., Sugiura A., Miyachi M., Fukuda T., Matsushita N., Inatome R., Ogata Y., Suzuki T., Dohmae N., Yanagi S. (2009) Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced reactive oxygen species generation. *Mol. Biol. Cell.* 20, 4524–4530.
- 108. Nishimura A.L., Mitne-Neto M., Silva H.C.A., Richieri-Costa A., Middleton S., Cascio D., Kok F., Oliveira J.R.M., Gillingwater T., Webb J., Skehel P., Zatz M. (2004) A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 822–831.
- 109. Anagnostou G., Akbar M.T., Paul P., Angelinetta C., Steiner T.J., de Belleroche J. (2014) Vesicle associated membrane protein B (VAPB) is decreased in ALS spinal cord. *Neurobiol. Aging.* **31**, 969–985.
- 110. Kim J.Y., Jang A., Reddy R., Yoon W.H., Jankowsky J.L. (2016) Neuronal overexpression of human VAPB slows motor impairment and neuromuscular denervation in a mouse model of ALS. *Hum. Mol. Genet.* 25, 4661–4673.
- 111. Haile Y., Deng X., Ortiz-Sandova C., Tahbaz N., Janowicz A., Lu J.-Q., Kerr B.J., Gutowski N.J., Holley J.E., Eggleton P., Giuliani F., Simmen T. (2017) Rab32 connects ER stress to mitochondrial defects in multiple sclerosis. J. Neuroinflam.14, 19.
- 112. Völgyi K., Badics K., Sialana F.J., Gulyassy P., Udvari E.B., Kis V., Drahos L., Lubec G., Kekesi KA.,

Juhasz G. (2018) Early presymptomatic changes in the proteome of mitochondria-associated membrane in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* **55**, 7839–7857.

- Contino S., Porporato P.E., Bird M., Marinangeli C., Opsomer R., Sonveaux P., Bontemps F., Dewachter I., Octave J.-N., Bertrand L., Stanga S., Kienlen-Campard P. (2017) Presenilin 2-dependent maintenance of mitochondrial oxidative capacity and morphology. *Front. Physiol.* 8, 796.
- 114. Zampese E., Fasolato C., Kipanyula M.J., Bortolozzi M., Pozzan T., Pizzo P. (2011) Presenilin 2 modulates endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria interactions and Ca²⁺ cross-talk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 2777–2782.
- 115. Erpapazoglou Z., Mouton-Liger F., Corti O. (2017) From dysfunctional endoplasmic reticulum-mitochondria coupling to neurodegeneration. *Neurochem. Int.* **109**, 171–183.
- 116. De Brito O.M., Scorrano L. (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. **456**, 605–610.
- 117. Area-Gomez E., Del Carmen Lara Castillo M., Tambini M.D., Guardia-Laguarta C., de Groof A.J., Madra M., Ikenouchi J., Umeda M., Bird T.D., Sturley S.L., Schon E.A. (2012) Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J.* **31**, 4106–4123.
- 118. Voelker D.R. (2005) Bridging gaps in phospholipid transport. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 396–404.
- 119. Area-Gomez E., Schon E.A. (2016) Mitochondriaassociated ER membranes and Alzheimer disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **38**, 90–96.

MOLECULAR INTERACTION'S MECHANISMS OF MITOCHONDRIA AND ENDOPLASMIC RETICULUM: A NEW LOOK AT THE DELIVERY OF IMPORTANT CELLULAR FUNCTIONS

V. S. Sukhorukov¹, A. S. Voronkova¹, T. I. Baranich^{1, 2, *}, A. A. Gofman², A. V. Brydun^{1, 2}, L. A. Knyazeva², and V. V. Glinkina²

¹ Research Center of Neurology, Moscow, 125367 Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: baranich_tatyana@mail.ru

Endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria are well-studied obligate organelles of eukaryotic cytoplasm. However, until recently, in the scientific literature little attention has been paid to their interaction. In recent years reports have increasingly appeared that the damage to the contact between ER and mitochondria is the important link in etiopathogenesis of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis. Taking into consideration these new data, a detailed study of the mechanisms of ER-mitochondrial interaction seems necessary to develop new diagnostic and therapeutic approaches to neurodegenerative diseases, as well as to extend fundamental knowledge about the physiology of the eukaryotic cell. In this paper, we will review data on the functions of mitochondria-associated ER membranes (MAM) obtained in recent years and actively discussed in the scientific literature. The structural elements of the MAM system, their role in the vital functions of the cell (homeostasis of calcium, lipids, autophagy, fusion and division of mitochondria, regulation of the mitochondria's amount) as well as the role of MAM dysfunctions in the pathogenesis of various forms of neurodegenerative diseases are analyzed.

Keywords: endoplasmic reticulum, mitochondria, membrane, calcium, chaperone, neurodegenerative diseases

———— ОБЗОРЫ ———

УДК 578.233.44

ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА ИЗ СЕМЕЙСТВА Coronaviridae

© 2022 г. С. О. Галкин^{а, b}, А. Н. Анисенко^{а, b, c}, О. А. Шадрина^{b, c}, М. Б. Готтих^{b, c, *}

^аФакультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

^bХимический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия ^cНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского

государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: gottikh@belozersky.msu.ru Поступила в редакцию 12.05.2021 г. После доработки 09.06.2021 г. Принята к публикации 14.06.2021 г.

Охватившая весь мир пандемия коронавирусного инфекционного заболевания (COVID-19), которое вызвано ранее неизвестным бетакоронавирусом SARS-CoV-2, сделала крайне актуальной разработку простых и безопасных клеточных систем, позволяющих манипулировать с геномом вируса, а также проводить высокопроизводительный скрининг его потенциальных ингибиторов. В этом обзоре мы постарались обобщить существующие на настоящий момент данные о генно-инженерных системах для исследования не только SARS-CoV-2, но и других вирусов из семейства Coronaviridae. Кроме того, в обзоре кратко представлены основные сведения о строении и жизненном цикле коронавирусов.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, репликоны, псевдовирусы **DOI:** 10.31857/S0026898422010025

введение

СОVID-19 (Coronavirus infectious disease 2019) – инфекционное заболевание, вызванное новым штаммом бетакоронавируса, вирусом-2 острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2), – уже унесло миллионы жизней по всему миру. В связи с высокой патогенностью и контагиозностью возбудителя Всемирной организацией здравоохранения была объявлена пандемия COVID-19. В научных центрах по всему миру активно идут исследования SARS-CoV-2, проведены масштабные работы по созданию вакцин, существенные усилия направлены на поиск лекарственных средств для эффективной терапии и профилактики COVID-19.

За последние 20 лет коронавирусы были этиологическими агентами трех масштабных вспышек тяжелых респираторных инфекций человека: тяжелый острый респираторный синдром (SARS) в 2002 году, ближневосточный респираторный синдром (MERS) в 2012 году и коронавирусная инфекция 2019 года (COVID-19), которая затронула практически все страны и вызвала общемировой кризис здравоохранения [1, 2]. SARS-CoV-2 отличается от SARS-CoV-1 и MERS-CoV продолжительным инкубационным периодом, большим процентом бессимптомных носителей, а также способностью передаваться от человека к человеку при отсутствии клинических симптомов у инфицированных индивидов [3]. Такой набор особенностей SARS-CoV-2 привел к тому, что локальная вспышка в китайском Ухане переросла в пандемию. Летальность COVID-19 сильно зависит от возраста и пола человека: наиболее высока вероятность летального исхода у пожилых людей,

Сокращения: ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) – ангиотензинконвертирующий фермент-2; ANPEP (aminopeptidase N) – аминопептидаза N; BAC (bacterial artificial chromosome) – искусственная бактериальная хромосома; DI-PHK (defective interfering PHK) – дефектная интерферирующая PHK; ERGIC (endoplasmic-reticulum–Golgi intermediate compartment) – интермедиат между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи; HDV (hepatitis delta virus) – вирус гепатита дельта; NSP (non-structural proteins) – неструктурные белки; ORF (open reading frame) – открытая рамка считывания; RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) – PHK-зависимая PHK-полимераза; TAR-клонирование (transformation-associated recombination kлонирование) – клонирование методом ассоциированной с трансформацией рекомбинации; TGEV (transmissible gastroenteritis virus) – вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней; TRS (transcription regulatory sequence) – последовательность, регулирующая транскрипцию; VLP (virus-like particles) – вирусоподобные частицы; UTR (untranslated region) – нетранслируемая область.



Рис. 1. Схематичное строение вириона представителей семейства Согопаviridae. Спирально-симметричный нуклеокапсид, состоящий из белка нуклеокапсида (N) и одной молекулы PHK-генома, окружен суперкапсидом клеточного происхождения с встроенными вирусными белками: S, M и E. Белок гемагглютинин-эстераза (HE) входит в состав вирионов коронавирусов человека HCoV-OC43 и HCoV-HKU1, но не HCoV-229E, HCoV-NL63, MERS-CoV, SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2. Вирион коронавирусов содержит около 300 копий S-белка, 2000 копий M-белка, 1000 копий N-белка и 100 копий E-белка [11].

особенно мужского пола [4]. Выявлена существенная корреляция между тяжестью заболевания COVID-19 и сопутствующими хроническими заболеваниями или избыточной массой тела [5].

Успех в исследовании высокопатогенных коронавирусов и, в частности, в поиске потенциальных препаратов для терапии вызываемых ими заболеваний во многом зависит от понимания особенностей инфекционного цикла вируса, а, следовательно, и развития технологий, используемых для его исследования. В основном это генно-инженерные системы; их много, они отличаются большим разнообразием, и каждая имеет свои преимущества и недостатки. В представленном обзоре предпринята попытка систематизировать существующие на сегодняшний день системы для изучения коронавирусов, подробно обозначив сильные и слабые стороны каждой из них.

БИОЛОГИЯ КОРОНАВИРУСОВ

Представители семейства Coronaviridae инфицируют млекопитающих и птиц, вызывая респираторные заболевания различной степени тяжести. До 2019 года в человеческой популяции циркулировало 6 коронавирусов, из которых Betacoronavirus 1 (HCoV-OC43), HCoV-229E, HCoV-NL63 и HCoV-HKU1 считаются сезонными респираторными вирусами. Появившийся в 2002 году коронавирус, ассоциированный с тяжелым острым респираторным синдромом (SARS-CoV, рекомендуемое с 2020 года название SARS-CoV-1; род Betacoronavirus, подрод Sarbecovirus), и коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV; род Betacoronavirus, подрод Merbecovirus) оказались высокопатогенными для человека. В 2019 году человечество столкнулось с еще одним штаммом подрода Sarbecovirus, получившим название SARS-CoV-2 [6]. В данном разделе описываются основные детали строения и жизненного цикла представителей семейства Coronaviridae в целом и семи человеческих патогенов в частности.

СТРОЕНИЕ ВИРИОНА

Коронавирусы – это оболочечные, содержашие (+)-цепь РНК вирусы IV группы по классификации Балтимора [7]. Средний диаметр вирионов составляет 80-120 нм. Вирионы имеют сферическую форму с характерными шипами, формируемыми S-белком, которые напоминают солнечную корону. Схематичное строение вириона коронавируса приведено на рис. 1. Снаружи вирион покрыт суперкапсидом - производным клеточной мембраны с интегрированными вирусными белками. В суперкапсиде большинства коронавирусов человека можно обнаружить следующие вирусные белки: формирующий шип гликопротеин (S) взаимодействует с поверхностью хозяйской клетки и инициирует проникновение компонентов вириона внутрь нее; мембранный белок (М) обеспечивает взаимодействие компонентов вириона между собой, что важно для успешной сборки вирусных частиц [8], а также белок оболочки (Е), который формирует пентамерные трансмембранные каналы и выполняет роль виропорина [9]. Включение Е-белка в вирион не строго обязательно для образования инфекционных вирусных частиц, однако такие вирусы аттенуированы относительно вирусов дикого типа [8]. Вирусы НСоV-ОС43 и НСоV-НКU1 дополнительно содержат в составе оболочки белок гемагглютинин-эстеразу (НЕ), который разрушает рецептор S-белка и тем самым способствует более эффективному отпочковыванию новых вирионов [10].

Под внешней оболочкой расположен спирально-симметричный нуклеокапсид, состоящий из N-белка и геномной (+)-цепи РНК. N-белок связан с вирусной РНК и выполняет структурную функцию: упаковки и стабилизации вирусного генома. Кроме того, N-белок модулирует клеточный иммунный ответ хозяина на вирусную инфекцию [8], а также способствует более эффективному синтезу 3'-дистальных генов [12].

СТРОЕНИЕ ГЕНОМА

Геномная РНК коронавирусов не сегментирована, кепирована по 5'-концу и полиаденилирована по 3'-концу. Особенность генома Coronaviridae — рекордная для РНК-содержащих вирусов длина, около 26—32 тыс. оснований [13], в то время как средний размер одноцепочечных несегментированных РНК вирусов человека в среднем не превышает 10—12 тыс. оснований [14]. Предполагают, что увеличенный по сравнению с другими вирусами размер генома коронавирусов обусловлен наличием редактирующей активности в комплексе РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp), которая снижает мутационную нагрузку [15].

Принципиально весь геном коронавирусов можно разделить на две смысловые части. Первая содержит открытую рамку считывания (ORF) ORF1a/b, кодирующую белки, отвечающие главным образом за процессы репликации и транскрипции. Вторая часть кодирует структурные и вспомогательные белки, отвечающие за взаимодействие с поверхностью клетки и проникновение в нее, а также адаптацию к хозяину. Результаты сравнительного анализа последовательностей геномов различных коронавирусов подтверждают функциональное значение этого разделения: консервативность ORF1a/b выше среди коронавирусов, чем консервативность остальной части генома [16].

Число ORF в геноме отличается у разных видов коронавирусов и составляет от 6 до 11 [17]. Первая ORF, ORF1a/b, составляет около 2/3 генома и кодирует два полипротеина: pp1a и pp1ab. Полипротеин pp1ab образуется в результате рибосомного сдвига рамки считывания на один нуклеотид назад (-1) перед терминирующим кодоном ORF1a. В состав pp1a/pp1ab входят неструктурные белки (non-structural proteins, NSPs), ответственные за процессы репликации и транскрипции, подавление синтеза клеточных мPHK и модуляцию клеточного иммунного ответа [18].

При анализе большого массива данных выявлено, что многие NSPs одновременно выполняют несколько функций в репликативном цикле вируса, что позволяет вирусу справиться с широким спектром задач — от собственной репликации до противодействия клеточному иммунному ответу, - дополнительно не увеличивая геном [19-22]. В табл. 1 приведена актуальная информация о наиболее изученных функциях NSPs. Среди них можно выделить несколько функциональных блоков: белки. отвечающие за формирование RdRp-комплекса (NSP7-NSP16); белки, вовлеченные в образование двумембранных репликативных органелл (NSP3–NSP6), процессинг полипротеинов pp1a и pp1ab (NSP3, NSP5), а также в модуляцию клеточных процессов (NSP1, NSP2). Остальная часть генома кодирует необходимые структурные

белки: S, N, E, M, (HE), — а также ряд вспомогательных белков, характерных для каждого конкретного вида [23, 24]. Считается, что вспомогательные белки не обязательны для репликации вируса, хотя способствуют более эффективной сборке вирионов как за счет подавления внутриклеточного иммунитета, так и выполняя роль скаффолд-белков при сборке вирионов [25].

Схема строения генома представителей семейства Согопаviridae, инфицирующих человека, приведена на рис. 2. Стоит отметить, что для всех коронавирусов порядок следования генов структурных белков: ORF1a/b \rightarrow S \rightarrow E \rightarrow M \rightarrow N консервативен, но, по-видимому, не несет функциональной нагрузки, так как при их перестановке инфекционность полученных вирусов не изменялась [46].

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ

Проникновение в клетку

Жизненный шикл коронавирусов начинается со связывания вириона с рецепторами на поверхности клетки-хозяина (рис. 3). Ключевую роль в этом процессе играет вирусный поверхностный гликопротеин S. Именно этот белок, изменчивость которого выше, чем других вирусных белков [16], определяет видовой и тканевой тропизм патогена. Со стороны клетки во взаимодействии с вирусными частицами принимают участие различные поверхностные компоненты [47]. Коронавирус HCoV-229Е в качестве рецептора использует аминопептидазу N (ANPEP). Это металлопротеиназа, представленная на поверхности эпителиальных клеток кишечника, легких и почек. В кишечнике этот фермент участвует в гидролизе пептидов, образующихся под действием желудочных и панкреатических протеаз. Функция ANPEP в легких и почках установлена не до конца – скорее всего, она метаболизирует различные регуляторные пептиды [48]. Для вируса HCoV-NL63 ситуация с клеточными рецепторами неоднозначна. Показано, что S-белок этого вируса взаимодействует с ангиотензинконвертирующим ферментом-2 (ACE2) [49], а М-белок связывается с гепарансульфатированными белками на поверхности клеток [50]. Это взаимодействие Мбелка может быть вспомогательным фактором для проникновения вируса или повышать локальную концентрацию вируса на поверхности клетки. При направленном удалении S-белка из состава исследуемых вирионов они сохраняли способность инфицировать клетки, даже в условиях заблокированного антителами АСЕ2, из чего можно сделать вывод о существовании альтернативных путей проникновения HCoV-NL63 в клетку, например через вышеуказанное взаимодействие М-белка с гепарансульфатированными

Название белка	Основные функции			
NSP1	Подавляет трансляцию клеточных мРНК, связываясь с 18S рРНК 40S субчастицы рибосомы [26]; способствует разрезанию клеточных мРНК в районе 5'UTR [27]			
NSP2	Возможно, регулирует сигнальные пути выживания клетки; взаимодействует с клеточными бел- ками prohibitin 1 и prohibitin 2 [28]; не обязателен для успешной инфекции [29]			
NSP3	Осуществляет процессинг pp1a и pp1ab, а именно NSP1–NSP4, за счет наличия домена папаин- подобной протеазы-2 [30]; компонент поры в двумембранных органеллах, осуществляющей экс- порт вирусных геномных и субгеномных РНК в цитоплазму [31]; обладает деубиквитинирующей активностью; отщепляет от белков моно-ADP-рибозу, подавляя клеточный интерфероновый ответ [30]			
NSP4	Участвует в образовании двумембранных репликативных органелл [32]			
NSP5	3-химотрипсинподобная протеаза, осуществляет процессинг pp1a и pp1ab, а именно, NSP4–NSP11/ NSP4–NSP16 [33]			
NSP6	Предотвращает слияние везикул, содержащих вирусные белки, с лизосомами; участвует в образовании двумембранных репликативных органелл [34]			
NSP7	Формирует гексадекамерный комплекс с NSP8, который, вероятно, функционирует как фактор процессивности [35] и праймаза [36, 37]			
NSP8	Формирует гексадекамерный комплекс с NSP7, который, вероятно, функционирует как фактор процессивности [35] и праймаза [36, 37]; подавляет встраивание белков в клеточную мембрану, формируя комплекс с 7SL PHK сигналраспознающих частиц (signal recognition particle, SRP) и 28S pPHK [26]			
NSP9	Подавляет встраивание белков в клеточную мембрану, формируя комплекс с 7SL PHK SRP [26]; компонент PHK-полимеразного комплекса [19]			
NSP10	Важен для синтеза (–)-цепи РНК в процессе вирусной репликации [38]; вовлечен в процессинг pp1a/ab [39]; регулирует активность компонентов RdRp-комплекса: NSP14 и NSP16 [40, 41]			
NSP11	Короткий пептид, который образуется при процессинге pp1a. Функции неизвестны [19]			
NSP12	Компонент RdRp, обладающий полимеразной активностью [19]			
NSP13	Обладает хеликазной активностью [42]			
NSP14	Способствует повышению точности синтеза вирусной РНК за счет наличия редактирующей 3' → 5'-экзонуклеазной активности [43]; участвует в 5'-кепировании вирусной РНК, обладает N7-метилтрансферазной активностью [44]			
NSP15	Подавляет активацию клеточных сенсоров двухцепочечных РНК (дцРНК); обладает функционально значимой эндорибонуклеазной активностью, хотя точный механизм неизвестен [45]			
NSP16	Нарушает сплайсинг, связываясь с U1/U2 малой ядерной РНК [26]; участвует в 5'-кепировании вирусной РНК, обладает 2'-О-метилтрансферазной активностью [40]			

Таблица 1. Функции неструктурных белков коронавирусов

белками [50]. Вирусы HCoV-OC43 и HCoV-HKU1 в качестве рецептора используют гликопротеины, содержащие 9-О-ацетилированную нейраминовую кислоту [25]. Эти же вирусы, как упоминалось ранее, имеют в своем составе белок гемагглютинин-эстеразу, которая способствует более эффективному взаимодействию с клеточной поверхностью и отпочковыванию новых вирусных частиц от зараженной клетки [51]. MERS-CoV в качестве рецептора использует дипептидилпептидазу-4 (DPP4) — поверхностный димерный белок, который в норме процессирует гормоны и хемокины [52]. SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 в качестве основного рецептора используют ACE2 [25], хотя SARS-CoV-2 в качестве кофактора также использует гепарансульфатированные белки: взаимодействие с ними вызывает конформационные перестройки в S-белке, которые способствуют его более эффективному связыванию с ACE2 [53].

После связывания с рецептором S-белок под действием поверхностных клеточных протеаз про-



Рис. 2. Схематичное строение геномов коронавирусов, циркулирующих в популяции человека. На схеме справа прописными буквами указаны кодируемые вирусные белки, цифрами и строчными буквами – номера вирусспецифичных ORF. UTR – нетранслируемая область. Цифрами слева обозначены номера закодированных NSPs.

цессируется и претерпевает конформационные перестройки, осуществляя слияние вирусной и клеточной мембран. Такой способ проникновения называется ранним. В случае, если поверхностные протеазы по какой-либо причине недоступны, активируется поздний путь проникновения в клетку. В этом случае вирус сначала подвергается эндоцитозу. В эндосоме, под действием пониженного pH, активируется клеточная протеаза катепсин L, которая подвергает S-белок протеолизу, вызывая слияние вирусной и эндосомной мембран [55]. После этого вирусный нуклеокапсид, состоящий из геномной PHK и N-белка, оказывается в цитоплазме и начинаются процессы вирусной транскрипции и репликации.

Репликация и транскрипция

Как упомянуто выше, РНК коронавируса содержит большое число ORF (от 6 до 11) [24], что приводит к проблеме в трансляции 3'-дистальных генов. Коронавирусы решают эту задачу за счет образования субгеномных РНК [56, 57]. Среди (+)РНК-вирусов встречаются два основных механизма их синтеза: за счет наличия в геноме последовательностей внутренней посадки RdRp (сем. Caliciviridae, сем. Bromoviridae, сем. Virgaviridae, сем. Togaviridae) или сайтов преждевременной терминации транскрипции (сем. Nodaviridae, сем. Togaviridae, сем. Roniviridae, сем. Tombusviridae) (рис. $4a, \delta$) [58]. Однако в случае коронавирусов процесс синтеза субгеномных РНК носит прерывистый характер [40, 41, 43]: в процессе синтеза (-)-цепи РНК RdRp-комплекс диссоциирует от (+)РНК-матрицы в определенных сайтах, связывается в регионе 5'UTR и продолжает синтез РНК (рис. 46) [59]. Позиции диссоциации и последующего связывания RdRp определяются последовательностями, регулирующими транскрипцию (transcription regulation sequence, TRS). В некоторых случаях "перескок" RdRp возможен при синтезе (+)РНК-цепи: в этом случае RdRp диссоциирует от TRS, расположенной в 5' UTR, и вновь гибридизуется с TRS перед началом белоккодирующей последовательности (рис. 4б) [60]. Полученные в процессе прерывистой транскрипции укороченные РНК служат матрицей для последующей трансляции вирусных белков. Интересно, что именно процесс прерывистой транскрипции позволяет вирусу использовать специфичные механизмы подавления клеточной трансляции, не влияя на трансляцию вирусных мРНК. Считается, что наличие лидерной последовательности в составе всех вирусных мРНК защищает их от деградации NSP1-белком, в то время как клеточные мРНК разрезаются им вблизи 5'-конца [56]. В случае, если RdRp-комплекс в процессе удлинения цепи РНК не диссоциирует, происходит синтез полноразмерной цепи РНК, комплементарной геномной, а на ее матрице синтезируются геномные (+)РНК, которые используются для сборки новых вирусных частиц и синтеза полипротеинов pp1a и pp1ab. Показано, что активный синтез вирусных белков начинается уже через пять часов после инфекции [61]. Одновременно с этим существенно повышается содержание вирусных РНК в клетке, что обусловлено не только репликацией и прерывистой транскрипцией, но



Рис. 3. Схема жизненного цикла вирусов сем. Coronaviridae. Инфекция начинается со связывания вирусной частицы с рецептором на поверхности клетки-хозяина, что приводит к слиянию вирусной и клеточной мембран (ранний путь проникновения) или захвату вирионов в состав эндосом и последующему слиянию вирусной и клеточной мембраны (поздний путь проникновения). Вирусная PHK в комплексе с N-белком проникает в цитоплазму. В результате трансляции первой открытой рамки считывания ORF1a/b образуются полипротеины pp1a и pp1ab, которые подвергаются автопротеолизу с образованием NSPs. Из NSPs формируется комплексе RdRp, который осуществляет репликацию и транскрипцию вирусной PHK. Этот процесс происходит в двумембранных органеллах, которые образуются из шеро-ховатого эндоплазматического ретикулума под действием компонентов pp1a и pp1ab. В процессе репликации/транскрипции образуются полноразмерные и субгеномные вирусные PHK. С субгеномных PHK транслируются структурные и вспомогательные белки. Структурные белки собираются в интермедиат между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи (ERGIC) и вместе с комплексом из N-белка и геномной вирусной PHK формируют вирионы. Собранные вирионы накапливаются во внутриклеточных везикулах, а затем выходят из зараженной клетки за счет экзоцитоза [модифицировано из работы 54].



Рис. 4. Схематичное изображение стратегий синтеза субгеномных РНК коронавирусов. *a* – Модель внутренней инициации. IBS – внутренний сайт посадки RdRp. *б* – Модель преждевременной терминации транскрипции. Терминация может происходить как во время синтеза (+)-цепи, так и во время синтеза (-)-цепи РНК. PTS – сайт преждевременной терминации RdRp. *в* – Модель прерывистой транскрипции. Прерывание может происходить как во время синтеза (+)-цепи, так и во время синтеза (-)-цепи РНК [58]. LS – лидерная последовательность; TRS – последовательность, регулирующая транскрипцию; L-TRS – лидерная TRS; B-TRS – TRS кодирующей части.

и подавлением синтеза клеточных мРНК вирусным белком NSP1 [62].

Сборка вириона и отпочковывание

Отличительная черта репликативного цикла коронавирусов – место сборки вирионов. Сборка большей части оболочечных вирусов происходит в плазматической мембране клетки; в то время как вирионы коронавирусов собираются в компартменте, переходном между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи (endoplasmic-reticulum–Golgi intermediate compartment, ERGIC). Показано, что после трансляции структурные белки S, M, E и N аккумулируются в ERGIC [63]. Ге-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

номная (+) PHK связывается с N-белком, формируя нуклеокапсид. В узнавании специального сигнала упаковки генома (раскаде sequence, PS) в составе PHK участвует M-белок [64]. Способность N-белка узнавать PS зависит от вида вируса: например, упаковка геномной PHK мышиного коронавируса (mouse hepatitis virus, MHV) происходит по N-независимому механизму [65], а упаковка генома SARS-CoV-1 – по N-зависимому [66]. Сигнал упаковки находится в пределах ORF1a/b, что обеспечивает включение в вирион только полноразмерных PHK [67, 68].

Центром сборки новых вирусных частиц выступает М-белок, который взаимодействует с белками S, N и E и геномной (+)PHK [69]. После того, как белки M, S, E и комплекс N-белка с PHK оказываются в ERGIC, собираются и отпочковываются зрелые вирусные частицы. Собранные вирионы накапливаются во внутриклеточных везикулах, которые, в свою очередь, высвобождаются во внеклеточное пространство в результате экзоцитоза или лизиса зараженной клетки [70].

СИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕПЛИКАЦИИ КОРОНАВИРУСОВ

Успех в изучении высокопатогенных вирусов, к которым относятся некоторые коронавирусы, и в поиске потенциальных препаратов для их терапии зависит от развития технологий, позволяющих манипуляции с вирусами и в частности с их геномом. Традиционно для изучения вирусной репликации используют полноразмерные вирусные системы, то есть инфекционные вирусные частины. К преимуществам таких систем можно отнести максимальное соответствие реальным условиям заражения. Во время инфекции вирусные белки контактируют между собой и со множеством клеточных факторов, формируя сложные сети белковых взаимодействий, которые реализуются в указанных системах. Однако применение инфекционных вирусов сопряжено с высоким риском инфицирования оператора, поэтому работа с ними допускается лишь в сертифицированных лабораториях, оснащенных соответствующим оборудованием. Более того, в случае РНК-содержащих вирусов при работе с полноразмерными вирусными системами лостаточно сложно получать варианты вирусов, мутантных по исследуемым генам. В случае коронавирусов манипуляции с их геномами крайне затруднены еще и большим размеров их геномных РНК, который, как указано выше, варьирует от 26 до 32 тыс. оснований [13]. В этой связи большое внимание уделяется как модификации полноразмерных вирусных систем. так и разработке более простых и безопасных систем, позволяющих изучать отдельные этапы жизненного цикла коронавирусов и проводить поиск их ингибиторов. Далее мы подробно рассмотрим существующие на данный момент варианты модифицированных полноразмерных вирусных систем, при работе с которыми можно получать вирусные РНК, содержащие необходимые мутации, а также более безопасные, чем вирусы дикого типа, хотя зачастую и менее информативные псевдовирусные системы и репликоны.

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛНОРАЗМЕРНЫЕ ВИРУСНЫЕ СИСТЕМЫ

Для получения различным образом измененного вирусного генома коронавирусов применяют два подхода: непосредственная модификация геномной РНК (defective interfering RNA, DI-PHK) или получение кДНК, содержащей необходимые модификации, которую затем используют для синтеза геномной РНК и последующей сборки вирусных частиц.

DI-PHK-системы

Исторически изучение механизмов репликации коронавирусов начиналось с использования вирусных DI-PHK, содержащих лишь части вирусного генома: регуляторные вирусные последовательности, необходимые для поддержания репликации РНК, и последовательности, кодирующие части вирусных белков. Такие РНК способны реплицироваться, но исключительно в клетках, инфицированных соответствующим коронавирусом, а в ряде случаев и упаковываться в неинфекционные вирусоподобные частицы (VLP) [67, 71, 72] (рис. 5). Таким образом можно получать новые варианты вирусных частиц, несущих необходимые модификации. DI-PHK могут также содержать репортерный ген и, если происходит репликация и транскрипция генома, с помощью таких систем можно оценивать эффективность работы вирусных ферментов. Это одни из первых и наиболее примитивных систем, с помощью которых был получен большой массив данных о механизмах репликации и упаковки коронавирусных геномов. Например, с помощью DI-PHK были определены сигналы упаковки МНV [73-75], вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней (transmissible gastroenteritis virus, TGEV) [67] и SARS-CoV-2 [68]. Для МНУ в этой системе продемонстрировано взаимодействие М-белка с РЅ РНК [64]. На примере SARS-CoV-2 показано, что при трансфекции зараженных вирусом клеток дефектной РНК она начинает активно реплицироваться и включаться в вирионы, что приводит к снижению пролукции инфекционных вирусных частиц приблизительно вдвое через 24 ч после введения DI-PHK. На основании этих данных было сделано предположение, что DI-PHK можно использовать в качестве терапевтического агента для снижения вирусной нагрузки [68].

Инфекционная кДНК, встроенная в искусственную бактериальную хромосому

Развитие методов молекулярного клонирования позволило собирать полноразмерные вирусные кДНК по частям. Впервые полноразмерная кДНК коронавирусного генома была получена для TGEV методом клонирования в искусственную бактериальную хромосому (bacterial artificial chromosome, BAC) [76]. В составе BAC вирусная кДНК находилась под контролем цитомегаловирусного (CMV) промотора, а с 3'-конца была



Рис. 5. Принцип работы DI-PHK-систем. В зараженных коронавирусом клетках DI-PHK может включаться в вирион (1), и/или реплицироваться (2), и/или экспрессировать репортерные белки (3) в присутствии вирусных белков, экспрессируемых с геномной PHK коронавируса.

ограничена поли(А)-участком, последовательностью рибозима вируса гепатита дельта (HDV) и терминатором транскрипции BGH (рис. 6*a*). Рибозим HDV катализирует разрыв цепи РНК между последним нуклеотидом генома коронавируса и первым нуклеотидом рибозима, что позволяет получить РНК, содержащую 3'-концевую последовательность, полностью идентичную вирусной [77]. Подобное соответствие необходимо в силу того, что 3'UTR последовательность коронавирусов крайне важна для успешной репликации и транскрипции вирусной РНК [78]. После трансфекции ВАС в клетках синтезируется полногеномная вирусная РНК и белки, которые собираются в инфекционные вирусные частицы. Использование ВАС для работы с кДНК коронавирусных геномов обладает рядом преимуществ. Во-первых, становится возможным эффективно наработать неограниченное количество необходимой кДНК в Escherichia coli. Во-вторых, можно с высокой эффективностью трансфицировать клетки млекопитающих этой бактериальной хромосомой, что позволяет осуществлять внутриклеточную экспрессию вирусной РНК и не прибегать к более сложным методикам ее получения, например in vitro транскрипции. В-третьих, последовательность ВАС относительно легко модифицировать, используя Red-рекомбиназу и эндонуклеазу рестрикции I-SceI, что позволяет вносить изменения в изучаемые гены вируса [79].

В последующем подход клонирования вирусной кДНК в ВАС, помимо TGEV, был применен для создания инфекционных клонов человеческих патогенов: HCoV-OC43 [80], MERS-CoV [81], SARS-CoV-1 [82] и SARS-CoV-2 [83] (табл. 2).

Инфекционная кДНК, полученная с помощью TAR-клонирования

Ассоциированная с трансформацией рекомбинация (transformation-associated recombination, TAR) – метод клонирования, использующий особенность клеток Saccharomyces cerevisiae, в которых с высокой частотой происходит гомологичная рекомбинация перекрывающихся фрагментов ДНК (рис. 6б) [91]. Использование клеток дрожжей для получения и наработки полноразмерных коронавирусных кДНК обладает рядом преимуществ перед бактериальной системой. Вопервых, длинные последовательности ДНК в целом менее стабильны в бактериях, чем в дрожжах. Во-вторых, показано, что фрагменты последовательности гена, кодирующего ORF1a/b, могут быть токсичны для бактерий [76]. В-третьих, высокая эффективность TAR-клонирования позволяет быстро и без большого труда внести мутации в геном вируса: для этого достаточно всего лишь внести изменения в один или несколько трансформируемых фрагментов. Этот метод был использован для сборки и модификации длинных геномов ДНК-вирусов: СМV (размер генома ~236 т.п.н.) [92, 93] и вируса простого герпеса (размер генома ~152 т.п.н.) [94, 95]. Из человеческих патогенов из семейства Coronaviridae методом TAR-клонирования были получены кДНК геномов MERS-CoV, HCoV-229E, HCoV-HKU1 и SARS-CoV-2 (табл. 2) [84]. Заметим, что этим методом кДНК SARS-CoV-2 была получена всего за два месяца [84].



Рис. 6. Схема получения полноразмерной вирусной кДНК с использованием искусственной бактериальной хромосомы (*a*), метода ТАR-клонирования (*б*), метода *in vitro* лигирования (*в*) или с использованием рекомбинантных поксвирусов (*г*). СМV – промотор цитомегаловируса; рА – поли(А)-хвост; Rz – рибозим HDV; MCS – полилинкер.

ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫЕ СИСТЕМЫ

Вирус	Метод получения кДНК				
	BAC	TAR-клонирование	лигирование in vitro	поксвирусные векторы	
HCoV-OC43	+ [80] ^a	_	—	_	
HCoV-229E	—	+ [84]	-	+ [85]	
HCoV-NL63	—	—	+ [86]	—	
HCoV-HKU1	—	+ [84]	-	—	
MERS-CoV	+ [81]	+ [84]	+ [87]	—	
SARS-CoV-1	+ [82]	_	+ [88]	+ [89]	
SARS-CoV-2	+ [83]	+ [84]	+ [90]	_	

Таблица 2. Способы получения полноразмерных кДНК коронавирусов, способных инфицировать человека

^а В квадратных скобках указан первоисточник.

Инфекционная кДНК, полученная in vitro лигированием

Еще один подход к получению геномов коронавирусов — сборка полноразмерной вирусной кДНК из фрагментов меньшего размера, которые фланкированы уникальными сайтами рестрикции. В качестве таких сайтов могут быть использованы последовательности, узнаваемые эндонуклеазами рестрикции I или III типа. В последнем случае после лигирования теряются сайты рестрикции, в связи с чем становится невозможной дальнейшая модификация уже полученной кДНК, так как сайт узнавания и сайт внесения разрыва в случае эндонуклеаз рестрикции III типа разнесены в пространстве. Для in vitro лигирования можно использовать как сайты рестрикции, которые уже существуют в исследуемом геноме, так и искусственно созданные. В этом случае сайты рестрикции вводят при помощи синонимичных замен, которые не изменяют аминокислотную последовательность вирусных белков. Также в ходе подготовки кДНК в начало собираемого таким образом генома вводится последовательность Т7-промотора, необходимая для наработки РНК в бесклеточной системе с использование Т7-РНК-полимеразы [88, 96] (рис. 6в). Полученная геномная РНК доставляется в целевые клетки трансфекцией или электропорацией, после чего в них идут процессы вирусной транскрипции и репликации, а также сборки инфекционных вирусных частиц. К недостаткам этого метода можно отнести необходимость в некоторых случаях изменять нативную нуклеотидную последовательность вирусного генома для введения дополнительных сайтов для эндонуклеаз рестрикции или для удаления случайных последовательностей Т7-терминатора, встречающихся в геноме коронавирусов. Однако использование эндонуклеаз рестрикции III типа, которые узнают ассиметричные последовательности ДНК и делают разрезы на определенном расстоянии от сайта посадки, позволяет минимизировать необходимость введения синонимичных замен. Несомненным плюсом такого подхода считается возможность фрагментировать вирусный геном таким образом, чтобы разбить на отдельные фрагменты гены белков, которые проявляют токсичность при наработке в бактериях. С использованием *in vitro* лигирования получены полноразмерные кДНК коронавирусов человека HCoV-NL63 [86], SARS-CoV-1 [88], MERS-CoV [87] и SARS-CoV-2 [90] (табл. 2).

Инфекционная кДНК, полученная с использованием векторов на основе поксвирусов

Альтернативной стратегий для получения и модификации инфекционных кДНК может быть использование векторов на основе вируса осповакцины (сем. Poxviridae). Полноразмерную кДНК коронавирусов, размер которой порядка 30 т.п.н., можно легко нарабатывать в составе генома вируса осповакцины, имеющего экстремально большой размер (около 200 т.п.н.). В рамках этого подхода на первом этапе с помощью in vitro лигирования перекрывающихся фрагментов кДНК коронавируса получают полноразмерную кДНК, которую после стадии очистки встраивают в поксвирусный вектор (рис. 6г). Однако в некоторых случаях возможно клонирование нескольких больших фрагментов кДНК в отдельные векторы [85]. Например, в случае получения кДНК SARS-CoV-1 из восьми исходных фрагментов получили два поксвирусных вектора, которые содержали в себе фрагменты 1-20288 и 20272-29727 генома SARS-CoV-1; причем в состав первого вектора также входила последовательность Т7-промотора. После этого проводили еще одно in vitro лигирование ДНК полученных рекомбинантных вирусов с последующей in vitro транскрипцией и трансфекцией эукариотических клеток наработанной РНК с целью получения полноценных инфекционных вирусных частиц SARS-CoV-1 [89]. Введение дополнительного этапа с использованием поксвирусных векторов, хотя и усложняет описанный подход *in vitro* лигирования, все же имеет ряд преимуществ. Так, геномы рекомбинантных поксвирусов стабильны, эффективно реплицируются в клеточных культурах, что позволяет преодолеть проблему токсичности некоторых коронавирусных последовательностей для бактерий [97]. Важно также, что есть подходы, позволяющие эффективно вносить мутации в геном рекомбинантных поксвирусов с помощью гомологичной рекомбинации, и это открывает широкие возможности для модификации изучаемых вирусных генов. С использованием рекомбинантных поксвирусов получены кДНК коронавирусов HCoV-229E [85] и SARS-CoV-1 [89] (табл. 2). Однако этот подход достаточно сложен и, возможно, именно этим можно объяснить отсутствие статей, в которых используются векторы на основе поксвирусов для получения полноразмерной кДНК SARS-CoV-2.

ПСЕВДОВИРУСНЫЕ СИСТЕМЫ

В качестве альтернативы полноразмерным вирусам в исследованиях часто используют так называемые псевдовирусы. Псевдовирусы, они же VLP, - это репликативно некомпетентные варианты исходных вирусов. В общем виде псевдовирусная система состоит как минимум из двух фрагментов ДНК: один кодирует вирусный геном, из состава которого удален один или несколько генов важных структурных вирусных белков, а вместо него встроен репортерный ген, позволяющий в клетках оценивать эффекты воздействий на вирусную репликацию; второй фрагмент ДНК кодирует недостающий сегмент генома. Совместная экспрессия двух фрагментов в специальных упаковывающих клетках приводит к сборке вирусных частиц, способных инфицировать целевые клетки и воспроизводить отдельные этапы жизненного цикла коронавирусов, но неспособных продуцировать новые вирусные частицы в трансдуцированных клетках, так как они содержат в своем составе укороченный геном. Несомненное и главное преимущество псевдовирусов заключается в их безопасности: для работы с ними не требуется специальных разрешений и соблюдения соответствующих уровней защиты.

Псевдовирусы используют как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях. В настоящее время уже разработаны противовирусные вакцины на основе VLP (см. в обзоре [98]). Их также используют в качестве векторов для таргетной доставки лекарств и генной терапии [99], в качестве положительного контроля в различных тест-системах для диагностики вирусных инфекций [100], как модели для исследования различных этапов жизненного цикла вируса в условиях, приближенных к физиологическим.

Для патогенов из семейства Coronaviridae paзработано много разнообразных псевдовирусных систем. Большая часть работ, в которых используются VLP, посвящена изучению различных аспектов строения коронавирусов, а также механизмов проникновения вирионов в клетку и отпочковывания от нее. Пионерские исследования были проведены на MHV [101]. Показано, что для сборки и эффективного отпочковывания псевдовирусных частиц необходима экспрессия всего двух вирусных белков: М и Е. S-белок, хотя и включался в состав VLP, не был необходим для продукции вирусных частиц. Удивительным было то, что N-белок не только не влиял на сборку псевдовирусных частиц, но и не включался в их состав при коэкспрессии с М- и Е-белками [65]. Стоит заметить, что столь необычные результаты согласуются с данными о том, что сигнал упаковки геномной РНК МНУ взаимодействует с М-, а не с N-белком [64]. VLP также были получены для HCoV-NL63. Минимальный набор структурных белков для формирования псевдовирусов и в этом случае включал только М-и Е-белки [102]. В случае SARS-CoV-1 данные о минимальном наборе белков для формирования псевдовирусных частиц весьма противоречивы. Согласно одному из исследований, для формирования в клетке псевдовирусных частиц необходима экспрессия двух белков: М и N. Однако эффективное отпочковывание псевдовирусов происходило лишь при коэкспрессии уже трех белков: S, M и N. Белок E, несмотря на включение в VLP при коэкспрессии с М- и N-белками, не был необходим для формирования псевдовирусов [103]. Согласно другому исследованию, для эффективной сборки и отпочковывания псевдовирусов на основе SARS-CoV-1 необходима экспрессия белков М, Е и N [104]. Подобная разница, вероятно, связана с различиями в используемых упаковочных клетках: НЕК-293 и Vero E6 соответственно. В случае SARS-CoV-2 для сборки VLP в клетках линии HEK-293T необходимы белки М, S и E [105]. Интересно, но для SARS-CoV-2 также наблюдаются различия в сборке VLP в клетках линий НЕК-293Т и Vero E6: при коэкспрессии белков S, E, M и N в клетках Vero E6 S-белок более эффективно включался в состав VLP, чем в клетках НЕК-293Т [106].

Меньшее число работ посвящено созданию VLP для изучения амплификации и транскрипции PHK коронавирусов. Например, для SARS-CoV-2 разработана специальная клеточная система, которая позволяет исследовать многие фундаментальные аспекты биологии вируса [107]. В рамках этой работы ген N-белка в геноме SARS-CoV-2 заменяли на ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). Для сборки VLP N-белок был экспрессирован эктопически в клетках-упаковщиках. В результате такого подхода VLP не могут нарабатываться в клетках, не экспрессирующих N-

белок. Культивирование клеток-упаковщиков, экспрессирующих N-белок, в течение месяца не приводило к актам рекомбинации, способствующим образованию полноразмерного генома SARS-CoV-2 и продукции инфекционных вирусов, что подтверждает безопасность таких систем. Тем не менее, были предложены дальнейшие меры по повышению безопасности созданной псевдовирусной системы. Для этого ген N-белка "разбили" на две части и "разнесли" по разным векторам. Полноценный N-белок образовывался в результате опосредованного интеином белкового сплайсинга [107]. Созданные псевдовирусные частицы могут быть использованы для самого широкого круга задач: фундаментального исследования биологии SARS-CoV-2, скрининга потенциальных ингибиторов проникновения, транскрипции и репликации вируса, создания вакцин и детекции нейтрализующих антител у пациентов. Благодаря использованию этой системы, уже удалось многое узнать о SARS-CoV-2. Так, обнаружено, что Nбелок контактирует с компонентами клеточных стресс-гранул G3BP1 и G3BP2, а также найдены потенциальные ингибиторы репликации этого вируса [107].

Использование псевдовирусов на основе сем. Coronaviridae имеет важное практическое приложение. Большое число работ посвящено разработке вакцин на основе VLP [102, 106-108]. На основе нейротропного коронавируса HCoV-229E [109] создан VLP вектор, способный трансдуцировать дендритные клетки человека [110]. РНК созданного псевдовируса кодирует полный ген ORF1a/b, а также три репортерных гена, которые впоследствии можно заменить на целевые. За счет прерывистой транскрипции все три гена могут быть экспрессированы в трансдуцированных клетках. Уникальность созданного вектора заключается в том, что в его состав помещают сразу несколько репортерных генов и суммарная длина генома составляет около 6 т.п.н. Однако такая система имеет и существенный недостаток: помимо целевых генов происходит экспрессия всего полипротеина pp1a/ab, некоторые фрагменты которого проявляют цитотоксичность [110].

