

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 85, выпуск 7, 2020

|  |     |
|--|-----|
| Сплайсосомные интроны: свойства, функции и эволюция (обзор)<br><i>И.В. Поверенная, М.А. Ройтберг</i>   | 851 |
| Инактивация эпигенетических регуляторов вследствие мутаций в солидных опухолях (обзор)<br><i>М.В. Немцова, Д.С. Михайленко, Е.Б. Кузнецова, И.И. Быков, А.А. Замятнин (мл.)</i>  | 863 |
| bta-miRNA-1271 быка способствует дифференцировке преадипоцитов, направленно воздействуя на фактор активации транскрипции 3<br><i>Х.Ю. Сюй, Ж. Шао, Б.З. Инь, Л.М. Чжан, Ж.К. Фан, Ж.С. Чжан, Г.Ж. Ся</i>   | 879 |
| Маркеры активации молекулярных путей связаны с эффективностью терапии трастузумабом при HER2-позитивном метастатическом раке молочной железы лучше, чем уровень экспрессии отдельных генов<br><i>М. Сорокин, К. Игнатьев, В. Барбара, У. Владимиров, А. Муравьева, М. Сунцова, Н. Гайфуллин, И. Воротников, Д. Камашев, А. Бондаренко, М. Баранова, Е. Поддубская, А. Буздин</i>           | 890 |
| Фитофлуин – эффективный фотосенсибилизатор образования синглетного кислорода под действием УФ-А излучения<br><i>А.А. Ашихмин, А.С. Бендикис, А.А. Москаленко, А.А. Красновский (мл.)</i>   | 907 |
| Идентификация гена химозина алтайского марала [ <i>Cervus Elaphus Sibiricus</i> (Severtzov, 1873)], наработка его рекомбинантного аналога в прокариотической системе экспрессии и анализ некоторых биохимических свойств полученного фермента<br><i>С.В. Беленькая, А.А. Бондарь, Т.А. Кургина, В.В. Ельчанинов, А.Ю. Бакулина, Е.А. Рухлова, О.И. Лаврик, А.А. Ильичев, Д.Н. Щербаков</i> | 916 |
| Роль контактов CRE-района РНК-полимеразы <i>Escherichia coli</i> с нематричной цепью днк в процессе ухода с промотора<br><i>И.В. Петушков, А.В. Кульбачинский</i>  | 929 |
| Регуляция белком р53 метаболизма млекопитающих, зависимого от тиамина (витамина В1)<br><i>В.И. Буник, В.А. Алешин, С. Жоу, Ш. Кришнан, А. Карлссон</i>   | 940 |
| Пленки из рекомбинантного спидроина отменяют некоторые признаки старения фибробластов NIH 3T3, индуцированные высокой концентрацией глюкозы<br><i>А.М. Мойсенович, М.М. Мойсенович, А.К. Судьина, В.В. Татарский, А.И. Хамидулина, М.А. Ястребова, Л.И. Давыдова, В.Г. Богуш, В.Г. Дебабов, А.Ю. Архипова, К.В. Шайтан, А.А. Штиль, И.А. Дёмина</i>  | 948 |
| Электрические кабели клеток. I. Перенос энергии вдоль сопрягающих мембран (обзор)<br><i>В.В. Птушенко</i>  | 963 |
| <b>ГИПОТЕЗА</b>  |     |
| Активация транскрипционного фактора Nrf2 как подход к предотвращению цитокинового шторма при COVID-19<br><i>Р.А. Зиновкин, О.А. Гребенчиков</i>  | 978 |

# CONTENTS

---

---

Vol. 85, Publ. 7, 2020

---

---

|  |     |
|--|-----|
| Spliceosomal Introns: Features, Functions, and Evolution (Review)<br><i>I. V. Poverennaya and M. A. Roytberg</i>   | 851 |
| Inactivation of Epigenetic Regulators due to Mutations in Solid Tumors (Review)<br><i>M. V. Nemtsova, D. S. Mikhaylenko, E. B. Kuznetsova, I. I. Bykov, and A. A. Zamyatnin, Jr.</i>   | 863 |
| Bovine bta-microRNA-1271 Promotes Preadipocyte Differentiation by Targeting Activation Transcription Factor 3<br><i>H. Y. Xu, J. Shao, B. Z. Yin, L. M. Zhang, J. C. Fang, J. S. Zhang, and G. J. Xia</i>  | 879 |
| Molecular Pathway Activation Markers Are Linked with Efficacy of Trastuzumab Therapy in Metastatic HER2-Positive Breast Cancer Better than Individual Gene Expression Levels<br><i>M. Sorokin, K. Ignatev, V. Barbara, U. Vladimirova, A. Muraveva, M. Suntsova, N. Gaifullin, I. Vorotnikov, D. Kamashev, A. Bondarenko, M. Baranova, E. Poddubskaya, and A. Buzdin</i>   | 890 |
| Phytofluene as a Highly Efficient UVA Photosensitizer of Singlet Oxygen Generation<br><i>A. A. Ashikhmin, A. S. Benditkis, A. A. Moskalenko, and A. A. Krasnovsky, Jr.</i>   | 907 |
| Identification of the Chymosin Gene of Altai Maral [ <i>Cervus Elaphus Sibiricus</i> (Severtzov, 1873)], Development of Its Recombinant Analog in the Prokaryotic Expression System and Analysis of Some Biochemical Properties of the Created Enzyme<br><i>S. V. Belenkaya, A. A. Bondar, T. A. Kurgina, V. V. Elchaninov, A. Yu. Bakulina, E. A. Rukhlova, O. I. Lavrik, A. A. Ilyichev, and D. N. Shcherbakov</i> | 916 |
| Role of the Interactions of the CRE Region of <i>Escherichia coli</i> RNA Polymerase with Nontemplate DNA during Promoter Escape<br><i>I. V. Petushkov and A. V