РЕПЛИКОНЫ

Репликоны — это самоподдерживающиеся РНК, содержащие все регуляторные элементы вирусного генома. При наличии вирусных неструктурных белков, обеспечивающих вирусную репликацию и транскрипцию, с репликонов синтезируются новые молекулы РНК [111]. Необходимые неструктурные белки могут быть закодированы в самом репликоне или экспрессироваться в клетке с дополнительных векторов. Репликоны не содержат структурных белков и не продуцируют инфекционных вирусных частиц, поэтому представляют собой безопасную альтернативу полноразмерным вирусным системам. Часто в составе репликонов закодированы репортерные гены, что позволяет относительно легко оценивать эффективность синтеза РНК в соответствующих условиях. Для изучения отдельных этапов жизненного цикла коронавирусов, в том числе репликации генома, транскрипции, трансляции, хорошо подходят и псевдовирусы, но тем не менее именно репликоны широко используют в подобного рода исследованиях, поскольку они намного проще в обращении и еще более безопасны, чем VLP, хотя и менее приближены к условиям реальной инфекции.

Принципиально все репликоны коронавирусов устроены одинаково: 5'- и 3'-концевые последовательности репликонов полностью совпадают соответственно с 5'- и 3'UTR коронавирусов. При изучении прерывистой транскрипции внутри репликона помещают последовательность, соответствующую межгенному участку исследуемого коронавируса и регулирующую процесс перескока RdRp-комплекса [112–118]. Как видно из рис. 7, в подавляющем большинстве случаев репликоны содержат большую рамку считывания ORF1a и 1b, которая кодирует неструктурные белки, участвующие в репликации вирусной РНК, а также последовательность гена белка N, необходимого для эффективного синтеза вирусных РНК [119, 120]. В состав репликонов на место генов разных структурных белков вируса часто встраивают гены белков-репортеров. Такие репортеры находятся под контролем вирусных регуляторных последовательностей TRS, взятых от генов соответствующих структурных белков TRS-S (от белка S), TRS-N (от белка N) и TRS-М (от белка М). В случае минимальных репликонов (рис. 73), не кодирующих pp1a/b и N-белок, вирусные белки, обеспечивающие репликацию/транскрипцию, необходимо экспрессировать в исследуемых клетках с дополнительных векторов.

Репликоны часто используются для высокопроизводительного скрининга ингибиторов вирусной репликации и транскрипции [81, 112, 113, 115, 117, 118, 121-125]. Репликоны на основе SARS-CoV-1 нашли применение при тестировании ингибиторов вирусных протеаз 3CL^{pro} и PL^{pro}, хеликазы и сдвига рамки считывания при трансляции [126–128]. При проведении скрининга в некоторых исследованиях получали стабильные репликонсодержащие клеточные линии, для чего помимо репортерных генов в репликон встраивали ген устойчивости к антибиотику – чаще всего к бластицидину и зеоцину [115, 123]. С помощью репликонов удобно оценивать влияние экспрессии различных белков на процессы репликации и транскрипции вирусного генома. Использование репликонов позволяет достоверно показать, что тот или иной эффект на жизненный цикл вируса



Рис. 7. Основные структурные элементы репликонов коронавирусов. a — Схема строения генома SARS-CoV-2 (приведена в качестве референсной структуры). δ —3 — Структура различных репликонов [112—118]; в репликоне всегда закодированы регуляторные элементы (5'UTR, 3'UTR, TRS), компоненты pp1a/b отсутствуют только в составе минимальных репликонов (3) [118]. Тело репликона может находиться под контролем либо T7-промотора, либо клеточного промотора. В первом случае можно проводить как *in vitro* транскрипцию с последующей трансфекцией клеток наработанной PHK, так и трансфицировать клетки ДНК-конструкцией при параллельной экспрессии T7 PHK-полимеразы [112—118]. На схеме буквами указаны кодируемые белки. Красной чертой обозначены TRS. GFP — зеленый флуоресцентный белок; LUC — люцифераза; BSD — белок устойчивости к бластицидину; NEO — белок устойчивости к неомицину; IRES — участок внутренней посадки рибосомы.

связан именно с влиянием на процессы репликации/транскрипции, а не сборки и отпочковывания вириона. Например, с помощью репликонов J.-M. Wang и соавт. [117] показали, что для эффективной репликации PHK SARS-CoV-1 необходима экспрессия NSP16, но не NSP1 и NSP2. А недавно Y. Luo и др. [118] обнаружили, что в присутствии продукта экспрессии с ORF6 значительно повышается эффективность репликации PHK SARS-CoV-2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном обзоре мы попытались систематизировать данные по разработанным к настоящему времени генно-инженерным системам для изучения патогенов человека из семейства Coronaviridae. Для каждого подхода приведены примеры возможного использования, обозначены достоинства и недостатки каждой системы. Мы не можем претендовать на полный охват всех используемых для изучения коронавирусов систем и полученных с их помощью результатов, поскольку исследования коронавирусов, и в первую очередь SARS-CoV-2, активно развиваются во всем мире и каждый день появляются новые ланные по механизмам патогенеза новой коронавирусной инфекции, ингибиторам репликации SARS-CoV-2, разрабатываемым лекарственным средствам и вакцинам. Надеемся, что приведенные в обзоре данные заинтересуют тех, кто занимается исследованием коронавирусов, и сориентируют их в выборе именно той системы, которая подходит для решения конкретной научной задачи.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-60216_вирусы.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все иллюстрации были созданы с помощью программного обеспечения BioRender.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Yin Y., Wunderink R.G. (2018) MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirology*. **23**, 130–137.
- Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.-M., Wang W., Song Z.-G., Hu Y., Tao Z.-W., Tian J.-H., Pei Y.-Y., Yuan M.-L., Zhang Y.-L., Dai F.-H., Liu Y., Wang Q.-M., Zheng J.-J., Xu L., Holmes E.C., Zhang Y.-Z. (2020) A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 579, 265–269.
- 3. Rothe C., Schunk M., Sothmann P., Bretzel G., Froeschl G., Wallrauch C., Zimmer T., Thiel V.,

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

Janke C., Guggemos W., Seilmaier M., Drosten C., Vollmar P., Zwirglmaier K., Zange S., Wölfel R., Hoelscher M. (2020) Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. *N. Engl. J. Med.* **382**, 970–971.

- Perez-Saez J., Lauer S.A., Kaiser L., Regard S., Delaporte E., Guessous I., Stringhini S., Azman A.S., Serocov-POP Study Group. (2021) Serology-informed estimates of SARS-CoV-2 infection fatality risk in Geneva, Switzerland. *Lancet Infect. Dis.* 21, e69–e70.
- Rebello C. J., Kirwan J.P., Greenway F.L. (2020) Obesity, the most common comorbidity in SARS-CoV-2: is leptin the link? *Int. J. Obes.* (Lond.). 44, 1810–1817.
- 6. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (2020) The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* **5**, 536–544.
- 7. Baltimore D. (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* **35**, 235–241.
- 8. Schoeman D., Fielding B.C. (2019) Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol. J.* **16**, 69.
- 9. Sarkar M., Saha S. (2020) Structural insight into the role of novel SARS-CoV-2 E protein: a potential target for vaccine development and other therapeutic strate-gies. *PLoS One.* **15**, e0237300.
- Lang Y., Li W., Li Z., Koerhuis D., van den Burg A.C.S., Rozemuller E., Bosch B.-J., van Kuppeveld F.J. M., Boons G.-J., Huizinga E.G., van der Schaar H.M., de Groot R.J. (2020) Coronavirus hemagglutinin-esterase and spike proteins coevolve for functional balance and optimal virion avidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 117, 25759–25770.
- 11. Bar-On Y.M., Flamholz A., Phillips R., Milo R. (2020) SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *eLife.* **9**, e57309.
- Almazán F., Galán C., Enjuanes L. (2004) The nucleoprotein is required for efficient coronavirus genome replication. *J. Virol.* 78, 12683–12688.
- Masters P.S. (2006) The molecular biology of coronaviruses. Adv. Virus Res. 66, 193–292.
- Belshaw R., Pybus O.G., Rambaut A. (2007) The evolution of genome compression and genomic novelty in RNA viruses. *Genome Res.* 17, 1496–1504.
- Sanjuán R., Nebot M.R., Chirico N., Mansky L.M., Belshaw R. (2010) Viral mutation rates. J. Virol. 84, 9733–9748.
- Chen Y., Liu Q., Guo D. (2020) Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* 92, 418–423.
- Song Z., Xu Y., Bao L., Zhang L., Yu P., Qu Y., Zhu H., Zhao W., Han Y., Qin C. (2019) From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses.* 11, 59.
- Sa Ribero M., Jouvenet N., Dreux M., Nisole S. (2020) Interplay between SARS-CoV-2 and the type I interferon response. *PLoS Pathog.* 16(7), e1008737.
- 19. Snijder E.J., Decroly E., Ziebuhr J. (2016) The nonstructural proteins directing coronavirus RNA synthesis and processing. *Adv. Virus Res.* **96**, 59–126.

- Raj R. (2021) Analysis of non-structural proteins, NSPs of SARS-CoV-2 as targets for computational drug designing. *Biochem. Biophys. Rep.* 25, 100847.
- Khan M.T., Irfan M., Ahsan H., Ahmed A., Kaushik A.C., Khan A.S., Chinnasamy S., Ali A., Wei D.-Q. (2021) Structures of SARS-CoV-2 RNA-binding proteins and therapeutic targets. *Intervirology*. 64, 55–68.
- 22. Yoshimoto F.K. (2020) The proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the cause of COVID-19. *Protein J.* **39**, 198–216.
- 23. Guo Y.-R., Cao Q.-D., Hong Z.-S., Tan Y.-Y., Chen S.-D., Jin H.-J., Tan K.-S., Wang D.-Y., Yan Y. (2020) The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Mil. Med. Res.* 7, 11.
- Cui J., Li F., Shi Z.-L. (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 181–192.
- Artika I.M., Dewantari A.K., Wiyatno A. (2020) Molecular biology of coronaviruses: current knowledge. *Heliyon.* 6, e04743.
- Banerjee A.K., Blanco M.R., Bruce E.A., Honson D.D., Chen L.M., Chow A., Bhat P., Ollikainen N., Quinodoz S.A., Loney C., Thai J., Miller Z.D., Lin A.E., Schmidt M.M., Stewart D.G., Goldfarb D., De Lorenzo G., Rihn S.J., Voorhees R.M., Botten J.W., Majumdar D., Guttman M. (2020) SARS-CoV-2 disrupts splicing, translation, and protein trafficking to suppress host defenses. *Cell.* 183, 1325–1339.e21.
- Gaglia M M., Covarrubias S., Wong W., Glaunsinger B.A. (2012) A common strategy for host RNA degradation by divergent viruses. *J. Virol.* 86, 9527–9530.
- Cornillez-Ty C.T., Liao L., Yates J.R., Kuhn P., Buchmeier M.J. (2009) Severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein 2 interacts with a host protein complex involved in mitochondrial biogenesis and intracellular signaling. *J. Virol.* 83, 10314–10318.
- Graham R.L., Sims A.C., Brockway S.M., Bari, R.S., Denison M.R. (2005) The nsp2 replicase proteins of murine hepatitis virus and severe acute respiratory syndrome coronavirus are dispensable for viral replication. *J. Virol.* **79**, 13399–13411.
- Lei J., Kusov Y., Hilgenfeld R. (2018) Nsp3 of coronaviruses: structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral Res.* 149, 58–74.
- Wolff G., Limpens R.W.A.L., Zevenhoven-Dobbe J.C., Laugks U., Zheng S., de Jong A.W.M., Koning R.I., Agard D.A., Grünewald K., Koster A.J., Snijder E.J., Bárcena M. (2020) A molecular pore spans the double membrane of the coronavirus replication organelle. *Science.* 369, 1395–1398.
- 32. Oostra M., te Lintelo E.G., Deijs M., Verheije M.H., Rottier P.J.M., de Haan C.A.M. (2007) Localization and membrane topology of coronavirus nonstructural protein 4: involvement of the early secretory pathway in replication. *J. Virol.* 81, 12323–12336.
- Tomar S., Johnston M.L., St John S.E., Osswald H.L., Nyalapatla P.R., Paul L.N., Ghosh A.K., Denison M.R., Mesecar A.D. (2015) Ligand-induced dimerization of middle east respiratory syndrome (MERS) coronavi-

rus nsp5 protease (3CLpro): implications for *nsp5* regulation and the development of antivirals. *J. Biol. Chem.* **290**, 19403–19422.

- Cottam E.M., Whelband M.C., Wileman T. (2014) Coronavirus NSP6 restricts autophagosome expansion. *Autophagy*. 10, 1426–1441.
- Zhai Y., Sun F., Li X., Pang H., Xu X., Bartlam M., Rao Z. (2005) Insights into SARS-CoV transcription and replication from the structure of the nsp7-nsp8 hexadecamer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 980–986.
- Imbert I., Guillemot J.-C., Bourhis J.-M., Bussetta C., Coutard B., Egloff M.-P., Ferron F., Gorbalenya A.E., Canard B. (2006) A second, non-canonical RNA-dependent RNA polymerase in SARS coronavirus. *EMBO J.* 25, 4933–4942.
- 37. te Velthuis A.J.W., van den Worm S.H.E., Snijder E.J. (2012) The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both *de novo* initiation and primer extension. *Nucleic Acids. Res.* 40, 1737–1747.
- Sawicki S.G., Sawicki D.L., Younker D., Meyer Y., Thiel V., Stokes H., Siddell S.G. (2005) Functional and genetic analysis of coronavirus replicase-transcriptase proteins. *PLoS Pathog.* 1, e39.
- Donaldson E.F., Sims A.C., Graham R.L., Denison M.R., Baric R.S. (2007) Murine hepatitis virus replicase protein nsp10 is a critical regulator of viral RNA synthesis. *J. Virol.* 81, 6356–6368.
- Bouvet M., Debarnot C., Imbert I., Selisko B., Snijder E.J., Canard B., Decroly E. (2010) *In vitro* reconstitution of SARS-coronavirus mRNA cap methylation. *PLoS Pathog.* 6, e1000863.
- Bouvet M., Imbert I., Subissi L., Gluais L., Canard B., Decroly E. (2012) RNA 3'-end mismatch excision by the severe acute respiratory syndrome coronavirus nonstructural protein nsp10/nsp14 exoribonuclease complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 9372–9377.
- 42. Shu T., Huang M., Wu D., Ren Y., Zhang X., Han Y., Mu J., Wang R., Qiu Y., Zhang D.-Y., Zhou X. (2020) SARS-coronavirus-2 Nsp13 possesses NTPase and RNA helicase activities that can be inhibited by bismuth salts. *Virol. Sin.* 35, 321–329.
- 43. Minskaia E., Hertzig T., Gorbalenya A.E., Campanacci V., Cambillau C., Canard B., Ziebuhr J. (2006) Discovery of an RNA virus 3'→5' exoribonuclease that is critically involved in coronavirus RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 5108–5113.
- 44. Chen Y., Cai H., Pan J., Xiang N., Tien P., Ahola T., Guo D. (2009) Functional screen reveals SARS coronavirus nonstructural protein nsp14 as a novel cap N7 methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 3484–3489.
- 45. Deng X., Hackbart M., Mettelman R.C., O'Brien A., Mielech A.M., Yi G., Kao C.C., Baker S.C. (2017) Coronavirus nonstructural protein 15 mediates evasion of dsRNA sensors and limits apoptosis in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, E4251– E4260.
- Forni D., Cagliani R., Clerici M., Sironi M. (2017) Molecular evolution of human coronavirus genomes. *Trends Microbiol.* 25, 35–48.

- 47. Li F. (2016) Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu. Rev. Virol.* **3**, 237–261.
- Yeager C.L., Ashmun R.A., Williams R.K., Cardellichio C.B., Shapiro L.H., Look A.T., Holmes K.V. (1992) Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*. 357, 420–422.
- Wu K., Li W., Peng G., Li F. (2009) Crystal structure of NL63 respiratory coronavirus receptor-binding domain complexed with its human receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 19970–19974.
- Naskalska A., Dabrowska A., Szczepanski A., Milewska A., Jasik K.P., Pyrc K. (2019) Membrane protein of human coronavirus NL63 is responsible for interaction with the adhesion receptor. *J. Virol.* **93**, e00355-19.
- Desforges M., Desjardins J., Zhang C., Talbot P.J. (2013) The acetyl-esterase activity of the hemagglutinin-esterase protein of human coronavirus OC43 strongly enhances the production of infectious virus. *J. Virol.* 87, 3097–3107.
- 52. Raj V.S., Mou H., Smits S.L., Dekkers D.H.W., Müller M.A., Dijkman R., Muth D., Demmers J.A.A., Zaki A., Fouchier R.A.M., Thiel V., Drosten C., Rottier P.J.M., Osterhaus A.D.M.E., Bosch B.J., Haagmans B.L. (2013) Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*. 495, 251–254.
- 53. Kalra R.S., Kandimalla R. (2021) Engaging the spikes: heparan sulfate facilitates SARS-CoV-2 spike protein binding to ACE2 and potentiates viral infection. *Sig. Transduct. Target. Ther.* 6(1), 39.
- Hartenian E., Nandakumar D., Lari A., Ly M., Tucker J.M., Glaunsinger B.A. (2020) The molecular virology of coronaviruses. *J. Biol. Chem.* 295, 12910–12934.
- 55. Tang T., Bidon M., Jaimes J.A., Whittaker G.R., Daniel S. (2020) Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral. Res.* **178**, 104792.
- Sola I., Almazán F., Zúñiga S., Enjuanes L. (2015) Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses. *Annu. Rev. Virol.* 2, 265–288.
- Sawicki S.G., Sawicki D.L., Siddell S.G. (2007) A contemporary view of coronavirus transcription. *J. Virol.* 81, 20–29.
- Sztuba-Solińska J., Stollar V., Bujarski J.J. (2011) Subgenomic messenger RNAs: mastering regulation of (+)-strand RNA virus life cycle. *Virology*. 412, 245– 255.
- Zúñiga S., Sola I., Alonso S., Enjuanes L. (2004) Sequence motifs involved in the regulation of discontinuous coronavirus subgenomic RNA synthesis. *J. Virol.* 78, 980–994.
- Wu H.-Y., Brian D.A. (2007) 5'-proximal hot spot for an inducible positive-to-negative-strand template switch by coronavirus RNA-dependent RNA polymerase. J. Virol. 81, 3206–3215.
- Bojkova D., Klann K., Koch B., Widera M., Krause D., Ciesek S., Cinatl J., Münch C. (2020) Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets. *Nature*. 583, 469–472.

- 62. Finkel Y., Gluck A., Nachshon A., Winkler R., Fisher T., Rozman B., Mizrahi O., Lubelsky Y., Zuckerman B., Slobodin B., Yahalom-Ronen Y., Tamir H., Ulitsky I., Israely T., Paran N., Schwartz M., Stern-Ginossar N. (2021) SARS-CoV-2 uses a multipronged strategy to impede host protein synthesis. *Nature*. **594**, 240–245.
- 63. Woo J., Lee E.Y., Lee M., Kim T., Cho Y.-E. (2019) An *in vivo* cell-based assay for investigating the specific interaction between the SARS-CoV N-protein and its viral RNA packaging sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **520**, 499–506.
- Narayanan K., Makino S. (2001) Cooperation of an RNA packaging signal and a viral envelope protein in coronavirus RNA packaging. J. Virol. 75, 9059–9067.
- Vennema H., Godeke G.J., Rossen J.W., Voorhout W.F., Horzinek M.C., Opstelten D.J., Rottier P.J. (1996) Nucleocapsid-independent assembly of coronaviruslike particles by co-expression of viral envelope protein genes. *EMBO J.* 15, 2020–2028.
- 66. Hsieh P.-K., Chang S.C., Huang C.-C., Lee T.-T., Hsiao C.-W., Kou Y.-H., Chen I.-Y., Chang C.-K., Huang T.-H., Chang M.-F. (2005) Assembly of severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA packaging signal into virus-like particles is nucleocapsid dependent. J. Virol. 79, 13848–13855.
- 67. Masters P.S. (2019) Coronavirus genomic RNA packaging. *Virology*. **537**, 198–207.
- Yao S., Narayanan A., Majowicz S., Jose J., Archetti M. (2021) A synthetic defective interfering SARS-CoV-2. *Peer J.* 9, e11686.
- Kuo L., Hurst-Hess K.R., Koetzner C.A., Masters P.S. (2016) Analyses of coronavirus assembly interactions with interspecies membrane and nucleocapsid protein chimeras. J. Virol. 90, 4357–4368.
- Orenstein J.M., Banach B., Baker S. (2008) Morphogenesis of coronavirus HCoV-NL63 in cell culture: a transmission electron microscopic study. *Open Infect. Dis. J.* 2, 52–58.
- Makino S., Lai M.M. (1990) Studies of coronavirus DI RNA replication using in vitro constructed DI cDNA clones. *Adv. Exp. Med. Biol.* 276, 341–347.
- Kim K.H., Narayanan K., Makino S. (1998) Characterization of coronavirus DI RNA packaging. *Adv. Exp. Med. Biol.* 440, 347–353.
- 73. Bos E.C., Dobbe J.C., Luytjes W., Spaan W.J. (1997) A subgenomic mRNA transcript of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 defective interfering (DI) RNA is packaged when it contains the DI packaging signal. J. Virol. 71, 5684–5687.
- Makino S., Keck J.G., Stohlman S.A., Lai M.M. (1986) High-frequency RNA recombination of murine coronaviruses. *J. Virol.* 57, 729–737.
- Williams G.D., Chang R.-Y., Brian D.A. (1999) A phylogenetically conserved hairpin-type 3' untranslated region pseudoknot functions in coronavirus RNA replication. J. Virol. 73, 8349–8355.
- Almazán F., González J.M., Pénzes Z., Izeta A., Calvo E., Plana-Durán J., Enjuanes L. (2000) Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 97, 5516–5521.

- 77. Strauss-Soukup J.K., Strobel S.A. (2001) Ribozyme enzymology. In: *RNA*. Eds Söll D., Nishimura S., Moore P. Pergamon, Oxford, pp. 187–206.
- Yang D., Leibowitz J.L. (2015) The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends. *Virus Res.* 206, 120–133.
- 79. Yang J., Sun B., Huang H., Jiang Y., Diao L., Chen B., Xu C., Wang X., Liu J., Jiang W., Yang S. (2014) Highefficiency scarless genetic modification in *Escherichia coli* by using lambda red recombination and I-SceI cleavage. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 3826–3834.
- St-Jean J.R., Desforges M., Almazán F., Jacomy H., Enjuanes L., Talbot P.J. (2006) Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone. *J. Virol.* 80, 3670–3674.
- Almazán F., DeDiego M.L., Sola I., Zuñiga S., Nieto-Torres J.L., Marquez-Jurado S., Andrés G., Enjuanes L. (2013) Engineering a replication-competent, propagation-defective middle east respiratory syndrome coronavirus as a vaccine candidate. *mBio*, 4, e00650-13.
- Pfefferle S., Krähling V., Ditt V., Grywna K., Mühlberger E., Drosten C. (2009) Reverse genetic characterization of the natural genomic deletion in SARS-coronavirus strain Frankfurt-1 open reading frame 7b reveals an attenuating function of the 7b protein *in-vitro* and *in-vivo. Virol. J.* 6, 131.
- Ye C., Chiem K., Park J.-G., Oladunni F., Platt R. N., Anderson T., Almazan F., de la Torre J.C., Martinez-Sobrido L. (2020) Rescue of SARS-CoV-2 from a single bacterial artificial chromosome. *mBio.* 11(5), e02168-20.

https://doi.org/10.1128/mBio.02168-20

- 84. Thi Nhu Thao T., Labroussaa F., Ebert N., V'kovski P., Stalder H., Portmann J., Kelly J., Steiner S., Holwerda M., Kratzel A., Gultom M., Schmied K., Laloli L., Hüsser L., Wider M., Pfaender S., Hirt D., Cippà V., Crespo-Pomar S., Schröder S., Muth D., Niemeyer D., Corman V.M., Müller M.A., Drosten C., Dijkman R., Jores J., Thiel V. (2020) Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature*. 582, 561–565.
- 85. Eriksson K.K., Makia D., Thiel V. (2008) Generation of recombinant coronaviruses using vaccinia virus as the cloning vector and stable cell lines containing coronaviral replicon RNAs. *Methods Mol. Biol.* **454**, 237–254.
- Donaldson E.F., Yount B., Sims A.C., Burkett S., Pickles R.J., Baric R.S. (2008) Systematic assembly of a full-length infectious clone of human coronavirus NL63. J. Virol. 82, 11948–11957.
- 87. Scobey T., Yount B.L., Sims A.C., Donaldson E.F., Agnihothram S.S., Menachery V.D., Graham R.L., Swanstrom J., Bove P.F., Kim J.D., Grego S., Randell S.H., Baric R.S. (2013) Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of the Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 110, 16157–16162.
- Yount B., Curtis K.M., Fritz E.A., Hensley L.E., Jahrling P.B., Prentice E., Denison M.R., Geisbert T.W., Baric R.S. (2003) Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 12995– 13000.

- van den Worm S.H.E., Eriksson K.K., Zevenhoven J.C., Weber F., Züst R., Kuri T., Dijkman R., Chang G., Siddell S.G., Snijder E. J., Thiel V., Davidson A.D. (2012) Reverse genetics of SARS-related coronavirus using vaccinia virus-based recombination. *PLoS One*. 7, e32857.
- 90. Xie X., Muruato A., Lokugamage K.G., Narayanan K., Zhang X., Zou J., Liu J., Schindewolf, C., Bopp N.E., Aguilar P.V., Plante K.S., Weaver S.C., Makino S., LeDuc J.W., Menachery V.D., Shi P.Y. (2020) An infectious cDNA clone of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe*. 27, 841–848.e3.
- Kouprina N., Larionov V. (2016) Transformation-associated recombination (TAR) cloning for genomics studies and synthetic biology. *Chromosoma*. 125, 621.
- 92. Cunningham C., Gatherer D., Hilfrich B., Baluchova K., Dargan D.J., Thomson M., Griffiths P.D., Wilkinson G.W.G., Schulz T.F., Davison A.J. (2010) Sequences of complete human cytomegalovirus genomes from infected cell cultures and clinical specimens. *J.Gen. Virol.* **91**, 605.
- 93. Vashee S., Stockwell T.B., Alperovich N., Denisova E.A., Gibson D.G., Cady K.C., Miller K., Kannan K., Malouli D., Crawford L.B., Voorhies A.A., Bruening E., Caposio P., Früh K. (2017) Cloning, assembly, and modification of the primary human cytomegalovirus isolate Toledo by yeast-based transformation-associated recombination. *mSphere*. 2, e00331-17.
- 94. Oldfield L.M., Grzesik P., Voorhies A.A., Alperovich N., MacMath D., Najera C.D., Chandra D.S., Prasad S., Noskov V.N., Montague M. G., Friedman R.M., Desai P.J., Vashee S. (2017) Genome-wide engineering of an infectious clone of herpes simplex virus type 1 using synthetic genomics assembly methods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, E8885–E8894.
- 95. Smith S., Reuven N., Mohni K.N., Schumacher A.J., Weller S.K. (2014) Structure of the herpes simplex virus 1 genome: manipulation of nicks and gaps can abrogate infectivity and alter the cellular DNA damage response. J. Virol. 88, 10146–10156.
- Yount B., Curtis K.M., Baric R.S. (2000) Strategy for systematic assembly of large rna and dna genomes: transmissible gastroenteritis virus model. *J. Virol.* 74, 10600–10611.
- Merchlinsky M., Moss B. (1992) Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by *in vitro* ligation: recombination-independent selectable cloning vectors. *Virology*. **190**, 522–526.
- Mohsen M.O., Zha L., Cabral-Miranda G., Bachmann M.F. (2017) Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin. Immunol.* 34, 123–132.
- Nooraei S., Bahrulolum H., Hoseini Z.S., Katalani C., Hajizade A., Easton A.J., Ahmadian G. (2021) Viruslike particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J. Nanobiotechnology*. **19**, 59.
- 100. Chan S.K., Du P., Ignacio C., Mehta S., Newton I.G., Steinmetz N.F. (2021) Biomimetic virus-like particles as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 diagnostic tools. ACS Nano. 15, 1259–1272.

- 101. Bos E.C., Luytjes W., Spaan W.J. (1997) The function of the spike protein of mouse hepatitis virus strain A59 can be studied on virus-like particles: cleavage is not required for infectivity. *J. Virol.* **71**, 9427–9433.
- 102. Naskalska A., Dabrowska A., Nowak P., Szczepanski A., Jasik K., Milewska A., Ochman M., Zeglen S., Rajfur Z., Pyrc K. (2018) Novel coronavirus-like particles targeting cells lining the respiratory tract. *PLoS One.* 13, e0203489.
- 103. Huang Y., Yang Z., Kong W., Nabel G.J. (2004) Generation of synthetic severe acute respiratory syndrome coronavirus pseudoparticles: implications for assembly and vaccine production. *J. Virol.* **78**, 12557–12565.
- 104. Siu Y.L., Teoh K.T., Lo J., Chan C.M., Kien F., Escriou N., Tsao S.W., Nicholls J.M., Altmeyer R., Peiris J.S., Bruzzone R., Nal B. (2008) The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles. *J. Virol.* 82, 11318–11330.
- 105. Swann H., Sharma A., Preece B., Peterson A., Eldridge C., Belnap D.M., Vershinin M., Saffarian S. (2020) Minimal system for assembly of SARS-CoV-2 virus like particles. *Sci. Rep.* **10**, 21877.
- 106. Xu R., Shi M., Li J., Song P., Li N. (2020) Construction of SARS-CoV-2 virus-like particles by mammalian expression system. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 862.
- 107. Ju X., Zhu Y., Wang Y., Li J., Zhang J., Gong M., Ren W., Li S., Zhong J., Zhang L., Zhang Q.C., Zhang R., Ding Q. (2021) A novel cell culture system modeling the SARS-CoV-2 life cycle. *PLoS Pathog.* 17, e1009439.
- 108. Wang C., Zheng X., Gai W., Zhao Y., Wang H., Wang H., Feng N., Chi H., Qiu B., Li N., Wang T., Gao Y., Yang S., Xia X. (2016) MERS-CoV virus-like particles produced in insect cells induce specific humoural and cellular imminity in rhesus macaques. *Oncotarget.* 8, 12686–12694.
- Talbot P.J., Ekandé S., Cashman N.R., Mounir S., Stewart J.N. (1993) Neurotropism of human coronavirus 229E. *Adv. Exp. Med. Biol.* 342, 339–346.
- Thiel V., Karl N., Schelle B., Disterer P., Klagge I., Siddell S.G. (2003) Multigene RNA vector based on coronavirus transcription. J. Virol. 77, 9790–9798.
- Khromykh A.A. (2000) Replicon-based vectors of positive strand RNA viruses. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2, 555–569.
- 112. Kotaki T., Xie X., Sh, P.-Y., Kameoka M. (2021) A PCR amplicon-based SARS-CoV-2 replicon for antiviral evaluation. *Sci. Rep.* **11**, 2229.
- He X., Quan S., Xu M., Rodriguez S., Goh S.L., Wei J., Fridman A., Koeplinger K.A., Carroll S.S., Grobler J.A., Espeseth A.S., Olsen D.B., Hazuda D.J., Wang D. (2021) Generation of SARS-CoV-2 reporter replicon for high-throughput antiviral screening and testing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **118**, e2025866118.
- 114. Ge F., Luo Y., Liew P.X., Hung E. (2007) Derivation of a novel SARS–coronavirus replicon cell line and its application for anti-SARS drug screening. *Virology*. 360, 150–158.
- Almazán F., DeDiego M.L., Galán C., Escors D., Álvarez E., Ortego J., Sola I., Zuñiga S., Alonso S.,

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

Moreno J.L., Nogales A., Capiscol C., Enjuanes L. (2006) Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J. Virol.* **80**, 10900–10906.

- 116. Hertzig T., Scandella E., Schelle B., Ziebuhr J., Siddell S.G., Ludewig B., Thiel V. (2004) Rapid identification of coronavirus replicase inhibitors using a selectable replicon RNA. *J. Gen. Virol.* **85**, 1717–1725.
- 117. Wang J.-M., Wang L.-F., Shi Z.-L. (2008) Construction of a non-infectious SARS coronavirus replicon for application in drug screening and analysis of viral protein function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 138–142.
- 118. Luo Y., Yu F., Zhou M., Liu Y., Xia B., Zhang X., Liu J., Zhang J., Du Y., Li R., Wu L., Zhang X., Pan T., Guo D., Peng T., Zhang H. (2021) Engineering a reliable and convenient SARS-COV-2 replicon system for analysis of viral RNA synthesis and screening of antiviral inhibitors. *mBio.* **12**, e02754-20. https://doi.org/10.1128/mBio.02754-20
- 119. McBride R., van Zyl M., Fielding B.C. (2014) The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses.* **6**, 2991–3018.
- Dutta N.K., Mazumdar K., GordyJ.T. (2020) The nucleocapsid protein of SARS-COV-2: a target for vaccine development. J. Virol. 94, e00647-20.
- 121. Ge F., Xiong S., Lin F.S., Zhang Z.P., Zhang X.E. (2008) High-throughput assay using a GFP-expressing replicon for SARS-CoV drug discovery. *Antiviral Res.* 80, 107–113.
- 122. Pfefferle S., Schöpf J., Kögl M., Friedel C.C., Müller M.A., Carbajo-Lozoya J., Stellberger T., von Dall'Armi E., Herzog P., Kallies S., Niemeyer D., Ditt V., Kuri T., Züst R., Pumpor K., Hilgenfeld R., Schwarz F., Zimmer R., Steffen I., Weber F., Thiel V., Herrler G., Thiel H.J., Schwegmann-Wessels C., Pöhlmann S., Haas J., Drosten C., von Brunn A. (2011) The SARS-coronavirus-host interactome: identification of cyclophilins as target for pan-coronavirus inhibitors. *PLoS Pathog.* 7, e1002331.
- 123. Jin Y.-Y., Lin H., Cao L., Wu W.-C., Ji Y., Du L., Jiang Y., Xie Y., Tong K., Xing F., Zheng F., Shi M., Pan J.A., Peng X., Guo D. (2021) A convenient and biosafe replicon with accessory genes of SARS-CoV-2 and its potential application in antiviral drug discovery. *Virol. Sin.* **36**(5), 913–923. https://doi.org/10.1007/s12250-021-00385-9
- 124. Wang B., Zhang C., Lei X., Ren L., Zhao Z., Wang J., Huang H. (2021) Construction of non-infectious SARS-CoV-2 replicons and their application in drug evaluation. *Virol. Sin.* 36, 890–900. https://doi.org/10.1007/s12250-021-00369-9
- 125. Zhang Q.-Y., Deng C.-L., Liu J., Li J.-Q., Zhang H.-Q., Li N., Zhang Y.-N., Li X.-D., Zhang B., Xu Y., Ye H.-Q. (2021) SARS-CoV-2 replicon for high-throughput antiviral screening. J. Gen. Virol. 102, 001583.
- 126. Ahn D.-G., Lee W., Choi J.-K., Kim S.-J., Plant E.P., Almazán F., Taylor D.R., Enjuanes L., Oh J.-W. (2011) Interference of ribosomal frameshifting by antisense peptide nucleic acids suppresses SARS coronavirus replication. *Antiviral Res.* **91**, 1–10.

- 127. Adedeji A.O., Marchand B., te Velthuis A.J.W., Snijder E.J., Weiss S., Eoff R.L., Singh K., Sarafianos S.G. (2012) Mechanism of nucleic acid unwinding by SARS-CoV helicase. *PLoS One.* **7**, e36521.
- 128. Ivanov K.A., Hertzig T., Rozanov M., Bayer S., Thiel V., Gorbalenya A.E., Ziebuhr J. (2004) Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 12694–12699.

GENETIC ENGINEERING SYSTEMS FOR STUDYING HUMAN VIRAL PATHOGENS FROM THE CORONAVIRIDAE FAMILY

S. O. Galkin^{1, 2}, A. N. Anisenko^{1, 2, 3}, O. A. Shadrina^{2, 3}, and M. B. Gottikh^{2, 3, *}

¹ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
² Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia *e-mail: gottikh@belozersky.msu.ru

The worldwide pandemic of the infectious disease, COVID-19, caused by the previously unknown Betacoronavirus SARS-CoV-2 made it extremely urgent to develop simple and safe cellular systems for studying the pathogenesis of this viral infection. These systems ideally should allow manipulations with the virus genome as well as high-throughput screening of potential inhibitors of this virus. In this review, we tried to summarize the currently existing data on genetic engineering systems for the study of not only SARS-CoV-2, but also other viruses from the Coronaviridae family. In addition, the review briefly provides basic information about the structure and life cycle of these viruses.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, replicon, pseudovirus

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 57.053:579.258

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ MxyR *Mycobacterium tuberculosis* С КСИЛАНАМИ: НЕОБЫЧНЫЕ ЛИГАНДЫ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ СЕМЕЙСТВА MarR^{1, 2}

© 2022 г. S. Mauran^{*a*}, N. T. Perera^{*b*}, I. C. Perera^{*a*}, *

^aSynthetic Biology Laboratory, Department of Zoology and Environment Sciences, Faculty of Science, University of Colombo, Colombo 03, 00700 Sri Lanka ^bDepartment of Chemistry, Faculty of Applied Sciences, University of Sri Jayewardenepura, Nugegoda, Sri Lanka *e-mail: icperera@sci.cmb.ac.lk

Поступила в редакцию 19.02.2021 г. После доработки 12.04.2021 г. Принята к публикации 28.04.2021 г.

Ген rv3095 Mycobacterium tuberculosis, принадлежащий семейству транскрипционных регуляторов MarR, кодирует фактор MxyR (<u>Mycobacterium xy</u>lanase regulator – регулятор ксиланазы Mycobacterium). Этот ген расположен дивергентно по отношению к генам, кодирующим гидролазу (rv3094c), оксидоредуктазу (rv3093c), белок-транспортер семейства ABC (rv3092c), и конвергентно по отношению к гену ксиланазы (*rv3096*). Ксиланаза широко используется микробными патогенами растений для деградации ксиланов – основного компонента гемицеллюлозы. В работе методом сдвига электрофоретической полвижности исследованы молекулярные взаимодействия очишенного транскрипционного регулятора MxyR. Этот белок взаимодействует с расположенной выше межгенной областью *ту*O с высокой специфичностью и константой диссоцииации, равной 5.01 \pm 0.017 нМ. Примечательно, что это связывание ослабляется специфическими углеводными лигандами, такими как ксилан, L-арабиноза и D-галактоза, со значениями IC₅₀, равными 22.7 ± 1.02 нг/мкл, 360.8 ± 24.25 нг/мкл и 2320.0 ± 96.97 мкг/мкл соответственно. Очевидно, эта ассоциация изменяет конформацию ДНКсвязывающей спирали α4, вследствие чего MxvR теряет способность связываться с операторной ДНК, тем самым не препятствуя транскрипции регулируемых им генов ксиланазы и других белков. В результате проведенного исследования идентифицированы природные лиганды MxyR M. tuberculosis, что углубляет наши знания относительно метаболической регуляции углевода ксилана.

Ключевые слова: туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, фактор транскрипции, MxyR, ДНК-связывание, углеводные лиганды, ксилан **DOI:** 10.31857/S0026898422010074

Туберкулез — основная причина смертности и заболеваемости в развивающихся странах, отрицательно сказывающаяся на их экономической и социальной динамике. Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2019 год, 10 млн человек было инфицированы туберкулезом, из которых 12% — дети [1]. В программе ВОЗ, названной "The End TB strategy", поставлена задача победить это заболевание к 2030 году [1]. В рамках реализации этой стратегии изучение биологии *Мусоbacterium tuberculosis* важно для поиска новых подходов для борьбы с заболеванием.

Изучение регуляции транскрипции – одна из жизненно важных областей в изучении физиологии микроорганизмов. Ключевым механизмом регуляции выступают транскрипционные факторы, динамически связывающиеся с геномной ДНК и контролирующие транскрипцию генов [2, 3]. Семейство регуляторов транскрипции множественной антибиотикорезистентности (MarR) представляет значительный интерес, поскольку сообщалось о том, что они контролируют в том числе и вирулентность патогенных бактерий [2, 4-71. Регуляторные пути бактериальной вирулентности довольно сложны, так как несколько регуляторов могут действовать на экспрессию отдельного гена или один регулятор может действовать на экспрессию многих регуляторных доменов. Помимо вирулентности, члены регуляторов семейства MarR контролируют ряд адаптивных реакций бактерии, таких как ответ на окисли-

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

² Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898422010074 для авторизованных пользователей.

тельный стресс [8–11], устойчивость к антибиотикам [12], термочувствительность [13] и деградация фенольных соединений [3, 14, 15].

Регуляторы транскрипции семейства MarR в M. tuberculosis могут выступать как специфическими, так и глобальными регуляторами, участвующими в ответе на лечение антибиотиками и внешнее воздействие. MosR (Rv1049), регулятор чувствительности к окислительному стрессу, активирует ген rv1050 M. tuberculosis, что позволяет бактерии выживать в окружающей среде, вызывающей окислительный стресс, например в макрофагах [16, 17]. Белок ответа на низкий рН, кодируемый rv1404; чувствительный к агенту на основе имидазо-[1,2-а]-пиридин-4-карбонитрила (МР-III-71) белок, кодируемый rv2887, и регулятор мембранных эффлюксных насосов Rv0678 считаются глобальными регуляторами. В регулон Rv1404 входит более тридцати генов, включая гены метилтрансфераз Rv1405с и Rv1403, участвуюших в адаптивных процессах [18]. Белок Rv2887. определяющий чувствительность к MP-III-71, peгулирует экспрессию гена rv0560c, кодирующего S-аденозил-*L*-метионинзависимую метилтрансферазу, и генов, участвующих в биосинтезе бензохинона и менохинона [19, 20]. Мембранный белок микобактерий, регулирующий экспрессию rv0678, связывается с промоторами оперонов *mmpS2-mmpL2*, *mmpS4-mmpL4*, *rv0991* и *mmpS5* [21].

Транскрипционный фактор Rv3095 M. tuberculosis, который по результатам данного исследования предлагается переименовать в MxyR (*Мусо*bacterium <u>xy</u>lanase <u>regulator</u> – регулятор ксиланазы Mycobacterium), относится к семейству MarR, и его роль и физиологические функции мало изучены. Нами была подтверждена его регуляторная функция и описаны его природные лиганды. Кластер близкорасположенных генов включает предполагаемый ген ксиланазы, который обычно находят в патогенных бактериях растений и сапрофитах, - фермента, расщепляющего ксилан на ксилозу и олигосахариды [22]. Ксилан, основной компонент гемицеллюлозы, представляет собой полисахарид, состоящий из линейной цепи ксилозы с замещениями в боковой цепи. Остов полисахарида в основном состоит из остатков 1,4-β-ксилопиранозида, которые могут содержать в боковой цепи ацетильную, арабинофуранозильную и 4-О-метилглюкуронильную группы – в зависимости от источника полисахарида. Микроорганизмы, разлагающие ксилан, "снабжены" набором соответствующих ферментов: эндоксиланаз, β -ксилозидаз, α -*L*-арабинофуранозидаз, α-глюкуронидаз и эстераз [22, 23], - а также регуляторами транскрипции, такими как ХупR и XlnR, для контроля биосинтеза ферментов, участвующих в процессе деградации ксилана [24–26]. Присутствие гена-гомолога ксиланаз в патогенной для человека бактерии M. tuberculosis

объяснить трудно, исходя из известной функции этого фермента, но наводит на мысль о его пока неизвестной биологической роли. В этом исследовании в клетках *M. tuberculos* проанализирована регуляция экспрессии гипотетического гена ксиланазы транскрипционным фактором MxyR.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Определение структуры генетического локуса и моделирование структуры белка. Структура MxyR была смоделирована в программе SWISS-MODEL с использованием структуры РА1607 в качестве шаблона. Для валидации модели полученные углы всех пептидных связей наносили на диаграмму Рамачандрана [27]. Топологический порядок α-спиралей и β-листов определяли выравниванием моделируемой структуры MxyR по отношению к РА1607. Для анализа генетического локуса использовали карты лепонированных геномов NCBI и программу NCBI BLASTp. Промоторные области, включая -35 и -10 и сайты начала транскрипции, были предсказаны с помощью программы BPROM из панели инструментов Softberry ("Softberry Inc.", CША; http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb) [28].

Филогенетический анализ. Для поиска гомологов с помощью программы BLAST использовали пептидную последовательность МхуR из штамма *M. tuberculosis* H37Rv (Uniprot No. P9WMG3). Белковые последовательности с уровнем идентичности выше 60% отфильтровывали для исключения удвоений и сохраняли с NCBI-сервера локально в формате "fasta". Полученные последовательности выравнивали в программе MEGA 6.06 с использованием алгоритма выравнивания ClustalW. Филогенетическое дерево выровненных последовательностей строили методом ближайших соседей (neighbor-joining). При валидации дерева методом бутстрепа использовали 1000 реплик. Дерево построено в масштабе, а эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода поправки Пуассона в единицах числа аминокислотных замен.

Выделение геномной ДНК. Культуру Mycobacterium tuberculosis H37Rv выращивали на скошенной среде Левенштейна-Йенсена (LJ) и использовали для выделения геномной ДНК. Колонии собирали в отдельный флакон с буфером для экстракции (50 мМ Трис-HCl, pH 7.4, и 20 мМ EDTA, pH 8.0) и прогревали при 80°C в течение 20 мин. Твердую клеточную стенку разрушали с помощью стеклянных шариков и инкубировали с лизоцимом в течение 2 ч при 37°C. Лизированные клетки обрабатывали 20 мг/мл протеиназы К в протеиназном буфере (100 мМ Трис-HCl, pH 7.8, 50 мМ EDTA и 5% SDS) и инкубировали при 45°C в течение ночи. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 20 мин, а супернатант экстрагировали смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25 : 24 : 1) с последующим осаждением этанолом. Выделенную ДНК анализировали с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Клонирование и выделение белка. Ген rv3095, кодирующий регуляторный белок МхуR (новое обозначение введено на основании результатов проведенного исследования), амплифицировали с использованием праймеров MxyR Fw и MxyR Rv (табл. S1, см. Приложение на сайте http://www. molecbio.ru/downloads/2022/1/supp_Mauran_rus.pdf). ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем 70 нг геномной ДНК, 10 мМ Трис-HCl (pH 8.8), 50 мМ KCl, 2 мМ MgCl₂, 20 мкМ каждого dNTP, 20 мкМ праймеров и 2.5 единицы ДНК-полимеразы Тад ("Sigma", США). Реакцию проводили в следующем режиме: начальная денатурация при 95°С в течение 5 мин. затем 30 циклов. включающих денатурацию при 95°С в течение 1 мин, отжиг при 55°С в течение 30 с и элонгацию при 72°С в течение 1 мин; и в конце – финальная элонгация в течение 10 мин.

Амплифицированный продукт клонировали в экспрессионный вектор рЕТ28а с введением гистидиновой метки (His-tag) на N-конец белка и трансформировали в Escherichia coli TOP10F'. Отсутствие ошибок в генетической конструкции подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Экспрессионный штамм E. coli BL21 (DE3) PlysS трансформировали рекомбинантной плазмидой для наработки белка. Ночную культуру разбавляли в 500 раз и выращивали в 2 л среды LB (содержащей 0.5 мкг/мл канамицина) до оптической плотности 0.5 при длине волны 600 нм, соответствующей экспоненциальной фазе роста. Для индукции экспрессии добавляли 0.5 мМ изопропилβ-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG) и продолжали культивирование в течение 2 ч, после чего охлаждали на льду в течение 20 мин. Бактериальные клетки собирали центрифугированием при 4500 g в течение 20 мин при 4°С и хранили при -80°C.

Для выделения целевого белка замороженную биомассу оттаивали, ресуспендировали в буфере для лизиса (LB): 20 мМ НЕРЕЅ, pH 7.4, 50 мМ KCl, 4.5% глицерин, 20 мМ имидазол, 0.15 мМ PMSF, 10 мМ β -меркаптоэтанол – и инкубировали с 0.5 мкг/мкл лизоцима в течение 1 ч при 4°С, периодически встряхивая. Лизис останавливали добавлением 0.05% Triton X-100 в 500 мМ NaCl. Полученную суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин (импульс 10 с с интервалом 10 с) при 4°С, центрифугировали и супернатант инкубировали с уравновешенными в LB гранулами Ni-NTA при 4°С в течение 1 ч при встряхивании; промывали тем же буфером и элюировали целевой белок ступенчатым градиентом имидазола, начиная с 20 мМ до 1 М. Наиболее чистые фракции собирали и проводили диализ против буфера: 20 мМ HEPES, pH 7.4, 50 мМ KCl, 4.5% глицерин, 0.15 мМ PMSF, 10 мМ β -меркаптоэтанол – до разведения 1 : 1000. Диализованный очищенный белок доводили до концентрации 1 мг/мл с помощью концентраторов с отсечкой по молекулярной массе (MWCO) ("Thermo Fisher Scientific", США). В наиболее чистых фракциях содержание глицерина доводили до 20% (v/v) и помещали их на хранение при -80° C.

Степень очистки выделенного белка анализировали электрофорезом в SDS-ПААГ с использованием бычьего сывороточного альбумина (BSA) в качестве стандарта. Для количественного определения белка гель, окрашенный Coomassie Brilliant Blue, анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ.

Сшивание белков. Олигомерное состояние белка определяли по образованию белок-белковых сшивок в буфере, содержащем 20 мМ НЕРЕS, pH 6.0, и 50 мМ NaCl, в присутствии 0.00125% глутаральдегида. Инкубацию проводили с белком и комплексом белок—ДНК в течение 2 мин, реакцию останавливали добавлением 1 М Трис-HCl (pH 8.0) с последующим добавлением SDS-содержащего буфера для нанесения образцов.

Влияние ДНК на олигомерное состояние МхуR определяли по содержанию олигомера, образующегося в результате обработки глутаральдегидом MxyR, предварительно проинкубированного с операторной ДНК *mxyO* в концентрации 10, 50, 100 и 200 нМ.

Сдвиг электрофоретический подвижности. Межгенную область *mxyO*, которая, как предполагается, является промоторной областью, амплифицировали с помощью ПЦР из геномной ДНК *M. tuberculosis* H37Rv с праймерами mxyO_Fw и mxyO_Rv (табл. S1). ПЦР проводили в тех же условиях, которые описаны выше, за исключением стадии отжига, проводившейся при 58°C в течение 1 мин. Амплифицированный продукт фрагмента ДНК *mxyO* размером 81 п.н. очищали пассивной элюцией и/или электроэлюированием с последующей экстракцией смесью фенол—хлороформ и осаждением этанолом.

Реакции связывания проводили в объеме 20 мкл, где очищенный белок МхуR в возрастающих концентрациях (4.66, 5.85, 7.26, 8.67, 13.88, 15.18 и 16.5 нМ) инкубировали с 9.5 нМ межгенной области *mxyO* в буфере для связывания (20 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 0.06% Triton X-100, 1.5% глицерин) при 25°C в течение 30 мин. Комплексы разделяли в 12%-ном ПААГ в ТАЕ-буфере (40 мМ Трис, 20 мМ АсOH, 1 мМ EDTA, pH 8.3) при 7.5 В/см в течение 3 ч при 4°C. Продукты визуализировали в ультрафиолетовом свете после окрашивания геля SYBR Green. Для количественного определения материала в полосах, соответствующих свободной ДНК и комплексам белок—ДНК, использовали программу ImageJ; полученные данные анализировали и наносили на график с использованием программы GraphPad Prism 7.00 и аппроксимировали по уравнению Хилла для специфического связывания лигандов [29, 30]:

$$f = \frac{f_{\max}[MxyR]^n}{K_d + [MxyR]^n},$$

где f_{max} — максимальное число сайтов специфического связывания при повышенных концентрациях; [MxyR] — концентрация белка; K_{d} — константа диссоциации в состоянии равновесия, а n — коэффициент Хилла.

Специфичность связывания. Специфичность взаимодействия между МхуR и его промоторной областью *mxyO* определяли путем воздействия на комплекс белок—ДНК конкурентной ДНК в избыточных молярных концентрациях (0.72, 1.43, 2.87, 4.3, 5.74 и 7.17 нМ) по сравнению с *mxyO*. В качестве конкурентной ДНК использовали линейную плазмиду pET28a.

Стехиометрия ДНК-белкового комплекса. Анализ сдвига электрофоретической подвижности белка при связывании ДНК проводили в трех повторах в вышеуказанных условиях при избыточных молярных концентрациях ДНК. Для количественного определения ДНК, как свободной, так и в комплексе с белком, в полосах геля использовали программу ImageJ [30]. Полученные данные наносили на график зависимости процентного содержания комплекса от соотношения концентраций MxyR в комплексе и в межгенной области mxyO и анализировали с помощью GraphPad Prism 7.00 [29]. Значение x на пересечении между касательными к наклону и плато кривой использовали для расчета стехиометрии комплекса МхуR-*тхуО* при насыщении.

Связывание MxyR с псевдопалиндромными последовательностями. На основании стехиометрических результатов было предсказано четыре псевдопалиндромные последовательности в межгенной области *тхуО*. Псевдопалиндромные последовательности размером 19 п.н. предсказаны с использованием алгоритма EMBOSS: Palindrome, допускающего до 10 несовпадений для каждой последовательности (http://emboss.bioinformatics.nl/ cgi-bin/emboss/palindrome). Олигомерные последовательности предсказанных связывающихся псевдопалиндромов (табл. S1) были синтезированы в компании "Intergrated DNA Technologies" (США). Олигонуклеотиды растворяли в буфере для отжига дуплексов, свободном от нуклеаз (100 мМ КОАс, 30 мМ HEPES, pH 7.5). Равные молярные количества прямой и обратной цепей каждого псевдопалиндромного сайта смешивали и нагревали до 94°C в течение 2 мин, после чего оставляли при комнатной температуре. Полученные двухцепочечные палиндромы очищали электроэлюцией. Значения сдвига электрофоретической подвижности и константы диссоциации (K_d) рассчитывали для каждого сайта отдельно, как указано выше. Консенсусную операторную последовательность длиной 19 п.н. сгенерировали из предсказанных палиндромов с использованием программы WebLogo 3.7 (http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi) [31].

Анализ *in vitro* связывания с предсказанными природными лигандами. Присутствие предполагаемого гена ксиланазы в опероне предполагает, что ксилан или любые продукты деградации ксилана могут действовать как естественные лиганды для комплекса белок-ДНК. Две структурно разные молекулы ксилана: ксилан с боковыми группами арабинозы и глюкуроновой кислоты, экстрагированный из кукурузного початка ("Sisco", США), ксилан с 4-О-метил-глюкуроновой кислотой, присоединенной к каждому 10 остатку ксилозы, экстрагированный из букового дерева ("Sigma", США), – а также мономер ксилана D(+)-ксилозу, структурно отличающийся пентозный сахар D(-)-арабинозу и гексозный сахар галактозу тестировали против комплекса MxyR-mxyO. Выбранные лиганды растворяли в 50 мМ Na-цитратном буфере (pH 5.3) и инкубировали с МхуR, который брали в концентрации, сравнимой с К_д для комплекса МхуR-*mxyO*, в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 0.06% Triton X-100 и 1.5% глицерина, при 25°С в течение 30 мин. Связывание с ДНК проводили в буфере, содержащем 20 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 50 мМ NaCl и 1.5% глицерина, при 25°С в течение 30 мин. Реакционную смесь наносили на 12%-ный ПААГ гель в ТАЕ-буфере (рН 8.3) и разделяли при 7.5 В/см в течение 3 ч при 4°С. Гель анализировали в ультрафиолетовом свете после окрашивания SYBR Green.

Кроме того, исследована аттенуация комплекса ДНК—белок продуктами расщепления арабиноксилана и глюкуроноксилана. Для этого анализа использовали внеклеточную ксиланазу из *Tricoderma virens*. Фермент ксиланазу добавляли к ксилану в буфере, содержащем Трис-HCl (pH 8.0), и инкубировали при 37°С в течение ночи. Реакцию останавливали нагреванием при 70°С в течение 10 мин. Анализ связывания обработанных и необработанных ксиланов проводили аналогично описанному выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Структура генетического локуса

Ген *rv3095 М. tuberculosis* H37Rv кодирует транскрипционный регулятор семейства MarR длиной 158 аминокислотных остатков, который в



Рис. 1. Генетическая организация области, прилегающей к *mxyO* и содержащей предполагаемые сайты связывания MxyR. Стрелками показаны точки старта и направления транскрипции. MxyR, $1,4-\beta$ -ксиланаза, гидролаза, оксидоредуктаза и ABC-транспортер кодируются генами *rv3095, rv3096, rv3094c, rv3093c* и *rv3092c* соответственно. Межгенный участок *mxyO* длиной 81 п.о., разделяющий гены, кодирующие MxyR и гидролазу, действует как общая промоторная область, включающая регионы -35 и -10, выделенные желтым и темно-синим цветом. Сайты начала транскрипции в обоих направлениях показаны красными изогнутыми стрелками, тогда как начало ORF MxyR и гидролазы указаны голубыми стрелками. Области промоторов и точки начала транскрипции предсказаны с помощью программы BPROM.

этой работе упоминается как MxvR. Межгенная область mxyO длиной 81 п.н. разделяет гены rv3095 и rv3094c. Фланкирующие mxyO гены rv3095 и rv3096 ориентированы в одном направлении, тогда как rv3092c, rv3093c и rv3094c ориентированы в противоположном направлении (рис. 1). Межгенная область *mxvO* действует как общая промоторная, включающая регионы -35 и -10 дивергентно ориентированных промоторов и предполагаемые сайты связывания MxyR (рис. 1). Функцию белков, кодируемых генами rv3094с и rv3096, определяли путем поиска гомологов (BLASTp). Можно предположить, что гены rv3094c и rv3096 кодируют гидролазу (84% идентичности при 100%-ном покрытии) и 1,4-β-ксиланазу (83% идентичности при 98%-ном охвате). Наиболее близкие гомологи с охарактеризованной функцией обнаружены у нетуберкулезной микобактерии *M. kansasii*.

Филогенетический анализ

Последовательности результатов поиска Protein Blast (BLASTp) с более чем 60%-ным сходством были выровнены с ClustalW, и филогенетическое дерево было построено по методу ближайших соседей. Дерево было укоренено с помощью MarR *Escherichia coli*, при этом в качестве контроля использовали хорошо охарактеризованный гомолог из *Pseudomonas aeruginosa* Q9I3B4. При выравнивании МхуR с другими гомологами семейства MarR выявлено, что ДНК-узнающие α -спирали есть только в подмножестве гомологов, которое в основном включает MarR из видов микобактерий (рис. 2*a* и 2*б*). Помимо микобактерий, большинство других видов, которые, как предполагается, кодируют гомолог MxyR, относится к актиномицетам.

Структура MxyR смоделирована в программе SWISS с использованием PA1607 в качестве шаблона и подтверждена анализом с использованием графика Рамачандрана (рис. 2*в* и рис. S1). Построение показывает, что большинство остатков (91.5%) находится в предпочитаемой области и смоделированная структура имеет большое число параллельных β -листов и правосторонних α -спиралей (рис. S1, см. Приложение на сайте http:// www.molecbio.ru/downloads/2022/1/supp_Mauran_rus.pdf).

Мономерная форма моделируемой структуры MxyR состоит из шести α-спиралей и четырех β-листов в топологическом порядке: α1- $\alpha 2 - \alpha 3 - \alpha 4 - \beta 1 - \beta 2 - \alpha 5 - \alpha 6 - \beta 3 - \beta 4$ (рис. 2*в*). Спирали α5 и α6 образуют длинную непрерывную спираль. Антипараллельные β-листы между спиралями α4 и α5 формируют мотив спираль-поворот-спираль (wHTH), тогда как другие два β-листа, β3 и β4, принимают участие в димеризации субъединиц. Димеризация в основном происходит через спирали $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ и $\alpha 6$ и стабилизируется ими, поскольку антипараллельное образование длинной спирали α5 и α6 важно для образования димера. Согласно структурному выравниванию MxyR с PA1607, спираль α4 идентифицирована как ДНК-узнающая, которая напрямую взаимодействует с операторной областью ДНК.

МхуR связывается с вышележащей промоторной областью тхуО

Для исследования связывания MxyR с *mxyO* ген *rv3095*, кодирующий MxyR, клонировали в

MAURAN и др.


Рис. 2. Филогенетический анализ белка MxyR. *a* – Выравнивание последовательностей MxyR *M. tuberculosis* и его гомологов. *б* – Эволюционные отношения MxyR и регуляторов транскрипции, для которых выявлена тесная связь с MxyR. Кластер, содержащий виды микобактерий, выделен синим цветом, MxyR – красным. Дерево укоренено с помощью MarR *E. coli* в качестве внешней группы. Для каждого гомолога приведено видовое название и идентификатор записи в Uniprot. *в* – Модель белка MxyR с выделением α-спиралей и β-листов. Каждый мономер (синий и серый) моделируется цепью A и B PA1607. ДНК-связывающие домены обоих мономеров обозначены желтым цветом.

экспрессионный вектор рЕТ28а. Штамм *E. coli* BL21 (DE3) PlysS трансформировали рекомбинантной плазмидой и индуцировали сверхэкспрессию целевого белка, который затем удалось очистить почти до гомогенного состояния (рис. 3*a*). Олигомерную форму целевого белка анализировали через образованные глутаральдегидом сшивки (рис. 3*b*). Показано, что МхуR (M_r мономера ~21 кДа) образует димер (~42 кДа) в качестве основной фракции. Влияние ДНК на олигомерное состояние белка анализировали, используя увеличивающиеся концентраций *mxyO*: 10 \rightarrow 50 \rightarrow 100 \rightarrow 200 нМ – против обработанного глутаральдегидом белка (рис. 3*b*). Показано, что связывание с ДНК не влияет на олигомерное состояние МхуR.

Связывание MxyR с областью *mxyO* исследовали по сдвигу электрофоретической подвижности. Межгенная область вместе с дополнительными 23 и 24 основаниями фланкирующих генов использована в качестве целевой ДНК *mxyO* (область между 3463867 и 3463995). Анализ сдвига и стехиометрические расчеты показали, что при увеличении концентрации белка образуется четыре комплекса (рис. 4*a* и 4*b*). Графическую зависимость образования комплекса MxyR—*mxyO* от концентрации МхуR аппроксимировали по уравнению Хилла и рассчитали константу диссоциации (K_d 5.01 ± ± 0.017 нМ) (рис. 46). На положительную кооперативность указывает коэффициент Хилла (n), равный 2.8 ± 0.19. В результате анализа образования комплекса белок-ДНК в присутствии увеличивающихся концентраций ДНК рЕТ28а подтверждена специфичность связывания МхуR с последовательностью *mxyO* (рис. 4 ϵ).

MxyR связывается с псевдопалиндромными последовательностями

Псевдопалиндромы Ψ P1, Ψ P2, Ψ P3 и Ψ P4 (рис. 5*a*) в межгенной области *mxyO* были исследованы на потенциальные сайты связывания МхуR. В связи с тем, что MxyR – регулятор транскрипции типа MarR, было предсказано, что он связывается с инвертированным повтором длиной 19 п.н. в области между *mxyR* и геном, кодирующим гидролазу. Показано, что среди предсказанных сайтов MxyR связывается с Ψ P1, Ψ P3 и Ψ P4, причем с высоким сродством к Ψ P3 (K_d = 7.7 ± ± 1.08 нМ) (рис. 5*6* и 5*в*). Для псевдопалиндромов Ψ P1 и Ψ P4 значения K_d были выше: 44.4 ± 1.48 нМ и 37.0 ± 1.02 нМ соответственно. Псевдопалиндромы Ψ P3 и Ψ P4 перекрываются друг с другом



Рис. 3. МхуR *M. tuberculosis* H37Rv преимущественно находится в виде димера. *a* – Электрофоретический анализ очищенного белка МхуR (дорожка 2). *б* – Анализ обработанного глутаральдегидом очищенного МхуR: МхуR (2), обработанный глутаральдегидом мхуR (3). *в* – Сшивание МхуR глутаральдегидом в присутствии *mxyO*: МхуR (концентрация мономера 5 нМ) (2), ДНК *mxyO* (концентрация 200 нМ) (3), обработанный глутаральдегидом МхуR (4), обработанный глутаральдегидом мхуR (4), обработанный глутаральдегидом мхуR в присутствии 10 (5), 50 (6), 100 (7) и 200 (8) нМ *mxyO*. Везде на дорожку 1 нанесен маркер молекулярной массы белков.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022



Рис. 4. Связывание МхуR с ДНК *mxyO. a* – Анализ сдвига электрофоретической подвижности МхуR с ДНК *mxyO*: свободная ДНК *mxyO* (1), продукты взаимодействия ДНК *mxyO* (9.5 нМ) с 4.66 (2), 5.85 (3), 7.26 (4), 8.67 (5), 13.88 (6), 15.18 (7) и 16.5 (8) нМ белка МхуR. δ – Нормализованная концентрация комплекса МхуR–*mxyO* как функция концентрации МхуR (Ig[MyxR]). Приведено стандартное отклонение (SD) по результатам трех независимых повторов. *в* – Определение стехиометрии комплекса МхуR–*mxyO*. График построен как зависимость образования комплекса в процентах от соотношения концентраций белка МхуR и ДНК *mxyO. е* – Анализ специфичности связывания МхуR с ДНК: только ДНК *mxyO* (1); примерно 50% ДНК *mxyO* (5.01 нМ) находится в комплексе с МхуR (9.5 нМ) (2); к комплексу белок–ДНК добавляли 0.72 (3), 1.43 (4), 2.87 (5), 4.3 (6), 5.74 (7) и 7.17 (8) нМ линейной ДНК pET28a в качестве потенциального конкурентного ингибитора; только ДНК pET28a (9).

одной парой оснований. Выровненные последовательности использовали для создания консенсусной последовательности с помощью инструмента WebLogo (рис. 5г). Рассматривая консенсусную последовательность, можно заметить ее асимметричность с наличием нескольких высококонсервативных областей ($G_2T_4G_8$ и $G_{14}C_{18}A_{19}$).

Связывание углеводов

Присутствие предполагаемого гена ксиланазы в исследованном кластере привело нас к исследованию промежуточных продуктов пути деградации ксилана в качестве потенциальных природных лигандов МхуR. Нами проанализировано два структурно различных варианта ксилана: арабиноксилан и глюкуроноксилан, — субстраты фермента ксиланазы. Кроме того, в качестве контролей использовали *D*-ксилозу как сахар-пентозу, образующуюся после утилизации ксиланов ксиланазой; *L*-арабинозу как изомер *D*-ксилозы и *D*-галактозу как сахар-гексозу. Два структурно различных варианта ксилана происходят из двух разных растительных источников. Так, ксилан с боковыми группами 4-О-метилглюкуроновой кислоты, присоединенной к каждому 10 остатку ксилозы (далее: ВW-ксилан), был получен из двудольного растения бука, а ксилан с боковыми группами арабинозы и глюкуроновой кислоты (далее: СС-ксилан) был получен из однодольного растения кукурузы (рис. 6а). Обнаружено, что растворимость СС-ксилана выше, чем ВW-ксилана. Среди протестированных углеводов только ВW-ксилан, L-арабиноза и D-галактоза ослабляли связывание MxyR с ДНК (рис. 66 и 6в). Хотя *L*-арабиноза в высоких концентрациях действует как лиганд МхуR, содержащий *L*-арабинозу СС-ксилан не "работает" ни в одной из исследованных концентраций. Оказалось, что комплекс MxvR-*mxvO* с самой высокой электрофоретической подвижностью проявлял наибольшую стабильность при добавлении лигандов, то есть обладал наибольшей аффинностью связывания. Мы также исследовали стабильность комплекса



Рис. 5. Связывание MxyR с четырьмя псевдопалиндромными последовательностями. *a* – Последовательность *mxyO* и предполагаемые связываемые MxyR псевдопалиндромные последовательности ΨP1, ΨP2, ΨP3 и ΨP4. *b* – Анализ сдвига электрофоретической подвижности MxyR при взаимодействии с псевдопалиндромными последовательностями: свободная ДНК (1); к палиндромной ДНК добавляли белок MxyR в концентрации 15 (2), 30 (3), 60 (4), 100 (5), 200 (6) или 300 (7) нМ. *в* – Зависимость образования комплексов MxyR–ДНК от lg[MxyR]. *e* – Консенсусная последовательность, с которой связывается MxyR. Высота букв оснований соответствует частоте встречаемости в каждой позиции.

МхуR—*mxyO* в присутствии трех ксилоолигосахаридов: ксилобиозы, ксилотриозы и ксилотетраозы (рис. S2 и 6б). Среди них только ксилотетраоза ослабляла связывание MxyR с ДНК (рис. 6б и 6в). Наибольшее ослабление связывания MxyR с ДНК наблюдали для ВW-ксилана – с IC₅₀ 22.74 \pm 1.02 нг/мкл. Для других лигандов: *L*-арабинозы, *D*-галактозы и ксилотетраозы – значения IC₅₀ были гораздо выше: 360.8 \pm 24.25, 2320 \pm 96.97 и 1241 \pm 35.24 нг/мкл соответственно (рис. 6*в*).



Рис. 6. Кинетика связывания MxyR с углеводами. a – Структура ксилана кукурузного початка с боковыми группами ксилоарабинозы и глюкуроновой кислоты (СС-ксилан) и ксилана бука с 4-О-метилглюкуроновой кислотой, присоединенной к каждому 10 остатку ксилозы (ВW-ксилан). δ – Влияние углеводов на комплекс MxyR–*mxyO*: ДНК *mxyO* (1), примерно 50% ДНК *mxyO* находится в комплексе с MxyR (2), комплекс белок–ДНК в присутствии возрастающих указанных концентраций углеводов. e – Количественный анализ содержания комплекса MxyR–*mxyO* в зависимости от концентрации лиганда. Результаты представлены как среднее значение ± SD, рассчитанное на основании трех независимых экспериментов.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

a



Рис.7. Влияние расщепленных и нативных ксиланов на стабильность комплекса MxyR—mxyO.a – Анализ сдвига электрофоретической подвижности с расщепленными и нативными BW- и CC-ксиланами: ДНК mxyO (1), комплекс MxyR—mxyO в равновесных условиях (2), на остальные дорожки нанесены образцы комплекса MxyR—mxyO в присутствии возрастающих концентраций CC- или BW-ксилана. δ – Зависимость содержания комплекса MxyR—mxyO от концентрации нативного или обработанного ксиланазой BW-ксилана.

Кроме того, мы исследовали аттенуацию комплекса ДНК-белок продуктами расщепления ксилана. Для этого использовали внеклеточную ксиланазу из *Trichoderma virens*. СС-ксилан ни в нативной, ни в расщепленной формах не влиял на стабильность комплекса, в то время как ВW-ксилан "срабатывал" в обеих формах (рис. 7*a* и 7*b*); при этом нативный BW-ксилан в 6 раз эффективнее дестабилизировал комплекс МхуR-*mxyO* по сравнению с обработанным ксиланазой препаратом (IC₅₀ 22.5 ± 1.04 и 130.0 ± 6.09 нг/мкл соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Понимание регуляции экспрессии генов на транскрипционном уровне имеет решающее значение для анализа метаболизма любого организма. Уже много исследований посвящено изучению транскрипционных факторов M. tuberculosis, среди которых факторы семейства MarR привлекают большое внимание. Белки Rv1049 (MosR) [16], Rv0880, Rv2887 [20, 32], Rv1404 [18] и Rv0678 [21] исследовали в аспекте их участия в ответе на окислительный и кислотный стрессы, реакции на воздействие лекарственных средств и глицериновых эфиров жирных кислот. Однако на факторы транскрипции семейства MarR, реагирующие на углеводы, обращали внимание редко, поэтому обнаружение их гомолога у M. tuberculosis было неожиданным – обычно их находят в сапрофитах и патогенах растений [24, 26, 33]. Здесь интересующий кластер генов включает предполагаемый ген ксиланазы, который может быть функционально неактивен по отношению к хозяину патогена, человеку, в связи с отсутствием в его организме субстрата — ксилана. 1,4-β-ксиланаза участвует в пути разложения ксилана и расщепляет его до ксилозы и/или ксилоолигосахаридов [34]. Присутствие предполагаемого гена ксиланазы в генном кластере предполагает, что на регуляцию транскрипции этого кластера влияет ксилан и/или интермедиаты, образующиеся при его деградации.

MxvR связывается с *mxvO*, который расположен между собственным геном (rv3095) и геном rv3094, кодирующим гидролазу, что позволяет предположить, что на регуляцию транскрипции может влиять связывание сигма-факторов с общей промоторной областью. Динамическое связывание MxvR с операторной областью может обеспечивать базальный уровень экспрессии *тхуR*. Благодаря оперонной структуре кластера, транскрипционная регуляция может распространяться не только на "собственную" экспрессию, но и на другие белки, кодируемые генами этого кластера, включая предполагаемый фермент ксиланазу. In vitro добавление BW-ксилана к комплексу MxyR-mxyO значительно снижало его содержание. В клетке ксилан действует как лиганд МхуR и ослабляет его связывание с ДНК, что влияет на транскрипцию. В связи с тем, что связывание MxyR с промоторной областью может либо активировать, либо супрессировать транскрипцию гена ксиланазы, оно будет напрямую влиять на гомеостаз уровня ксилана в клетке.

Хотя ксилан в большом количестве содержится в растительном материале как неотъемлемая часть гемицеллюлозы, можно полагать, что *M. tu*berculosis не сталкивается с этим соединением в больших количествах в течение своего жизненного цикла. Возможно, что гипотетический ген ксиланазы происходит от предковых почвенных микобактерий. Филогенетический анализ выявил, что большинство гомологов MxvR принадлежат почвенным и другим бактериям окружающей среды (рис. 2*a* и 2*б*). Гомологи МхуR в основном связаны с условно-патогенными бактериями, при полном сходстве с транскрипционным фактором из *M. canettii* – вида, относящегося к комплексу Mycobacterium tuberculosis, – а также с некоторыми другими нетуберкулезными бактериями, поражающими пациентов с ослабленным иммунитетом. Хотя эти бактерии поражают легочную систему человека, некоторые из этих видов были первоначально обнаружены и выделены из окружающей среды: *M. szulgai* и *M. angelicum* из пресноводных источников и пресноводных рыб [35, 36], *М. тагіпит* из морской воды и морских рыб [37], M. conspicuum и M. moriokaense из почвы [38, 39].

Помимо микобактерий, большинство других видов, содержащих гомолог MxyR, относится к актиномицетам, выделенными из почвы. *Amycolaptosis vancoresmycina*, *Kutzneria buriramensis*, *A. xy*- lanica и A. saalfeldensis относятся к семейству Pseudonocardiaceae. Это семейство актиномицетов имеет в составе клеточной стенки типа IV мезо-диаминопимелиновую кислоту, арабинозу и галактозу; МК-9(Н₄) в качестве основного менахинона и отсутствие миколовых кислот [40-43]. Lechevalieria xinjiangensis u Lentzea wavwavandensis, принадлежащие к семейству Actinosynnemataceae, также кодируют гомолог MxyR. Семейство Actinosynnemataceae имеет состав клеточной стенки типа III с мезо-диаминопимелиновой кислотой, галактозой и маннозой или рамнозой [44, 45]. Почвенные бактерии A. saalfeldensis и A. xylanica используют *L*-арабинозу, *D*-фруктозу, *D*-глюкозу и *D*-ксилозу в качестве единственного источника углерода [40-43]. Присутствие гомологов МхуR в почвенных бактериях можно расценивать как подтверждение гипотезы о том, что этот регулятор пути деградации ксилана в M. tuberculosis, coхранился от предковых почвенных микобактерий, поскольку организм хозяина (человека) не продуцирует и не накапливает ксиланы в течение жизни. Однако, по всей видимости, у M. tuberculosis MxyR сохранился в активной форме для выполнения той же и/или другой физиологической функции.

В настоящее время нет сообщений о наличии у человека ксилана, ксилозы или родственных соединений. Однако в капсуле M. tuberculosis обнаружены следовые количества ксилана [46]. Присутствие гена ксиланазы в патогене, который не сталкивается с ксиланом, конечно, интригует. Между тем гены, кодирующие предполагаемые переносчики углеводов в M. tuberculosis, играют важную роль в использовании углеводов в качестве источника углерода только в течение первой недели заражения. Благодаря наличию адаптивной иммунной системы, этот организм может использовать липиды в качестве основного источника углерода на последующих стадиях своего инфекционного цикла [47]. Сапрофитные микобактерии используют более широкий спектр углеводов в качестве источника углерода и имеют большое число систем утилизации углеводов, тогда как в *M. tuberculosis* найдено только пять из них [44]. Однако эти углеводы не могут быть использованы в качестве источника углерода, поскольку они являются структурными компонентами клеточной оболочки микобактерий. Хотя M. tuberculosis не имеет доступа к ксилозе в естественной среде, эта бактерия обладает способностью синтезировать молекулы сахаров, которые необходимы для формирования ее структуры и/или физиологии, из других углеводов - тех, которые могут быть ею усвоены [44]. Действительно, большая часть компонентов клеточной оболочки микобактерий синтезируется самим организмом [45, 48]. Следовательно, присутствие ксилана в капсуле M. tuberculosis и синтез этой бактерией необходимых углеводов из других усваиваемых ею сахаров позволяют говорить о возможности ею и синтеза ксилана. Таким образом, мы предполагаем, что клетки *M. tuberculosis* могут усваиваемые ими углеводы конвертировать в ксилан.

Нами показано, что ксилан с 4-О-метил-глюкуроновой кислотой, присоединенной к каждому 10 остатку ксилозы, действует как лиганд МхуR, ослабляя его связывание с ДНК (рис. 6). Помимо этого соединения, *L*-арабиноза и галактоза также действуют как лиганды МхуR, но пути утилизации всех этих соединений *M. tuberculosis* неизвестны. Есть собщения о значительном содержании производных арабинозы в оболочке микобактериальных клеток в виде арабиноманнана в капсуле и арабиногалактана, соединяющего миколовые кислоты с клеточной стенкой [46, 49].

Остается немало вопросов на пути к полному пониманию метаболизма *M. tuberculosis*. Выявление транскрипционных цепочек — важнейшая задача, и проведенное исследование вносит вклад в понимание регуляторной функции необычных для этого патогена углеводов

В итоге определена роль белка MxyR как регулятора транскрипции из семейства MarR и идентифицированы его природные лиганды. Кроме того, изучен механизм регуляции экспрессии гена ксиланазы *M. tuberculosis*, высказано предположение о его происхождении от предковых почвенных бактерий. Исследованы природные лиганды MxvR, а для углеводов, которые присутствуют в клеточной стенке микобактерий: ксиланов с 4-О-метил-глюкуроновой кислотой, присоединенной к каждому 10 остатку ксилозы, *L*-арабинозы и галактозы, выявлена способность ослаблять связывание МхуR с ДНК, а значит их можно рассматривать как потенциальные лиганды МхуR. Полученные результаты ставят много вопросов и задают направления дальнейших исследований по физиологии *M. tuberculosis*.

Работа поддержана Национальным исследовательским советом Шри-Ланки (National Research Council, Sri Lanka; Grant No: NRC 15-063).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. World Health Organization. (2020) *Global tuberculosis* report 2020.
- 2. Perera I.C., Grove A. (2010) Urate is a ligand for the transcriptional regulator PecS. J. Mol. Biol. **402**(3), 539–551.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

- Wilkinson S.P., Grove A. (2004) HucR, a novel uric acid-responsive member of the MarR family of transcriptional regulators from *Deinococcus radiodurans*. *J. Biol. Chem.* 279(49), 51442–51450.
- Stapleton M.R., Norte V.A., Read R.C., Green J. (2002) Interaction of the *Salmonella typhimurium* transcription and virulence factor SlyA with target DNA and identification of members of the SlyA regulon. *J. Biol. Chem.* 277(20), 17630–17637.
- Ellison D.W., Miller V.L. (2006) Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 153–159.
- Chang Y.M., Jeng W.Y., Ko T.P., Yeh Y.J., Chen C.K., Wang A.H. (2010) Structural study of TcaR and its complexes with multiple antibiotics from *Staphylococcus epidermidis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**(19), 8617–8622.
- Michaux C., Sanguinetti M., Reffuveille F., Auffray Y., Posteraro B., Gilmore M.S., Hartke A., Giard J.C. (2011) SlyA is a transcriptional regulator involved in the virulence of *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* **79**(7), 2638–2645.
- 8. Birukou I., Seo S.M., Schindler B.D., Kaatz G.W., Brennan R.G. (2014) Structural mechanism of transcription regulation of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux operon mepRA by the MarR family repressor MepR. *Nucleic Acids Res.* **42**(4), 2774–2788.
- Kim H., Choe J. (2013) The X-ray crystal structure of PA1374 from *Pseudomonas aeruginosa*, a putative oxidative-stress sensing transcriptional regulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 431(3), 376–381.
- Palm G.J., Khanh Chi B., Waack P., Gronau K., Becher D., Albrecht D., Hinrichs W., Read R.J., Antelmann H. (2012) Structural insights into the redoxswitch mechanism of the MarR/DUF24-type regulator HypR. *Nucleic Acids Res.* **40**(9), 4178–4192.
- Aoki R., Takeda T., Omata T., Ihara K., Fujita Y. (2012) MarR-type transcriptional regulator ChlR activates expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in response to low-oxygen conditions in cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* 287(16), 13500–13507.
- Seoane A.S., Levy S.B. (1995) Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177(12), 3414–3419.
- Quade N., Mendonca C., Herbst K., Heroven A.K., Ritter C., Heinz D.W., Dersch P. (2012) Structural basis for intrinsic thermosensing by the master virulence regulator RovA of *Yersinia*. J. Biol. Chem. 287(43), 35796–35803.
- Martin R.G., Rosner J.L. (1995) Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to mar operator sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92(12), 5456–5460.
- 15. Alekshun M.N., Levy S.B., Mealy T.R., Seaton B.A., Head J.F. (2001) The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 710–714.
- 16. Brugarolas P., Movahedzadeh F., Wang Y., Zhang N., Bartek I.L., Gao Y.N., Voskuil M.I., Franzblau S.G., He C. (2012) The Oxidation-sensing regulator (MosR) is a new redox- dependent transcription factor in *Myco*-

bacterium tuberculosis. J. Biol. Chem. **287**(45), 37703–37712.

- Camara A.S., Horjales E. (2018) Computer simulations reveal changes in the conformational space of the transcriptional regulator MosR upon the formation of a disulphide bond and in the collective motions that regulate its DNA-binding affinity. *PLoS One.* 13(2), 1–23.
- Healy C., Golby P., Machugh D.E., Gordon S.V. (2016) The MarR family transcription factor Rv1404 coordinates adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to acid stress via controlled expression of Rv1405c, a virulence-associated methyltransferase. *Tuberculosis*. 97, 154–162.
- Winglee K., Lun S., Pieroni M., Kozikowski A., Bishai W. (2015) Mutation of *Rv2887*, a marR-like gene, confers *Mycobacterium tuberculosis* resistance to an imidazopyridine-based agent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(11), 6873–6881.
- Warrier T., Kapilashrami K., Argyrou A., Ioerger T.R., Little D., Murphy K.C. (2016) N-methylation of a bactericidal compound as a resistance mechanism in *Mycobacterium tuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113(31), E4523–E4530.
- Radhakrishnan A., Kumar N., Wright C.C., Chou T.H, Tringides M.L., Bolla J.R., Lei H.T, Rajashankar K.R, Su C.C, Purdy G.E., Yu E.W. (2014) Crystal structure of the transcriptional regulator Rv0678 of *Mycobacterium tuberculosis. J. Biol. Chem.* 289(23), 16526–16540.
- Yeoman C.J., Han Y., Dodd D., Schroeder C.M., Mackie R.I., Cann I.K.O. (2010) Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. *Adv. Appl. Microbiol.* 70, 1–55.
- 23. Schyns P. (1997) The bacterial degradation of xylan. In: *Xylan Degradation by the Anaerobic Bacterium Bacteroides xylanolyticus*. 1–44.
- Han Y., Agarwal V., Dodds D., Kims J., Bae B., Mackie R.I., Nair S.K., Cann I.K.O. (2012) Biochemical and structural insights into xylan utilization by the thermophilic bacterium *Caldanaerobius polysaccharolyticus. J. Biol. Chem.* 287(42), 34946–34960.
- Johnsen U., Dambeck M., Zaiss H., Fuhrer T., Soppa J., Sauer U., Schönheit P. (2009) D-xylose degradation pathway in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *J. Biol. Chem.*284, 27290–27303.
- Hasper A.A., Visser J., De Graaff L.H. (2000) The Aspergillus niger transcriptional activator XlnR, which is involved in the degradation of the polysaccharides xylan and cellulose, also regulates D-xylose reductase gene expression. *Mol. Microbiol.* 36(1), 193–200.
- Lovell S.C., Davis I.W., Arendall III W.B., de Bakker P.I.W., Word J.M., Prisant M.G., Richardson J.S., Richardson D.C. (2003) Structure validation by C alpha geometry: Phi, Psi and C beta deviation. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 50(3), 437–450.
- Solovyev V.V., Salamov A. (2011) Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. In: *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*. 61–78.
- 29. Specific binding with Hill's slope performed using Graph-Pad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com

- Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W., Instrumentation C. (2012) NIH Image to ImageJ : 25 years of Image Analysis. *Nat. Methods*. 9(7), 671–675.
- Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.M., Brenner S.E. (2004) WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14(6), 1188–1190.
- 32. Peterson E.J.R., Ma S., Sherman D.R., Baliga N.S. (2016) Network analysis identifies Rv0324 and Rv0880 as regulators of bedaquiline tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Microbiol.* **1**(8), 1–7.
- Häkkinen M., Sivasiddarthan D., Aro N., Saloheimo M., Pakula T.M. (2015) The effects of extracellular pH and of the transcriptional regulator PACI on the transcriptome of *Trichoderma reesei*. *Microb. Cell Fact.* 14(63), 1–15.
- 34. Topakas E., Panagiotou G., Christakopoulos P. (2013) Xylanases: characteristics, sources, production, and applications. In: *Bioprocessing Technologies in Biorefinery* for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers. 147–165.
- Marumo K., Nakamura H., Tazawa S., Kazumi Y., Kawano R., Shirata C., Taguchi K. (2010) Isolation of novel mycobacteria contaminating an aquarium fish tank in a Japanese university hospital. *J. Appl. Microbiol.* 109(2), 558–566.
- Pourahmad F., Pate M., Borroni E., Cabibbe A.M., Capitolo E., Cittaro D., Frizzera E., Mariottini A., Marumo K., Cirillo D.M., Tortoli E. (2015) *Mycobacterium angelicum* sp. nov., a non-chromogenic, slowgrowing species isolated from fish and related to *Mycobacterium szulgai. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65(12), 4724–4729.
- 37. Aronson J.D. (1926) Spontaneous tuberculosis in salt water fish. J. Infect. Dis. **39**(4), 315–320.
- Tsukamura M., Yan I., Imaeda T. (1986) *Mycobacterium moriokaense* sp. nov., a rapidly growing, nonphotochromogenic mycobacterium. *Internl. J. Syst. Bacteriol.* 36(2), 333–338.
- Kopecky J., Kyselkova M., Omelka M., Cermak L., Novotna J., Grundmann G., Moënne-loccoz Y., Sagova-Mareckova M. (2011) Soil biology and biochemistry environmental mycobacteria closely related to the pathogenic species evidenced in an acidic forest wetland. *Soil Biol. Biochem.* 43(3), 697–700.
- 40. Suriyachadkun C., Ngaemthao W., Chunhametha S., Tamura T., Sanglier J.J. (2013) *Kutzneria buriramensis* sp. nov., isolated from soil, and emended description of the genus *Kutzneria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**(1), 47–52.
- Chen J., Su J.J., Wei Y.Z., Li Q.P., Yu L.Y., Liu H.Y., Zhang Y.Q., Zhang Y.Q. (2010) *Amycolatopsis xylanica* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60(9), 2124–2128.
- 42. Kaur N., Kumar S., Mayilraj S. (2014) Genomics data genome sequencing and annotation of *Amycolatopsis* vancoresmycina. Genomics Data. **2**, 16–17.
- Carlsohn M.R., Groth I., Tan G.Y.A., Schütze B., Saluz H.P., Munder T., Yang J., Wink J., Goodfellow M. (2007) *Amycolatopsis saalfeldensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a medieval alum slate mine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(7), 1640–1646.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

- 44. Titgemeyer F., Amon J., Parche S., Mahfoud M., Bail J., Schlicht M., Rehm N., Hillmann D., Stephan J., Walter B., Burkovski A., Niederweis M. (2007) A genomic view of sugar transport in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol. 189(16), 5903–5915.
- Hanks J.H. (1961) Demonstration of capsules on *M. leprae* during carbol-fuchsin staining mechanism of the Ziehl-Neelsen stain. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 29(2), 179–182.
- Ortalo-Magné A., Dupont M.A., Lemassu A., Andersen A.B., Gounon P., Daffé M. (1995) Molecular

composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology*. **141**(7), 1609–1620.

- 47. Sassetti C.M., Rubin E.J. (2003) Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**(22), 12989–12994.
- Hanks J.H. (1961) The origin of the capsules on *Mycobacterium leprae* and other tissue-grown *Mycobacteria*. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 29(2), 172–174.
- 49. Chatterjee D. (1997) The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1(4), 579–588.

MxyR OF *Mycobacterium tuberculosis* RESPONDS TO XYLAN: AN UNUSUAL LIGAND FOR A MarR FAMILY TRANSCRIPTIONAL REGULATOR

S. Mauran¹, N. T. Perera², and I. C. Perera^{1, *}

¹ Synthetic Biology Laboratory, Department of Zoology and Environment Sciences, Faculty of Science, University of Colombo, Colombo 03, 00700 Sri Lanka

² Department of Chemistry, Faculty of Applied Sciences, University of Sri Jayewardenepura, Nugegoda, Sri Lanka *e-mail: icperera@sci.cmb.ac.lk

Among the repertoire of MarR family transcriptional regulators in *Mycobacterium tuberculosis*, gene *rv3095* (*mxyR*) encodes Mycobacterial Xylanase Regulator, MxyR. Gene *mxyR* is divergently oriented from a hydrolase (*rv3094c*), oxidoreductase (*rv3093c*) and an ABC transporter (*rv3092c*) and convergently oriented with xylanase (*rv3096*). Xylanase is commonly used by plant pathogenic microbes where they degrade xylan, the major component of hemicellulose. We have purified the transcriptional regulatory protein encoded by *rv3095* and its molecular interactions were studied in detail using electrophoretic mobility shift assay. MxyR interacts with its upstream intergenic region *mxyO* with high specificity and at a dissociation constant of 5.01 \pm 0.017 nM. Notably, this binding is attenuated by specific carbohydrate ligands such as xylan, L-arabinose and D-galactose with an IC₅₀ values of 22.7 \pm 1.02 ng/µL, 360.8 \pm 24.25 ng/µL and 2320.0 \pm 96.97 µg/µL, respectively. Consequently, it is evident that this association changes the conformation of the DNA binding helix α 4 making the transcriptional regulator incompatible with binding to its cognate DNA, allowing xylanase and other genes to be transcribed. This study establishes the natural ligands of MxyR of *M. tuberculosis* providing insight on metabolic regulation of the carbohydrate, xylan.

Keywords: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, transcriptional regulator, MxyR, DNA binding, carbohydrate ligands, xylan

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21:579.23"315

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ 5'-ФЛАНКИРУЮЩЕЙ ОБЛАСТИ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИН ЧЕЛОВЕКА^{1, 2}

© 2022 r. C. Zhang^{a,} *, H. J. Zhao^a, J. Wang^a, W. Y. Zhou^a, T. J. Zhang^a, C. B. Zhang^{a,} **

^aNational Center for Clinical Laboratories, Beijing Hospital, National Center of Gerontology; Institute of Geriatric Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, P.R. China *E-mail: zc_mdy@163.com **E-mail: cbzhang@nccl.org.cn

Поступила в редакцию 07.01.2021 г. После доработки 14.04.2021 г. Принята к публикации 18.05.2021 г.

Альфа-фетопротеин (AFP) — фактор роста и сигнальная молекула, которая способствует развитию гепатоклеточной карциномы (HCC). Однако механизм "пробуждения" AFP в ходе прогрессии HCC не установлен. Структура 5'-фланкирующей регуляторной области гена *AFP* изучена с использованием двойных люциферазных репортерных векторов с фрагментами этой области. Репортерные конструкции вводили в линии клеток гепатомы HepG2 и PLC. Регуляторные 5'-фланкирующие последовательности –1871...–1004 п.н. *AFP* стимулировали транскрипцию гена, тогда как влияние последовательности –1004...–667 п.н. было слабым. Фрагмент, расположенный между положениями –667 и –448 п.н., ингибировал транскрипционную активность гена *AFP*, тогда как фрагмент –448...–287 п.н. усиливал экспрессию AFP. Действие прилегающей промоторной последовательности было слабым. Картированы множественные сайты связывания факторов транскрипции.

Ключевые слова: альфа-фетопротеин, транскрипционная регуляция, 5'-фланкирующая область, промотор, сайленсер

DOI: 10.31857/S0026898422010128

введение

Ген альфа-фетопротеина (AFP) человека, состоящий из 14 экзонов и 15 интронов, локализован в хромосоме 4. Зрелая мРНК AFP имеет длину 2039 н. и кодирует 609 аминокислотных остатков, включая 19 N-концевых, образующих сигнальный пептид. Белок AFP, входящий в семейство альбуминов, модифицирован аминосахарами [1, 2]. В это семейство входят альбумин, белок, связывающий витамин D, и альфа-глобулин [3]. Структура белков этого семейства поддерживается дисульфидными связями, образованными остатками цистеина. Белок сворачивается с образованием U-образного домена.

АFP экспрессируется в фетальном периоде и способствует росту и развитию плода. Ген *AFP* реактивируется в ходе доброкачественной регенерации печени у взрослых или при развитии гепатоклеточной карциномы (HCC). С начала 1970-х AFP используется в качестве диагностического маркера первичной HCC. Механизмы реэкспрес-

сии AFP понятны не полностью, а изучению регуляторной области гена AFP посвящено ограниченное число исследований. Ранее установили, что регуляторные элементы гена AFP мыши локализованы в вышележащем участке (-1.0...-7.6 т.п.н.), а 5'-фланкирующая область -3.8 т.п.н. регуляторной области способна значительно усиливать транскрипционную активность гена AFP, независимо от ее локализации [4]. Энхансеры гена AFP человека расположены в области -4.0...-3.3 т.п.н., что примерно совпадает с их локализацией в гене мыши, а их активность также не зависит от характера локализации. Однако сайленсер гена AFP человека находится во фрагменте -1.8 т.п.н. 5'-фланкирующей области, тогда как промотор найден в положении -1.0 т.п.н. вышележащей области [5].

Учитывая, что большая часть результатов изучения AFP опубликована в 1980-х, мы сфокусировались на изучении участка гена *AFP*, расположенного в области –1.8 т.п.н. Путем конструирования репортерных генов люциферазы с разными фрагментами регуляторной области определена локализация сайленсера и промотора в гене *AFP*, что создает структурные основы для исследова-

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

² Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898422010128 для авторизованных пользователей.

ний аномальной экспрессии гена *AFP* в клетках гепатомы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные культуры. Клетки HepG2 и PLC/PRF/5 хранили в жидком азоте. Клетки оттаивали, культивировали в среде DMEM (High Glucose) фирмы "Gibco", содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Клетки инкубировали при 37°C в присутствии 5% CO₂.

Конструирование плазмид. Плазмиды PLuc1-4, содержащие фрагменты 5'-фланкирующей области гена *AFP* разной длины (1871, 1567, 1004, 677, 448, 287 и 215 п.н.), сконструированы путем встраивания этих фрагментов по сайтам KpnI и MluI. Матрицей для амплификации фрагментов 5'-фланкирующей области гена *AFP* человека служила геномная ДНК человека. Сначала амплифицировали самый длинный фрагмент (1871 п.н.), а затем использовали его в качестве матрицы для амплификации остальных фрагментов. Последовательность олигонуклеотидов, использованных для анализа плазмидных конструкций, приведены в табл. S1 (см. Приложение на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2022/1/supp Zhang_rus.pdf).

ПЦР-амплификацию фрагментов гена *AFP* проводили в следующих условиях.

Предварительная денатурация — 94°С, 2 мин. Затем 30 циклов:

денатурация 94°С, 30 с; отжиг 55–65°С, 30 с; удлинение 72°С, 60 с/1 т.п.н.; окончательная достройка 72°С, 5–10 мин.

Все плазмиды, использованные в опытах по трансфекции, получали, используя набор для крупномасштабной очистки ("Tiangen Biotech", КНР), в соответствии с инструкциями производителя. Клетки трансфицировали плазмидами, используя липофектамин 3000 ("Thermo Fischer", Waltham, США), согласно рекомендациям производителя. В качестве контроля использовали плазмиду pGL3-Basic.

Предсказание сайтов связывания факторов транскрипции. Программы Genomatix MatInspector (https://www.genomatix.de/index.html) и JASPAR (http://jaspar.genereg.net/) использовали для предсказания сайтов связывания факторов транскрипции.

Трансфекция плазмид. Плазмидно-липосомный комплекс готовили в следующей дозировке (в расчете на ячейку шестилуночного планшета): 1 мкл липофектамина добавляли в 100 мкл среды Opti-MEM[™] и тщательно перемешивали в течение 5 мин. Затем 4 мкг плазмиды добавляли в 100 мкл Opti-MEM[™] и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Эти две смеси объединяли, аккуратно перемешивали и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем плазмидно-липосомный комплекс добавляли по каплям в бессывороточную среду DMEM. После инкубации в течение 4–6 ч при 37°C заменяли культуральную среду. Через 24 ч после трансфекции определяли активность люциферазы.

Анализ люциферазной активности. Активность репортерного гена люциферазы определяли согласно [6], используя Dual Luciferase Assay System ("Promega", США). Активность люциферазы светлячка нормировали по активности люциферазы *Renilla*. В качестве отрицательного контроля использовали вектор pGL3-Basic.

Статистический анализ. Результаты представляли как средние значения \pm SD, вычисленные из результатов по меньшей мере трех независимых экспериментов. Статистическую значимости определяли с использованием *t*-теста Стъюдента. Значения *p* < 0.05 считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование плазмид с укороченной 5'-фланкирующей областью гена AFP

На основании сообщений о регуляторной последовательности 5'-фланкирующей области *AFP*, сконструированы укороченные варианты (pluc1-1871 п.н., pluc2-1004 п.н., pluc3-488 п.н. и pluc4-215 п.н.) (рис. 1*a*). Условия проведения ПЦР на колониях, электрофореза в агарозном геле, секвенирования и других экспериментов были оптимизированы для подтверждения успешного конструирования укороченных вариантов 5'-фланкирующей области гена *AFP* (рис. 1*б*).

Анализ транскрипционной активности фрагментов 5'-фланкирующей области гена AFP

Плазмидами (pLuc1-4), содержащими фрагменты 5'-фланкирующей области гена AFP, трансфицировали клетки линий HepG2 и PLC и через 24 ч определяли люциферазную активость (рис. 2). Значительное повышение люциферазной активности плазмиды pLuc1 по сравнению с контролем (pL3-Basic) указывает на то, что эта последовательность может способствовать транскрипции гена AFP. Люциферазная активность pLuc2 была значительно ниже, чем у pLuc1, что указывает на ингибирование транскрипции областью -1871...-1004 п.н. Однако люциферазная активность pLuc3 значительно превышала активность pLuc2, т.е. область -1004...-448 п.н. может содержать последовательности, подавляющие транскрипцию. Делеция области -448...-215 п.н.



Рис. 1. Конструирование плазмид с репортерным геном люциферазы, содержащих укороченные варианты 5'-области гена *AFP*. *a* – Схематическое изображение 5'-фланкирующей области гена *AFP*; *б* – электрофореграмма ПЦР-амплифицированных 5'-укороченных фрагментов гена *AFP* в агарозном геле.

приводила к заметному снижению люциферазной активности, т.е. эта часть последовательности может способствовать транскрипции. Плазмида pLuc4 обеспечивала почти такую же активность люциферазы, как и контрольная pGL-Basic, т.е. 215 п.н. вышележащей последовательности гена *AFP* могут вносить небольшой вклад в активацию транскрипции или индуцирующие и ингибирующие эффекты могут действовать антагонистически. Нами проведен ПЦР-анализ содержания мРНК люциферазы светлячка и получены такие же результаты (рис. S1, см. Приложение на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2022/1/supp_ Zhang_rus.pdf). Следовало проанализировать сайты связывания факторов транскрипции в разных последовательностях и детализировать специфические сайты регуляции транскрипции в 5'-фланкирующей области гена *AFP*.

Анализ сайтов связывания факторов транскрипции в 5'-фланкирующей области гена AFP

В начале 1990-х показали, что уровень экспрессии AFP контролируется двумя взаимоисключающими транс-действующими факторами: ядерным фактором гепатоцитов 1 (HNF-1) и P53. HNF1 повышает уровень экспрессии AFP, тогда как Р53 ингибирует экспрессию. Ингибирующее лействие усиливалось после анетилирования Р53 гистонацетилазой р300 [7]. Анализ сайтов связывания факторов транскрипции в 5'-фланкирующей области AFP (1871 п.н.) выявил четыре сайта связывания NF1 в положении между –1871 и -1004 п.н. Эти данные, а также результаты, представленные на рис. 2, свидетельствуют о том, что четыре обнаруженных сайта связывания могут играть значимую роль в транскрипции гена. Два сайта связывания Р53 найдены между положениями -677 и -448 п.н. Транскрипционная активность, как показано на рис. 2, значительно возрастает при делеции участка -1004...-448 п.н. что может быть ассоциировано с ингибирующим



Рис. 2. Анализ люциферазной активности, обеспечиваемой 5'-укороченными фрагментами гена *AFP* в трансфицированных клетках HepG2 и PLC. Трансфекция плазмид, содержащих регуляторные последовательности разной длины, в клетки HepG2 и PLC приводила к изменению люциферазной активности. Приведены репрезентативные результаты экспериментов, проведенных по меньшей мере в трех повторах: *p < 0.05, **p < 0.01 по сравнению с контролем.

СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ 5'-ФЛАНКИРУЮЩЕЙ ОБЛАСТИ ГЕНА



Рис. 3. Сайты связывания факторов транскрипции в 5'-фланкирующей области гена *AFP*. Сайт старта транскрипции отмечен вертикальной стрелкой.

действием Р53. Главная роль последовательности –1004...–677 п.н. нуждается в дополнительной верификации. В участке –448...–215 п.н. иденти-фицирован только один сайт связывания HNF1.

Для проверки возможной роли этих сайтов в изменении транскрипционной активности сконструированы две плазмиды, содержащие сайты связывания HNF1 на границе.



а

I.H. 500 000 500 400 300 200 100 28¹ ^{11.h} _{4.48} ^{11.h} ₆⁻¹ ^{11.h} _{Magkeeg} _{00.h} ^{11.h} ₅₆ ^{11.h}.

б

Рис. 4. Конструирование плазмид с репортерным геном люциферазы, содержащих 5'-укороченные фрагменты гена *AFP*, на основе результатов анализа сайтов связывания факторов транскрипции. a - Cxema 5'-фланкирующей области гена *AFP*; $\delta - Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации 5'-укороченных фрагментов гена$ *AFP*в агарозном геле.

Конструирование плазмид с укороченной 5'-областью AFP на основе анализа сайтов связывания факторов транскрипции

Взяв за основу результаты анализа сайтов связывания факторов транскрипции, сконструировали дополнительные варианты плазмид с укороченными фрагментами 5'-области гена *AFP* (pLuc1-1, pLuc2-1 и pLuc3-1) из исходных плазмид pLuc1—4 (рис. 4*a*). Правильность конструкций подтвердили с помощью ПЦР, электрофореза в агарозном геле (рис. 4*б*) и секвенирования.

Картирование промоторного и сайленсерного элементов в 5'-фланкирующем субрегионе гена AFP

После предварительной верификации и предсказания сайтов связывания факторов транскрипции (рис. 2 и 3) и построили схему 5'-фланкирующей области гена AFP (рис. 5a). Сконструированными плазмидами трансфицировали клетки HepG2 и PLC. Люциферазную активность определяли через 24 ч после трансфекции. Показано, что люциферазная активность варианта, содержащего фрагмент 1567 п.н., полученный в результате делеции двух сайтов связывания HNF1, была значительно ниже, чем активность варианта размером 1871 п.н., что указывает на вклад этих двух сайтов в промоторную активность. Люциферазная активность варианта 1004 п.н. была значительно ниже, чем активность варианта 1567 п.н., что свидетельствует о том, что сайты связывания HNF1 в этой области также могут играть роль в транскрипции гена AFP. Люциферазна активность варианта 677 п.н. практически не отличается от активности варианта 1004 п.н. Люциферазная активность области размером 4486 п.н. значительно превышала активность вариантов 677 и 1004 п.н., что свидетельствует об ингибирующем действии сайтов связывания P53 на транскрипцию гена AFP. Варианты размером 287 и 215 п.н. не вызывали значительного изменения люциферазной активности по сравнению с контролем, тогда как удаление фрагмента -448...-287 п.н. снижало люциферазную активность. Эти данные свидетельствуют о том, что сайты связывания HNF1 в области между -287 и -448 п.н. могут играть роль в транскрипции гена, тогда как вклад фрагмента 287 п.н. минимален. Можно также предположить, что эта последовательность может быть мишенью других ингибиторов. Плазмиды pLuc1, pLuc 1-1, pLuc2, pLuc 2-1 и pLuc3 обеспечивали значительно более высокую люциферазную активность, чем pGL3-Basic. Встроенные в них последовательности содержат регуляторные элементы, способствующие транскрипции гена AFP или одновременно ингибирующие и активирующие элементы, причем последние проявляют доминирующее действие (рис. 5б). Мы провели ПЦР-анализ содержания мРНК люциферазы и получили такие же результаты (рис. S2, см. Приложение на сайте http://www.molecbio.ru/ downloads/2022/1/supp Zhang rus.pdf).



Рис. 5. Анализ люциферазной активности, обеспечиваемой различными 5'-укороченными фрагментами гена *AFP* человека в трансфицированных клетках HepG2 и PLC. a – Паттерны распределения HNF1 и P53; δ – изменение люциферазной активности после трансфекции клеток HepG2 и PLC плазмидами, содержащими регуляторные последовательности разной длины. *p < 0.05, **p < 0.01 по сравнению с контролем. Опыты проводили в трех повторностях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

AFP входит в суперсемейство альбуминов, которое включает AFP, сывороточный альбумин, белок, связываюший витамин D, и альфа-альбумин [8]. Изучение регуляторных участков гена AFP проведено в прошлом столетии. Поиск по ключевым словам "AFP gene expression" и "AFP transcriptional regulation" в базе данных PubMed не находит ссылок на работы последнего десятилетия. К настоящему времени в регуляторных областях генов AFP мыши и крысы выявлены три дальних энхансера, промотор и сайленсер, однако известно несколько работ, посвященных гену AFP человека [9]. Хотя общая структура регуляторной области гена AFP у этих видов имеет значительное сходство, точная локализация и детальная структура этих элементов у мыши, крысы и человека имеют некоторые различия [10]. Экспрессия AFP характеризуется высокой тканевой специфичностью и строгой временной регуляцией. Во взрослой печени AFP почти не экспрессируется или экспрессируется на очень низком уровне [11]. Показано также, что в разных линиях клеток гепатомы с высоким, средним и низким уровнем экспрессии *AFP* АТ-мотив-связывающий фактор 1 подтипа A (ATBF1) может ингибировать экспрессию гена *AFP*, подавляя активность энхансеров, а подтип В ATBF1 играет как активирующую, так и ингибирующую роль [12].

Удаление фрагмента -677...-448 п.н. из плазмиды, содержащей регуляторную последовательность транскрипции *AFP*, приводило к значительному повышению люциферазной активности, что свидетельствует об увеличении транскрипционной активности гена *AFP*. Анализ сайтов связывания факторов транскрипции выявил два сайта связывания P53 в этой области. Ранее обнаружили, что делеция P53 связана с повышением экспрессии *AFP*, тогда как ингибирование *AFP* устраняется путем PHK-интерференции P53 в клетках гепатомы [13]. Это согласуется с уже известными и новыми данными. HNF-1 — это активатор транскрипции гена *AFP*. Нами обнаружено значительное снижение активности люциферазы после удаления сайтов связывания HNF. Однако следует отметить, что сайты связывания HNF выявлены в области -287...-215 п.н., но транскрипционная активность остается практически неизменной. В этом участке обнаружены два сайта связывания NF-1. Поскольку NF-1 является мощным ингибитором активности промотора *AFP*, конкуренция между NF-1 и HNF-1 может быть ключом к регуляции транскрипционной активности [14]. Таким образом, изменение баланса этих транс-действующих факторов может строго регулировать активность промотора *AFP* в ходе развития печени и в канцерогенезе.

Примерно у 60-70% пациентов с НСС обнаружен аномальный уровень AFP в сыворотке, а ранее показали важную роль реэкспрессии AFP в развитии НСС [6, 15]. Хотя высказываются предположения, что реэкспрессия AFP может быть связана с активацией прогениторных клеток печени и с ослаблением ингибирующего действия фактора транскрипции Р53. Однако механизм реэкспрессии AFP не установлен. Изучение функции AFP показало, что этот белок может способствовать пролиферации опухолевых клеток и ингибировать апоптоз, участвуя в избегании иммунного контроля, активации PI3K/Akt и интерференции с сигнальным путем каспазы-3 [16, 17]. Таким образом, изучение структуры регуляторной области гена AFP позволит понять основы реэкспрессии AFP и разработать подходы к терапии НСС. Хотя показано, что в области -4.0...-3.3 т.п.н. находятся определенные энхансеры гена AFP, сайты связывания факторов транскрипции локализованы преимущественно в области –1.8 т.п.н. Считалось, что между этими двумя участками расположена нефункциональная область размером 1.5 т.п.н., поэтому наше исследование было сфокусировано на области -1.8 т.п.н. В дальнейшем мы объединили области -4.0...-3.3 и -1.8 т.п.н. с целью более детального и всестороннего изучения регуляторных последовательностей гена AFP.

Мы признательны Wenting Hou за помощь в редактировании статьи.

Выполнение работы получил поддержку National Natural Science Foundation of China (No. 82003809) Beijing Hospital Nova Project (BJ-2020-087), Beijing Hospital Doctoral Scholars Foundation (BJ-2019-148).

В работе не использовали животных и людей в качестве объекта исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Morinaga T., Sakai M., Wegmann T.G., Tamaoki T. (1983) Primary structures of human alpha-fetoprotein and its mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80, 4604–4608.
- Sakai M., Morinaga T., Urano Y., Watanabe K., Wegmann T.G., Tamaoki T. (1985) The human alpha-fetoprotein gene. Sequence organization and the 5' flanking region. J. Biol. Chem. 260, 5055–5060.
- 3. Dimitris K., Fern E., Paul R., Michael B., Robert S., Tilghman S.M. (1981) The evolution of α-fetoprotein and albumin. *J. Biol. Chem.* **256**, 1960–1967.
- 4. Roseline G., Robert I., Tilghman S.M. (1986) Multiple regulatory elements in the intergenic region between the alpha-fetoprotein and albumin genes. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 477–487.
- Nakabayashi H., Hashimoto T., Miyao Y., Tjong K.K., Chan J., Tamaoki T. (1991) A position-dependent silencer plays a major role in repressing alpha-fetoprotein expression in human hepatoma. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5885–5893.
- Zhang C., Chen X., Liu H., Li H., Jiang W., Hou W., McNutt M.A., Lu F., Li G. (2015) Alpha fetoprotein mediates HBx induced carcinogenesis in the hepatocyte cytoplasm. *Int. J. Cancer.* 137, 1818–1829.
- Lee K.C., Crowe A.J., Barton M.C. (1999) p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression by specific DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1279–1288.
- Терентьев А.А, Молдогазиева Т.Е. (2006) Структурно-функциональное картирование альфа-фетопротеина. Биохимия. 71(2), 152–172
- 9. Lienard P., Mees C., Dreze P.L., Dieu M., Dierick J.F., Raes M., Szpirer J., Szpirer C. (2006) Regulation of the alpha-fetoprotein promoter: Ku binding and DNA spatial conformation. *Biochimie*. **88**, 1409–1417.
- Miyake K., Takahashi M., Dohda T., Kaneoka H., Sato Y., Inayoshi Y., Kamihira M., Iijima S. (2005) Transcriptional regulation of the alpha-fetoprotein gene by SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Cytotechnology*. **49**, 143–151.
- Zhang H., Cao D., Zhou L., Zhang Y., Guo X., Li H., Chen Y., Spear B.T., Wu J.W., Xie, Z., Zhang W.J. (2015) ZBTB20 is a sequence-specific transcriptional repressor of alpha-fetoprotein gene. *Sci Rep.* 5, 11979.
- Ninomiya T., Mihara K., Fushimi K., Hayashi Y., Hashimoto-Tamaoki T., Tamaoki T. (2002) Regulation of the alpha-fetoprotein gene by the isoforms of ATBF1 transcription factor in human hepatoma. *Hepatology*. 35, 82–87.
- Wilkinson D.S., Ogden S.K., Stratton S.A., Piechan J.L., Nguyen T.T., Smulian G.A., Barton M.C. (2005) A direct intersection between p53 and transforming growth factor beta pathways targets chromatin modification and transcription repression of the alpha-fetoprotein gene. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1200–1212.
- 14. Bois-Joyeux B., Danan J.L. (1994) Members of the CAAT/enhancer-binding protein, hepatocyte nuclear factor-1 and nuclear factor-1 families can differentially modulate the activities of the rat alpha-fetoprotein promoter and enhancer. *Biochem. J.* **301**(Pt 1), 49–55.
- Zhang C., Liu P., Zhang C. (2020) Hepatitis B virus X protein upregulates alpha-fetoprotein to promote hepatocellular carcinoma by targeting miR-1236 and miR-329. *J. Cell. Biochem.* 121, 2489–2499.

- Li M., Li H., Li C., Zhou S., Guo L., Liu H., Jiang W., Liu X., Li P., McNutt M.A., Li G. (2009) Alpha fetoprotein is a novel protein-binding partner for caspase-3 and blocks the apoptotic signaling pathway in human hepatoma cells. *Int. J. Cancer.* **124**, 2845–2854.
- Li M., Li H., Li C., Wang S., Jiang W., Liu Z., Zhou S., Liu X., McNutt M.A., Li G. (2011) Alpha-fetoprotein: a new member of intracellular signal molecules in regulation of the PI3K/AKT signaling in human hepatoma cell lines. *Int. J. Cancer.* 128, 524–532.

STRUCTURAL ANALYSIS OF THE 5'-FLANKING REGION OF HUMAN ALPHA-FETOPROTEIN ENCODING GENE

C. Zhang^{1, *}, H. J. Zhao¹, J. Wang¹, W. Y. Zhou¹, T. J. Zhang¹, and C. B. Zhang^{1, **}

¹ National Center for Clinical Laboratories, Beijing Hospital, National Center of Gerontology; Institute of Geriatric Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, P. R. China *E-mail: zc mdv@163.com

**E-mail: cbzhang@nccl.org.cn

Alpha fetoprotein (AFP) is a growth factor and a signaling molecule that promotes the development of HCC. However, the mechanism of the awakening of AFP in course of HCC progression remains unclear. We have studied the structure of AFP 5'-flanking regulatory sequence using dual-luciferase reporter vectors with fragments of this region. Reporter constructs were transfected into HepG2 and PLC hepatoma cell lines. The AFP 5'-flanking regulatory sequence between -1871 bp and -1004 bp was promoting gene transcription, while the effects of the sequence between -1004 bp and -667 bp were small. The fragment located between positions -667 bp and -287 bp promoted expression of AFP. The effects of the adjacent promoter sequence were small. A variety of transcription factor binding sites were mapped.

Keywords: alpha-fetoprotein, transcriptional regulation, 5'-flanking region, promoter, silencer

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21

МИНОРНЫЙ Т-АЛЛЕЛЬ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА rs13360222 СНИЖАЕТ АКТИВНОСТЬ ЭНХАНСЕРА ГЕНА *HAVCR2* в клеточной модели макрофагов человека

© 2022 г. А. Н. Уварова^{*a*, *b*}, А. С. Устюгова^{*a*}, Н. А. Митькин^{*a*}, А. М. Шварц^{*a*}, К. В. Корнеев^{*a*}, Д. В. Купраш^{*a*, *b*, *}

^аЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия ^bБиологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,

> Москва, 119234 Россия *e-mail: kuprash@gmail.com Поступила в редакцию 16.08.2021 г. После доработки 08.09.2021 г. Принята к публикации 08.09.2021 г.

Рецептор TIM-3, кодируемый геном HAVCR2 (Hepatitis A Virus Cellular Receptor 2), относится к группе иммунологических "контрольных точек" (checkpoints) и выполняет важную роль в предотвращении развития аутоиммунных реакций. Этот рецептор экспрессируется на поверхности различных иммуноцитов. С одной стороны, роль TIM-3, представленного на T-клетках, активно изучается в контексте поиска перспективных терапевтических мишеней при иммунотерапии рака, с другой стороны, его функции в клетках миелоидного ряда остаются малоизученными. Нами проведен делеционный анализ промоторной области гена HAVCR2, функционально охарактеризован его энхансер и изучено влияние ряда однонуклеотидных полиформизмов (SNP) на активность этих регуляторных элементов в релевантной модели макрофагоподобных клеток человека — активированной моноцитарной линии U937. Показано, что ассоциированные с развитием ряда патологий SNP rs10515746(A) и rs4704853(A), находящиеся в промоторе гена HAVCR2, не влияют на активность этого регуляторного элемента в активированных моноцитах. Однако в энхансере, в третьем интроне гена, находится SNP rs13360222, минорный T-вариант которого значимо снижает способность энхансера активировать промотор HAVCR2, предположительно вследствие ослабления связывания ядерного рецептора ESR2.

Ключевые слова: *HAVCR2*, TIM-3, однонуклеотидные полиморфизмы, регуляция транскрипции, промотор, энхансер

DOI: 10.31857/S0026898422010116

введение

Иммунологическая контрольная точка (immunological checkpoint) TIM-3 – белок, который изначально был охарактеризован как маркер Т-лимфоцитов, продуцирующих интерферон-ү (IFNү). TIM-3 играет ключевую роль в ингибировании Th1 иммунного ответа и продукции провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухолей (TNF) и IFNγ, поэтому дисрегуляция его экспрессии может приводить к развитию аутоиммунных патологий [1]. TIM-3 представлен на Т-лимфоцитах, а также на клетках врожденного иммунитета, таких как макрофаги, дендритные клетки, естественные киллерные (NK) клетки и натуральные Т-киллеры (NKT) [2]. Т-клеточный ТІМ-3 активно исследуют в качестве мишени при иммунотерапии онкологических заболеваний, однако его функции в других иммуноцитах изучены хуже. Появляется все больше данных по ингибиторной роли ТІМ-3 и в клетках миелоидного ряда дифференцировки. Например показано, что ТІМ-3, при участии своего лиганда фосфатидилсерина, опосредует фагоцитоз апоптотических клеток и сти-

Сокращения: ChIP-Seq (chromatin immunoprecipitation-sequencing) – иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием; ESR2 (estrogen receptor 2) – β -рецептор эстрогена; HAVCR2 (hepatitis A virus cellular receptor 2) – клеточный рецептор-2 вируса гепатита A; NK (natural killer cell) – естественные киллеры; PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) – форбол-12-миристат-13-ацетат; SNP (single-nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм; TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing protein 3) – белок-3, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и муцин-домен; TLR (Toll-like receptor) – Toll-подобный рецептор; ТФ – транскрипционный фактор.

мулирует кросс-презентацию антигена CD8⁺ дендритными клетками *in vitro* и *in vivo* [3]. Другой лиганд TIM-3 – HMGB1 – играет важную роль в осуществлении транспорта нуклеиновых кислот в эндосомы для дальнейшего их распознавания рецепторами врожденного иммунитета в дендритных клетках. Так, инфильтрирующие опухоль дендритные клетки экспрессируют повышенный уровень TIM-3, который, связываясь с HMGB1, блокирует его функции и таким образом супрессирует опосредованный паттернраспознающими рецепторами иммунный ответ против опухолевых нуклеиновых кислот [4].

Yang с соавт. [5] показали, что ТІМ-3 – негативный регулятор опосредованного Toll-подобными рецепторами (TLR) иммунного ответа макрофагов. Подавление экспрессии ТІМ-3 приводит к повышенной активации макрофагов в экспериментальной мышиной модели сепсиса, что способствует формированию системного воспалительного ответа, тогда как сверхэкспрессия TIM-3 в макрофагах подавляет TLR-зависимую продукцию провоспалительных цитокинов. В NK-клетках TIM-3 служит маркером их активации или созревания и может подавлять NK-зависимую цитотоксичность [6]. У пациентов с тяжелой формой меланомы подавление TIM-3 способствует восстановлению активности NK-клеток [7]. В связи с широким спектром функций TIM-3 на разных типах клеток детальное изучение его роли в биологии не только Т-лимфоцитов, но и других популяций иммуноцитов, в частности макрофагов, вовлеченных в противоопухолевый иммунный надзор, относится к важной задаче современной онкоиммунологии.

Нами исследовано два однонуклеотидных полиморфизма (SNP) промоторной области гена HAVCR2, ассоциированных с риском развития различных патологий: rs10515746 и rs4704853. Высокая частота минорного аллеля rs10515746(T) наблюдается в группе пациентов с раком желудка, эссенциальной тромбоцитемией, ревматоидным артритом и болезнью Крона [8-11]. Частота минорного варианта rs4704853(A) бывает повышена у пациентов с раком молочной железы по сравнению с представителями контрольной группы [12]. В результате проведенного анализа регуляции экспрессии репортерного гена мы выяснили, что эти SNP не оказывают влияния на активность промотора HAVCR2 в клеточной модели активированных моноцитов человека. Кроме того, мы функционально охарактеризовали энхансерную регуляторную область, находящуюся в третьем интроне гена HAVCR2, и выявили влияние минорного варианта SNP rs13360222(T) в этой области на способность энхансера активировать промотор ТІМ-3.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биоинформатическое определение границ регуляторных последовательностей и выбор SNP. Для определения границ промоторов и энхансеров использовали сервис USCS Genome Browser, сборка GRCh37/hg19 (http://genome.ucsc.edu), coдержащий большой набор эпигеномных данных ENCODE [13]. Основными параметрами для выбора границ регуляторных последовательностей было наличие пиков ацетилирования Lys27 гистона H3 (H3K27Ac), Lys9 гистона H3 (H3K9Ac), моно- и триметилирования Lys4 гистона H3 (H3K4me1, H3K4me3), а также данные по чувствительности к ДНКазе I и наличию сайтов посадки транскрипционных факторов (ТФ), определенных ранее методом иммунопреципитации (ChIP-Seq) [14]. Расположение полиморфизмов в сайтах посадки ТФ оценивали с помощью ресурса GTRD [15] на основе данных ChIP-Seq. Влияние альтернативных вариантов полиморфизмов на вероятность связывания релевантных ТФ проводили с помощью сервиса PERFECTOS-APE [16] с использованием баз данных НОСОМОСО11 [17], JASPAR [18] и SELEX [19]. Учитывали факторы, для которых различие в аллеле SNP давало наименьшее р-значение для мотива связывания (p-value < 0.0005) и наибольшее изменение силы связывания Т Φ (fold change > 5.0).

Создание репортерных конструкций. Для создания репортерных конструкций разные варианты промотора (1 992, 1 505, 453, 199, 97, 32 п.н.) и предполагаемый энхансер (1025 п.н.) гена HAVCR2, а также контрольный фрагмент схожего с энхансером размера (1080 п.н.) из первого интрона гена STAT3 (не проявляет энхансерной активности) [20] амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием очищенной геномной ДНК человека ("Евроген", Россия) и пар праймеров, указанных в табл. 1. Контрольную последовательность использовали, чтобы исключить влияние размера плазмиды на уровень сигнала в люциферазных тестах. Последовательности промотора были клонированы в вектор pGL3basic ("Promega", США) по сайтам HindIII/NcoI перед геном люциферазы. Последовательности энхансера и контрольного участка клонировали после гена люциферазы по сайтам BamHI/SalI. Растворы плазмид получали с помощью набора Plasmid Midiprep ("Евроген"). Для получения последовательностей промоторов и энхансеров, содержащих альтернативные аллели полиморфизмов, использовали праймеры с точечной мутацией на месте SNP по методу, описанному ранее [21, 22]. Все полученные конструкции верифицировали секвенированием по Сэнгеру.

Клеточные линии. Моноцитарную клеточную линию U937 [23] культивировали в среде RPMI-1640 с аланил-глутамином ("ПанЭко",

Таблица 1.	Олигонуклеотиды,	использованные	при получении	репортерных	плазмид,	содержащих и	исследуемые
промоторы	и энхансеры						

Название олигонуклеотида	Последовательность (5' \rightarrow 3')					
Праймеры для клонирования регуляторных элементов гена НАVCR2						
promHAVCR2-nested-F	GAAATGAGCAGAAAACAAAGTGGT					
promHAVCR2-nested-R	CATATTCCTGCTCCCCGACA					
promHAVCR2-BsaI(NcoI)-R	TTAAGGTCTCCCATGGAGCTTGCAGAAGAAAAG					
promHAVCR2-F-BsaI(HindIII)-1992	TTTTGGTCTCAAGCTTGAACACAGGAGGCGGA					
promHAVCR2-F-BsaI(HindIII)-1505	TTTTGGTCTCAAGCTTAACAGCCTGACCAACATGGAG					
promHAVCR2-F-BsaI(HindIII)-453	TTTTGGTCTCAAGCTTTGATTTGAGTGAATGAATCCATG					
promHAVCR2-F-BsaI(HindIII)-199	TTTTGGTCTCAAGCTTAATGTGACTGTAGACCTGGCA					
promHAVCR2-F-BsaI(HindIII)-97	TTTTGGTCTCAAGCTTATTGTGGAGTAGACAGTTGGA					
promHAVCR2-F-BsaI(HindIII)-32	TTTTGGTCTCAAGCTTAGGTGTCCTCTGACTTTTCTTC					
enhHAVCR2-F-BamHI	TTTTGGATCCCAATGGTGTGATCTCGGCTCA					
enhHAVCR2-R-SalI	TTTTGTCGACGAGAAGGGAGACAGGGTTGC					
ContrEnh-F-BamHI	AGGATCCGGATTACAGGTGTATTTCACCAT					
ContrEnh-R-SalI	TATGTCGACGTTGATGTAATTCCTTTAAATCTAT					
Праймеры для введения минорных вариантов полиморфизмов						
Overlap_rs10515746_promHAVCR2_T_F	GGGAGTTGCTATGGTCTGTAAATGTGAG					
Overlap_rs10515746_promHAVCR2_A_R	ACAGACCATAGCAACTCCCAGCATAAGC					
Overlap_rs4704853_promHAVCR2_T_F	GCCTCTTGGGGTAGGGGAGAGG					
Overlap_rs4704853_promHAVCR2_A_R	CTACCCCAAGAGGCTTTGGCCATGA					
Overlap_rs13360222_enhHAVCR2_A_F	GCTGGGCAACATGACCCTCTTCATA					
Overlap_rs13360222_enhHAVCR2_T_R	AGGGTCATGTTGCCCAGCCACC					
Overlap_rs73308313_enhHAVCR2_T_F	CTTGGGTTAGTCATTTCACTTCCCTAAT					
Overlap_rs73308313_enhHAVCR2_A_R	GGAAGTGAAATGACTAACCCAAGGTC					

Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; "Biological Industries", Израиль), смеси антибиотиков (100 U/мл пенициллин и 100 мкг/мл стрептомицин), 10 мМ Na-соли HEPES ("ПанЭко") и 1% раствора незаменимых аминокислот MEM NEAA ("Gibco", США) при 37°С и 5% CO₂. Активацию моноцитарной линии U937 проводили в течение 24 ч при добавлении форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA), как описано ранее [24].

Люциферазный тест. Трансфекцию клеток исследуемыми репортерными плазмидами проводили методом электропорации с использованием Neon[™] Transfection System ("Thermo Fisher Scientific", США). В качестве внутреннего контроля использовали плазмиду, содержащую ген люциферазы *Renilla* pRL-CMV ("Promega", США). Через 24 ч после трансфекции клетки лизировали с использованием набора Dual-Luciferase Reporter Assay System ("Promega") и с помощью люминометра 20/20n ("Turner BioSystems", США) измеряли сигнал от люцифераз *Lampyridae* и *Renilla*, как описано ранее [25]. Сигнал от люциферазы *Renilla* использовали для нормализации на внешние вариабельные параметры: эффективность трансфекции и лизиса клеток и т.п.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (версия 6.01 для Windows, GraphPad Software, США; www.graphpad.com). Для определения степени достоверности использовали двусторонний непарный *t*-критерий Стьюдента. Данные были получены не менее чем в трех независимых экспериментах и представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Значимое различие идентифицировали при значении *P* < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Альтернативные варианты SNP rs10515746 и rs4704853 не влияют на активность промотора HAVCR2 в активированных моноцитах U937

Границы регуляторных элементов гена *HAVCR2* определяли с помощью геномного браузера UCSC Genome Browser, предоставляющего доступ к аннотациям геномов большого числа видов и позво-



Рис. 1. Схема расположения изучаемых SNP и предполагаемых регуляторных элементов локуса гена *HAVCR2*. Промоторная область *HAVCR2* обозначена красным, предполагаемый энхансер — синим. Вертикальными линиями указано расположение изучаемых SNP. Гистограммы отражают уровни модификаций гистонов, ассоциированных с активными регуляторными участками (монометилирование H3K4, ацетилирование H3K27, H3K9) и активными промоторами (триметилирование H3K4) в CD14⁺ моноцитах. Прямоугольниками отмечены кластеры гиперчувствительности к ДНКазе I и сайты связывания факторов транскрипции (ТФ) по данным ENCODE ChIP-Seq. Схема построена на основе визуализации в UCSC Genome Browser (GRCh37/hg19).

ляющего выявлять регуляторные последовательности на основании эпигенетических признаков. В качестве промоторной области гена HAVCR2 был выбран участок генома размером 1992 п.н. (chr5: 156535992—156537986, сборка GRCh37/hg19; рис. 1) с соответствующими эпигенетическими метками: повышенная чувствительность к ДНКазе I, высокая плотность сайтов связывания ТФ, а также модификации гистонов H3K4me3, H3K27Ac и НЗК9Ас. В этой области были отобраны два некодирующих SNP: rs10515746 и rs4704853. – ассоциированных с риском развития различных патологий, — с целью изучить их влияние на активность промотора гена HAVCR2. Для этого несколько вариантов промотора гена HAVCR2, содержащих минорные либо мажорные аллели этих SNP, клонировали в репортерный вектор pGL3-basic перед кодируюшей последовательностью гена люциферазы.

Способность выбранных SNP влиять на активность соответствующего промотора анализировали с использованием люциферазного теста в модели активированных моноцитов — стимулированных РМА клеток линии U937 [26]. Оказалось, что альтернативные варианты исследуемых полиморфизмов rs10515746 и rs4704853 не оказывают влияния на активность промотора *HAVCR2* в активированных моноцитах (рис. 2*a*).

На следующем этапе был проведен делеционный анализ промотора, содержащего более распространенные аллели исследуемых SNP. Для этого в плазмиду pGL3-basic перед геном люциферазы клонировали пять вариантов промоторных последовательностей длиной 1 505, 453, 199, 97 и 32 п.н. до старта трансляции гена HAVCR2 (рис. 2δ). Промоторная активность достоверно не различалась для делеционных вариантов промотора длиной ≥ 199 п.н., что свидетельствует о том, что в активированных моноцитах наиболее активная область промотора располагается в пределах 200 п.н. до старт-кодона гена НАУСК2. Результаты делеционного анализа объясняют, почему расположенные вне функционально активной области промотора гена HAVCR2 полиморфизмы rs10515746 и rs4704853 не влияли на его активность в активированных моноцитах.

Минорный аллель полиморфизма rs13360222(T) снижает активность энхансерной области, расположенной в интроне 3 гена HAVCR2

В качестве потенциального энхансера была выбрана область в интроне 3 гена *HAVCR2* размером 1 025 п.н. (chr5: 156527046–156528070, сборка GRCh37/hg19; рис. 1), содержащая эпигенетиче-



Рис. 2. Альтернативные варианты SNP rs10515746 и rs4704853 не влияют на активность промотора *HAVCR2* в активированных моноцитах U937 (*a*) потенциально из-за их дистального расположения от функционально активной части промотора (δ). Уровень активности репортерной люциферазы в клетках, трансфицированных плазмидами на основе репортерного вектора pGL3-basic, содержащих промотор reнa *HAVCR2* с мажорными вариантами исследуемых полиморфизмов (WT) и их минорными аллелями (*a*), либо содержащих различающиеся по длине варианты промотора *HAVCR2* (δ). Гистограммы отражают уровень активности репортерной люциферазы, нормализованный на активность люциферазы внутреннего контроля в активированных моноцитах U937. На виде (*a*) представлены результаты 5 экспериментов в виде средних значений ± SEM; на виде (δ) – не менее 3 экспериментов в виде средних значений ± SEM. **P* < 0.05 – достоверное различие от промотора размером 1 992 п.н. (непарный *t*-критерий Стьюдента); п.s. – статистически недостоверное различие.

ские метки Н3К4те1, Н3К9Ас и Н3К27Ас, а также кластеры повышенной чувствительности хроматина к ДНКазе I и потенциальные участки связывания ТФ, определенные методом ChIP-Seq. Последовательность предполагаемого энхансера клонировали в плазмиду pGL3-basic, в которую предварительно был внесен промотор гена HAVCR2 (1 992 п.н.). В качестве контроля была создана аналогичная конструкция, где вместо потенциального энхансера использована последовательность идентичного размера из интрона 1 гена STAT3 (chr17: 40508494-40509573, сборка GRCh37/hg19), не проявляющая энхансерную активность (иррелевантный контроль). В используемой репортерной системе энхансерная область в пять раз повышала активность промотора гена *HAVCR2* в активированных РМА моноцитах U937 (рис. 3).

На следующем этапе сконструированы репортерные плазмиды, содержащие минорные варианты полиморфизмов гs73308313 и гs13360222 в энхансере гена *HAVCR2*. Для этих SNP нет информации об ассоциациях с заболеваниями, однако, по данным ChIP-Seq биоинформатического ресурса GTRD, гs73308313 располагается в области потенциального участка связывания TФ SPI1, a rs13360222 – ESR2. Кроме того, по данным ресурса PERFECTOS-APE, минорные варианты rs73308313(A) и rs13360222(T) понижают расчетную аффинность сайтов этих TФ, что может указывать на их потенциальную роль в изменении регуляторных свойств энхансера в зависимости от представленного аллеля. Нами показано, что альтернативные аллели SNP rs73308313 не оказывали достоверного влияния на способность энхансера активировать промотор гена *HAVCR2*, тогда как введение в последовательность энхансера минорного варианта rs13360222(T) приводило к значимому снижению активности промотора *HAVCR2* (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Накопление больших объемов данных, полученных на образцах от пациентов, в сочетании с полногеномным поиском ассоциаций (genomewide association studies, GWAS) позволяет связать геномные характеристики с предрасположенностью к прогрессии определенных заболеваний. Однако информация об ассоциациях не объясняет механизмов влияния генетической составляющей и носит только диагностический характер [27]. В частности, SNP, выявляемые в ходе GWAS,



Рис. 3. Минорный аллель SNP rs13360222(T) снижает активность энхансера гена *HAVCR2* в активированных моноцитах U937. В левой части рисунка изображена схема плазмид на основе вектора pGL3-basic, содержащих репортерный ген люциферазы под промотором гена *HAVCR2*, а также энхансеры с альтернативными аллелями: rs13360222 и rs73308313. Вертикальными красными линиями обозначено расположение соответствующих SNP в энхансерной области. Справа представлен уровень активности репортерной люциферазы в клетках, трансфицированных плазмидами: с промотором *HAVCR2*; с промотором *HAVCR2* и иррелевантной последовательностью, не обладающей энхансерными свойствами (контроль); с промотором и разными вариантами предполагаемого энхансера *HAVCR2*. На графике представлены результаты шести экспериментов в виде средних значений \pm SEM. *P < 0.05 – достоверное различие между активностью энхансеров с мажорными вариантами SNP (WT) и минорным вариантом rs13360222(T); ***P < 0.001 – достоверное различие от контрольной конструкции (непарный *t*-критерий Стьюдента); n.s. – статистически недостоверное различие.

требуют дальнейшей функциональной аннотации. С целью изучить особенности регуляции гена *HAVCR2* в активированных моноцитах мы проанализировали влияние SNP rs10515746 и rs4704853, ассоциированных с онкологическими и/или аутоиммунными заболеваниями, на активность промотора этого гена. Согласно полученным результатам, альтернативные варианты исследуемых полиморфизмов не оказывают влияния на активность промотора гена *HAVCR2* в клеточной модели активированных моноцитов U937. Мы также провели делеционный анализ промотора и выяснили, что для относительно высокой активности промотора в использованной экспериментальной системе достаточно области размером около 200 п.н. до старт-кодона ТІМ-3. Следовательно, отсутствие влияния разных аллелей исследуемых полиморфизмов промотора rs10515746 и rs4704853 на его активность может быть связано с их расположением в дистальной области, не оказывающей принципиального влияния на активность промотора.

Кроме того, мы функционально охарактеризовали энхансер, располагающийся в интроне 3 гена *HAVCR2*. Присутствие в составе репортерных конструкций энхансерного элемента приводило к пятикратному повышению активности промотора *HAVCR2* в клеточной модели активированных человеческих моноцитов. Эти результаты служат дополнительным подтверждением универсальности вышеописанных эпигенетических подходов для выбора потенциальных регуляторных элементов в геноме [28]. Мы проанализировали полиморфизм rs13360222, расположенный в анализируемом энхансере, и. по нашим данным, его минорный вариант Т значимо снижает активность промотора гена *HAVCR2* в активированных моноцитах. По данным ChIP-Seq этот SNP располагается в области связывания ТФ ESR2, кроме того, согласно данным ресурса PERFECTOS-APE, при наличии минорного варианта rs13360222(T) в энхансерной последовательности снижается расчетная аффинность существующего сайта связывания ESR2. Согласно данным ресурса The Tissue Atlas, ESR2 экспрессируется в клеточной линии U937 [29], кроме того, была показана экспрессия ESR2 в активированных моноцитах [30], что подтверждает возможное участие этого ТФ в регулировании экспрессии HAVCR2 в использованной нами клеточной модели. Ранее показано, что активация эстрогенового рецептора ESR2 может приводить к многократной стимуляции экспрессии гена *HAVCR2* в клетках остеосаркомы [31]. Также известно, что эстроген стимулирует экспрессию TIM-3 на иммунных клетках, участвующих в воспалительных процессах тканей сердца,

что может быть связано с различным уровнем смертности от сердечных заболеваний у мужчин и женщин [32]. Кроме того, влияние эстрогена на экспрессию TIM-3 может быть связано с важной ролью данного рецептора в формировании иммунологической толерантности при беременности, а именно в предотвращении активации макрофагов в ответ на антигены плода [33]. Таким образом, полиморфизм rs13360222 может быть ассоциирован с некоторыми патологиями, ассоциированными с хроническим воспалением, а также с нарушением течения беременности, посредством регуляции транскрипции гена *HAVCR2*. Дальнейшее изучение молекулярных механизмов влияния rs13360222(T) на регуляцию экспрессии TIM-3, в том числе и в других популяциях иммунных клеток, представляется интересной задачей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00341).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhu C., Anderson A., Schubart A., Xiong H., Imitola J., Khoury S., Zheng X., Strom T., Kuchroo V. (2005) The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* 6(12), 1245–1252.
- Das M., Zhu S., Kuchroo V. (2017) Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunol. Rev.* 276(1), 97–111.
- Nakayama M., Akiba H., Takeda K., Kojima Y., Hashiguchi M., Azuma M., Yagita H., Okumura K. (2009) Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood.* 113(16), 3821–3830.
- Chiba S., Baghdadi M., Akiba H., Yoshiyama H., Kinoshita I., Dosaka-Akita H., Fujioka Y., Ohba Y., Gorman J., Colgan J., Hirashima M., Uede T., Takaoka A., Yagita H., Jinushi M. (2012) Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat. Immunol.* 13(9), 832–842.
- Yang X., Jiang X., Chen G., Xiao Y., Geng S., Kang C., Zhou T., Li Y., Guo X., Xiao H., Hou C., Wang R., Lin Z., Li X., Feng J., Ma Y., Shen B., Li Y., Han G. (2013) T cell Ig mucin-3 promotes homeostasis of sepsis by negatively regulating the TLR response. *J. Immunol.* 190(5), 2068–2079.
- Ndhlovu L.C., Lopez-Vergès S., Barbour J.D., Brad Jones R., Jha A.R., Long B.R., Schoeffler E.C., Fujita T., Nixon D.F., Lanier L.L. (2012) Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity. *Blood.* **119**(16), 3734–3743.
- 7. da Silva I.P., Gallois A., Jimenez-Baranda S., Khan S., Anderson A.C., Kuchroo V.K., Osman I., Bhardwaj N.

(2014) Reversal of NK cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade. *Cancer Immunol. Res.* **2**(5), 410–422.

- Cao B., Zhu L., Zhu S., Li D., Zhang C., Xu C., Zhang S. (2010) Genetic variations and haplotypes in TIM-3 gene and the risk of gastric cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 59(12), 1851–1857.
- Han F., Wang G., Li Y., Tian W., Dong Z., Cheng S., Liu Y., Qu T., Wang X., Wang Y., Zhang B., Ju Y. (2017) Investigation of T-cell immunoglobulin- and mucindomain-containing molecule-3 (TIM-3) polymorphisms in essential thrombocythaemia (ET). *Hematology*. 22(6), 361–367.
- Sun L., Wu H., Cao S.G., Xia X.P., Lin X.Q., Jin J., Ding R., Jiang Y. (2017) [Association of Crohn's disease with T cell immunoglobulin and mucin domain 3 gene polymorphisms in Chinese patients]. *Zhonghua nei ke za zhi.* 56(9), 667–672.
- Chae S.C., Park Y.R., Shim S.C., Yoon K.S., Chung H.T. (2004) The polymorphisms of Th1 cell surface gene Tim-3 are associated in a Korean population with rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.* **95**(1), 91–95.
- Wang Z., Liu X., Wang X., Chong T., Lin S., Wang M., Ma X., Liu K., Xu P., Feng Y., Dai Z., Wang Z., Liu X., Wang X., Chong T., Lin S., Wang M., Ma X., Liu K., Xu P., Feng Y., Dai Z. (2016) Polymorphisms in TIM-3 and breast cancer susceptibility in Chinese women: a case-control study. *Oncotarget*. 7(28), 43703–43712.
- 13. Dunham I., Kundaje A., Aldred S.F., Collins P.J., Davis C.A., Doyle F., Epstein C.B., Frietze S., Harrow J., Kaul R., Khatun J., Lajoie B.R., Landt S.G., Lee B.K., Pauli F., Rosenbloom K.R., Sabo P., Safi A., Sanyal A., Shoresh N., Simon J.M., Song L., Trinklein N.D., Altshuler R.C., Birney E., Brown J.B., Cheng C., Djebali S., Dong X., Ernst J., Furey T.S., Gerstein M., Giardine B., Greven M., Hardison R.C., Harris R.S., Herrero J., Hoffman M.M., Iyer S., Kellis M., Kheradpour P., Lassmann T., Li Q., Lin X., Marinov G.K., Merkel A., Mortazavi A., Parker S.C.J., Reddy T.E., Rozowsky J., Schlesinger F., Thurman R.E., Wang J., Ward L.D., Whitfield T.W., Wilder S.P., Wu W., Xi H.S., Yip K.Y., Zhuang J., Bernstein B.E., Green E.D., Gunter C., Snyder M., Pazin M.J., Lowdon R.F., Dillon L.A.L., Adams L.B., Kelly C.J., Zhang J., Wexler J.R., Good P.J., Feingold E.A., Crawford G.E., Dekker J., Elnitski L., Farnham P.J., Giddings M.C., Gingeras T.R., Guigó R., Hubbard T.J., Kent W.J., Lieb J.D., Margulies E.H., Myers R.M., Stamatoyannopoulos J.A., Tenenbaum S.A., Weng Z., White K.P., Wold B., Yu Y., Wrobel J., Risk B.A., Gunawardena H.P., Kuiper H.C., Maier C.W., Xie L., Chen X., Mikkelsen T.S., Gillespie S., Goren A., Ram O., Zhang X., Wang L., Issner R., Coyne M.J., Durham T., Ku M., Truong T., Eaton M.L., Dobin A., Tanzer A., Lagarde J., Lin W., Xue C., Williams B.A., Zaleski C., Röder M., Kokocinski F., Abdelhamid R.F., Alioto T., Antoshechkin I., Baer M.T., Batut P., Bell I., Bell K., Chakrabortty S., Chrast J., Curado J., Derrien T., Drenkow J., Dumais E., Dumais J., Duttagupta R., Fastuca M., Fejes-Toth K., Ferreira P., Foissac S., Fullwood M.J., Gao H., Gonzalez D., Gordon A., Howald C., Jha S., Johnson R., Kapranov P., King B., Kingswood C., Li G., Luo O.J., Park E., Preall J.B., Presaud K., Ribeca P., Robyr D., Ruan X., Sammeth M., Sandhu K.S., Schaeffer L., See L.H., Shahab A.,

Skancke J., Suzuki A.M., Takahashi H., Tilgner H., Trout D., Walters N., Wang H., Hayashizaki Y., Reymond A., Antonarakis S.E., Hannon G.J., Ruan Y., Carninci P., Sloan C.A., Learned K., Malladi V.S., Wong M.C., Barber G.P., Cline M.S., Dreszer T.R., Heitner S.G., Karolchik D., Kirkup V.M., Meyer L.R., Long J.C., Maddren M., Raney B.J., Grasfeder L.L., Giresi P.G., Battenhouse A., Sheffield N.C., Showers K.A., London D., Bhinge A.A., Shestak C., Schaner M.R., Kim S.K., Zhang Z.Z., Mieczkowski P.A., Mieczkowska J.O., Liu Z., McDaniell R.M., Ni Y., Rashid N.U., Kim M.J., Adar S., Zhang Z., Wang T., Winter D., Keefe D., Iyer V.R., Zheng M., Wang P., Gertz J., Vielmetter J., Partridge E.C., Varley K.E., Gasper C., Bansal A., Pepke S., Jain P., Amrhein H., Bowling K.M., Anaya M., Cross M.K., Muratet M.A., Newberry K.M., McCue K., Nesmith A.S., Fisher-Aylor K.I., Pusey B., DeSalvo G., Parker S.L., Balasubramanian S., Davis N.S., Meadows S.K., Eggleston T., Newberry J.S., Levy S.E., Absher D.M., Wong W.H., Blow M.J., Visel A., Pennachio L.A., Petrykowska H.M., Abyzov A., Aken B., Barrell D., Barson G., Berry A., Bignell A., Boychenko V., Bussotti G., Davidson C., Despacio-Reves G., Diekhans M., Ezkurdia I., Frankish A., Gilbert J., Gonzalez J.M., Griffiths E., Harte R., Hendrix D.A., Hunt T., Jungreis I., Kay M., Khurana E., Leng J., Lin M.F., Loveland J., Lu Z., Manthravadi D., Mariotti M., Mudge J., Mukherjee G., Notredame C., Pei B., Rodriguez J.M., Saunders G., Sboner A., Searle S., Sisu C., Snow C., Steward C., Tapanari E., Tress M.L., Van Baren M.J., Washietl S., Wilming L., Zadissa A., Zhang Z., Brent M., Haussler D., Valencia A., Addleman N., Alexander R.P., Auerbach R.K., Balasubramanian S., Bettinger K., Bhardwaj N., Boyle A.P., Cao A.R., Cayting P., Charos A., Cheng Y., Eastman C., Euskirchen G., Fleming J.D., Grubert F., Habegger L., Hariharan M., Harmanci A., Iyengar S., Jin V.X., Karczewski K.J., Kasowski M., Lacroute P., Lam H., Lamarre-Vincent N., Lian J., Lindahl-Allen M., Min R., Miotto B., Monahan H., Moqtaderi Z., Mu X.J., O'Geen H., Ouyang Z., Patacsil D., Raha D., Ramirez L., Reed B., Shi M., Slifer T., Witt H., Wu L., Xu X., Yan K.K., Yang X., Struhl K., Weissman S.M., Penalva L.O., Karmakar S., Bhanvadia R.R., Choudhury A., Domanus M., Ma L., Moran J., Victorsen A., Auer T., Centanin L., Eichenlaub M., Gruhl F., Heermann S., Hoeckendorf B., Inoue D., Kellner T., Kirchmaier S., Mueller C., Reinhardt R., Schertel L., Schneider S., Sinn R., Wittbrodt B., Wittbrodt J., Jain G., Balasundaram G., Bates D.L., Byron R., Canfield T.K., Diegel M.J., Dunn D., Ebersol A.K., Frum T., Garg K., Gist E., Hansen R.S., Boatman L., Haugen E., Humbert R., Johnson A.K., Johnson E.M., Kutyavin T.V., Lee K., Lotakis D., Maurano M.T., Neph S.J., Neri F. V., Nguyen E.D., Qu H., Reynolds A.P., Roach V., Rynes E., Sanchez M.E., Sandstrom R.S., Shafer A.O., Stergachis A.B., Thomas S., Vernot B., Vierstra J., Vong S., Wang H., Weaver M.A., Yan Y., Zhang M., Akey J.M., Bender M., Dorschner M.O., Groudine M., MacCoss M.J., Navas P., Stamatoyannopoulos G., Beal K., Brazma A., Flicek P., Johnson N., Lukk M., Luscombe N.M., Sobral D., Vaquerizas J.M., Batzo-glou S., Sidow A., Hussami N., Kyriazopoulou-Panagiotopoulou S., Libbrecht M.W., Schaub M.A., Miller W., Bickel P.J., Banfai B., Boley N.P., Huang H., Li J.J.,

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

Noble W.S., Bilmes J.A., Buske O.J., Sahu A.D., Kharchenko P.V., Park P.J., Baker D., Taylor J., Lochovsky L. (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. **489**(7414), 57–74.

- Ernst J., Kellis M. (2017) Chromatin-state discovery and genome annotation with ChromHMM. *Nat. Protoc.* 12(12), 2478–2492.
- Kolmykov S., Yevshin I., Kulyashov M., Sharipov R., Kondrakhin Y., Makeev V.J., Kulakovskiy I.V., Kel A., Kolpakov F. (2021) GTRD: an integrated view of transcription regulation. *Nucleic Acids Res.* 49(D1), D104– D111.
- Vorontsov I.E., Kulakovskiy I.V., Khimulya G., Nikolaeva D.D., Makeev V.J. (2015) PERFECTOS-APE: Predicting regulatory functional effect of SNPs by approximate *p*-value estimation. In: *Proceedings of the International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms (BIOINFORMATICS-2015)*, pp. 102–108. https://doi.org/10.5220/0005189301020108
- Kulakovskiy I.V., Vorontsov I.E., Yevshin I.S., Sharipov R.N., Fedorova A.D., Rumynskiy E.I., Medvedeva Y.A., Magana-Mora A., Bajic V.B., Papatsenko D.A., Kolpakov F.A., Makeev V.J. (2018) HOCOMOCO: towards a complete collection of transcription factor binding models for human and mouse via large-scale ChIP-Seq analysis. *Nucleic Acids Res.* 46(D1), D252–D259.
- Fornes O., Castro-Mondragon J.A., Khan A., Van Der Lee R., Zhang X., Richmond P.A., Modi B.P., Correard S., Gheorghe M., Baranašić D., Santana-Garcia W., Tan G., Chèneby J., Ballester B., Parcy F., Sandelin A., Lenhard B., Wasserman W.W., Mathelier A. (2020) JASPAR 2020: Update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 48(D1), D87–D92.
- Jolma A., Kivioja T., Toivonen J., Cheng L., Wei G., Enge M., Taipale M., Vaquerizas J.M., Yan J., Sillanpää M.J., Bonke M., Palin K., Talukder S., Hughes T.R., Luscombe N.M., Ukkonen E., Taipale J. (2010) Multiplexed massively parallel SELEX for characterization of human transcription factor binding specificities. *Genome Res.* 20(6), 861–873.
- Schwartz A.M., Demin D.E., Vorontsov I.E., Kasyanov A.S., Putlyaeva L.V., Tatosyan K.A., Kulakovskiy I.V., Kuprash D.V. (2017) Multiple single nucleotide polymorphisms in the first intron of the IL2RA gene affect transcription factor binding and enhancer activity. *Gene.* 602, 50–56.
- Afanasyeva M.A., Putlyaeva L.V., Demin D.E., Kulakovskiy I.V., Vorontsov I.E., Fridman M.V., Makeev V.J., Kuprash D.V., Schwartz A.M. (2017) The single nucleotide variant rs12722489 determines differential estrogen receptor binding and enhancer properties of an *IL2RA* intronic region. *PLoS One.* **12**(2), e0172681.
- 22. Ustiugova A.S., Korneev K.V., Kuprash D.V., Afanasyeva M.A. (2019) Functional SNPs in the human autoimmunity-associated locus 17q12-21. *Genes* (Basel). **10**(2), 77.
- 23. Sundström C., Nilsson K. (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer.* **17**(5), 565–577.

- Korneev K. V., Sviriaeva E.N., Mitkin N.A., Gorbacheva A.M., Uvarova A.N., Ustiugova A.S., Polanovsky O.L., Kulakovskiy I.V., Afanasyeva M.A., Schwartz A.M., Kuprash D.V. (2020) Minor C allele of the SNP rs7873784 associated with rheumatoid arthritis and type-2 diabetes mellitus binds PU.1 and enhances TLR4 expression. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1866(3), 165626.
- 25. Gorbacheva A.M., Uvarova A.N., Ustiugova A.S., Bhattacharyya A., Korneev K.V., Kuprash D.V., Mitkin N.A. (2021) EGR1 and RXRA transcription factors link TGF-β pathway and CCL2 expression in triple negative breast cancer cells. *Sci. Rep.* 11(1), 114120. https://doi.org/10.1038/s41598-021-93561-6

Minefre I. Di Care C. Albanasa N.N. Care

- Minafra L., Di Cara G., Albanese N.N., Cancemi P. (2011) Proteomic differentiation pattern in the U937 cell line. *Leuk. Res.* 35(2), 226–236.
- 27. Visscher P.M., Wray N.R., Zhang Q., Sklar P., McCarthy M.I., Brown M.A., Yang J. (2017) 10 years of GWAS discovery: biology, function, and translation. *Am. J. Hum. Genet.* **101**(1), 5.
- Mora A., Sandve G.K., Gabrielsen O.S., Eskeland R. (2016) In the loop: promoter–enhancer interactions and bioinformatics. *Brief. Bioinform.* 17(6), 980.

- Uhlén M., Fagerberg L., Hallström B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson Å., Kampf C., Sjöstedt E., Asplund A., Olsson I.M., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szigyarto C.A.K., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J.O., Hober S., Alm T., Edqvist P.H., Berling H., Tegel H., Mulder J., Rockberg J., Nilsson P., Schwenk J.M., Hamsten M., Von Feilitzen K., Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., Von Heijne G., Nielsen J., Pontén F. (2015) Tissuebased map of the human proteome. *Science*. 347(6220), 1260419.
- 30. Campesi I., Marino M., Montella A., Pais S., Franconi F. (2017) Sex differences in estrogen receptor α and β levels and activation status in LPS-stimulated human macrophages. *J. Cell. Physiol.* **232**(2), 340–345.
- Vivar O.I., Zhao X., Saunier E.F., Griffin C., Mayba O.S., Tagliaferri M., Cohen I., Speed T.P., Leitman D.C. (2010) Estrogen receptor β binds to and regulates three distinct classes of target genes. *J. Biol. Chem.* 285(29), 22059–22066.
- Fish E.N. (2008) The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8(9), 737–744.
- Zhang Y.H., He M., Wang Y., Liao A.H. (2017) Modulators of the balance between M1 and M2 macrophages during pregnancy. *Front. Immunol.* 8, 120.

MINOR T ALLELE OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM rs13360222 DECREASES THE ACTIVITY OF *HAVCR2* GENE ENHANCER IN THE CELL MODEL OF HUMAN MACROPHAGES

A. N. Uvarova^{1, 2}, A. S. Ustiugova¹, N. A. Mitkin¹, A. M. Schwartz¹, K. V. Korneev¹, and D. V. Kuprash^{1, 2, *}

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

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: kuprash@gmail.com

TIM-3 receptor, encoded by Hepatitis A Virus Cellular Receptor 2 (*HAVCR2*) gene, belongs to the group of "immunological checkpoints" and plays an important role in preventing the development of autoimmune reactions. This receptor is expressed on the surface of various immunocytes and its functions in myeloid cells remain poorly understood, compared to the role of T cell specific TIM-3 that is actively studied in the context of the search for promising therapeutic targets in cancer immunotherapy. During this study, we performed deletion analysis of the promoter region of *HAVCR2* gene, as well as functional characterization of its enhancer, and studied the effect of a number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) on the activity of these regulatory elements in the relevant model of human macrophage-like cells – activated U937 monocytes. We have shown that SNPs rs10515746(A) and rs4704853(A) located in *HAVCR2* gene promoter and associated with the development of a number of SNP rs13360222 located in the enhancer in the third intron of the gene, significantly reduces the ability of the enhancer to activate *HAVCR2* promoter, presumably due to weak-ening of the binding of nuclear receptor ESR2 to the respective region.

Keywords: HAVCR2, TIM-3, single nucleotide polymorphisms, transcription regulation, promoter, enhancer

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 577.321

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ СЕЛЕНОПРОТЕИНОВ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И МАРКЕРОВ АПОПТОЗА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СЕЛЕНИТА НАТРИЯ И ДИТИОТРЕИТОЛА НА КЛЕТКИ ЛИНИИ МСГ7 РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2022 г. В. Н. Мальцева^{*a*}, *, М. В. Голтяев^{*a*}, С. В. Новоселов^{*a*}, Е. Г. Варламова^{*a*}

^аИнститут биофизики клетки Российской академии наук "Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", Пущино, Московская обл., 142290 Россия *e-mail: MaltsevaVN@gmail.com, mvn3@mail.ru

> Поступила в редакцию 09.02.2021 г. После доработки 02.05.2021 г. Принята к публикации 30.05.2021 г.

Изучено влияние индукторов стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) – дитиотреитола (ДТТ) и селенита натрия (СН) – на экспрессию селенопротеинов ЭПР и маркеров апоптоза в клетках линии МСF7 рака молочной железы. Показано, что ДТТ в концентрациях 1 и 5 мМ не влиял на выживаемость клеток MCF7. Исходя из данных ПЦР в реальном времени и уровня маркеров стресса ЭПР мы предполагаем, что ДТТ в использованных концентрациях вызывает в клетках МСF7 развитие ЭПР-стресса по адаптационному пути, преимущественно с участием факторов транскрипции IRE1 и ATF6, а также селенопротеинов SELS, SELK, SELT, SELM, SELN. Обработка клеток MCF7 0.01 мкМ СН приводила к снижению уровня мРНК всех исследуемых генов. При увеличении концентрации СН до 0.1 мкМ наблюдалось повышение уровня экспрессии ключевых генов ЭПР-стресса и маркеров апоптоза: CHOP, GADD34, PUMA, BIM, ATF4, sXBP, uXBP, AKT1, BAX, BAK. Согласно полученным результатам, 0.1 мкМ СН инициирует развитие процесса, известного как "ответ на неправильную укладку белка" (unfolded protein response, UPR) по проапоптическому пути с участием PERK, а также по альтернативному пути IRE1. СН в концентрации 1 мкМ также вызывает повышение уровня мРНК маркеров апоптоза, усиливает экспрессию сплайсированной формы ХВР1, а также сопровождается значительным снижением выживаемости опухолевых клеток. Мы предполагаем, что СН (1 мкМ) инициирует гибель клеток МСГ7 по пути апоптоза. Показано, что в зависимости от природы и концентрации индуктора ЭПР-стресса в клетках активируются как адаптивные, так и проапоптотические пути передачи сигналов UPR.

Ключевые слова: стресс эндоплазматического ретикулума, селенопротеины, селенит натрия, дитиотреитол, апоптоз

DOI: 10.31857/S0026898422010062

введение

Рак молочный железы — наиболее частая форма рака у женщин и одна из основных причин смертности от онкологических заболеваний [1]. Однако эффективность препаратов, применяемых в химиотерапии рака молочной железы, ограничена развитием лекарственной резистентности раковых клеток [2, 3].

Один из возможных процессов, приводящих к апоптотической гибели клеток, — стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР-стресс) — процесс, в развитии которого огромное значение имеет нарушение фолдинга белков, приводящее к развитию

Сокращения: ASK1 – цитозольная серин/треониновая протеинкиназа семейства MAP3K5, регулирующая апоптотические сигналы; ATF4 и ATF6 – активирующие факторы транскрипции 4 и 6 соответственно; Bak, Bax, Bim – белки-индукторы апоптоза, относящиеся к семейству Bcl2; CHOP – белок, гомологичный белку, связывающему CCAAT-энхансер; DIO2 – иодтирозиндеиодиназа 2; IRE1 – инозитолзависимый фермент 1; GADD34 – белок 34, вызывающий прекращение роста и повреждение ДНК; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; PUMA – активируемый p53 проапоптотический белок; SELK, SELN, SELS, SELM, SELT, SEP15 – селенопротеины K, N, S, M, T, I, 15 соответственно; UPR – ответ на неправильную укладку белка (unfolded protein response); XBP1 – фактор транскрипции, X-box-связывающий белок-1; AФК – активные формы кислорода; ДТТ – дитиотреитол; CH – селенит натрия; OУЭ – относительный уровень экспрессии; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

гомеостатического механизма, известного как ответ на неправильную упаковку белка (UPR). UPR – это сложный комплекс взаимосвязанных сигнальных путей, имеющих как адаптационную, так и проапоптотическую направленность, но объединенных общим пусковым механизмом, который представлен триадой трансмембранных белков – PERK, IRE1 и ATF6. В физиологических условиях регуляторные домены этих триггерных белков находятся в просвете ЭПР и связаны с иммуноглобулинсвязывающим белком BiP (BiP/GRP78). С увеличением нагрузки на ЭПР содержание свободных шаперонов в просвете уменьшается, в результате чего происходит диссоциация BiP от этих белков, активация PERK, IRE1 и ATF6 и запуск каскада сигнальных путей UPR.

ЭПР-стресс может индуцироваться как физическими факторами и соединениями различной химической природы, так и нарушениями метаболизма клетки [5–7]. Среди хорошо известных индукторов ЭПР-стресса особое место занимают селенсодержащие соединения. Одно из распространенных соединений селена – селенит натрия (СН) - широко используется в качестве потенциального противоопухолевого средства. СН оказывает цитотоксическое, антипролиферативное и проапоптотическое действие на раковые клетки разной этиологии [8-16]. Основными механизмами цитотоксического действия СН считаются продукция активных форм кислорода (АФК), дисфункция митохондрий с высвобождением цитохрома с, активация каспаз и, как следствие, окислительный стресс [17], а также образование дисульфидных мостиков, что приводит к модификациям структуры белков и изменению их конформации. Накопление неправильно свернутых белков в просвете ЭПР приводит к стрессу ЭПР с последующей активацией проапоптотического сигнального пути UPR [18-22]. Показано, что характер воздействия СН на клетки зависит от концентрации: при низких концентрациях индуцируется остановка клеточного цикла в S-фазе, в то время как высокие концентрации СН способствуют задержке клеточного цикла в фазе G0/G1 [20]. Описан антиапоптотический эффект СН, обусловленный ингибированием окислительного стресса, индуцированного токоферилсукцинатом (α-TOS), и стимуляцией механизма аутофагии [21].

Одним из типичных индукторов ЭПР-стресса является низкомолекулярный серусодержащий восстанавливающий агент дитиотреитол (ДТТ). Цитотоксическое действие ДТТ обусловлено наличием тиольной группы, при окислении которой образуется пероксид водорода. Повышенный уровень пероксида водорода и других АФК, образующихся в реакции Фентона, вызывает, в конечном итоге, окислительный стресс и гибель клетки [22, 23]. Кроме того, ДТТ приводит к гибели клеток путем активации не связанного с митохондриями пути апоптоза с участием каспазы 3. Это подтверждается отсутствием деполяризации митохондриальной мембраны и раннего высвобождения цитохрома *с* из митохондрий в цитозоль, а также незначительной ролью каспазы 9 в индуцированном ДТТ апоптозе [22].

Известно, что селенопротеины вовлечены в процессы канцерогенеза, их рассматривают в качестве маркеров онкологических заболеваний [24-28]. Роль этих белков в регуляции стресса ЭПР активно исследуется, при этом особый интерес представляют селенопротеины, локализующиеся преимущественно в ЭПР, такие как SELK, SELN, SELS, SELM, SELT, SEP15 и DIO2 [29-33]. Вклад этих селенопротеинов в гомеостатическую функцию ЭПР становится все более очевидным: они чувствительны к действию различных источников ЭПР-стресса, экспрессия мРНК и количественное содержание самих белков существенно зависят от природы индуктора и его концентрации. Подобные исследования проведены нами ранее на раковых клетках линий НТ-1080 (фибросаркома) и DU 145 (карцинома простаты). Обнаружено, что уровни экспрессии семи селенопротеинов-резидентов ЭПР по-разному изменялись в зависимости от клеточной линии и концентрации индуктора ЭПР [34-36]. Однако характеристика некоторых белков in vivo ограничена, а их связь с метаболической дисфункцией только предполагается, что делает необходимым изучение функций этих белков, их роли в ЭПРстрессе и патофизиологии метаболических заболеваний, в том числе в канцерогенезе. В настоящей работе изучены молекулярные механизмы развития ЭПР-стресса, роль селенопротеинов, ключевых белков UPR и апоптоза в индукции ЭПР-стресса посредством СН и ДТТ на примере аденокарциномы молочной железы человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и реагенты. В работе использованы: набор для анализа пролиферации клеток МТТ ("Abcam", Великобритания), антитела для Вестерн-блотинга, включая анти-Gapdh, анти-ATF4, анти-ATF6, анти-Xbp1 и вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена ("Abcam"), CH ("Sigma Aldrich", CША), ДТТ ("Sigma Aldrich"). Суммарную РНК выделяли с использованием реагента ExtractRNA ("Евроген", Россия). Использовали набор для проведения обратной транскрипции MMLV RT kit ("Евроген"), 5-кратную реакционную смесь для ПЦР в режиме реального времени qPCRmix-HS SYBR ("Евроген").

Культура клеток и реагенты. Работа проведена на клетках линии MCF7 (аденокарцинома молочной железы человека), приобретенных в АТСС (Американская коллекция типовых культур клеток, Manassas, США). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10%-ной фетальной сыворотки крупного рогатого скота.

Анализ пролиферации и жизнеспособности клеток. Количество жизнеспособных клеток MCF7 и скорость их пролиферации в каждом образце определяли с помощью MTT-теста. Клетки высевали на 96-луночный планшет из расчета 5500 клеток/лунку и инкубировали в течение 24 ч с CH (0.01, 0.1 и 1 мкМ) или ДТТ (1, 5 мМ). Далее клетки инкубировали в течение 3 ч с реагентом MTT (20 мкл, 5 г/л в фосфатном буфере, pH 7.4) при 37°С. После инкубации клетки обрабатывали растворителем МТТ в течение 15 мин при комнатной температуре. Оптическую плотность растворов измеряли при $\lambda = 590$ нм. Каждое измерение повторяли трижды.

Выделение РНК, обратная транскрипция и количественная ПЦР в режиме реального времени. Клетки МСF7 инкубировали в течение 24 ч с СН (0.01, 0.1 или 1 мкМ) или ДТТ (1 или 5 мМ), а затем выделяли суммарную РНК с использованием реагента ExtractRNA, содержащего раствор фенола и гуанидинизотиоцианата, в соответствии с инструкциями производителя ("Евроген"). Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически (NanoDrop ND-1000, "NanoDrop Technologies", США) при длине волны 260 нм. Качество РНК проверяли по сохранности 18S и 28S рРНК с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Растворы суммарной РНК хранили при температуре –75°С.

кДНК первой цепи синтезировали из 2 мкг суммарной РНК, реакцию проводили в присутствии oligo(dT)-праймеров и обратной транскриптазы ММLV в соответствии с инструкциями производителя ("Евроген"). Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени. ПЦР в реальном времени проводили с помощью смеси qPCRmix-HS SYBR ("Евроген") на амплификаторе "ДТлайт 5" ("ДНК-Технология", Россия). Специфичность праймеров и чистоту продуктов ПЦР проверяли с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле.

Ген *GAPDH*, кодирующий глицеральдегид-3фосфат—дегидрогеназу, использовали в качестве референсного. Нуклеотидные последовательности праймеров к исследуемым генам и гену *GAPDH* синтезированы фирмой "Евроген" (табл. 1).

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР в реальном времени

Ген	Прямой праймер 5' → 3'	Обратный праймер 5' → 3'
GAPDH	ACATCGCTCAGACACCATG	GCCAGTGAGCTTCCCGTT
SELT	TCTCCTAGTGGCGGCGTC	GTCTATATATTGGTTGAGGGAGG
SELM	AGCCTCCTGTTGCCTCCGC	AGGTCAGCGTGGTCCGAAG
SEP15	TACGGTTGTTGTTGGCGAC	CAAATTGTGCTTCCTCCTGAC
SELK	TTTACATCTCGAACGGACAAG	CAGCCTTCCACTTCTTGATG
SELS	TGGGACAGCATGCAAGAAG	GCGTCCAGGTCTCCAGG
SELN	TGATCTGCCTGCCCAATG	TCAGGAACTGCATGTAGGTGG
DIO2	AGCTTCCTCCTCGATGCC	AAAGGAGGTCAAGTGGCTG
СНОР	GCTCTGATTGACCGAATGG	TCTGGGAAAGGTGGGTAGTG
GADD34	CTCCGAGAAGGTCACTGTCC	GACGAGCGGGAAGGTGTGG
PUMA	CAGATATGCGCCCAGAGAT	CCATTCGTGGGTGGTCTTC
BIM	GGACGACCTCAACGCACAGTACGAG	GTAAGGGCAGGAGTCCCA
ATF4	GTGTTCTCTGTGGGTCTGCC	GACCCTTTTCTTCCCCCTTG
ATF6	AACCCTAGTGTGAGCCCTGC	GTTCAGAGCACCCTGAAGA
XBPu	ACTCAGACTACGTGCACCTC	GTCAATACCGCCAGAATCC
XBPs	CTGAGTCCGCAGCGGTGCAGG	GGTCCAAGTTGTCCAGAATG
CAS3	GCATTGAGACAGACAGTGGTG	AATAGAGTTCTTTTGTGAGCATG
CAS4	CACGCCTGGCTCTCATCATA	TAGCAAATGCCCTCAGCG
MAP3K5	AACACCTGAAGCTTAAGTCCC	TCAATGATAGCCTTCCACAGTG
MAPK-8	AAAGGGAACACACAATAGAAGAG	GCTGCTGCTTCTAGACTG
BAX	GGGCTGGACATTGGACTTC	AACACAGTCCAAGGCAGCTG
BAK	GAGAGTGGCATCAATTGGGG	CAGCCACCCCTCTGTGCAATCCA



Рис. 1. Цитотоксический эффект CH и ДТТ на линию клеток MCF7. Клетки инкубировали с CH и ДТТ в разных концентрациях в течение 24 ч и определяли их жизнеспособность с помощью MTT-теста. За 100% принимали значения, полученные для необработанных клеток. Стандартные отклонения рассчитывали по результатам не менее трех независимых экспериментов.

Изменение уровня экспрессии мРНК исследуемых белков до и после обработки CH и ДТТ определяли по формуле ОУЭ = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, где $\Delta\Delta Ct$ – разница значений ΔCt для каждого гена до и после обработки клеток. Каждое значение ΔCt рассчитывали по формуле ΔCt = Ct (исследуемый ген) – Ct (референсный ген).

Вестерн-блотинг. Клетки МСГ7 после инкубации СН или ДТТ трижды промывали ледяным фосфатно-солевым буфером, далее гомогенизировали с помощью лизирующего буфера, содержащего 100 мМ Трис-HCl pH 8.0, 0.15 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ фенилметансульфонилфторид (PMSF). Лизаты очищали центрифугированием при 14000 g в течение 10 мин при 4°С. Белки разделяли методом электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану ("GE Healthcare", Франция). Неспецифическое связывание антител предупреждали, блокируя мембраны 5%-ным обезжиренным молоком на шейкере в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем мембраны инкубировали в течение ночи при 4°С с первичными антителами (все 1 : 200). После отмывки в TBST мембраны с образцами инкубировали в течение 1 ч с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (1:5000). Связавшиеся антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, выявляли с использованием раствора DAB (0.05% DAB в TBS + 10 мкл 30% H₂O₂). Денситометрический анализ проводили, используя программу Image J Software.

Статистический анализ. Для анализа данных, построения графиков и статистической обработки использовали пакет программ Microsoft Excel и GraphPadPrism 5. Данные нескольких (не менее трех) независимых экспериментов объединяли и анализировали с помощью *t*-теста Стьюдента. Значения p < 0.05 рассматривали как статистически значимые. Количество белка в образцах определяли по методу Лоури. Уровень экспрессии белка количественно оценивали с помощью программы ImageJ. На графиках приведены средние значения \pm стандартное отклонение (SD), вычисленные по результатам трех независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние CH и ДТТ на пролиферацию и жизнеспособность клеток MCF7

На первом этапе работы с помощью МТТ-анализа мы проверили цитотоксические свойства используемых нами индукторов стресса ЭПР на клетках МСF7. Показано, что обработка клеток ДТТ (1 и 5 мМ) и СН (0.01 мкМ) в течение 24 ч практически не повлияла на их пролиферацию и жизнеспособность. Оказалось, что СН постепенно снижает жизнеспособность клеток МСF7 с 94 до 62% (p < 0.05) по мере увеличения его концентрации с 0.01 до 1 мкМ соответственно (рис. 1).

Влияние СН и ДТТ на экспрессию мРНК генов селенопротеинов-резидентов ЭПР

Методом ПЦР в реальном времени проанализированы изменения уровней экспрессии генов семи селенопротеинов, локализующихся преимущественно в ЭПР, в клетках МСF7, обработанных селенсодержащим (СН) и серусодержащим (ДТТ) индукторами ЭПР-стресса.

Результаты, представленные на рис. 2*а*, *б*, позволяют считать, что при обработке клеток СН в минимальной концентрации (0.01 мкМ) количество мРНК SELS, SELT и SELN не меняется существенно по сравнению с интактными клетками. Значительно увеличилась экспрессия гена *SELK* (в 2 раза, p < 0.05), а уровни мРНК SELM, SEP15 и DIO2, наоборот, уменьшились. Повышение концентрации СН до 0.1 мкМ привело к значительному росту уровня экспрессии генов всех исследуемых белков, что особенно заметно для DIO2 (в 3.2 раза, p < 0.05) и SELT (в 2.5 раза, p < 0.05). Вы-



Рис. 2. Экспрессия мРНК селенопротеинов, резидентных в ЭПР – SELT, SELM, SEP15, SELK, SELS, SELN и DIO2 – в линии клеток MCF7 после обработки различными концентрациями CH (*a*) и ДТТ (*б*) в течение 24 ч. Данные получены с помощью ПЦР в реальном времени и представлены как среднее значение ± стандартное отклонение, вычисленные по результатам не менее трех независимых экспериментов. В качестве внутреннего контроля для нормирования использовали ген *GAPDH*. За единицу (черная пунктирная линия) принят уровень каждой из исследуемых мРНК в необработанных клетках.

сокая концентрация CH (1 мкМ) практически не повлияла на экспрессию генов *SELT*, *SELK*, *SELS*, *SEP15*, но значительно усилила экспрессию мPHK SELM (в 2.6 раза, p < 0.05), SELN (в 2.1 раза, p < < 0.05) и DIO2 (в 1.9 раза, p < 0.05).

Воздействие ДТТ в концентрации 1 и 5 мМ на клетки в течение 24 ч повысило экспрессию генов почти всех исследуемых селенопротеинов по сравнению с интактными клетками, за исключением DIO2 и SEP15, уровень экспрессии которых не изменялся статистически значимо (рис. 26).

Изменение экспрессии генов ключевых участников ЭПР-стресса при обработке клеток MCF7 CH и ДТТ в разных концентрациях

С помощью ПЦР в реальном времени выявлены значимые различия в уровнях мРНК исследуемых белков в клетках MCF7, обработанных в течение 24 ч CH или ДТТ в разных концентрациях (рис. $3a, \delta$)

Интересно, что СН в низкой концентрации (0.01 мкМ) вызывает значительное снижение мРНК всех исследуемых генов, ассоциированных с ЭПР-стрессом (рис. 3*a*). Добавка СН в более высокой концентрации – 0.1 мкМ, приводит к инверсии описанного эффекта, уровень мРНК возрастает по сравнению с контрольными клетками. Выявлено значительное увеличение экспрессии следующих генов: *СНОР* (3.6 раза, p < 0.05), *GADD34*, *BIM*, *XBSs*, *BAK* и *MAPK8* примерно в 3 раза (p < 0.05) (рис. 3*a*).

Увеличение концентрации СН до 1 мкМ приводит к максимальному росту уровня мРНК GADD34 — в 5 раз (p < 0.05), ВАК и РUMA — в 4 раза (p < 0.05), а уровень мРНК МАР3К5, наоборот, значительно снизился. Стоит отметить, что при воздействии 1 мкМ СН на клетки в течение 24 ч экспрессия генов *СНОР*, *ATF4*, *ATF6*, *XBP*, *CAS3*, *CAS4* практически не отличалась от значений в контроле (рис. 3*a*).

ДТТ стимулировал усиление экспрессии почти всех изученных генов в клетках МСF7: мРНК ХВРи – в 3 раза при добавке 1 и 5 мМ, МАР3К5 – в 4 раза, при добавке 1 мМ ДТТ, СНОР, САS4 и GADD34 – более чем в 2 раза в присутствии 5 мМ ДТТ. Исключение составили гены *СНОР, ВАХ, АТF4* – уровень их экспрессии снизился почти в 2 раза при инкубации клеток с 1 мМ ДТТ в течение 24 ч по сравнению с интактными клетками (рис. 36).



Рис. 3. Экспрессия мРНК ключевых участников ЭПР-стресса и апоптоза в линии клеток МСF7, обработанных CH (*a*) и ДТТ (*б*) в течение 24 ч. Данные получены с помощью ПЦР в реальном времени и представлены как среднее значение ± стандартное отклонение, вычисленное по результатам не менее трех независимых экспериментов. Данные нормировали с использованием *GAPDH* в качестве внутреннего контроля. За единицу (черная пунктирная линия) принят уровень каждой из мРНК в необработанных клетках.

Изменение экспрессии на уровне белка ключевых маркеров ЭПР-стресса (ATF4, ATF6, XBP1s, XBP1u) при обработке клеток MCF7 CH и ДТ в разных концентрациях в течение 24 ч

Так как белки ATF4, ATF6, XBP1s, XBP1u являются ключевыми маркерами основных сигнальных путей UPR, мы изучили изменение их уровня при добавлении CH и ДТТ к клеткам MCF7.

Обнаружено повышение экспрессии мРНК и количественного содержания ATF4, ATF6 и XBP1s в клетках MCF7, обработанных 0.1 и 1 мкМ CH (рис. 4*a*). Уровни экспрессии генов *ATF4* и *ATF6* и сплайсированных форм XBP1 возрастали статистически значимо (примерно в 2 раза по сравнению с контролем), что подтверждено данными Вестернблотинга (рис. 4*a*). При воздействии CH во всех использованных концентрациях уровень экспрессии белка XBP1s значимо не менялся (рис. 4*a*).

Влияние ДТТ (1 и 5 мМ) на уровень экспрессии белков отличалось от воздействия СН на клетки MCF7. Уровень мРНК АТF4, АТF6, ХВР1s при инкубации клеток с 1 и 5 мМ ДТТ практически не изменялся и не отличался от уровня в контроле (рис. 4г). Исключением стал белок ХВР1и, уровень экспрессии которого увеличился почти в 2 раза при воздействии 5 мМ ДТТ. Таким образом, мы обнаружили противоположное действие СН (во всех концентрациях) и ДТТ на уровень экспрессии белка XBP1u — незначительное снижение в случае СН и повышение в случае ДТТ, что подтверждено результатами Вестерн-блотинга (рис. 46).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нарушение состояния и нормального функционирования клеток приводит к развитию стресса ЭПР, который инициирует UPR-ответ, направленный на восстановление гомеостаза ЭПР, т.е. в клетке начинают работать адаптивные сигнальные пути, способствующие выживанию клеток, в противном случае происходит переключение с адаптивных процессов на проапоптотические.

Эти процессы происходят как в нормальных, так и в онкотрансформированных клетках. Следовательно, блокирование адаптивного пути стресса ЭПР или стимуляция пути апоптоза можно рассматривать как потенциальную противо-



Рис. 4. Экспрессия генов ключевых маркеров ЭПР-стресса: *ATF4*, *ATF6*, *XBP1s*, *XBP1u* в клетках MCF7, обработанных CH и ДТТ в течение 24 ч. a – Вестерн-блот-анализ содержания белков ATF4, ATF6, XBP1s и XBP1u в клетках MCF7, обработанных CH (0.01, 0.1 или 1 мкМ). δ – Вестерн-блот-анализ содержания белков ATF4, ATF6, XBP1s и XBP1u в клетках MCF7, обработанных CH (0.01, 0.1 или 1 мкМ). δ – Вестерн-блот-анализ содержания белков ATF4, ATF6, XBP1s и XBP1u в клетках MCF7, обработанных CH (0.01, 0.1 или 1 мкМ). δ – Вестерн-блот-анализ содержания белков ATF4, ATF6, XBP1s и XBP1u в клетках MCF7, обработанных 1 или 5 мМ ДТТ. e – Уровень экспрессии мPHK ATF4, ATF6, XBP1s и XBP1u относительно мPHK GAPDH (отн. ед.) в клетках MCF7, обработанных CH в разной концентрации. e – Уровень экспрессии мPHK ATF4, ATF6, XBP1s и XBP1u относительно мPHK GAPDH (отн. ед.) в клетках MCF7, обработанных ДТТ в разной концентрации. Представлены средние значения \pm стандартное отклонение (SD), вычисленные по результатам трех независимых экспериментов.

опухолевую стратегию. Раковые клетки активируют UPR для облегчения стрессового состояния ЭПР как стратегию выживания и прогрессии канцерогенеза. UPR играет важную роль в обеспечении устойчивости опухолевых клеток к химио- или лучевой терапии [37, 38]. По-видимому, существует возможность терапии рака, направленной на индукцию ЭПР-стресса, а также путем ингибирования компонентов, участвующих в адаптивном пути UPR и стимуляции апоптотического пути. В нашей работе мы использовали хорошо известные индукторы ЭПР-стресса – CH, одно из наиболее распространенных соединений селена, которое используют в качестве потенциального противоопухолевого препарата, и ДТТ. Оба индуктора ЭПР-стресса обладают высокой активностью, благодаря чему вызывают глобальные модификации, изменяют конформацию белков и, как следствие, приводят к накоплению неправильно свернутых белков в просвете ЭПР. Мы сравнили влияние СН и ДТТ на развитие ЭПРстресса. Эти вещества вызывают противоположные модификации белков: так, СН образует в белках дисульфидные связи, а ДТТ, наоборот, восста-

навливает их. Важно подобрать такие концентрации индукторов ЭПР, которые способствовали бы пролонгированному ЭРП-стрессу и гибели раковых клеток, не оказывая при этом цитотоксического эффекта на здоровые клетки, окружающие опухоль. В качестве раковых клеток мы выбрали клетки линии MCF7, эпителиоподобной клеточной линии, полученной из инвазивной аденокарциномы протоков молочной железы человека. Клетки линии MCF7 часто используют для изучения молекулярной биологии рака и цитотоксичности противоопухолевых фармпрепаратов in vitro. Цитотоксические свойства СН и ДТТ в возрастающих концентрациях мы определяли при помощи МТТ-анализа, который показал, что обработка опухолевых клеток 1 и 5 мМ ДТТ, а также 0.01 мкМ СН в течение 24 ч практически не влияет на их пролиферацию и жизнеспособность. Дальнейшее увеличение концентрации СН приводило к снижению выживаемости клеток MCF7. Критической концентрацией СН, близкой к LD₅₀, оказалась 1 мкМ, так как мы наблюдали гибель около 40% клеток. Очевидно, что именно эта доза СН приводит к однозначному переключению механизмов ЭПР-стресса с адаптивных на проапоптические и вызывает гибель опухолевых клеток, предположительно по пути апоптоза. Далее мы анализировали молекулярные механизмы наблюдаемых явлений.

Большой интерес представляет роль селенопротеома, т.е. совокупности всех селенсодержащих белков организма, в развитии, росте и прогрессии рака [25, 27, 28]. Мы сделали акцент на семи селенопротеинах, резидентно присутствующих в ЭПР, проанализировав изменение их экспрессии при воздействии на клетки MCF7 двух индукторов ЭПР-стресса. Эти селенопротеины, несмотря на сходное строение, обладают структурными особенностями, различиями в топологии и выполняют различные функции: участвуют в распознавании и регуляции окислительно-восстановительного статуса и правильного фолдинга белков, в контроле потока Ca²⁺ и регуляции Ca²⁺зависимой передачи сигналов и др. [29, 39]. Сниженная экспрессия селенопротеинов-резидентов ЭПР связана с повышенным клеточным стрессом и воспалением. Нами показано, что экспрессия мРНК практически всех исследуемых селенопротеинов увеличивается как при воздействии 1 и 5 мМ ДТТ, так и 0.1 мкМ СН. Вероятно, эта концентрация СН ассоциирована с развитием ЭПРстресса по адаптивному сигнальному пути UPR, как и обе концентрации ДТТ.

Воздействие СН в низкой концентрации (0.01 мкМ) приводило к снижению уровня экспрессии генов трех селенопротеинов – SELM, SEP15, DIO2. Единственным селенопротеином, уровень мРНК которого значительно увеличил-

ся, был SELK (в 2 раза, р <0.05). Это позволяет предположить, что большую роль в развитии алаптационного пути на начальных сталиях инициации ЭПР-стресса играет именно SELK. Показано, что подавление экспрессии SELK путем РНК-интерференции усугубляло гибель клеток HepG2 и апоптоз. Предполагается, что белок SELK регулируется ЭПР-стрессом и играет важную роль в защите клеток HepG2 от апоптоза, вызванного индукторами стресса ЭПР [40]. Показано также, что подавление экспрессии белка SELK сопровождается окислительным стрессом и апоптозом в мышцах курицы [41]. Напротив, избыточная экспрессия SELK защищает кардиомиоциты от апоптоза благодаря своим антиоксидантным свойствам [42]. Кроме того, SELK относится к тем селенопротеинам, которые сами не обладают ферментативной активностью, но используют остаток селеноцистеина альтернативным образом, в основном при взаимодействии с другими белками ЭПР [43]. Основные клеточные функции SELK – участие в пути деградации белка, связанного с ЭПР (ERAD), регуляция потока Ca²⁺ из ЭПР, а также восстановление мембраны ЭПР. SELK входит в состав мембранных комплексов ЭПР, связывается с SELS, валозин-содержащим белком (VCP; p97) и Derlin, компонентами комплекса ERAD, который облегчает транслокацию неправильно свернутых белков из ЭПР в процессе UPR. SELK обладает более высоким сродством к трансмембранному белку Derlin-1, в то время как SELS имеет более высокое сродство к Derlin-2, что указывает на потенциальную способность этих селенопротеинов распознавать и регулировать транслокацию различных субстратов через канал Derlin в мембране ЭПР [44, 45]. SELK также важен для гомеостаза кальция, так как участвует в высвобождении внутриклеточного кальция из ЭПР. Можно предположить, что те селенопротеины, экспрессия которых снизилась при воздействии на клетки MCF7 0.01 мкМ CH, незначимы на данном этапе, и клетка экономит свои метаболические и энергетические ресурсы, чтобы максимально быстро и безболезненно восстановить гомеостаз ЭПР.

Селенопротеины M и N, как следует из характера изменения их экспрессии, вовлечены в эти процессы, развиваемые как по адаптивному сценарию, так и по апоптическому пути. Мы наблюдали повышение уровня мРНК в клетках МСF7, обработанных как ДТТ (1 и 5 мМ), так и 1 мкМ СН, при котором происходит гибель около 40% клеток. Активно обсуждается участие SELM и SELN в проапоптическом пути развития ЭПРстресса. Увеличение экспрессии этих белков способствует выживаемости клеток, обеспечивая антиоксидантную защиту и регулируя гомеостаз кальция [46–49]. Особый интерес представляет повышение экспрессии DIO2 (в 3 и 2 раза) при

обработке клеток 0.1 и 1 мкМ СН соответственно. Объяснить этот результат довольно сложно, так как подробно описана в основном роль данного селенопротеина в активации тиреоидных гормонов [50, 51]. Показано, что экспрессия DIO2 у грызунов наиболее высока вскоре после рождения, что указывает на его потенциальное участие в развитии мышц. DIO2 действует под контролем фактора транскрипции Forkhead box O3 (FoxO3), который регулирует такие клеточные функции, как рост, развитие и метаболизм мышц. Интересно, что FoxO3 играет важную роль в метаболизме скелетных мышц, регулируя гликолитический и липолитический поток, а также метаболизм митохондрий [42]. Дозозависимое усиление экспрессии мРНК DIO2 сложно объяснить исходя из функциональной роли этого белка. Этот феномен требует дальнейшего изучения. Экспрессия ключевых участников ЭПР-стресса и маркеров апоптоза на уровне как мРНК, так и белка существенно менялась в зависимости от природы индуктора ЭПР-стресса и его концентрации.

Учитывая данные ПЦР в реальном времени и Вестерн-блотинга, мы можем предположить, что 1 мМ ДТТ активирует сигнальные пути IRE1 и ATF6 UPR с участием ASK1 (MAP3K5) киназы, которая способствует увеличению экспрессии белков апоптоза – BIM, PUMA и BAK. IRE1, один из трех основных сенсорных белков UPR, представляет собой бифункциональную молекулу, содержащую в своей цитоплазматической части домен с киназной активностью и С-концевой домен с РНКазной активностью. Активация IRE1 включает ее олигомеризацию и трансаутофосфорилирование киназных доменов. IRE1, после его активации по каноническому пути, удаляет с помощью РНКазного домена интрон из полноразмерной мРНК ХВР1, образуя фактор транскрипции XBP1s, который активирует гены шаперонов. Кроме того, IRE1 способен взаимодействовать с адаптерным белком TRAF2 (фактор 2, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли). Это взаимодействие инициирует каскад фосфорилирования киназой ASK1 и завершается активацией N-концевой киназы с-JUN (JNK). Воздействие на клетки 5 мМ ДТТ приводило к активации PERK сигнального пути UPR. Это подтверждается увеличением экспрессии мРНК ATF4 и нижерасположенных белков-маркеров апоптоза. Так ATF4 обеспечивает индукцию СНОР, активированный СНОР индуцирует ряд генов, кодирующих белки, участвующие в процессах апоптоза, такие как GADD34, PUMA, BIM, BAX, CAS4 [52-54]. Также, вероятно, запускается путь IRE1, что подтверждается возросшим уровнем мРНК сплайсированной формы ХВР. Следует отметить довольно странные результаты, полученные нами при анализе экспрессии мРНК ключевых участников UPR в клетках, обработанных низкой дозой СН (0.01 мкМ). Эти результаты, а именно, снижение уровней мРНК всех исследуемых белков, участников ЭПР-стресса, сложно объяснить. Можно предположить, что СН в концентрации 0.01 мкМ запускает IRE1-сигнальный путь UPR. При этом IRE1 способен расшеплять множество мРНК без специфичной выборки, в том числе и мРНК изучаемых нами белков. Этот процесс известен как IRE1α-зависимый регулируемый распад (RIDD) [54, 55]. Другим возможным объяснением снижения уровня мРНК, как это не удивительно, может быть увеличение количества селенопротеина К, которое мы наблюдали при воздействии 0.01 мкМ СН. Это воздействие приводило к значительному увеличению в клетках MCF7 уровня мРНК ATF4 и всех исследуемых селенопротеинов, локализующихся в ЭПР. Возможно, фактор транскрипции ATF4 в данном случае стимулирует транскрипцию генов селенопротеинов ЭПР, неактивных в нормальном физиологическом состоянии, но транскрибируемых в условиях стресса, что мы и наблюдали. Воздействие на клетки MCF7 как 0.1, так и 1 мкМ СН приводило к увеличению экспрессии ключевых маркеров ЭПР-стресса на уровне как белка, так и мРНК. Мы предполагаем, что СН в этих концентрациях способствует активации сразу двух проапоптотических сигнальных путей UPR: PERK и IRE1. Это подтверждается увеличением уровня мРНК таких маркеров апоптоза, как РUMA, BIM, BAX и BAK. Если сравнить использованные нами индукторы ЭПР-стресса (СН и ДТТ), можно сделать следующие выводы. Используемые нами соединения имеют разное строение, одно из них содержит селен, другое серу, но оба действуют сходным образом, провоцируя стресс ЭПР: вызывают продукцию АФК, нарушают конформацию белков. Конформационные изменения в случае СН возникают за счет образования дисульфидных связей, в случае ДТТ – их восстановления. Нами показано, что данные соединения затрагивают различные адаптивные и проапоптотические пути UPR. Для развития ЭПР-стресса имеет значение также концентрация индуктора. Нами показано, что СН является более сильным стрессором, нарушающим гомеостаз ЭПР, а ДТТ – более слабым. Таким образом, полученные нами данные важны для понимания молекулярных механизмов регуляции ЭПР-стресса, вызванного индукторами разной природы, и роли в этих процессах селенопротеинов, локализующихся строго в ЭПР. Мы полагаем, что подобные исследования позволят проводить поиск потенциальных мишеней для онкотерапевтических препаратов и стратегий воздействия при онкологических заболеваниях.

Авторы выражают благодарность сектору Оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (http://www.ckp-rf.ru/ckp/ 670266/). Работа выполнена в рамках Госзадания № 0191-2019-0019.

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. Azamjah N., Soltan-Zadeh Y., Zayeri F. (2019) Global trend of breast cancer mortality rate: a 25-year study. *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* **20**, 2015–2020.
- Tang Y., Wang Y., Kiani M.F., Wang B. (2016) Classification, treatment strategy, and associated drug resistance in breast cancer. *Clin. Breast Cancer.* 16, 335–343.
- 3. Fisusi F.A., Akala E.O. (2019) Drug combinations in breast cancer therapy. *Pharm. Nanotechnol.* **7**, 3–23.
- 4. Comşa Ş., Cîmpean A.M., Raica M. (2015) The story of MCF 7 breast cancer cell Line: 40 years of experience in research. *Anticancer Res.* **35**, 3147–3154.
- Hotamisligil G.S., Davis R.J. (2016) Cell signaling and stress responses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a006072.
- Almanza A., Carlesso A., Chintha C., Creedican S., Doultsinos D., Leuzzi B., Luís A., McCarthy N., Montibeller L., More S., Papaioannou A., Püschel F., Sassano M. L., Skoko J., Agostinis P., Belleroche J., Eriksson L.A., Fulda S., Gorman A.M., Healy S., Kozlov A., Muñoz-Pinedo C., Rehm M., Chevet E., Samali A. (2019) Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J.* 286(2), 241–278.
- Lemmer I.L., Willemsen N., Hilal N., Bartelt A. (2021) A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. *Mol. Metab.* 20, 101169.
- Cui Z., Li C., Li X., Zhang Q., Zhang Y., Shao J., Zhou K. (2015) Sodium selenite (Na₂SeO₃) induces apoptosis through the mitochondrial pathway in CNE-2 nasopharyngeal carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 46(6), 2506–2514.
- Jiang Q., Li F., Shi K., Wu P., An J., Yang Y., Xu C. (2013) ATF4 activation by the p38MAPK–eIF4E axis mediates apoptosis and autophagy induced by selenite in Jurkat cells. *FEBS Lett.* 587(15), 2420–2429.
- Liu T., Sun Y., Yang S., Liang X. (2020) Inhibitory effect of selenium on esophagus cancer cells and the related mechanism. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 66(5), 456–461.
- Bonfim N.E.S., Baranoski A., Mantovani M.S. (2020) Cytotoxicity of sodium selenite in HaCaT cells induces cell death and alters the mRNA expression of PUMA, ATR, and mTOR genes. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 62, 126605.
- Yang L., Cai Y.-S., Xu K., Zhu J.-L., Li Y.-B., Wu X.-Q., Sun J., Lu S.-M., Xu P. (2018) Sodium selenite induces apoptosis and inhibits autophagy in human synovial

sarcoma cell line SW982 *in vitro*. *Mol. Med. Rep.* **17**(5), 6560–6568.

- Гольтяев М.В., Варламова Е.Г., Новосёлов С.В., Фесенко Е.Е. (2020) Активация сигнальных путей апоптоза в условиях пролонгированного ЭР-стресса, вызванного действием селен-содержащих соединений на клетки тератокарциномы семенников мыши. ДАН. 490(1), 9–11. https://doi.org/10.1134/S160767292001007X
- 14. Кузнецова Ю.П., Гольтяев М.В., Горбачева О.С., Новосёлов С.В., Варламова Е.Г., Фесенко Е.Е. (2018) Влияние селенита натрия на экспрессию мРНК генов селеноцистеин-содержащих белков млекопитающих в раковых клетках семенников и предстательной железы. ДАН, 480(1), 107–111. https://doi.org/10.1134/S1607672918030018
- 15. Takahashi K., Suzuki N., Ogra Y. (2017) Bioavailability comparison of nine bioselenocompounds *in vitro* and *in vivo. Int. J. Mol.* **18**, 506.
- Misra S., Boylan M., Selvam A., Spallholz J.E., Björnstedt M. (2015) Redox-active selenium compounds from toxicity and cell death to cancer treatment. *Nutrients*. 7, 3536–3556.
- Guan L., Han B., Li Z., Hua F., Huang F., Wei W., Yang Y., Xu C. (2009) Sodium selenite induces apoptosis by ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human acute promyelocytic leukemia NB4 cells. *Apoptosis.* 14, 218–225.
- Okuno T., Honda E., Arakawa T., Ogino H., Ueno H. (2014) Glutathione-dependent cell cycle G1 arrest and apoptosis induction in human lung cancer A549 cells caused by methylseleninic acid: comparison with sodium selenite. *Biol. Pharm. Bull.* 37, 1831–1837.
- Palsamy P., Bidasee K.R., Shinohara T. (2014) Selenite cataracts: activation of endoplasmic reticulum stress and loss of Nrf2/Keap1-dependent stress protection. *Biochim. Biophys. Acta.* 1842(9), 1794–1805.
- Cui Z., Li C., Li X., Zhang Q., Zhang Y., Shao J., Zhou K. (2015) Sodium selenite (Na₂SeO₃) induces apoptosis through the mitochondrial pathway in CNE-2 nasopharyngeal carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 46(6), 2506–2514.
- Badr D.M., Hafez H.F., Agha A.M., Shouman S.A. (2016) The combination of α-tocopheryl succinate and sodium selenite on breast cancer: a merit or a demerit? *Oxid. Med. Cell Longev.* 2016, 4741694.
- 22. Tartier L., McCarey Y.L., Biaglow J.E., Kochevar I.E., Held K.D. (2000) Apoptosis induced by dithiothreitol in HL-60 cells shows early activation of caspase 3 and is independent of mitochondria. *Cell Death Differ*. 7(10), 1002–1010.
- Xiang X.Y., Yang X.C., Su J., Kang J.S., Wu Y., Xue Y.N., Dong Y.T., Sun L.K. (2016) Inhibition of autophagic flux by ROS promotes apoptosis during DTT-induced ER/oxidative stress in HeLa cells. *Oncol. Rep.* 35, 3471–3479.
- 24. Hughes D.J., Kunická T., Schomburg L., Liška V., Swan N., Souček P. (2018) Expression of selenoprotein

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022
genes and association with selenium status in colorectal adenoma and colorectal cancer. *Nutrients*. **10**(11), 1812.

- Jia Y., Dai J., Zeng Z. (2020) Potential relationship between the selenoproteome and cancer. *Mol. Clin. Oncol.* 13(6), 83.
- Capone F., Polo A., Sorice A., Budillon A., Costantini S. (2020) Integrated analysis to study the relationship between tumor-associated selenoproteins: focus on prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 21(18), 6694.
- Li J., Zhu Y., Zhou Y., Jiang H.G., Chen Z.H., Lu B.H., Shen X.N. (2020) The SELS rs34713741 polymorphism is associated with susceptibility to colorectal cancer and gastric cancer: a meta-analysis. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 24(12), 835–844.
- Callejón-Leblic B., Arias-Borrego A., Rodríguez-Moro G., Roldán F.N., Pereira-Vega A., Gómez-Ariza J.L., García-Barrera T. (2021) Advances in lung cancer biomarkers: the role of (metal-) metabolites and selenoproteins. *Adv. Clin. Chem.* 100, 91–137.
- Varlamova E.G. (2020) Protein-protein interactions of ER-resident selenoproteins with their physiological partners. *Biochimie*. **171–172**, 197–204. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.03.012
- Rocca C., Pasqua T., Boukhzar L., Anouar Y., Angelone T. (2019) Progress in the emerging role of selenoproteins in cardiovascular disease: focus on endoplasmic reticulum-resident selenoproteins. *Cell Mol. Life Sci.* 76(20), 3969–3985.
- Zhang C., Ge J., Liv M., Zhang Q., Talukder M., Li J.L. (2020) Selenium prevent cadmium-induced hepatotoxicity through modulation of endoplasmic reticulumresident selenoproteins and attenuation of endoplasmic reticulum stress. *Environ. Pollut.* 260, 113873.
- Pitts M.W., Hoffmann P.R. (2018) Endoplasmic reticulum-resident selenoproteins as regulators of calcium signaling and homeostasis. *Cell Calcium*. **70**, 76–86.
- 33. Wang P., Lu Z., He M., Shi B., Lei X., Shan A. (2020) The effects of endoplasmic-reticulum-resident selenoproteins in a nonalcoholic fatty liver disease pig model induced by a high-fat diet. *Nutrients.* 12(3), 692.
- Varlamova E.G. (2018) Participation of selenoproteins localized in the ER in the processes occurring in this organelle and in the regulation of carcinogenesis-associated processes. J. Trace Elem. Med. Biol. 48, 172–180.
- Варламова Е.Г., Гольтяев М.В., Фесенко Е.Е. (2019) Белки-партнеры селенопротеина SELM и роль соединений селена в регуляции его экспрессии в раковых клетках человека. ДАН. 488(2), 212– 216.
- Goltyaev M.V., Mal'tseva V.N., Varlamova E.G. (2020) Expression of ER-resident selenoproteins and activation of cancer cells apoptosis mechanisms under ER-stress conditions caused by methylseleninic acid. *Gene.* 755, 144884.
- Kim C., Kim B. (2018) Anti-cancer natural products and their bioactive compounds inducing ER stress– mediated apoptosis: a review. *Nutrients*. 10(8), 1021.
- Harnoss J., Thomas A., Reichelt M., Guttman O., Wu T.D., Marsters S.A., Shemorry A., Lawrence D.,

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

Kan D., Segal E., Merchant M., Totpal K., Crocker L.M., Mesh K., Dohse M., Solon M., Modrusan Z., Rudolph J., Koeppen H., Walter P., Ashkenazi A. (2020) IRE1 α disruption in triple-negative breast cancer cooperates with antiangiogenic therapy by reversing ER stress adaptation and remodeling the tumor microenvironment. *Cancer Res.* **80**(11), 2368–2379.

- Zhang Y., Roh Y.J., Han S.J., Park I., Lee H.M., Ok Y.S., Lee B.C., Lee S.R. (2020) Role of selenoproteins in redox regulation of signaling and the antioxidant system: a review. *Antioxidants* (Basel). 9(5), 383.
- 40. Du S., Zhou J., Jia Y., Huang K. (2010) SelK is a novel ER stress-regulated protein and protects HepG2 cells from ER stress agent-induced apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* **502**(2), 137–143.
- Fan R.F., Cao C.Y., Chen M.H., Shi Q.X., Xu S.W. (2018) Gga–let–7f–3p promotes apoptosis in selenium deficiency-induced skeletal muscle by targeting selenoprotein K. *Metallomics*. 10(7), 941–952.
- Addinsall A.B., Wright C.R., Andrikopoulos S., Poel C., Stupka N. (2018) Emerging roles of endoplasmic reticulum-resident selenoproteins in the regulation of cellular stress responses and the implications for metabolic disease. *Biochem J.* 475(6), 1037–1057.
- 43. Marciel M.P., Hoffmann P.R. (2019) Molecular mechanisms by which selenoprotein K regulates immunity and cancer. *Biol. Trace Elem. Res.* **192**(1), 60–68.
- 44. Lee J.H., Park K.J., Jang J.K., Jeon Y.H., Ko K.Y., Kwon J.H., Lee S.R., Kim I.Y. (2015) Selenoprotein Sdependent selenoprotein K binding to p97(VCP) protein is essential for endoplasmic reticulum-associated degradation. J. Biol. Chem. 290(50), 29941–29952.
- 45. Shchedrina V.A., Everley R.A., Zhang Y., Gygi S.P., Hatfield D.L., Gladyshev V.N. (2011) Selenoprotein K binds multiprotein complexes and is involved in the regulation of endoplasmic reticulum homeostasis. *J. Biol. Chem.* 286(50), 42937–42948.
- Huang J.Q., Ren F.Z., Jiang Y.Y., Lei X. (2016) Characterization of selenoprotein M and its response to selenium deficiency in chicken brain. *Biol. Trace Elem. Res.* 170(2), 449–458.
- 47. Gong T., Hashimoto A.C., Sasuclark A.R., Khadka V.S., Gurary A., Pitts M.W. (2019) Selenoprotein M promotes hypothalamic leptin signaling and thioredoxin antioxidant activity. *Antioxid. Redox Signal.* https://doi.org/10.1089/ars.2018.7594
- 48. Jiang H., Shi Q.Q., Ge L.Y., Zhuang Q.F., Xue D., Xu H.Y., He X.Z. (2019) Selenoprotein M stimulates the proliferative and metastatic capacities of renal cell carcinoma through activating the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Med.* 8(10), 4836–4844.
- 49. Varone E., Pozzer D., Di Modica S., Chernorudskiy A., Nogara L., Baraldo M., Cinquanta M., Fumagalli S., Villar-Quiles R.N., De Simoni M.G., Blaauw B., Ferreiro A., Zito E. (2019) SELENON (SEPN1) protects skeletal muscle from saturated fatty acid-induced ER stress and insulin resistance. *Redox Biol.* 24, 101176.
- 50. AlRasheed M.M., AlAnzi A., AlShalhoub R., Abanmy N., Bakheet D. (2019) A study of the role of DIO1

and DIO2 polymorphism in thyroid cancer and drug response to therapy in the Saudi population. *Saudi Pharm. J.* **27**(6), 841–845.

- 51. Zevenbergen C., Groeneweg S., Swagemakers S.M.A., de Jong A., Medici-Van den Herik E., Rispens M., Klootwijk W., Medici M., de Rijke Y.B., Meima M.E., Larsen P.R., Chavatte L., Venter D., Peeters R.P., Van der Spek P.J., Visser W.E. (2019) Functional analysis of genetic variation in the SECIS element of thyroid hormone activating type 2 deiodinase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **104**(5), 1369–1377.
- Sovolyova N., Healy S., Samali A., Logue S.E. (2014) Stressed to death – mechanisms of ER stress-induced cell death. *Biol. Chem.* 395(1), 1–13.
- Hetz C., Zhang K., Kaufman R.J. (2020) Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 21(8), 421–438.
- Sano R., Reed J.C. (2013) ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1833(12), 3460– 3470.
- 55. Maurel M., Chevet E., Tavernier J., Gerlo S. (2014) Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem. Sci.* **39**(5), 245–254.

EFFECTS OF SODIUM SELENITE AND DITHIOTRITOL ON EXPRESSION OF ER SELENOPROTEINS AND APOPTOSIS MARKERS IN THE BREAST ADENOCARCINOMA CELLS MCF 7

V. N. Mal'tseva^{1, *}, M. V. Goltyaev¹, S. V. Novoselov¹, and E. G. Varlamova¹

¹ Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia *e-mail: mvn3@mail.ru

This work is devoted to the study of the molecular mechanisms of the development of endoplasmic reticulum (ER) stress and to the participation of ER selenoproteins in it, which are key proteins of the response to protein misfolding (UPR) and apoptosis, upon induction of ER stress by sulfur and selenium containing compounds, dithiotreitol (DTT) and sodium selenite (SS), in breast adenocarcinoma cells (MCF 7). It was shown that DTT at concentrations of 1 and 5 mM does not affect the survival of MCF 7 breast carcinoma cells. Based on the real time PCR data and the protein expression level of the studied ER stress markers, we assume that when MCF 7 cells were treated by 1 and 5 mM DTT, ER stress evolves along an adaptation pathway, mainly with the participation of IRE1 and ATF6, aimed at restoring the metabolism and homeostasis of the cell, without leading to its death. Our results confirm that ER selenoproteins are actively involved in these processes, in particular – SELS, SELK, SELT, SELM, SELN. Treatment of MCF 7 cells with 0.01 μ M SS led to a decrease in mRNA of all studied genes. With an increase in the SS concentration to 0.1 μ M, we observed an increase in the expression level of all key ER stress genes and apoptosis markers: CHOP, GADD34, PUMA, BIM, ATF4, sXBP, uXBP, AKT1, BAX, BAK. According to the obtained results, it can be assumed that high concentrations of SS leads to the development of UPR via a proapoptic signaling pathway involving PERK and an alternative IRE1 signaling pathway. 1 µM SS promoted the development of apoptosis, which was confirmed by a significant increase in the level of mRNA markers of apoptosis, an increase in the expression of the spliced form of XBP1 and, as a consequence of these processes, a decrease in the survival of carcinoma cells by almost half. The results of this work demonstrate that the mechanisms of regulation of ER stress and the role of ER selenoproteins in them depend on the nature and concentration of the ER stress inducer, and lead to the activation of various UPR signaling pathways, both adaptive and proapoptic.

Keywords: stress of the endoplasmic reticulum, selenoproteins, sodium selenite, dithiothreitol, apoptosis

— МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ —

УДК 578.22:57.083.224:57.085.23

НИЗКИЙ ТИТР ЛЕНТИВИРУСНОГО ВЕКТОРА, СОДЕРЖАЩЕГО ГЕН *TRIM5*α-*HRH*, ОБУСЛОВЛЕН ЭКСПРЕССИЕЙ TRIM5α-HRH В КЛЕТКАХ-ПРОДУЦЕНТАХ И ВЛИЯНИЕМ ПРОМОТОРА Ef1α

© 2022 г. Ф. А. Урусов^{а, b,} *, Д. В. Глазкова^а, Г. М. Цыганова^а, Д. В. Поздышев^с, Е. В. Богословская^а, Г. А. Шипулин^а

^аЦентр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации, Москва, 119992 Россия

 b Научно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова, Москва, 105275 Россия

^сНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

> **e-mail: flanger.fx@mail.ru* Поступила в редакцию 02.04.2021 г. После доработки 11.06.2021 г. Принята к публикации 11.06.2021 г.

Химерный белок TRIM5 α -HRH — перспективный для генной терапии ВИЧ-инфекции фактор, способный защитить клетки, блокируя ВИЧ-1 в цитоплазме. Разрабатываемая нами стратегия генной терапии ВИЧ-инфекции предполагает доставку гена *TRIM5\alpha-HRH* в CD4⁺ T-лимфоциты с помощью лентивирусных векторов. Однако такие векторы, содержащие *TRIM5\alpha-HRH*, имеют низкий инфекционный титр, что препятствует эффективной модификации T-клеток. Нами установлено, что одной из причин низкого титра является белок TRIM5 α -HRH, присутствующий в клетках HEK293T во время наработки псевдовирусных частиц. Другая причина — промотор Ef1 α , входящий в состав разрабатываемой нами конструкции, замена которого на промотор CMV приводит к пятикратному повышению титра вируса. Полученные результаты позволили определить направления дальнейшей оптимизации вектора, содержащего ген *TRIM5\alpha-HRH*, с целью повышения его инфекционного титра.

Ключевые слова: TRIM5α, TRIM5α-HRH, генная терапия, ВИЧ-1, Ef1α, лентивирусный вектор **DOI:** 10.31857/S0026898422010104

ВВЕДЕНИЕ

ВИЧ-инфекция – неизлечимое на сегодняшний день заболевание. Антиретровирусные (АРВ) препараты подавляют репликацию вируса и снижают вирусную нагрузку, но не позволяют полностью элиминировать вирус из организма. По этой причине ВИЧ-инфицированные пациенты вынуждены принимать АРВ-препараты пожизненно, что почти всегда сопряжено с побочными эффектами. Режим приема этих препаратов должен строго соблюдаться, в противном случае возрастает риск возникновения устойчивых к АРВ-препаратам вариантов вируса [1, 2]. Эти проблемы заставляют искать новые подходы к лечению ВИЧ-инфекции, один из которых – генная терапия (ГТ), предполагающая введение генов, блокирующих вирус, в геном CD4⁺ Т-лимфоцитов или CD34⁺ стволовых гемопоэтических предшественников, которые дают начало всем клеточным популяциям, вовлеченным в развитие инфекции [3, 4]. Наиболее эффективным средством

доставки на сегодняшний день считаются лентивирусные векторы (ЛВ), сконструированные на основе ВИЧ. Они способны эффективно доставлять трансген в CD4⁺ Т-лимфоциты, обеспечивать его встраивание в геном, поддерживать постоянную экспрессию и возможность передачи дочерним клеткам в процессе пролиферации [5]. Безопасность ЛВ подтверждена многочисленными доклиническими и клиническими исследованиями препаратов на основе этих векторов для лечения различных патологий [6–14].

Белки TRIM5α (TRIpartite Motif, 5α-изоформа) способны блокировать различные ретровирусы в цитоплазме клетки, причем спектр нейтрализуемых вирусов специфичен для разных видов млекопитающих [15, 16]. Так, белок TRIM5α макаков резусов TRIM5α-rh (TRIM5α rhesus) способен предотвратить инфекцию ВИЧ-1, в то время как человеческий гомолог huTRIM5α не защищает клетки от ВИЧ-инфекции [17]. Созданный в 2005 году химерный белок TRIM5α-HRH (human-rhesus hybrid) — это модифицированный huTRIM5 α , в котором 11 аминокислотных остатков в PRYSPRY-домене, определяющем противовирусную специфичность, заменены на 13 аминокислотных остатков из TRIM5 α -rh [18]. В результате такой замены белок TRIM5 α -rh [18]. В резульспособность ингибировать репликацию ВИЧ-1 в клетках человека [19].

TRIM5α-HRH — перспективный фактор для ГТ ВИЧ-инфекции. Однако существуют сложности с производством ЛВ, содержащих данный ген. При наработке такие ЛВ имеют низкий титр [19, 20], что препятствует эффективной модификации CD4⁺ лимфоцитов и затрудняет дальнейшее развитие ГТ. Настоящая работа посвящена поиску причин низкого титра ЛВ, содержащих *TRIM5α-HRH*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клонирование конструкций. ЛВ конструировали на основе вектора pLVX Puro ("Clontech", США), содержащего интактные длинные концевые повторы (LTR), CMV-промотор и экспрессионную кассету PGK-puro. Из данного вектора с использованием ранее описанной методики был удален элемент сРРТ (central polypurine tract), а селективный маркер устойчивости к пуромицину *puro* заменен на ген зеленого флуоресцентного белка (eGFP) [21]. Полученная конструкция названа pLVX eGFP. В результате удаления последовательности промотора CMV из pLVX eGFP по сайтам ClaI и BamH1 получена конструкция eGFP-LV. Для получения Ef-PGK-eGFP-LV промотор CMV в pLVX eGFP заменили на Ef1α по сайтам ClaI и BamH1. Послеловательность Ef1a получена амплификацией геномной ДНК человека с праймерами atcgataccgtcagtgggcaga и ggatc-BamH1- и XbaI-сайтам встроили линкер с необходимыми сайтами рестрикции, полученный отжигом олигонуклеотидов gatcctgctagaattctcagcatatggtct и ctagagaccatatgctgagaattctagcag. Гены *huTRIM5*α и *TRIM5*α-*HRH* получены согласно [21] и клонированы в pGEM-T ("Promega", США). В плазмидах pGEM-huTRIM и pGEM-TRIM-HRH кодон atg в положении 47 заменили с помощью сайт-направленного мутагенеза на taa и получили в результате конструкции pGEM-huTRIM47TAA и pGEM-TRIM-HRH47TAA. Далее последовательности TRIM5α реамплифицировали и вставили по сайтам EcoR1 и XbaI в Ef-PGK-eGFP-LV. Для получения CMV-TRIM-HRH-LV амплифицированный ген *TRIM5*α-*HRH* встроили в pLVX eGFP по сайтам XhoI и XbaI. Праймеры для реамплификации, матрицы и полученные конструкции указаны в табл. 1.

Для получения конструкции noEf-TRIM-HRH-LV из вектора TRIM-HRH-LV по сайтам ClaI и BamH1 удалили промотор Ef1α, вектор лигировали сам на себя.

Клеточные линии. Клетки лимфобластоидной линии SupT1 (ATCC CRL-1942) культивировали в среде Advanced RPMI1640 ("Thermo Fisher Scientific", США) с добавлением 2% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS, "Gibco",

Праймер (5' → 3')	Матрица	Конструкция
agcgaattccgccaccatggcttctggaatcctgg, gttctagattatcaagagcttggtgagcacagagt	pGEM-TRIM-HRH	TRIM-HRH-LV
agcgaattccgccaccatggcttctggaatcctgg, gttctagattatcaagagcttggtgagcacagagt	pGEM-huTRIM	huTRIM-LV
agcgaattc taa gcttctggaatcctggttaatgta, gttctagattatcaagagcttggtgagcacagagt*	pGEM-TRIM-HRH47TAA	stopTRIM-HRH-LV
agcgaattc taa gcttctggaatcctggttaatgta, gttctagattatcaagagcttggtgagcacagagt*	pGEM-huTRIM47TAA	stophuTRIM-LV
agcgaattc taa gcttctggaatcctggttaatgta, gttctagattaccatccacaccctgaagcagctcca*	pGEM-huTRIM	stop1/2huTRIM-N-LV
agcgaattcgcttcagggtgtgggatggcgtcat, gttctagattatcaagagcttggtgagcacagagt	pGEM-TRIM-HRH	½TRIM-HRH-C-LV
agcgaattcgcttcagggtgtgggatggcgtcat, gttctagattatcaagagcttggtgagcacagagt	pGEM-huTRIM	½huTRIM-C-LV
gaactcgagcgccaccatggcttctggaatcctgg, gttctagattatcaagagcttggtgagcacagagt	pGEM-TRIM-HRH	CMV-TRIM-HRH-LV

Таблица 1. Праймеры для реамплификации генов *TRIM5α*, матрицы и названия полученных конструкций

* Реамплификация с данной парой праймеров приводила к замене кодона atg в положении 1 на taa.

США) и *L*-глутамина до 4 мМ ("ПанЭко", Россия). Клетки линии НЕК293Т (АТСС® CRL-3216) культивировали в среде DMEM ("ПанЭко") с 10% FBS ("Gibco") и 4 мМ *L*-глутамином ("ПанЭко"). Все клеточные линии культивировали при температуре 37°С и 5% CO₂.

Получение лентивирусных частии. Для получения частиц, псевдотипированных VSV-G (белок G вируса везикулярного стоматита), клетки НЕК293Т трансфицировали смесью упаковочных плазмид второго поколения (0.6 мкг pCMV-dR8.91, 0.1 мкг pCMV-VSV-G [20] и соответствующей ЛВ конструкцией (0.6 мкг) в 6-луночных культуральных планшетах ("TPP", Швейцария). Использовали линейный полиэтиленимин (PEI MAX 40000; "Polysciences Inc.", США). Трансфекцию, сбор и хранение ЛВ-частиц проводили согласно [20].

Вестерн-блотинг. Клетки линии НЕК293Т, собранные после наработки лентивирусных частиц с одной лунки, лизировали в 0.5 мл реагента для лизиса Proteojet ("Thermo Fisher Scientific"). Лизат (10 мкл) использовали для нанесения на полиа-криламидный гель с последующим переносом на PVDF-мембрану Immun-Blot® ("BioRad"). Использовали антитела: против β -актина (ab8227, "Abcam", Великобритания) 1 : 8000, против TRIM5 α (ab59000, "Abcam") 1 : 500, вторичные антикроличьи антитела, меченные пероксидазой хрена (ab6721, "Abcam") 1 : 12000.

Определение инфекционного титра псевдовирусных частиц. Инфекционный титр псевдовирусных частиц (единицы транслукции/мл. или TU/мл) определяли путем титрования ЛВ-суспензии на клеточной линии SupT1. Для этого из свежеразмороженных аликвот ЛВ готовили серию пятикратных разведений (1, 1/5, 1/25, 1/125), которыми трансдуцировали 10⁵ клеток в присутствии 2 мкг/мл полибрена в объеме 0.3 мл на 48-луночном планшете ("ТРР"). На следующий день заменяли ростовую среду на свежую. Через 48 ч после трансдукции измеряли долю клеток, экспрессирующих маркер eGFP (eGFP⁺ клетки) с помощью проточного цитофлуориметра Novo-Cyte Quanteon ("Agilent Technologies", CIIIA). Титр рассчитывали по формуле: $a \times 10^5 \times d/v$, где a – доля eGFP⁺ клеток, 10^5 – общее количество клеток, d -коэффициент разведения вируса, v объем вируса, добавляемый в лунку. При расчете использовали разведения, в которых получали культуру, содержащую не более 30% клеток eGFP⁺. Лля определения титра с помошью количественной ПЦР клетки SupT1, полученные после трансдукции разведениями ЛВ, культивировали в течение 3 недель, чтобы избавиться от остаточной плазмидной ДНК, привнесенной в культуру вместе с ЛВ-частицами. Клетки обрабатывали бензоназой ("Merck", Германия) в разведении 1 : 37000 в течение 1 ч при 37°С. Из клеточных линий, трансдуцированных различными количествами вектора, выделяли ДНК и определяли число копий вектора, встроенных в геном, используя праймеры ccttgtataaatcctggttgctgtct, ggaaaggagctgacaggtggt и зонд R6G-tcaggcaacgtggcgtggtgtg-BHQ2. Для нормирования числа копий вектора (ЧКВ) на количество клеток использовали ген В-глобина (праймеры gtcagggcagagcctctattgct, ccacatgcccagtttctattggtct и зонд Fam-tgcccagggcctcaccacea-BHQ1), получая среднее ЧКВ на клетку. В качестве количественного стандарта использовали линию клеток SupT1, содержащую 1 копию встроенного ЛВ на клетку. График зависимости среднего ЧКВ на клетку от объема добавленного ЛВ (разведения 1/125, 1/25 и 1/5) строили в программе MS Exel. По уравнению линейной аппроксимирующей кривой вычисляли инфекционный титр вектора число трансдукционных единиц в 1 мл вирусной суспензии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Белки TRIM50.-HRH и huTRIM50. снижают титр ЛВ

Одной из причин снижения титра ЛВ, содержащих *TRIM5*α-*HRH*, может быть присутствие белка TRIM5α-HRH в клетках-продуцентах HEK293T, поскольку его гомолог – белок TRIM5α-rh – обладает способностью снижать продукцию ВИЧ-1 и ЛВ в культурах клеток HEK293T [22, 23]. Экспрессия TRIM5α-HRH во время наработки ЛВ обеспечивается плазмидой, кодирующей векторную PHK.

Влияние белков TRIM5α на титр ЛВ оценивали с использованием ЛВ-конструкций, схемы которых приведены на рис. 1a. Конструкции TRIM-HRH-LV и huTRIM-LV содержат гены TRIM5α-HRH и huTRIM5 α под контролем промотора Ef1 α , а также маркерный ген eGFP под контролем промотора PGK. Конструкции stopTRIM-HRH-LV и stophuTRIM-LV лишены стартового кодона ATG и содержат терминирующие кодоны в начале рамки считывания, что препятствует инициации трансляции белка (см. Экспериментальную часть). В качестве контрольного ЛВ использовали eGFP-LV, содержащий только кассету для экспрессии маркерного гена (рис. 1а). Эти конструкции использовали для наработки псевдовирусных частиц (рис. 16). Эффективность подавления трансляции мы оценивали, определяя количество белка TRIM5α в клетках-продуцентах НЕК293Т с помощью вестерн-блотинга (рис. 16). В клетках с вектором TRIM-HRH-LV обнаружено значительное количество белка. В клетках с вектором stopTRIM-HRH-LV выявлен слабый сигнал, такой же, как и в клетках с eGFP-LV. Сигнал в stopTRIM-HRH-LV и eGFP-LV, по-видимому, обусловлен присутствием эндогенного белка TRIM5α.



Рис. 1. Оценка влияния белков TRIM5 α на продукцию ЛВ. *a* – Схемы ЛВ-конструкций: LTR – длинный концевой повтор, Ef1 α – промотор гена фактора элонгации 1 человека, PGK – промотор гена фосфоглицераткиназы мыши; "stop" – положение терминирующего кодона; заштрихованным прямоугольником в рамке гена *TRIM5\alpha-HRH* отмечена последовательность, кодирующая участок PRYSPRY-домена, содержащий аминокислоты из TRIM5 α -rh; δ – схема эксперимента и вестерн-блот-анализ белка TRIM5 α в клетках HEK293T. При создании схемы эксперимента использованы изображения с ресурса Biorender. *в* – Инфекционный титр конструкций, определенный на клетках SupT1. Инфекционный титр контрольного вектора eGFP-LV, принятого за 100%, составил 1 × 10⁷ TU/мл. **p* > 0.05 согласно критерию Maнна–Уитни, *n* = 4.

Титры TRIM-HRH-LV и huTRIM-LV оказались в 20 раз ниже, чем титр контрольного вектора (рис. 1e). Установлено, что подавление трансляции белков TRIM5 α в ЛВ конструкциях ^{stop}TRIM-HRH-LV и ^{stop}huTRIM-LV усиливает их продукцию в 2 раза (рис. 1e). Следовательно, оба белка — TRIM5 α -HRH и huTRIM5 α — снижают титр ЛВ.

При оценке инфекционного титра мы обратили внимание на тот факт, что медиана интенсивности флуоресценции белка eGFP (MFI) в клетках с конструкциями, которые содержат гены $TRIM5\alpha$ под промотором Ef1 α , примерно в 4.5 раза ниже, чем в клетках с контрольным вектором (рис. 2*a*). Снижение интенсивности флуоресценции маркера затрудняет разделение eGFP⁺ и eGFP⁻ популяций клеток на проточном цитометре, что в свою очередь может уменьшать чувствительность определения титра ЛВ и приводить к неправильной его оценке. Чтобы исключить недооценку титра при измерении с помощью флуоресцентного маркера, мы оценили титр альтернативным способом. Из клеток, в которых мы измеряли флуоресценцию eGFP, была выделена геномная ДНК для оценки титра с помощью количественной ПЦР. Измерение титра каждого из представленных на рис. 26 ЛВ с помощью ПЦР дало значения, схожие со значениями, полученными при измерении титра по флуоресценции eGFP (рис. 1e). Таким образом, в данном случае eGFP-маркер



Рис. 2. Медиана интенсивности флуоресценции и оценка инфекционного титра ЛВ с помощью количественной ПЦР. a — Медиана интенсивности флуоресценции (MFI) в eGFP⁺-популяции клеток SupT1 при определении инфекционного титра, n = 4. δ — Инфекционный титр конструкций, определенный на клетках SupT1 с помощью количественной ПЦР. Инфекционный титр контрольного вектора eGFP-LV, принятого за 100%, составил 8 × 10⁶ TU/мл; n = 4.

корректно отражает инфекционный титр исследуемых ЛВ.

Нуклеотидная последовательность гена TRIM5α. per se не влияет на продукцию лентивирусных векторов

Обнаруженное нами влияние белков TRIM5а на титр ЛВ (снижение титра в 2 раза) не в полной мере объясняет 20-кратную разницу между контрольным вектором и векторами, содержащими гены TRIM5а-HRH и huTRIM5а. Мы предположили, что еше одной причиной низкого титра может быть нуклеотидная последовательность гена TRIM5α per se. Для проверки этого предположения мы разбили гены *TRIM5*α-*HRH* и *huTRIM5*α на две равные части и вставили их в ЛВ под промотор Еflα. Получили конструкцию stop1/2huTRIM-N-LV, содержащую N-концевую часть гена, и две конструкции – ½TRIM-HRH-C-LV и ½huTRIM-C-LV, содержащие С-концевые области (рис. 3a). В начале каждой из половин генов TRIM5 отсутствуют стартовые кодоны, что исключает трансляцию укороченных вариантов белка. Существование двух вариантов С-концевой последовательности обусловлено различиями в этой части белков TRIM5α-HRH и huTRIM5α. Мы наработали указанные ЛВ и оценили их титр. Ожидалось, что, если в конструкции, содержащей одну из половин гена, находится последовательность, неблагоприятная для продукции ЛВ, то мы увидим существенное увеличение титра у конструкции, содержащей другую половину. Однако инфекционные титры конструкций ^{stop1}/zhuTRIM-N-LV, ¹/zTRIM-HRH-C-LV и ½huTRIM-C-LV не различались статистически значимо. Титры конструкций ½TRIM-HRH-C-LV и ½huTRIM-C-LV оказались сопоставимыми со значениями титров ЛВ с полноразмерными генами *stopTRIM5* α , а конструкция *stop*½huTRIM-N-LV обеспечивала увеличение титра только в 1.4 раза (рис. *36*). Таким образом, в генах *TRIM5* α отсутствуют какие-либо структуры, существенно влияющие на титр ЛВ.

Промотор Ef1 в составе ЛВ-конструкции снижает титр псевдовирусных частиц

Помимо последовательности целевого гена и его продукта на титр могут влиять и другие элементы ЛВ-конструкции. Анализируя причины низкого титра, мы акцентировали внимание на промоторе Efla, который в наших конструкциях обеспечивает экспрессию *TRIM5α-HRH*. С целью изучения влияния промотора получили следующие конструкции (рис. 4*a*): 1) Ef-PGK-eGFP-LV, в которой сохранен промотор Eflα, но отсутствует последовательность гена $TRIM5\alpha$ -HRH; 2) noEf-TRIM-HRH-LV, содержащая только ген $TRIM5\alpha$ -HRH, без промотора Ef1 α ; 3) CMV-TRIM-HRH-LV, где мы заменили Ef1α на цитомегаловирусный промотор (CMV). Все конструкции содержали кассету pPGK-eGFP для экспрессии маркерного гена.

Наработка ЛВ и оценка их титров позволила установить, что добавление только промотора Eflα в контрольный вектор приводит (как показывает анализ конструкции Ef-PGK-eGFP-LV) к снижению титра примерно на 30%. Удаление



Рис. 3. Анализ инфекционного титра конструкций, содержащих половины генов *TRIM5* α . *a* – Схемы ЛВ-конструкций, элементы ЛВ обозначены как на рис. 1*a*. δ – Инфекционный титр конструкций, определенный на клетках SupT1 по флуоресценции eGFP-маркера. Инфекционный титр контрольного вектора eGFP-LV, принятого за 100%, составил 1 × 10⁷ TU/мл; **p* > 0.05 согласно критерию Манна–Уитни, *n* = 4.



Рис. 4. Влияние промотора на титр ЛВ. *a* – Схемы ЛВ-конструкций, элементы ЛВ обозначены, как и на рис. 1*a*. δ – Инфекционный титр конструкций, определенный на клетках SupT1 по флуоресценции eGFP-маркера, *n* = 4. Инфекционный титр контрольного вектора eGFP-LV, принятого за 100%, составил 8 × 10⁶ TU/мл.

Еflα из конструкции TRIM-HRH-LV или его замена на CMV-промотор приводит к увеличению титра конструкций noEf-TRIM-HRH-LV и CMV-TRIM-HRH-LV в 2.8 и 5.2 раза соответственно, по сравнению с TRIM-HRH-LV (рис. 4*б*). Следовательно, промотор Eflα отрицательно влияет на титр ЛВ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Белок TRIM5α-HRH – перспективный для генотерапии ВИЧ-инфекции защитный фактор, блокирующий репликацию вируса [18, 19, 24]. Однако ЛВ, кодирующие ген *TRIM5α-HRH*, имеют низкий инфекционный титр, что усложняет процесс модификации первичных CD4⁺ клеток [20] и неизбежно увеличивает стоимость производства. Определение причин низкого титра ЛВ и поиск способов решения проблемы крайне актуальны, поскольку на этапе клинических исследований это может стать серьезным ограничением для применения данного вектора в генотерапии.

Мы определяли причины низкого титра созданных нами ЛВ, содержащих ген $TRIM5\alpha$ -HRHпод контролем промотора Efl α . При наработке ЛВ в клетках-продуцентах экспрессируется ген $TRIM5\alpha$ -HRH, находящийся на векторной плазмиде. Появление белка TRIM5 α -HRH во время

наработки частиц мы рассматривали в качестве основной причины низкого титра ЛВ, поскольку известно, что белки TRIM5α вовлечены в процесс снижения продукции ВИЧ-1 и ЛВ в клетках НЕК293Т [22, 23]. Это явление названо рестрикцией на позднем этапе жизненного цикла вируса. В первых работах было показано, что позднюю рестрикцию может обеспечивать только TRIM5α-rh [22]. Однако затем установили, что это не так, и huTRIM5α также ингибирует продукцию ВИЧ-1 [25]. В составе химерного белка TRIM5α-HRH большая часть принадлежит белку человека, поэтому следовало ожидать, что и он может влиять на титр ЛВ. Это предположение подтвердилось в результате проделанных нами экспериментов – оказалось, что белок TRIM5α-HRH, а также huTRIM5 α в равной степени влияют на титр ЛВ, снижая его примерно в 2 раза. Чтобы устранить это влияние, необходимо исключить или существенно снизить экспрессию TRIM5α-HRH в клетках НЕК293Т во время наработки частиц. С этой целью можно использовать систему производства ЛВ, которая предотвращает экспрессию гена интереса в клетках-продуцентах. Описаны потенциально перспективные подходы, применимые для решения поставленной задачи [26-28]. Однако следует отметить, что влияние белка оказалось не столь существенным, как ожидалось.

Выяснилось, что присутствие промотора Efl α снижает титр ЛВ-частиц. Влияние внутреннего промотора или его положения в векторе на титр ЛВ описано ранее [29, 30]. Наиболее вероятной причиной данного явления представляется интерференция внутреннего промотора с близко расположенными промоторами, включая промотор, контролирующий образование векторной PHK. Так, Eflα обладает способностью подавлять другой промотор в составе ЛВ, который располагается выше Ef1α [31]. Аналогичным образом присутствие Ef1α в нашем векторе может подавлять промотор в составе LTR, который регулирует продукцию геномной РНК ЛВ. В основе интерференции между указанными промоторами может лежать конкуренция за связывание с факторами транскрипции [32]. Сайты связывания одних и тех же факторов транскрипции присутствуют в Ef1α и LTR [33, 34].

Интерференцией между Ef1 α и нижележащим промотором PGK можно объяснить и снижение экспрессии eGFP в конструкциях, представленных на рис. 2*a*, поскольку такой эффект не наблюдался при удалении промотора Ef1 α или при его замене на CMV (данные не представлены). Следует отметить, что в дальнейшем при переходе к клинической фазе исследований необходимо будет удалить маркерный ген и его промотор. Таким образом, в нашем случае интерференция между внутренними промоторами не имеет практической значимости.

Заменив промотор Ef1 и на промотор CMV нам удалось существенно (в 5 раз) повысить титр вектора, несущего целевой ген *TRIM5*α-*HRH*. Однако эта конструкция может оказаться малоэффективной для генотерапии, так как промотор CMV проявляет слабую активность в целевых CD4⁺ клетках [35]. Кроме того, этот промотор подвержен метилированию, а активность экспрессии гена под его контролем постепенно снижается [36, 37]. Учитывая выявленное влияние промотора Ef1 α на титр ЛВ, несущего ген *TRIM-HRH*, целесообразно будет провести поиск альтернативного промотора, который не будет препятствовать получению титра ЛВ, приемлемого для работы. При этом новый промотор должен обеспечивать длительную экспрессию трансгена в CD4⁺ лимфоцитах на уровне, достаточном для их защиты от ВИЧ-1, что усложняет поставленную задачу.

Мы установили, как минимум, две причины, обуславливающие низкий титр ЛВ, содержащего *TRIM5*α-*HRH* под контролем промотора Ef1α, это способность белка TRIM5α-HRH снижать титр ЛВ во время наработки в клетках-продуцентах и присутствие промотора Ef1α в составе вектора. Однако не исключено, что на титр влияют и другие факторы. В частности, мы рассматривали последовательность гена $TRIM5\alpha$ -HRH per se как одну из рабочих версий, которая не нашла подтверждений. Кроме того, к параметрам, которые влияют на титр, относится длина ЛВ. Известно, что увеличение размера ЛВ-вставки неизбежно приводит к снижению титра [38, 39]. Промотор Еf1α и ген *TRIM5*α-*HRH* состоят из 1189 и 1488 п.н. соответственно, что может сказываться на титре ЛВ. Однако наши результаты показывают, что длина не является основной причиной низкого титра вектора TRIM-HRH-LV. К примеру, длина вектора CMV-TRIM-HRH-LV на 604 п.н. больше, чем у noEf-TRIM-HRH-LV (рис. 4a), но титр CMV-TRIM-HRH-LV при этом примерно в 2 раза выше. По всей видимости, причин, воздействующих на титр ЛВ, может быть множество, и оценить влияние каждого фактора не всегда просто. По-видимому, решить проблему низкого титра можно с помощью эмпирического подхода, который в перспективе позволит найти оптимальные комбинации элементов ЛВ-конструкции.

Написание статьи не потребовало специального финансирования.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Bangsberg D.R. (2008) Preventing HIV antiretroviral resistance through better monitoring of treatment adherence. J. Infect. Dis. 197(S3), S272–S278.
- Pasternak A.O., de Bruin M., Jurriaans S., Bakker M., Berkhout B., Prins J.M., Lukashov V.V. (2012) Modest nonadherence to antiretroviral therapy promotes residual HIV-1 replication in the absence of virological rebound in plasma. *J. Infect. Dis.* 206(9), 1443–1452.
- Peterson C.W., Kiem H.P. (2017) Cell and gene therapy for HIV cure in HIV-1 latency. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* Eds Silvestri G., Lichterfeld M. Springer, Cham, 417, 211–248.
- 4. Ahlenstiel C.L., Turville S.G. (2019) Delivery of gene therapy to resting immune cells for an HIV cure. *Curr. Opin. HIV AIDS.* **14**(2), 129–136.
- Зайкова Е.К., Левчук К.Л., Поздняков Д.Ю., Дакс А.А., Зарицкий А.Ю., Петухов А.В. (2020) Эффективная трансдукция Т-лимфоцитов лентивирусными частицами в онкоиммунологических исследованиях. Клин. онкогематология. 13(3), 295– 306.
- Cartier N., Hacein-Bey-Abina S., Bartholomae C.C., Veres G., Schmidt M., Kutschera I., Vidaud M., Abel U., Dal-Cortivo L., Caccavelli L., Mahlaoui N., Kiermer V., Mittelstaedt D., Bellesme C., Lahlou N., Lefrère F., Blanche S., Audit M., Payen E., Leboulch P., l'Homme B., Bougnères P., Von Kalle C., Fischer A., Cavazzana-Calvo M., Aubourg P. (2009) Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science*. **326**(5954), 818–823.
- DiGiusto D.L., Krishnan A., Li L., Li H., Li S., Rao A., Mi S., Yam P., Stinson S., Kalos M., Alvarnas J., Lacey S.F., Yee J.K., Li M., Couture L., Hsu D., Forman S.J., Rossi J.J., Zaia J.A. (2010) RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector-modified CD34⁺ cells in patients undergoing transplantation for AIDSrelated lymphoma. *Sci. Transl. Med.* 2(36), 36ra43.
- McGarrity G.J., Hoyah G., Winemiller A., Andre K., Stein D., Blick G., Greenberg R.N., Kinder C., Zolopa A., Binder-Scholl G., Tebas P., June C.H., Humeau L.M., Rebello T. (2013) Patient monitoring and follow-up in lentiviral clinical trials. *J. Gene Med.* 15(2), 78–82.
- Lidonnici M.R., Paleari Y., Tiboni F., Mandelli G., Rossi C., Vezzoli M., Aprile A., Lederer C.W., Ambrosi A., Chanut F., Sanvito F., Calabria A., Poletti V., Mavilio F., Montini E., Naldini L., Cristofori P., Ferrari G. (2018) Multiple integrated non-clinical studies predict the safety of lentivirus-mediated gene therapy for β-thalassemia. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 11, 9–28.
- Palfi S., Gurruchaga J.M., Lepetit H., Howard K., Ralph G.S., Mason S., Gouello G., Domenech P., Buttery P.C., Hantraye P., Tuckwell N.J., Barker R.A., Mitrophanous K.A. (2018) Long-term follow-up of a phase I/II study of proSavin, a lentiviral vector gene therapy for Parkinson's disease. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 29(3), 148–155.
- Cornetta K., Duffy L., Turtle C.J., Jensen M., Forman S., Binder-Scholl G., Fry T., Chew A., Maloney D.G., June C.H. (2018) Absence of replication-competent

lentivirus in the clinic: analysis of infused T cell products. *Mol. Ther.* **26**(1), 280–288.

- Mamcarz E., Zhou S., Lockey T., Abdelsamed H., Cross S.J., Kang G., Ma Z., Condori J., Dowdy J., Triplett B., Li C., Maron G., Aldave Becerra J.C., Church J.A., Dokmeci E., Love J.T., da Matta Ain A.C., van der Watt H., Tang X., Janssen W., Ryu B.Y., De Ravin S.S., Weiss M.J, Youngblood B., Long-Boyle J.R., Gottschalk S., Meagher M.M., Malech H.L., Puck J.M., Cowan M.J., Sorrentino B.P. (2019) Lentiviral gene therapy combined with low-dose busulfan in infants with SCID-X1. *N. Engl. J. Med.* 380(16), 1525– 1534.
- Ferrua F., Cicalese M.P., Galimberti S., Giannelli S., Dionisio F., Barzaghi F., Migliavacca M., Bernardo M.E., Calbi V., Assanelli A.A., Facchini M., Fossati C., Albertazzi E., Scaramuzza S., Brigida I., Scala S., Basso-Ricci L., Pajno R., Casiraghi M., Canarutto D., Salerio F.A., Albert M.H., Bartoli A., Wolf H.M., Fiori R., Silvani P., Gattillo S., Villa A., Biasco L., Dott C., Culme-Seymour E.J., van Rossem K., Atkinson G., Valsecchi M.G., Roncarolo M.G., Ciceri F., Naldini L., Aiuti A. (2019) Lentiviral haemopoietic stem/progenitor cell gene therapy for treatment of Wiskott–Aldrich syndrome: interim results of a non-randomised, openlabel, phase 1/2 clinical study. *Lancet Haematol.* 6(5), e239–e253.
- Kohn D.B., Booth C., Kang E.M., Pai S.Y., Shaw K.L., Santilli G., Armant M., Buckland K.F., Choi U., De Ravin S.S., Dorsey M.J., Kuo C.Y., Leon-Rico D., Rivat C., Izotova N., Gilmour K., Snell K., Dip J.X., Darwish J., Morris E.C., Terrazas D., Wang L.D., Bauser C.A., Paprotka T., Kuhns D.B., Gregg J., Raymond H.E., Everett J.K., Honnet G., Biasco L., Newburger P.E., Bushman F.D., Grez M., Gaspar H.B., Williams D.A., Malech H.L., Galy A., Thrasher A.J., Net4CGD consortium (2020) Lentiviral gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease. *Nat. Med.* 6(2), 200–206.
- Stremlau M., Perron M., Welikala S., Sodroski J. (2005) Species-specific variation in the B30.2 (SPRY) domain of TRIM5alpha determines the potency of human immunodeficiency virus restriction. *J. Virol.* 79(5), 3139–3145.
- 16. Nakayama E.E., Shioda T. (2015) Impact of TRIM5α *in vivo. AIDS*. **29**(14), 1733–1743.
- Stremlau M., Owens C.M., Perron M.J., Kiessling M., Autissier P., Sodroski J. (2004) The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*. 427(6977), 848–853.
- Sawyer S.L., Wu L.I., Emerman M., Malik H.S. (2005) Positive selection of primate TRIM5alpha identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(8), 2832–2837.
- Anderson J., Akkina R. (2008) Human immunodeficiency virus type 1 restriction by human-rhesus chimeric tripartite motif 5alpha (TRIM 5alpha) in CD34⁺ cell-derived macrophages *in vitro* and in T cells *in vivo* in severe combined immunodeficient (SCID-hu) mice transplanted with human fetal tissue. *Hum. Gene Ther.* 19(3), 217–228.
- Омельченко Д.О., Глазкова Д.В., Богословская Е.В., Урусов Ф.А., Жогина Ю.А., Цыганова Г.М., Ши-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

пулин Г.А. (2018) Защита лимфоцитов от ВИЧ с помощью лентивирусного вектора, несущего комбинацию генов *TRIM5*α-*HRH* и микроРНК против CCR5. *Молекуляр. биология*. **52**(2), 294–305.

- Жогина Ю.А., Глазкова Д.В., Ветчинова А.С., Богословская Е.В., Цыганова Г.М., Шипулин Г.А. (2014) Сравнительная оценка активности различных генетических конструкций, направленных на подавление репликации ВИЧ-1. Биофармацевтический журн. 6(5), 11–18.
- Sakuma R., Noser J.A., Ohmine S., Ikeda Y. (2007) Rhesus monkey TRIM5alpha restricts HIV-1 production through rapid degradation of viral Gag polyproteins. *Nat. Med.* 13(5), 631–635.
- Sakuma R., Ohmine S., Ikeda Y. (2010) Determinants for the rhesus monkey TRIM5alpha-mediated block of the late phase of HIV-1 replication. *J. Biol. Chem.* 285(6), 3784–3793.
- Глазкова Д.В., Урусов Ф.А., Богословская Е.В., Шипулин Г.А. (2020) Фактор рестрикции ретровирусов TRIM5α: механизм действия и перспективы использования в генной терапии ВИЧ-инфекции Молекуляр. биология. 54(5), 707–717.
- Zhang F., Perez-Caballero D., Hatziioannou T., Bieniasz P.D. (2008) No effect of endogenous TRIM5alpha on HIV-1 production. *Nat. Med.* 14(3), 235–236.
- Bagnis C., Zwojsczyki G., Chiaroni J., Bailly P. (2014) Off-on polyadenylation strategy as a supplemental mechanism for silencing toxic transgene expression during lentiviral vector production. *Biotechniques*. 56(6), 311–312, 314–318.
- 27. Maunder H.E., Wright J., Kolli B.R., Vieira C.R., Mkandawire T.T., Tatoris S., Kennedy V., Iqball S., Devarajan G., Ellis S., Lad Y., Clarkson N.G., Mitrophanous K.A., Farley D.C. (2017) Enhancing titres of therapeutic viral vectors using the transgene repression in vector production (TRiP) system. *Nat. Commun.* 27(8), 14834.
- Delviks-Frankenberry K.A., Ackerman D., Timberlake N.D., Hamscher M., Nikolaitchik O.A., Hu W.S., Torbett B.E., Pathak V.K. (2019) Development of lentiviral vectors for HIV-1 gene therapy with Vif-resistant APOBEC3G. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* 18, 1023–1038.
- 29. Liu Y.P., Vink M.A., Westerink J.T., de Arellano E.R., Konstantinova P., Ter Brake O., Berkhout B. (2010) Ti-

ters of lentiviral vectors encoding shRNAs and miRNAs are reduced by different mechanisms that require distinct repair strategies. *RNA*. **16**(7), 1328–1339.

- Ben-Dor I., Itsykson P., Goldenberg D., Galun E., Reubinoff B.E. (2006) Lentiviral vectors harboring a dual-gene system allow high and homogeneous transgene expression in selected polyclonal human embryonic stem cells. *Mol. Ther.* 14(2), 255–267.
- Curtin J.A, Dane A.P., Swanson A., Alexander I.E., Ginn S.L. (2008) Bidirectional promoter interference between two widely used internal heterologous promoters in a late-generation lentiviral construct. *Gene Ther.* 15(5), 384–390.
- Karreth F.A., Tay Y., Pandolfi P.P. (2014) Target competition: transcription factors enter the limelight. *Genome Biol.* 15, 114.
- Rad S.M.A.H., Poudel A., Tan G.M.Y., McLellan A.D. (2020) Promoter choice: who should drive the CAR in T cells? *PLoS One.* 15 (7), e0232915.
- 34. Roebuck K.A., Saifuddin M. (1999) Regulation of HIV-1 transcription. *Gene Expr.* **8**(2), 67–84.
- 35. Jones S., Peng P.D., Yang S., Hsu C., Cohen C.J., Zhao Y., Abad J., Zheng Z., Rosenberg S.A., Morgan R.A. (2009) Lentiviral vector design for optimal T cell receptor gene expression in the transduction of peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes. *Hum. Gene Ther.* 20(6), 630–640.
- Brooks A.R., Harkins R.N., Wang P., Qian H.S., Liu P., Rubanyi G.M. (2004) Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J. Gene Med.* 6(4), 395–404.
- Yang Y., Chusainow M.J., Yap M.G. (2010) DNA methylation contributes to loss in productivity of monoclonal antibody-producing CHO cell lines. *J. Biotechnol.* 147(3–4), 180–185.
- Kumar M., Keller B., Makalou N., Sutton R.E. (2001) Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 12(15), 1893–1905.
- Canté-Barrett K., Mendes R.D., Smits W.K., van Helsdingen-van Wijk Y.M., Pieters R., Meijerink J.P. (2016) Lentiviral gene transfer into human and murine hematopoietic stem cells: size matters. *BMC Res. Notes.* 9, 312.

TITER OF LENTIVIRAL VECTOR ENCODING CHIMERIC *TRIM5α-HRH* GENE ARE REDUCED DUE TO EXPRESSION OF TRIM5α-HRH IN PRODUCER CELLS AND THE NEGATIVE EFFECT OF Ef1α PROMOTER

F. A. Urusov^{1, 2, *}, D. V. Glazkova¹, G. M. Tsyganova¹, D. V. Pozdyshev³, E. V. Bogoslovskaya¹, and G. A. Shipulin¹

¹ Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks, Federal Medical-Biological Agency of the Russian Federation, Moscow, 119992 Russia

² Izmerov Research Institute of Occupational Health, Moscow, 105275 Russia

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia *e-mail: flanger.fx@mail.ru

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

УРУСОВ и др.

The chimeric protein TRIM5 α -HRH is a promising antiviral factor for HIV-1 gene therapy. This protein is able to protect cells from HIV-1 by blocking the virus in the cytoplasm. We are developing protocol of HIV-1 gene therapy, which involves the delivery of the *TRIM5\alpha-HRH* gene into CD4+ T-lymphocytes by lentiviral vectors (LVs). However, LVs containing *TRIM5\alpha-HRH* have a low infectious titer, which prevents effective T cells modification. Here, we found that expression of the *TRIM5\alpha-HRH* during pseudoviral particles production in HEK293T cells, as well as the presence of Ef1 α promoter in our construction are responsible for the titer reduction. These results allow us to determine the directions for further optimization of LV with the *TRIM5\alpha-HRH* gene to improve their infectious titer.

Keywords: TRIM5α, TRIM5α-HRH, gene therapy, HIV-1, Ef1α, lentiviral vector

_ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ _ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УЛК 577.113.4

ИЗУЧЕНИЕ МНОЖЕСТВЕННОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО ВСТРАИВАНИЯ МОЛИФИШИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИЛОВ ПУРИНОВОЙ И ПИРИМИДИНОВОЙ ПРИРОДЫ В РАСТУШУЮ ЦЕПЬ ДНК

© 2022 г. С. А. Лапа^{а, *}, О. С. Волкова^а, В. Е. Кузнецова^а, А. С. Заседателев^а, А. В. Чудинов^а

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

*e-mail: lapa@biochip.ru Поступила в редакцию 27.04.2021 г. После доработки 27.04.2021 г. Принята к публикации 21.05.2021 г.

Изучены субстратные свойства модифицированных по азотистому основанию производных пуриновых и пиримилиновых лезоксинуклеозилтрифосфатов при их олновременном попарном встраивании в растущую цепь ДНК. Модифицированные нуклеотиды вводили с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и реакции удлинения праймера; в одной реакции использовали производные как с различными, так и с аналогичными функциональными заместителями. В качестве матриц применяли геномную бактериальную ДНК, специальным образом сконструированные синтетические фрагменты ДНК, а также библиотеки для SELEX. Реакции проводили с помощью ДНК-полимераз, не имеющих 3'-5'-корректирующей экзонуклеазной активности: Тад, Vent (exo-), DeepVent (exo-) и KOD XL. Показано, что на субстратную эффективность дезоксинуклеозидтрифосфата влияет как размер группы-заместителя, так и его химическая природа. Субстратная эффективность значительно зависит также от используемой полимеразы. Наиболее эффективными субстратами оказались пиримидиновые дезоксинуклеозидтрифосфаты в сочетании с ДНКполимеразой Vent (exo-). Получены ДНК, модифицированные парами разноименных нуклеотидов (dU + dC, dU + dA, dC + dA) с аналогичными и различными функциональными заместителями.

Ключевые слова: модифицированные дезоксинуклеозидтрифосфаты, модифицированные нуклеотиды, множественное ферментативное встраивание, модифицированные аптамеры

DOI: 10.31857/S0026898422010050

ВВЕДЕНИЕ

Нуклеотиды, модифицированные по азотистому основанию различными химическими группами, используются преимущественно для создания аптамеров (одноцепочечных фрагментов нуклеиновых кислот, проявляющих аффинность к определенным молекулярным мишеням) с расширенными свойствами. Присутствие в составе аптамера функциональных групп, не характерных для природной ДНК (РНК), позволяет увеличить его сродство к молекулярным мишеням за счет расширения спектра физико-химических взаимодействий [1-3].

Модифицированные ДНК получают чаще всего ферментативным способом, а наиболее распространенным модифицированным субстратом для ДНК-полимераз служит дезоксиуридинтрифосфат (dUTP) с различными функциональными группами, введенными по 5-положению пиримидинового цикла. Модифицированные dCTP применяют в ферментативных реакциях амплификации ДНК [4, 5], при этом субстратные свойства пуриновых нуклеотидов изучены в гораздо меньшей степени и в настоящее время не находят широкого применения при создании модифицированных аптамеров в силу сложностей их синтеза.

Следующим шагом в создании модифицированных аптамеров может стать одновременное введение в одну цепь ДНК разноименных нуклеотидов (например, dU и dC, dU и dA) с различными модификациями. Теоретически такой подход способен резко расширить спектр физико-химических взаимодействий аптамера с мишенями и, следовательно, расширить спектр мишеней для создания высокоспецифичных аптамеров.

Этот подход использовали для получения модифицированных аптамеров к белковой мишени [6], однако он не получил широкого распространения.

Одним из наиболее важных аспектов создания аптамеров нового поколения становится изучение совместимости разноименных модифицированных нуклеотидов с полимеразами, используемыми в SELEX.



Рис. 1. dUTP и dATP, модифицированные по азотистому основанию. dUp и dCp – производные, содержащие 5-пропинил; dCm и dAm – производные, содержащие метил в качестве модифицирующей функциональной группы.

В настоящей работе изучена субстратная эффективность различных модифицированных пуриновых и пиримидиновых dNTP при их одновременном ферментативном встраивании в растущую цепь ДНК.

Субстратное поведение модифицированных производных dNTP анализировали, используя генетические бактериальные мишени и специальным образом сконструированные матричные олигонуклеотидные последовательности. С применением полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и реакции удлинения праймера (РЕХ) проанализирована кинетика и определен выход продуктов ферментативных реакций в условиях последовательных множественных замен природных нуклеотидов на модифицированные пуриновые и пиримидиновые модифицированные аналоги (поли-dA-, поли-dG- и поли-dT-матрицы).

Осуществлен выбор наиболее эффективных ДНК-полимераз с отсутствующей 3'-5'-экзонуклеазной активностью для реакций амплификации при одновременном введении в растущую цепь ДНК разноименных модифицированных производных dNTP.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Модифицированные dNTP. Все соединения, использованные в работе, произведены фирмой "Trilink Biotechnologies" (США): 5-пропинил-2'дезоксиуридин-5'-трифосфат (N-2016), 5-пропинил-2'-дезоксицитидин-5'-трифосфат (N-2017), 5-метил-2'-дезоксицитидин-5'-трифосфат (N-2025), N⁶-метил-2'-дезоксиаденозин-5'-трифосфат (N-2026).

Структуры использованных соединений приведены на рис. 1.

Матрицы. В работе использованы бактериальные и синтетические матрицы. ПЦР-РВ проводили на полногеномных бактериальных матрицах (Mycobacterium tuberculosis, Staphylococcus aureus, Legionella pneumophila), что позволило получить ПЦР-продукты различающиеся длиной и GCсоставом.

В качестве синтетической ПЦР-матрицы использовали комбинаторную ДНК-библиотеку для SELEX и соответствующие праймеры [7].

При изучении множественного последовательного встраивания модифицированных нуклеотидов с помощью РЕХ применяли специальным образом сконструированные матрицы. Последовательности специализированных матриц приведены на рис. 2. Использовали праймер, пол-

MIU 5'-CTAAAACTCTAAACTCTAACTCTACT-GGCTACCAGTATGGAGCTGACAG-3'

M2CU 5'-CTAGAGCTCTGAGCTCTAGCTCTGCT-GGCTACCAGTATGGAGCTGACAG-3'

M2UC 5'-CTGAGACTCTAGACTCTGACTCTGACTCTGGCTACCAGTATGGAGCTGACAG-3'

	δ
M1A	5'-GC TTTT GCGC TT GCGC T GCGC T GC- <i>GGCTACCAGTATGGAGCTGACAG</i> -3'
M2UA	5'-GC TATA GCGC ATA GCGC TA GCGC A GC- <i>GGCTACCAGTATGGAGCTGACAG</i> -3'
M2AU	5'-GC ATAT GCGC TAT GCGC T GCGC T GC- <i>GGCTACCAGTATGGAGCTGACAG</i> -3'

Рис. 2. Матричные олигонуклеотиды для изучения индивидуального и попарного множественного последовательного встраивания модифицированных производных dU и dC методом PEX. Курсивом на каждой последовательности выделена праймерная часть. Полужирным показаны олигонуклеотиды, комплементарные модифицированным производным dU, dC и dA. a – Олигонуклеотиды, использованные в экспериментах с множественным встраиванием модифицированных dU и dC [8]; δ – олигонуклеотиды, сконструированные для определения одновременного множественного встраивания пар модифицированных пиримидиновых и пуриновых нуклеотидов (dU + dA и dC + dA).

ностью комплементарный указанной на рис. 2 праймерной части матрицы.

Твердофазный синтез матричных олигонуклеотидов. Твердофазный синтез матричных олигонуклеотидов проводили с помощью автоматического синтезатора ABI 394 DNA/RNA ("Applied Biosystems", США) по стандартному регламенту с использованием коммерческих растворителей и реагентов. З'-Амидофосфиты природных 2'-дезоксирибонуклеозидов (dA-CE "Phosphoramidite", кат. номер 10-1000-5S, dmf-dG-CE Phosphoramidite, кат. номер 10-1029-5S, dT-CE Phosphoramidite, кат. номер 10-1030-5S, Ac-dC-CE Phosphoramidite, кат. номер 10-1015-5S) использовали в виде 0.1 М растворов в абсолютном ацетонитриле. В качестве твердой фазы использовали высокопористое стекло (CPG-1000), содержащее иммобилизованный нуклеозид и применяемое для синтеза олигонуклеотидов длиной примерно 40 н.

Хроматографическая очистка матричных олигонуклеотидов. Очистку олигонуклеотидов проводили с использованием хроматографической колонки ("Thermo Scientific" BDS Hypersil C18 размером 250×4.6 мм, размер частиц 5 мкм) в системе элюентов: буфер А – 0.1 М ТЕАА, буфер Б – 50% ацетонитрила в буфере А. Использовали "градиент для олигонуклеотидов с DMT группой", или "TR-on", который наилучшим образом соответствовал характеру очищаемого продукта. Оба буфера готовили с использованием воды качества milliQ и ацетонитрила для ВЭЖХ (ChromAR® HPLC, "Macron Fine Chem.", США), фильтровали через фильтр ZAPCAP-CR Nylon 0.22 мкм 47 мм ("Sigma-Aldrich", США). Олигонуклеотиды разделяли при комнатной температуре (скорость подачи элюента – 1 мл/мин) и детектировали на двух длинах волн: $\lambda 1 = 270$ нм и $\lambda 2 = 295$ нм.

ДНК-полимеразы. В работе использовали Таqполимеразу ("ThermoScientific", США), Vent (exo-), Deep Vent (exo-) ("New England Biolabs", США), KOD XL ("Novataq", США) в реакционных буферах и концентрациях, рекомендованных производителями.

Реакция удлинения праймера (PEX). Реакционная смесь содержала природные dCTP и dGTP каждый в концентрации 0.2 мМ, а также различные сочетания модифицированных dUTP и/или dATP (при тестировании dCTP природный трифосфат также заменяли искусственным модифицированным аналогом); полимеразу (из списка тестируемых) в количестве, рекомендуемом производителем (реакционный буфер соответствовал полимеразе); праймер для PEX; одну из синтетических матриц. Реакцию проводили на ДНКамплификаторе MiniCycler ("MJ Research", США) по следующей программе: 5 мин при 95°C; далее 30 с при 65°C и 40 мин при 72°C.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Реакционная смесь для ПЦР была аналогична смеси для РЕХ. В качестве матрицы использовали фрагменты бактериальных генов различной длины либо комбинаторную библиотеку и соответствующие праймеры. Температурно-временной профиль ПЦР состоял из предварительной денатурации при 95° С в течение 3 мин, за которой следовал 31 цикл: 95° С, 30 с; 65° С, 30 с; 72° С, 40 с, затем завершающая инкубация при 72° С в течение 5 мин.

ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Для визуализации процесса в реакционную смесь добавляли краситель EvaGreen ("Biotium", Россия). Амплификацию проводили на приборе IQ5 ("Bio-Rad", США).

Определение выхода продуктов амплификации. Полученные ПЦР-продукты разделяли в 4%-ном агарозном геле, окрашивали бромидом этидия. Количество продукта определяли по оптической плотности полос в дорожках геля с использованием программы ImageJ (NIH, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ранее мы изучили попарное множественное встраивание модифицированных производных dUTP и dCTP. Анализ методом ПЦР-РВ показал, что производные с менее объемными функциональными группами (dUp и dCp, содержащие пропинильный заместитель в 5-положении цикла) характеризуются высокой скоростью накопления продукта, в то время как у массивных (dUi и dCi, содержащие индольный заместитель в 5-положении цикла) наблюдается либо пологая кривая накопления сигнала, либо задержка порогового цикла (C_t) в зависимости от использованной комбинации dU + dC. По-видимому, гораздо более короткие временные интервалы элонгации праймеров в ПЦР по сравнению с РЕХ были причиной более сильного проявления ингибирующего влияния модифицированных производных в ПЦР [8].

В настоящей работе нами определены такие показатели субстратной эффективности модифицированных dNTP, как величина "*E*" и выход целевого продукта при использовании различных матриц, ферментативных реакций и ДНК-полимераз. В соответствии с опубликованными данными [8], из рассмотрения были исключены производные с массивными заместителями. Основная цель нашей работы состояла в изучении одновременного встраивания нуклеотидов пиримидиновой (dU и dC) и пуриновой (dA) природы.

ПЦР-РВ с применением полногеномных бактериальных матриц

Один из важных показателей пригодности модифицированного субстрата для полимераз в ПЦР – эффективность амплификации "*E*", определяемая математически [9, 10].

Кинетику встраивания изучали методом ПЦР-РВ на термоциклере (амплификаторе) BioRad IQ5 с использованием ДНК-полимеразы семейства В –

Vent (exo-), ранее показавшей наибольшую эффективность в реакциях с модифицированными dNTP [8, 11].

ПЦР-продукты разной длины получали с использованием генетических бактериальных мишеней различного GC-состава и сконструированных ранее праймеров [11]. Использовали следующие бактерии, фрагменты генов для амплификации и последовательности праймеров:

1. *Mycobacterium tuberculosis*, ген *rpoB*, праймеры f1272 (5'-CGCCGCGATCAAGGAGTTCT-3') и r1398 (5'-TCACGTGACAGACCGCCGGG-3'). Длина ПЦР-продукта – 126 п.н.;

2. *Staphylococcus aureus*, ген *ebpS*, праймеры ebpS-f1 (5'-ACTCGACTGAGGATAAAGCGTCT-3') и ebps-r1 (5'-CCTCCAAATATCGCTAATGCACC-3'). Длина ПЦР-продукта – 283 п.н.;

3. Legionella pneumophila, ген sidA, праймеры ebpS-f1 (5'-TTCCACTGGTGGGTGGGTTTTG-3') и ebps-r1 (5'-TCATGTTGGAGTTCTATGGCACG-3'). Длина ПЦР-продукта – 370 п.н.

Субстратное поведение модифицированных dNTP определяли с использованием фрагментов бактериального генома различной длины и GCсостава, что позволило выявить закономерности влияния различных циклических структур в модификациях для производных с функциональными группами (потенциально применимыми в mod-SELEX) на выход реакции и ее эффективность в зависимости от длины ПЦР-продукта (рис. 3, табл. 1).

ПЦР-РВ с применением комбинаторных ДНКбиблиотек в качестве матриц

Изучение возможности одновременного применения различных трифосфатов для введения модификаций в комбинаторные библиотеки крайне важно, поскольку амплификация библиотек является одной из наиболее важных составляющих SELEX. Введение разноименных модифицированных нуклеотидов в процессе обогащения библиотек может быть востребовано для получения аптамеров с расширенными свойствами.

В отличие от матриц с фиксированной последовательностью, при амплификации комбинаторных библиотек наблюдается более сложный характер накопления сигнала ПЦР. На рис. 4 приведен типичный пример кривых амплификации ДНК-библиотек. Подобный характер кривых накопления сигнала (с одним или более максимумами) описан нами ранее [7, 12, 13] и определяется поведением библиотек при их амплификации.

Кинетику встраивания модифицированных нуклеотидов изучали методом ПЦР-РВ на термоциклере (амплификаторе) BioRad IQ5 с использованием ДНК-полимераз Taq (семейство А), Vent (exo-) и DeepVent (exo-) – (семейство В) и по-



Рис. 3. Встраивание модифицированных dNTP с использованием в качестве матицы геномной ДНК *L. pneumophila* (ПЦР-продукт 370 п.н.). Полимераза Vent (exo-).

лимеразы KOD XL. У всех этих полимераз отсутствует 3'-5'-корректирующая экзонуклеазная активность, что позволяет использовать их для получения ДНК с включением модифицированных нуклеотидов.

Эффективность амплификации "E" рассчитывали по углу наклона прямого участка S-образной кривой накопления сигнала [9, 10]. С учетом характера амплификации ДНК-библиотек расчеты проводили до достижения кривой первого максимума. Из рис. 4 и табл. 2 видно, что все исследованные модифицированные dNTP как пуриновой, так и пиримидиновой природы в различной степени ингибируют ПЦР. Этот результат хорошо коррелирует с полученными ранее данными [11].

Определение выхода полноразмерных продуктов ПЦР

Выход модифицированных продуктов определяли электрофоретически в режиме как индивидуального встраивания, так и одновременного параллельного встраивания разноименных модифицированных нуклеотидов. Матрицей служила комбинаторная ДНК-библиотека Matrix_1f-a 5'-CTGTCAGCTCCATACTGGTAGCC-(N)₄₀-GC-

Положительный контроль	dUp	dCp	dCm	dAm	$dUp + dCp^*$	dUp + dAm	dCp + dAm	dCm + dAm
Mycobacterium tuberculosis (126 п.н.)								
E = 1.82	1.70	1.64	1.45	1.73	1.54	1.63	1.48	1.48
	Staphylococcus aureus (283 п.н.)							
E = 1.85	1.76	1.62	1.42	1.22	1.64	1.50	1.14	1.11
Legionella pneumophila (370 п.н.)								
<i>E</i> = 1.83	1.71	1.45	1.34	1.27	1.30	1.29	1.00**	1.00**

Таблица 1. Эффективность амплификации на матрицах с фиксированной последовательностью (полимераза Vent (exo-)

* Расчеты произведены для контроля корреляции с данными [8].

** Отсутствие накопления сигнала при амплификации. Из табл. 1 видно, что эффективность амплификации снижается при увеличении длины матрицы, что коррелирует с полученными ранее данными [11].

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022



Рис. 4. Кривые накопления сигнала (комбинаторные библиотеки), ПЦР-РВ, полимераза КОD XL.

GTTCGAATCTAGACGGTACGA-3' и праймеры для ее амплификации:

Forw_1-06 5'-CTGTCAGCTCCATACTGG-TAGCC-3' 23 н.

И

Rev_1-06 5'-TCGTACCGTCTAGATTCGAAC-GC-3' 23 н.

Выход продукта определяли по оптической плотности полосы геля при электрофоретическом разделении продуктов ПЦР. Следует заметить, что в ряде случаев наблюдается низкая корреляция эффективности амплификации и выхода продукта. Это связано с тем, что кривая наклона может иметь крутой всплеск, но быстро выходить на плато, т.е. в таких случаях, согласно данным расчета по тангенусу угла наклона прямого участка S-образной кривой накопления сигнала, наблюдается интенсивная, но быстро затухающая динамика процесса накопления целевого продукта. Электрофореграммы продуктов ПЦР, полученных с различными полимеразами, приведены на рис. 5. Видно, что производное dAm служит плохим субстратом для всех изученных полимераз, не обладающих 3'-5'-корректирующей экзонуклеазной активностью. Однако при использовании dAm в сочетании с модифицированными производными dCT в ряде случаев удавалось получить полноразмерный продукт. Сочетания соединений в одной реакции описаны в разделе, посвященном множественному параллельному встраиванию.

Наибольшую эффективность в реакции с модифицированными субстратами показали полимеразы семейства В: Vent (exo-) и DeepVent (exo-). При анализе эффективности "*E*" полученные данные важно дополнять результатами электрофоретического анализа, так как само значение "*E*", будучи кинетической характеристикой, не дает информации о получаемом продукте. Так, в

ниями модифици	рованных dNTP п	ри по	лном	замеш	ении і	триродных d	NTP	Ĩ	
Полимераза	Положительный	dUp	dCp	dCm	dAm	dUp + dCp*	dUp + dAm	dCp + dAm	dCm + dAm

Таблица 2. Сводная таблица эффективности в ПЦР с комбинаторной ДНК-библиотекой и различными сочета-

Полимераза	Положительный контроль	dUp	dCp	dCm	dAm	dUp + dCp*	dUp + dAm	dCp + dAm	dCm + dAr
Vent (exo-)	1.87	1.82	1.57	1.40	1.01	1.83	1.21	1.41	1.67
Deep Vent (exo-)	1.95	1.88	1.80	1.77	1.49	1.68	1.73	1.70	1.59
Taq	1.91	1.25	1.15	1.16	1.08	1.11	1.70**	1.05	1.11
KOD XL	1.71	1.82	1.01	1.00	1.00	1.02	1.32	1.72	1.61

* Расчеты произведены для контроля корреляции с данными [8].

** Высокое значение "Е" обусловлено образованием неполноразмерных продуктов.

162



Рис. 5. ПЦР с использованием комбинаторной ДНК-библиотеки в качестве матрицы. Под каждой электрофореграммой приведено название полимеразы, не обладающей 3'-5'-корректирующей экзонуклеазной активностью. 1 -Маркер длин фрагментов ДНК (ladder 50 bp), 2 - положительный контроль (только природные dNTP), 3 -dUp, 4 -dCp, 5 -dCm, 6 -dAm, 7 -ladder 50 bp, 8 -dUp + dCp, 9 -dUp + dAm, 10 -dCp + dAm, 11 -dCm + dAm, 12 -отрицательный контроль.

ряде случаев при хороших значениях эффективности этого показателя дальнейший анализ длин продуктов с помощью электрофореза позволил выявить большую долю неполноразмерных продуктов (это характерно для полимераз DeepVent (ехо-) и KOD XL). Таq-полимераза показала низкую способность воспринимать модифицированные dNTP в качестве субстратов при полном замещении природных нуклеотидов, необходимом, в частности, для проведения SELEX. В то же время ранее мы показали, что Taq-полимераза пригодна для включения пиримидиновых нуклеотидов (dU), модифицированных флуорофорами, при частичной замене природных dT [11].

Результаты ПЦР с различными полимеразами показаны на рис. 5.

Изучение субстратных свойств модифицированных dNTP в реакции удлинения праймера (PEX)

С целью изучения субстратных свойств исследуемых соединений с использованием PEX сконструированы и синтезированы специализированные матричные олигонуклеотиды. Эти синтетические матрицы сконструированы таким образом, чтобы изучать последовательное встраивание: одного, двух, трех и четырех модифицированных нуклеотидов.

Последовательности матриц приведены на рис. 2.

Матрицы сконструированы с учетом опыта изучения множественного последовательного встраивания модифицированных нуклеотидов в растущую цепь ДНК [8, 14].

Матрица М1А предназначена для изучения последовательного множественного встраивания производных dA в индивидуальном режиме. Встраивание происходит последовательно 1, 2, 3 и 4 раза в процессе элонгации праймера по матричной цепи. Это позволяет оценить эффективность множественного последовательного встраивания mod-dA. После праймерной части последовательность матрицы такова, что, кроме комплементарного Т, не содержит других нуклеотидов, комплементарных модифицированным dA. Видно, что спейсерные участки матрицы не содержат комплементарных аденину нуклеотидов (Т). Кроме того, для сравнения с результатами попарного встраивания с dU (на матрицах M2UA и M2AU) спейсерные участки также не содержат dA.

Матрицы M2UA и M2AU предназначены для изучения множественного попарного встраивания dA и dU в различных последовательностях, что отражено в названиях матричных олигонуклеотидов.

Аналогичная матрица для dU уже синтезирована и описана ранее [8], как и матрицы для dC и (dU + dC), рис. 2*a*. Применение этих матриц позволяет в параллельном режиме (каждый разноименный нуклеотид на своей матрице) изучать особенности встраивания только определенных пар, например A и U (C и U, C и A).

Так, для изучения одновременного встраивания модифицированных производных dU и dA сконструированы и синтезированы матрицы M2AU и M2UA, последовательности которых приведены на рис. 26. Эти матрицы позволяют изучать последовательное встраивание нескольких произ-



Рис. 6. РЕХ с применением производных пуриновой и пиримидиновой природы. a - Cхема расположения продуктов РЕХ в лунках геля. $\delta - C$ хема маркера длин двухцепочечной ДНК GeneRuler 50 bp ("Thermo", США). e - e – Результаты РЕХ с различными полимеразами. 1 - Mаркер длин GeneRuler 50 bp ("Thermo"); 2 - положительный контроль; <math>3 - dUp; 4 - dAm; 5 - dUp + dAm, далее как для других матриц (указаны на схеме a).

водных в последовательности A-U и U-A в растущую цепь ДНК.

Таким образом, нами использованы синтетические матрицы M1U, M1A, M2UA и M2AU.

На рис. 6 показаны результаты получения модифицированных ДНК с производными пуриновой природы dAm и dAp как отдельно, так и в сочетании с dUp, методом PEX. Применены специализированные синтетические матрицы.

Из электрофореграмм видно, что для получения ДНК с модифицированными дезоксиаденозинтрифосфатами наиболее подходят полимеразы семейства В. Получить полноразмерные продукты удалось во всех случаях, но с разными выходами целевого продукта. Видны полосы непрореагировавших праймеров, более заметные в случае Таqполимеразы, которая характеризуется наименьшим выходом целевого продукта.

РЕХ обеспечивает более подходящие условия для встраивания модифицированного пуринового производного, в том числе последовательного множественного встраивания. Применение ферментов семейства В – Vent (ехо-) и DeepVent (ехо-) – позволило получить полноразмерные модифицированные продукты как при индивидуальном, так и при одновременном параллельном применении модифицированных производных пиримидиновой и пуриновой природы. Таq-полимеразу отличают низкие выходы продукта и образование неполноразмерных продуктов. КОD XL может использоваться для множественного встра-

ивания, однако она не отличается высокой воспроизводимостью результатов, а на электрофореграммах видны побочные продукты (by-products).

Таким образом, для ферментативного получения ДНК с множественными модификациями по совокупности характеристик (воспроизводимость и выход целевого полноразмерного продукта) выбрана Vent (exo-)-ДНК-полимераза. Получены продукты элонгации праймера, содержащие множественные модификации, в том числе одновременно на пуриновых и пиримидиновых нуклеотидах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные ранее данные как основа настоящих исследований

Ранее мы изучили закономерности одновременного встраивания пиримидиновых нуклеотидов в ДНК [8]. С использованием ДНК-полимераз Таq, Vent (exo-), KOD XL детально изучено субстратное поведение dC и dU в PEX и ПЦР, рассчитаны выход и эффективность амплификации. Осуществлено попарное введение разноименных модифицированных dNTP (mod-dU + + mod-dC) как в ПЦР, так и в PEX. Получены ДНК, содержащие несколько модификаций в одной цепи.

Определено, что модифицированные нуклеотиды с менее массивными заместителями являются более эффективными субстратами для полимераз семейства В при полной замене соответствующих природных dNTP. Тестирование модифицированных dU и dC показало, что для ферментативного получения модифицированных ДНК предпочтительно использовать полимеразы семейства В, не обладающие 3'-5'-экзонуклеазной активностью [8, 11], а именно Vent (ехо-) и DeepVent (ехо-). При этом DeepVent (ехо-) чувствительна к количеству матрицы и склонна к образованию побочных продуктов реакции. Сходным образом проявляет себя и полимераза КОD XL.

Выбор ДНК-полимераз, наиболее эффективных в реакциях амплификации, в случае одновременного введения в растущую цепь ДНК модифицированных производных dU, dC и dA

Из рис. 5 видно, что все протестированные нами полимеразы встраивают использованное модифицированное пуриновое производное менее эффективно, чем производные пиримидиновой природы. Причины этого могут быть связаны как с модифицирующей группой, так и с плохим восприятием модификаций по позиции 6 пуринового цикла полимеразами [15–17].

Тем не менее, в комбинации с разноименными трифосфатами пиримидинового ряда удалось получить продукт для dAm. Наиболее воспроизводимые результаты получены при использовании полимеразы Vent (exo-), принадлежащей к семейству В. В целом, результаты, полученные при применении большинства ферментов (исключая Vent (exo-)) на комбинаторных ДНК-библиотеках, недостаточно воспроизводимы, что может быть связано с флуктуацией состава библиотеки, содержащей сотни тысяч последовательностей, при добавлении аликвоты такой разнородной смеси в каждую из реакционных пробирок.

Несколько большая эффективность амплификации библиотек по сравнению с матрицами с фиксированной последовательностью обусловлена, предположительно, избирательной (конкурентной) амплификацией, при которой амплифицируются преимущественно только матрицы, "удобные" для полимеразы. Падение эффективности амплификации было более заметным в случае фиксированных матриц, содержащих лишь одну последовательность, и низкой субстратной совместимости.

Сопоставляя эффективность амплификации с применением ПЦР-РВ и данные электрофоретического разделения ПЦР-продуктов, следует заключить, что Vent (exo-)-полимераза в условиях ПЦР способна воспринимать в качестве субстратов все исследованные производные dNTP. Производное пуринового ряда оказалось более сложным субстратом по сравнению с производными пиримидинового ряда.

РЕХ характеризуется длинным циклом элонгации праймера, что в условиях медленной кинетики встраивания модифицированных нуклеотидов оказывается несомненным преимуществом (рис. 6). С другой стороны, при этом способе амплификации наблюдается арифметическая прогрессия накопления продукта и, соответственно, небольшой выход. ПЦР более чувствительна к модифицированным субстратам, однако при подходящем сочетании субстрата-полимеразы выход целевого продукта будет гораздо больше, чем в РЕХ.

Таким образом, нами получены ДНК с полной заменой одного и нескольких природных нуклеотидов на модифицированные аналоги как пуриновой, так и пиримидиновой природы.

выводы

По результатам тестирования различных полимераз в реакциях ПЦР и РЕХ в режимах полной замены одного пуринового нуклеотида (dAp или dAm), а также при различных комбинациях mod-dA + mod-dU и mod-dC + mod-dU наибольшую воспроизводимость результатов и больший выход полноразмерных продуктов обеспечивала полимераза Vent (exo-), которую часто выбирают для получения модифицированных аптамеров [3]. Нами показано, что полимеразами, пригодными для ферментативного получения ДНК, содержащих модифицированные основания (как пуриновые, так и пиримидиновые), следует считать ДНК-полимеразы семейства В, а также KOD XL. При этом более высокий выход полноразмерных продуктов как в ПЦР, так и в РЕХ, а также относительно высокие значения эффективности амплификации "E" в ПЦР указывают на предпочтительность использования полимеразы Vent (exo-).

Расширение набора применяемых dNTP новыми производными дезоксицитидина и дезоксиаденозина позволит увеличить спектр физикохимических свойств модифицированных фрагментов ДНК и, как следствие, расширить сферу их применения в молекулярно-биологических исследованиях и медицинской диагностике.

Исследование поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-04-01217).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gold L., Ayers D., Bertino J., Bock C., Bock A., Brody E.N., Carter J., Dalby A.B., Eaton B.E., Fitzwater T., Flather D., Forbes A., Foreman T., Fowler C., Gawande B., Goss M., Gunn M., Gupta S., Halladay D., Heil J., Heilig J., Hicke B., Husar G., Janjic N., Jarvis T., Jennings S., Katilius E., Keeney T.R., Kim N., Koch T.H., Kraemer S., Kroiss L., Le N., Levine D., Lindsey W., Lollo B., Mayfield W., Mehan M., Mehler R., Nelson S.K., Nelson M., Nieuwlandt D., Nikrad M., Ochsner U., Ostroff R.M., Otis M., Parker T., Pietrasiewicz S., Resnicow D.I., Rohloff J., Sanders G., Sattin S., Schneider D., Singer B., Stanton M., Sterkel A., Stewart A., Stratford S., Vaught J.D., Vrkljan M., Walker J.J., Watrobka M., Waugh S., Weiss A., Wilcox S.K., Wolfson A., Wolk S.K., Zhang C., Zichi D. (2010) Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PLoS One.* 5, e15004.
- Hollenstein M. (2012) Nucleoside triphosphates-building blocks for the modification of nucleic acids. *Molecules.* 17, 13569–13591.
- Lapa S.A., Chudinov A.V., Timofeev E.N. (2016) The toolbox for modified aptamers. *Mol. Biotechnol.* 58, 79–92.
- Sandin P., Stengel G., Ljungdahl T., Borjesson K., Macao B., Wilhelmsson L.M. (2009) Highly efficient incorporation of the fluorescent nucleotide analogs tC and tCO by Klenow fragment. *Nucl. Acids Res.* 37, 3924–3933.
- Kielkowski P., Cahova H., Pohl R., Hocek M. (2016) Flexible double-headed cytosine-linked 2'-deoxycytidine nucleotides. Synthesis, polymerase incorporation to DNA and interaction with DNA methyltransferases. *Bioorg. Med. Chem.* 24, 1268–1276.

- Gawande B.N., Rohloff J.C., Carter J.D., von Carlowitz I., Zhang C., Schneider D.J., Janjic N. (2017) Selection of DNA aptamers with two modified bases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114, 2898–2903.
- Лапа С.А., Ромашова К.С., Спицын М.А., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Гусейнов Т.О., Заседателева О.А., Радько С.П., Тимофеев Э.Н., Лисица А.В., Чудинов А.В. (2018) Получение модифицированных комбинаторных ДНК-библиотек методом ПЦР в обратной эмульсии с последующим разделением цепей. Молекуляр. биология. 52, 984–996.
- Чудинов А.В., Шершов В.Е., Павлов А.С., Волкова О.С., Кузнецова В.Е., Заседателев А.С., Лапа С.А. (2020) Одновременное встраивание модифицированных производных dU и dC в растущую цепь ДНК в реакции удлинения праймера и ПЦР. Биоорган. химия. 46, 546–549.
- Ramakers C., Ruijter J.M., Deprez R.H., Moorman A.F. (2003) Assumption-free analysis of quantitative realtime polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 339, 62–66.
- Peirson S.N., Butler J.N., Foster R.G. (2003) Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucl. Acids Res.* 31, e73.
- Лапа С.А., Гусейнов Т.О., Павлов А.С., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Заседателев А.С., Чудинов А.В. (2020) Одновременное применение Су5-модифицированных производных дезоксиуридина и дезоксицитидина в ПЦР. Биоорган. химия. 46, 418–424.
- Лапа С.А., Павлов А.С., Кузнецова В.Е., Шершов В.Е., Спицын М.А., Гусейнов Т.О., Радько С.П., Заседателев А.С., Лисица А.В., Чудинов А.В. (2019) Ферментативное получение модифицированных ДНК: изучение кинетики ПЦР в режиме реального времени. *Молекуляр. биология.* 53, 513–523.
- Радько С.П., Лапа С.А., Чудинов А.В., Хмелёва С.А., Маннанова М.М., Курбатов Л.К., Киселёва Я.Ю., Заседателев А.С., Лисица А.В. (2019) Оценка разнообразия комбинаторных ДНК-библиотек на основе анализа формы амплификационных кривых для мониторинга эффективности селекции аптамеров. Биомед. химия. 65, 477–484.
- 14. Василисков В.А., Шершов В.Е., Мифтахов Р.А., Кузнецова В.Е., Радько С.П., Лисица А.В., Лапа С.А., Суржиков С.А., Тимофеев Э.Н., Заседателев А.С., Чудинов А.В. (2020) Эффект проскальзывания в реакции элонгации праймера при использовании модифицированных 2'-дезоксиуридинтрифосфатов. Биоорган. химия. 46, 270–272.
- Porter K.W., Tomasz J., Huang F., Sood A., Shaw B.R. (1995) N7-cyanoborane-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate is a good substrate for DNA polymerase. *Biochemistry.* 34, 11963–11969.
- Rohloff J.C., Gelinas A.D., Jarvis T.C., Ochsner U.A., Schneider D.J., Gold L., Janjic N. (2014) Nucleic acid ligands with protein-like side chains: modified aptamers and their use as diagnostic and therapeutic agents. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* 3, e201.
- Giller G., Tasara T., Angerer B., Mühlegger K., Amacker M., Winter H. (2003) Incorporation of reporter molecule-labeled nucleotides by DNA polymerases. I. Chemical synthesis of various reporter grouplabeled 2'-deoxyribonucleoside-5'-triphosphates. *Nucl. Acids Res.* 31, 2630–2635.

2022

STUDY OF MULTIPLE ENZYMATIC INCORPORATION OF MODIFIED NUCLEOTIDES OF PURINE AND PYRIMIDINE NATURE IN THE GROWING DNA CHAIN

S. A. Lapa^{1, *}, O. S. Volkova¹, V. E. Kuznetsova¹, A. S. Zasedatelev¹, and A. V. Chudinov¹

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia *e-mail: lapa@biochip.ru

The substrate properties of base-modified deoxynucleosides triphosphates of purine and pyrimidine nature with their simultaneous pairwise incorporation into the growing DNA chain are studied. The modified nucleotides were incorporated using real-time PCR and a primer extension reaction; modified derivatives with both different and similar functional substituents were used in the same reaction. Genomic bacterial DNA, specially constructed synthetic DNA fragments, and SELEX libraries were used as templates. The reactions were performed using DNA polymerases with no 3'-5' correcting exonuclease activity: Taq, Vent (exo-), DeepVent (exo-), and KOD XL. It is shown that the substrate efficiency is affected by both the size of the substituent group and the chemical nature of deoxynucleoside triphosphate. The effectiveness varies significantly depending on the polymerase used. It is shown that the most effective substrates of the studied are pyrimidine deoxynucleoside triphosphates in combination with Vent (exo-) DNA polymerase. DNAs modified by pairs of dissimilar nucleotides (dU + dC, dU + dA, dC + dA) with similar and different functional substituents were obtained.

Keywords: modified deoxynucleoside triphosphates, multiple enzymatic incorporation of modified nucleotides into DNA, modified aptamers УДК 578.2

КОНСТРУИРОВАНИЕ *in silico* НОВОЙ МУЛЬТИЭПИТОПНОЙ КАНДИДАТНОЙ ПЕПТИДНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ Q-ЛИХОРАДКИ¹

© 2022 г. S. Jabarzadeh^a, A. Samiminemati^a, M. Zeinoddini^{a, *}

^a Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran *e-mail: zeinoddini52@mut.ac.ir Поступила в редакцию 06.12.2020 г. После доработки 07.04.2021 г.

Принята к публикации 15.04.2021 г.

С появлением новых патогенов возникает необходимость в новых вакцинах. Эффективную вакцину отличает высокая иммуногенностью и безопасность, и этим критериям могут удовлетворять вакцины на основе эпитопов. Среди зоонозных инфекций особое место занимает О-лихорадка, вызываемая бактерией Coxiella burnetii. Из-за многочисленных вспышек и пандемического потенциала это заболевание находится под пристальным вниманием эпидемиологов и клиницистов. Мы представляем синтетическую мультиэпитопную вакцину против Coxiella burnetii. Эта вакцина разработана с использованием иммуноинформатики. Изучены антигенные белки этого патогена и отобрано пять эпитопов Т-клеток. Антигенность, аллергенность и токсичность выбранных эпитопов оценивали с использованием серверов VaxiJen 2.0, AllerTOP и ToxinPred соответственно. Выбранные эпитопы объединили в пептидную последовательность с субъединицей В холерного токсина (СТХВ) в качестве адъюванта. Сродство предложенной вакцины к молекулам главного комплекса гистосовместимости (MHC) классов I и II оценивали с использованием технологии молекулярного докинга. Полученный препарат характеризуется высокой иммуногенностью, стабильностью и периодом полувыведения, сопоставимым с используемым в программах вакцинации. Валидированную последовательность эпитопов можно рассматривать в качестве потенциальной вакцины для защиты от возбудителя Q-лихорадки.

Ключевые слова: Q-лихорадка, *Coxiella burnetii*, пептидная вакцина, иммуноинформатика, эпитоп **DOI:** 10.31857/S0026898422010037

Q-лихорадка — широко распространенное зоонозное заболевание, которое вызвано *Coxiella burnetii*, грамотрицательной облигатной внутриклеточной бактерией, открытой в 1935 году Наrold Cox и MacFarlane Burnet (см. обзоры [1, 2]). Эта бактерия принадлежит к семейству Coxiellaceae, способному к внутриклеточной внутривакуолярной персистенции как у беспозвоночных, так и у позвоночных хозяев.

С. burnetii хорошо переносит различные среды, в том числе кислые условия до pH примерно 4.5, высокие температуры до 62° C в течение 30 мин, УФ-облучение и давление до 300000 кПа [3, 4]. Домашние животные, такие как крупный рогатый скот, овцы и козы, представляют собой основные источники C. burnetii. Эту инфекцию могут передавать человеку инфицированные насекомые, такие как клещи и комары, ей можно заразиться при прямом контакте с инфицированными животными, а также при употреблении их мяса, молока и других продуктов питания [3, 5]. Симптомы Q-лихорадки у людей изначально похожи на симптомы гриппа, но впоследствии они могут привести к вторичным хроническим состояниям, таким как гепатит, острый эндокардит, васкулит, лимфаденит и др. [6].

К настоящему времени этот бактериальный зооноз вызвал три крупные вспышки. В 1955 году первые случаи Q-лихорадки зарегистрировали в девяти африканских странах. В период с 2007 по 2010 гг. Нидерланды столкнулись с большой волной инфекций, вызванных ею. Самая крупная зоонозная вспышка Q-лихорадки произошла в Кайенне – столице Французской Гвианы [6, 7].

Как упомянуто ранее, Q-лихорадка может передаваться людям или другим животным при прямом контакте или через инфицированные продукты. Однако о горизонтальной передаче этого заболевания (от человека человеку) сообщений нет [1]. Учитывая зоонозный потенциал Q-лихорадки на основании зарегистрированных крупных вспышек, встала задача предотвратить распространение этой инфекции, а значит приступить к разработке вакцин. До сих пор доступна

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

MIKLKFGVFFIVLLSSAYAHGTPQNITDLCAEDHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQV EVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN<u>PAPAPA</u>SEQITLQTAEK VGLNVA<u>KK</u>TPTFVIGNKALTKFGF<u>KK</u>GNVTLVEFFDY<u>KK</u>VPGYRNASSKRFVAP<u>KK</u>RFDLSLMLNYPNS ADRY<u>PAPAPA</u>MIKLKFGVFFIVLLSSAYAHGTPQNITDLCAEDHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIIT FKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN

Рис. 1. Последовательность разработанного иммуногена включает аминокислотные последовательности эпитопов *Coxiella burnetii* (штамм RSA 493), адъюванта и линкеров. Последовательности эпитопов показаны черным, адъюванта – синим, линкеров КК (соединяют эпитопы) – зеленым, линкеров РАРАР (соединяют последовательности адъюванта с эпитопами) – красным цветом.

только одна вакцина против Q-лихорадки, Q-VAX, — в виде инактивированного формалином цельноклеточного препарата штамма Heinzerling *C. burnetii* фазы 1 [8].

Последние достижения в области геномного секвенирования улучшили наше понимание биологии микроорганизмов [9, 10] и привели к созданию баз данных по специфичным для организма белкам, нуклеотидным последовательностям, а также к доступности серверов для предсказания эпитопов [11, 12]. Предсказание эпитопов В- и Т-клеток выполняют раздельно [13, 14].

В представленном исследовании, проведенном методом обратной вакцинологии, для разработки иммуноактивной пептидной/белковой вакцины против *C. burnetii* использовано несколько баз данных и серверов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сбор данных по эпитопам. В этом разделе предложенные эпитопы исследовали в базе данных IEDB (https://www.iedb.org/) и выбирали некоторые поверхностные эпитопы. Отметим, что фильтры корректировали на основе использования вакцины против *Coxiella burnetii* (штамм RSA 493) со всеми линейными и структурными эпитопами. Результат этого поиска — около 62 эпитопов и эпитопов поверхностных белков, которые отобрали из предложенных. Аминокислотная последовательность токсина Vibrio cholerae (субъединица В) получена из банка NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ protein/) с регистрационным номером AAV67882.1. Кроме того, из банка данных PDB (https:// www.rcsb.org/) была извлечена трехмерная структура молекул главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса I и MHC класса II с идентификационными номерами 4UQ3 и 1DLH соответственно.

Множественное выравнивание последовательностей и выбор антигена. Полная последовательность целевого поверхностного белка получена из базы данных UniProt (https://www.uniprot.org/) в формате FASTA [15]. На следующем этапе с использованием базы NCBI BLAST (https://blast.ncbi. nlm.nih.gov/Blast.cgi) эту последовательность выравнивали с таковыми для белков человека и подтвердили, что между ними нет сходства.

Антигенность предсказанных эпитопов. Антигенность как В-клеточных, так и Т-клеточных эпитопов предсказана с использованием сервера VaxiJen 2.0 с точностью предсказания от 70 до 89% (http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/) [16].

Прогнозирование аллергенности и токсичности. Аллергенность и токсичность эпитопов имеют решающее значение для вакцин на основе пептидов, поскольку некоторые предполагаемые эпитопы могут проявлять эти свойства и тем самым вызывать нежелательные перекрестные реакции иммунной системы. Выбранные в качестве эпитопов пептиды проверяли на аллергенность с помощью сервера AllerTOP (https://www.ddgpharmfac.net/AllerTOP/) [17]. Токсичность эпитопов анализировали с использованием базы данных (https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/algo.php).

Создание пептидов для химерного белка. На этом этапе эпитопы-кандидаты размещали в пептидной последовательности и соединяли вместе через жесткий линкер LysLys (КК), как показано на рис. 1. На следующем этапе аминокислотную последовательность адъюванта (AAV67882.1) – субъединицы В токсина *Vibrio cholera* – вводили в начало и конец полиэпитопной последовательности – для повышения иммуногенности конструкта. Для присоединения адъювантных последовательностей к полиэпитопной использовали линкер PAPAP.

Физико-химические свойства и стабильность родственного белка. Для анализа химических и физических свойств полученного полипептида, таких как молекулярная масса, чистый заряд и период полураспада, его последовательность исследовали с использованием баз данных PepCalc (https://pepcalc.com) [18] и ProtParam (https:// web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam). Стабильность белка рассмотрели и смоделировали с использованием программ IUpred 2.0 (https:// iupred2a.elte.hu/) [19], IsUnstruct (v2.02) (http:// bioinfo.protres.ru/IsUnstruct/) [20] и сервера FoldUnfold (http://bioinfo.protres.ru/ogu/) [21].

Предсказание вторичной и третичной структуры. Вторичная структура сконструированного пептида предсказана по методу GorIV с использованием базы данных PRABI (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgibin/ npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_gor4.html). Трехмерная структура белка спрогнозирована с использованием сервера I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) [22]. Он предсказал трехмерную структуру белка с использованием моделирования *de novo*. I-TASSER – это ранжированный подход к предсказанию структуры и функции белка, основанный на уровне подобия входных и шаблонных структур, доступных в банке данных PDB.

Уточнение модели и оценка качества. Уточнение предсказанной модели выполнено с использованием сервера 3Drefine (http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine/), чтобы уменьшить возможные структурные ошибки в предсказанной третичной структуре родственной белковой вакцины. Кроме того, структурное качество вакцины проверено на графике Рамачандрана с использованием сервера RAPAGE (https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/) и Z-балла сервера ProSA (https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php) [23].

Молекулярный докинг. Процесс молекулярной стыковки выполняли для проверки аффинности связывания разработанной белковой последовательности с молекулами МНС класса I (HLA-A0201; PDB Acc. No. UQ3) и МНС класса II (HLA-DR; PDB Acc. No. 1DLH). Молекулярный докинг проводили с использованием он-

Таблица 1. Эпитопы, выбранные для исследования

лайн-сервера ClusPro (https://cluspro.bu.edu/ login.php?redir=/queue.php) со сложным типом по умолчанию [24–26]. На следующем этапе процесс повторяли с использованием программного обеспечения HEX 6.0. С этой целью выбирали следующие параметры: FFT Mode–3D fast life, диапазоны расстояний, скручивания, рецепторов и лигандов – 40, 360, 180 и 180 соответственно, тип корреляции – только форма, размер сетки – 0.6.

Обратная трансляция пептида и проверка открытой рамки считывания (ORF). На заключительном этапе аминокислотную последовательность полученного полипептида обратно транслировали в нуклеотидную с использованием базы данных (https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html). Открытую рамку считывания (ORF) связанной последовательности со значением по умолчанию для *Escherichia coli* исследовали в базе данных ORFfinder (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор эпитопов и выравнивание последовательностей

В табл. 1 показаны эпитопы, выбранные на сервере IEDB. Последовательность пептидов (эпитопов) для вакцины *С. burnetii* сконструирована, отобрана и проанализирована в программе protein BLAST.

Кроме того, чтобы подтвердить отсутствие сходства между последовательностями сконструированного полипептида и белков человека, полные последовательности из эпитопов-кандидатов, содержащихся в поверхностных белках *C. burnetii*, со-

UniProt (Acc. No.)	Белок	Эпитопы		
H7C7D7 (CBU_1910)	Com1	DIQSIVHHYLVNHPEVL GNVTLVEFFDY KYYAFHDALLS SEQITLQTAEKVGLNVA TPTFVIGNKALTKFGF		
Q83DK8 (CBU_0718) Гипотетический ассоциированный с мем- браной белок		DDVAKLRGDLSSIIHKLTSFSKTEASM		
Q83AL4 (CBU_1869)	Гипотетический экспортируемый белок	PITKKQLKTMSNYEVIAK IKLPRNRYRLVFTQQ GKHFDGIKVLKLSPQNTI		
Q83F71 (CBU_0077)	Гипотетический трансмембранный белок	EVLTLLLNWVNYHE		
Q83EL2 (CBU_0307)	Наружный белок мембраны	GVAYTYNRANAGLPTNK VPGYRNASSKRFVAP		
Q83DT1 (OmpH)	OmpH	QELFVAQNKAMSDFM		
Q83CG1 (CBU_1157) Гипотетический экспортируемый белок		ISLLVFKNSHRVQLWAK RFDLSLMLNYPNSADRY		

	NCBI Blast						
Эпитоп	Минимальная идентичность, % <i>Homo sapiens</i>	Максимальная идентичность, % <i>Homo sapiens</i>	Минимальная идентичность, % <i>Coxiella burnetii</i>	Максимальная идентичность, % Coxiella burnetii			
H7C7D7 (CBU_1910)	35.14	35.90	96.92	100.00			
Q83DK8 (CBU_0718)	0	0	98.94	100.00			
Q83AL4 (CBU_1869)	0	0	98.62	100.00			
Q83F71 (CBU_0077)	0	0	99.24	100.00			
Q83EL2 (CBU_0307)	0	0	35.11	100.00			
Q83DT1 (ompH)	0	0	99.14	100.00			
Q83CG1 CBU_1157	0	0	99.14	100.00			

Таблица 2. Результаты исследования белков *C. burnetii* с помощью программы protein BLAST и предсказание антигенности

Таблица 3. Прогнозируемые свойства выбранных Т-клеточных эпитопов

Эпитоп	Вероятностный протективный аллерген (AllertTop)	Антиген (VaxiJen 2.0)
DIQSIVHHYLVNHPEVL	Аллерген	Антиген
GNVTLVEFFDY	Аллерген	Антиген
KYYAFHDALLS	Не аллерген	Не антиген
SEQITLQTAEKVGLNVA	Не аллерген	Антиген
TPTFVIGNKALTKFGF	Не аллерген	Антиген
DDVAKLRGDLSSIIHKLTSFSKTEASM	Не аллерген	Не антиген
PITKKQLKTMSNYEVIAK	Не аллерген	Не антиген
IKLPRNRYRLVFTQQ	Не аллерген	Не антиген
GKHFDGIKVLKLSPQNTI	Аллерген	Антиген
EVLTLLLNWVNYHE	Не аллерген	Не антиген
GVAYTYNRANAGLPTNK	Не аллерген	Не антиген
VPGYRNASSKRFVAP	Не аллерген	Антиген
ISLLVFKNSHRVQLWAK	Аллерген	Не антиген
RFDLSLMLNYPNSADRY	Не аллерген	Антиген
QELFVAQNKAMSDFM	Не аллерген	Не антиген

поставляли с белками человека. Результаты protein BLAST показаны в табл. 2.

Прогнозирование и выбор Т-клеточного эпитопа

Внутриклеточная природа заражения *C. burnetii* побудила нас ограничить выбор кандидатных пептидов только Т-клеточными эпитопами. Для предсказания эпитопов Т-клеток проводили трехэтап-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

ный скрининг иммуногенных (порог: 0.4) и аллергенных характеристик эпитопов (табл. 3). Все эпитопы по предсказанию были нетоксичными.

Инженерия вакцин и физико-химические свойства

С помощью иммуноинформатического анализа отобрали пять эпитопов Т-клеток. Сконструированная вакцина-кандидат включала 344 аминокислоты, разделенные на следующие сегменты: CTxB в качестве адъюванта, Т-клеточные эпитопы и соответствующие линкеры. Физические и химические свойства конечной конструкции предсказаны с помощью сервера PepCalc. Результаты подтвердили, что полипептид с молекулярной массой около 38261.89 Да – стабильный растворимый белок с pI 9.92 и расчетным суммарным зарядом около 14.7 (рис. 2*a*).

Стабильность белка

Стабильность родственного белка оценивали с использованием серверов IUpred 2.0, IsUnstruct (v2: 02) и FoldUnfold (масштаб: ожидаемое число контактов 8 Å, порог: 20.4, рамка усреднения: 11). Рассчитанная стабильность белка подтверждена, как показано соответственно на рис. 26, 28 и 2г.

С использованием программы ProtParam для аминокислотного состава сконструированного полипептида предсказаны стабильность и период полужизни. Согласно результатам, показанным на рис. 3, структура белка стабильна, период его полужизни составляет примерно 30 ч в клетках млекопитающих, более 20 ч в дрожжах и более 10 ч в *E. coli* (рис 3).

Прогнозирование вторичной и третичной структуры

Прогноз вторичной и третичной структуры химерного полипептида проиллюстрирован на рис. 4. Как можно видеть, в α-спираль, удлиненную βструктуру и случайный клубок организовано соответственно 31.58, 19.30 и 49.12% аминокислотных остатков из общего числа 344. Кроме того, первичную 3D-модель предлагаемого иммуногена предсказали онлайн-сервером I-TASSER.

Уточнение модели и оценка качества

Процессы уточнения модели выполнены на сервере 3Drefine для выбранной модели полипептида. С этой целью анализировали всю структуру белка, включая элементы вторичной структуры, области петель и его боковые цепи. Пять факторов, включая оценку 3Drefine, GDT-TS, GDT-HA, RMSD, RWplus и MolProbity, – основные параметры для процесса уточнения, которые отражают потенциальную энергию (3Drefine-оценочная функция и RWplus), оценку сходства (GDT-TS и GDT-HA). классификации и физическую реалистичность соответственно. Далее выбирали уточненную модель с соответствующими характеристиками для дальнейших оценок упомянутых факторов. Выявлено, что уточненная сервером 3Drefine модель имеет значения GDT-TS 1.0000, GDT-HA 0.9644, RMSD 0.375, MolProbity 3.395, оценку 3Drefine 22028.8 и RWPlus – 63478.84. На

Таблица 4. Результаты молекулярного докинга, проведенного с использованием сервера ClusPro, для предлагаемой последовательности потенциального иммуногена с MHC класса I

Выбранная модель МНС I	Репрезентативность	Взвешенная Score-функция
0	Центр	-829.0
0	Самая низкая энергия	-829.0
1	Центр	-805.6
1	Самая низкая энергия	-805.6
2	Центр	-659.0
	Самая низкая энергия	-745.5

следующем этапе геометрическое качество первичной и уточненной моделей проанализировали по графику Рамачандрана (рис. 5).

Молекулярный докинг

Результаты анализа молекулярного докинга подтвердили сродство химерных пептидов как МНС класса I, так и МНС класса II. Обнаружено, что химерный пептид проявлял большее сродство к МНС класса II с *e*-value, равным –920.88, тогда как для МНС класса I параметр составлял –772.51. В этом разделе альбумин использовали в качестве нейтрального белка. Кроме того, энергия связывания с МНС класса I и МНС класса II для сконструированного полипептида проанализирована с использованием онлайн-сервера Clusрго (https://cluspro.bu.edu/login.php). Результаты представлены в табл. 4 и табл. 5.

Обратная трансляция белка и дизайн конструктов

Чтобы сконструировать кассету для экспрессии в плазмидном векторе для синтеза целевого белка, необходимо осуществить обратный перевод аминокислотной последовательности в нуклеотидную. С этой целью конечную пептидную последовательность преобразовали в нуклеотидную с использованием инструментов биоинформатики. Поиск ORF последовательности проводили в программе ORFfinder. Полученную нуклеотидную последовательность использовали для моделирования клонирования в вектор PET21 с использованием автономного программного обеспечения SnapGene. Эти результаты показаны на рис. 6.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Недавно разработали несколько методов для индукции иммуногенности вакцин и снижения связанных с их применением рисков. В случае рас-



Рис. 2. Свойства сконструированного полипептида. a – Аминокислотная последовательность и физико-химические характеристики. Согласно результатам, получен полипептид с общим числом аминокислотных остатков (а.о.) 344, молекулярной массой 38261.89 Да, хорошо растворимый в воде. Кроме того, изоэлектрическая точка равна 9.92, а суммарный заряд при рН 7.0 – около 14.7. δ – График стабильности белка, созданный с использованием сервера IUpred 2.0. Этот график подтверждает стабильность полученного полипептида, так как прогнозируемые нарушения его структуре ниже порогового значения 0.5. e – Результаты анализа по программе IsUnstruct и предсказание неупорядоченных участков на основе модели Изинга. e – Предсказание по программе FoldUnfold в соответствии с аминосислотной последовательностью. Сервер FoldUnfold проверяет аминокислоту в последовательности. Свернутые и несвернутые области в последовательности показаны синим и красным цветом соответственно.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

Число аминокислот: 344 Молекулярная масса: 38262.32 Теоретическая pI: 9.47

Аминокислотный состав: CSV-формат

7 11/11/1	IOKIN	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	IIDIN COCTUD.	~
Ala	(A)	38	11.0%	
Arg	(R)	10	2.9%	
Asn	(N)	20	5.8%	
Asp	(D)	13	3.8%	
Cys	(C)	4	1.2%	
Gln	(Q)	12	3.5%	
Glu	(E)	17	4.9%	
Gly	(G)	15	4.4%	
His	(H)	10	2.9%	
Ile	(I)	26	7.6%	
Leu	(L)	25	7.3%	
Lys	(K)	34	9.9%	
Met	(M)	9	2.6%	
Phe	(F)	19	5.5%	
Pro	(P)	16	4.7%	
Ser	(S)	19	5.5%	
Thr	(T)	26	7.6%	
Trp	(W)	2	0.6%	
Tyr	(Y)	10	2.9%	
Val	(V)	19	5.5%	
Pyl	(O)	0	0%	
Sec	(U)	0	0%	
(B)	0		0%	
(Z)	0		0%	
(X)	0		0%	

Общее число отрицательно заряженных остатков (Asp + Glu): 30 Общее число положительно заряженных остатков (Arg + Lys): 44

Предполагаемый период полужизни:

N-конец рассмотренной последовательности – М (Met)

Установленный период полужизни: 30 ч (ретикулоциты человека, in vitro)

> 20 ч (дрожжи, *in vivo*) > 10 ч (*E. coli*, *in vivo*)

Рис. 3. Результаты предсказания стабильности сконструированного полипептида программой ProtParam. Аланин и лизин чаще всего встречаются в последовательности белка и в сумме составляют 20% всех аминокислот; расчетный период полужизни белка в клетках млекопитающих составляет около 30 ч.







Рис. 5. Анализ пептидной последовательности по графику Рамачандрана.

пространенного зоонозного заболевания, Q-лихорадки, доступна только одна коммерческая вакцина. Это инактивированная формалином бактерия *C. burnetii* [8]. В представленной работе описано со-

Таблица 5. Результаты молекулярного докинга, проведенного с использованием сервера ClusPro, для предлагаемой последовательности иммуногена с МНС класса II

Выбранная модель MHC II	Репрезентативность	Взвешенная Score-функция		
0	Центр	-824.2		
	Самая низкая энергия	-824.2		
1	Центр	-631.3		
	Самая низкая энергия	-708.2		
2	Центр	-648.4		
	Самая низкая энергия	-737.4		

здание полипептида, который может быть использован как иммуноген для вакцины против О-лихорадки. Полипептид сконструирован на основе спрогнозированных функциональных и иммунодоминантных эпитопов C. burnetii. При предсказании эпитопов использовали несколько баз данных [27-29]. В пептидных вакцинах на конец аминокислотной цепи можно ввести метку, например Arg-тег. кальмолулинсвязывающий пептил. целлюлозсвязывающий домен, DsbA, с-тус-тег, глутатион-S-трансферазу, FLAG-, НАТ-тег, Ніз-тег, мальтозсвязывающий белок, NusA, S-тег и др. [30]. Дальнейшую белковую инженерию можно применять для солюбилизации нерастворимого полипептида или стабилизации нестабильного [31]. После отбора эпитопов сконструированную аминокислотную последовательность обратно переводят в кодирующую ее нуклеиновую и полученный остов синтезируют и клонируют в подходящем хозяине для экспрессии целевого белка [32].

В последнее время опубликовано множество исследований по разработке вакцин на основе



Рис. 6. Смоделированная и сконструированная конструкция ДНК, кодирующей полипептид в векторе экспрессии PET21. *In silico* клонирование проводили через сайты рестрикции NdeI и Hind III системы рЕТ.

пептидов против инфекционных заболеваний. Например, Farhadi и др. [33] представили вакцину на основе пептидов, которая состоит из эпитопов В-клеток и линейных CD4⁺ Т-клеток, выбранных из белков внешней мембраны (Omps) Klebsiella pneumoniae. В другом исследовании Nosrati и др. [34] получили мультиэпитопную рекомбинантную вакцину из линейных В-клеточных и Т-клеточных связывающих эпитопов из гликопротеинов Gc и Gn вируса геморрагической лихорадки Крым–Конго. Полученный ими оптимизированный пептид состоял из 382 аминокислотных остатков, организованных в четыре домена, включая линейные В-клеточные эпитопы, Т-клеточные эпитопы и два адъюванта [34]. В 2020 году Aryanzad и соавт. [35] разработали и изготовили иммуногенный химерный белок против антигенов ІраD и ІраB из Shigella dysenteriae [35]. В 2021 году Sohali и др. [36] описали процедуру in silico для предсказания Т-клеточного эпитопа SARS-CoV-2 [36]. Jaydari и соавт. [37] сообщали о В- и Т-клеточных эпитопах против *C. burnetii*. В этой вакцине эпитопы Com1 и OmpH в различном порядке были организованы в 3 группы: Т-клеточные, В-клеточные и общие Т- и В-клеточные. Авторы показали, что каркас, сконструированный из эпитопов В-клеток, проявляет наибольшую иммуногенность как в отношении антигенов Com1, так и ОтрН.

Нами исследованы все Т-клеточные эпитопы семи антигенов *C. burnetii*, включая белки Com1 и ОтрН (табл. 1). При разработке пептидных вакцин первостепенное значение имеет определение иммуногенных В-клеточных и Т-клеточных эпитопов. Т-клетки играют важную роль в иммунном ответе клетки на патогены. Бактерия C. burnetii – облигатный внутриклеточный патоген, поэтому иммунные ответы на *С. burnetii* главным образом основаны на Т-клеточном иммунитете [38]. Из-за этого мы сосредоточились на Т-клеточных эпитопах с высоким уровнем иммуногенности и сродства к МНС класса I и II. Мы изучили все Т-клеточные эпитопы семи антигенов *C. burnetii*, включая белки Com1 и OmpH (табл. 1). После проверки показателей иммуногенности, аллергенности, физико-химических характеристик и взаимодействия между вакциной-кандидатом и молекулами МНС была подтверждена пригодность вакцины-кандидата.

Иммуноинформатический подход — рентабельный, безопасный и быстрый метод разработки вакцин. Эта работа была направлена на создание мультиэпитопной вакцины против зоонозной бактерии *C. burnetii*, вызывающей Q-лихорадку. В результате сконструирован и наработан мультиэпитопный иммуногенный полипептид высокой стабильности, пригодный для использования в качестве иммуногена в вакцине против Q-лихорадки.

Авторы благодарят исследовательский совет Malek-Ashtar University of Technology (MUT) за финансовую поддержку этого исследования.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- McQuiston J.H., Childs J.E., Thompson H.A. (2002) Q fever. J. Am. Vet. Med. Assoc. 221(6), 796–799. https://doi.org/10.2460/javma.2002.221.796
- Marrier T.J. (2010) Q fever pneumonia. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 24(1), 27–41. https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.10.004
- Angelakis E., Raoult D. (2010) Q fever. Vet. Microbiol. 140(3–4), 297–309.
 - https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.016
- Mori M., Mertens K., Cutler S.J., Santos A.S. (2017) Critical aspects for detection of *Coxiella burnetii*. Vector Borne Zoonotic Dis. 17(1), 33–41. https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1958
- Fenollar F., Fournier P.E., Raoult D. (2004) Molecular detection of *Coxiella burnetii* in the sera of patients with Q fever endocarditis or vascular infection. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4919–4924. https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.4919-24
- Melenotte C., Protopopescu C., Million M., Edouard S., Carrieri M.P., Eldin C., Angelakis E., Djossou F., Bardin N., Fournier P.E., Mege J.L., Raoult D. (2018) Clinical features and complications of *Coxiella burnetii* infections from the French national reference center for Q fever. *JAMA Netw. Open.* 1(4), e181580. https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2018.1580
- Njeru J., Henning K., Pletz M.W., Heller R., Neubauer H. (2016) Q fever is an old and neglected zoonotic disease in Kenya: a systematic review. *BMC Public Health.* 16, 297. https://doi.org/10.1186/s12889-016-2929-9
- Bond K.A., Franklin L.J., Sutton B., Firestone S.M. (2017) Q-Vax Q fever vaccine failures, Victoria, Australia 1994–2013. *Vaccine*. 35(51), 7084–7087. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.10.088
- Hornstra H.M., Priestley R.A., Georgia S.M., Kachur S., Birdsell D.N., Hilsabeck R., Gates L.T., Samuel J.E., Heinzen R.A., Kersh G.J., Keim P., Massung R.F., Pearson T. (2011) Rapid typing of *Coxiella burnetii*. *PloS One.* 6(11), e26201. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026201
- Vigil A., Ortega R., Nakajima-Sasaki R., Pablo J., Molina D.M. (2010) Genome-wide profiling of humoral immune response to *Coxiella burnetii* infection by protein microarray. *Proteomics*. 10(12), 2259–2269. https://doi.org/10.1002/pmic.201000064
- Florea L., Halldórsson B., Kohlbacher O., Schwartz R., Hoffman S., Istrail S. (2003) Epitope prediction algorithms for peptide-based vaccine design. *Proc. IEEE Comput. Soc. Bioinform. Conf.* 2, 17–26. https://doi.org/10.1109/CSB.2003.1227293
- Zhang Q., Wang P., Kim Y., Haste-Andersen P., Beaver J., Bourne P.E., Bui H.H., Buus S., Frakild S., Greenbaum J., Lund O., Lundegaard C., Nielsen M., Ponomarenko J., Sette A., Zhu Z., Peters B. (2008) Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 1 2022

Nucleic Acids Res. **36**, 513–518. https://doi.org/10.1093/nar/gkn254

- Saha S., Bhasin M., Raghava G.P.S. (2005) Bcipep: a database of B-cell epitopes. *BMC Genom.* 6, 79. https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-79
- Deavin A.J., Auton T.R., Greaney P.J. (1996) Statistical comparison of established T-cell epitope predictors against a large database of human and murine antigens. *Mol. Immunol.* 33(2), 145–155. https://doi.org/10.1016/0161-5890(95)00120-4
- Consortium T. (2019) UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 47(D1), D506–D515. https://doi.org/10.1093/nar/gky1049
- Doytchinova I., Flower D. (2007) VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinform*. 8(4), 1–7. https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4
- Dimitrov I., Bangov I., Flower D., Doytchinova I. (2014) AllerTOP v.2 – a server for *in silico* prediction of allergens. J. Mol. Model. 20(6), 2278–2284. https://doi.org/10.1007/s00894-014-2278-5
- Lear S., Cobb S. (2016) Pep-Calc.com: a set of web utilities for the calculation of peptide and peptoid properties and automatic mass spectral peak assignment. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **30**(3), 271–277. https://doi.org/10.1007/s10822-016-9902-7
- Dosztányi Z ., Csizmok V., Tompa P., Simon I. (2005) IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics*. 21(16), 3433–3434. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti541
- Lobanov M.Y., Sokolovskiy I.V., Galzitskaya O.V. (2013) IsUnstruct : prediction of the residue status to be ordered or disordered in the protein chain by a method based on the Ising model. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **31**(10), 37–41. https://doi.org/10.1080/07391102.2012.718529
- 21. Galzitskaya O., Garbuzynskiy S. (2006) FoldUnfold: web server for the prediction of disordered regions in protein chain. *Bioinformatics*. **22**(23), 2948–2949. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bt1504
- Zhang Y. (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. 9(1), 40. https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40
- Wiederstein M., Sippl M. (2007) ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 35(Web Server issue), W407–W410. https://doi.org/10.1093/nar/gkm290
- 24. Vajda S., Yueh C., Beglov D., Bohnuud T., Mottarella S.E., Xia B., Hall D.R., Kozakov D. (2017) New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins.* 85(3), 435–444. https://doi.org/10.1002/prot.25219
- Kozakov D., Beglov D., Bohnood T., Mottarella S.E., Xia B., Hall R., Vajda S. (2013) How good is automated protein docking? *Proteins.* 81(12), 1–22. https://doi.org/10.1002/prot
- Kozakov D., Hall D.R., Xia B., Porter K.A., PadhornyD., Yueh C., Beglov D., Vajda S. (2017) The ClusPro web server for protein – protein docking. *Nat.*

Protoc. 12(2), 255-278. https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169

27. Soria-Guerra R.E., Nieto-Gomez R., Govea-Alonso D.O., Rosales-Mendoza S. (2015) An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development. J. Biomed. Inform. 53, 405 - 414

https://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.11.003

- 28. Wagstaff S.C., Laing G.D., Theakston R.D.G., Papaspyridis C., Harrison R.A. (2006) Bioinformatics and multiepitope DNA immunization to design rational snake antivenom. PLoS Med. 3(6), 832-844. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030184
- 29. Patronov A., Doytchinova I. (2013) T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. Open Biol. 3(1), 120139. https://doi.org/10.1098/rsob.120139

- 30. Terpe K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60(5), 523-533. https://doi.org/10.1007/s00253-002-1158-6
- 31. Kazlauskas R.J., Bornscheuer U.T. (2009) Finding better protein engineering strategies. Nat. Chem. Biol. 5(8), 526-529. https://doi.org/10.1038/nchembio0809-526
- 32. Ghorban Hosseini N., Tebianian M., Farhadi A., Hossein Khani A., Rahimi A., Mortazavi M., Hosseini S.Y., Taghizadeh M., Rezaei M., Mahdavi M. (2017) In silico analysis of L1/L2 sequences of human papillomaviruses: implication for universal vaccine design. Viral. Immunol. 30(3), 210-223. https://doi.org/10.1089/vim.2016.0142

- 33. Farhadi T., Karimia Z., Younes G., Nezafatb N., Hemmati S., Erfani N. (2015) Production of a novel multiepitope vaccine based on outer membrane proteins of Klebsiella pneumoniae. Trends Pharm. Sci. 1, 167–172.
- 34. Nosrati M., Behbahani M., Mohabatkar H. (2019) Towards the first multi-epitope recombinant vaccine against Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: a computer-aided vaccine design approach. J. Biomed. Informat. 93, 103160. https://doi.org/10.1016/j.jbi.2019.103160
- 35. Arvanzad S.A., Zeinoddini M., Haddadi A., Nazarian S., Sajedi R.H. (2020) In silico design of chimeric and immunogenic protein-containing IpaB and IpaD as a vaccine candidate against Shigella dysenteriae. Curr. Proteom. 17(4), 333-341. https://doi.org/10.2174/1570164617666190906145843
- 36. Sohail M.S., Ahmed S.F., Quadeer A.A., McKay M.R. (2021) In silico T cell epitope identification for SARS-CoV-2: progress and perspectives. Adv. Drug Del. Rev. 171, 29–47. https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.007
- 37. Jaydari A., Forouharmehr A., Nazifi N. (2019) Determination of immunodominant scaffolds of Com1 and OmpH antigens of Coxiella burnetii. Microb Pathog. 126.298-309. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.012
- 38. Zhang G., Peng Y., Schoenlaub L., Elliott A., Mitchell W., Zhang Y. (2013) Formalin-inactivated Coxiella burnetii phase I vaccine-induced protection depends on B cells to produce protective IgM and IgG. Infect. Immun. 81(6), 2112-2122. https://doi.org/10.1128/IAI.00297-13

In silico DESIGN OF A NEW MULTI-EPITOPE PEPTIDE-BASED VACCINE **CANDIDATE AGAINST Q FEVER**

S. Jabarzadeh¹, A. Samiminemati¹, and M. Zeinoddini^{1, *}

¹ Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

*e-mail: zeinoddini52@mut.ac.ir

Novel types of the vaccines with high immunogenicity and low risks, including epitope-based vaccines, are sought. Among zoonotic disease, Q fever caused by Coxiella burnetii is an important target due to numerous outbreaks and the pandemic potential. Here we present a synthetic multi-epitope vaccine against Coxiella *burnetii*. This vaccine was developed using immunoinformatics approach. Antigenic proteins were studied, and five T cell epitopes were selected. Antigenicity, allergenicity, and toxicity of the selected epitopes were evaluated using the VaxiJen 2.0, AllerTOP, and ToxinPred servers, respectively. Selected epitopes were joined in a peptide sequence, with the cholera toxin B subunit (CTxB) as an adjuvant. The affinity of the proposed vaccine to MHC I and II molecules was measured in a molecular docking study. Resultant vaccine has high antigenicity, stability, and a half-life compatible with utilization in vaccination programs. In conclusion, the validated epitope sequences may be used as a potential vaccine to ensure protection against Q fever agent.

Keywords: Q fever, Coxiella burnetii, peptide-based vaccine, immune informatics, epitope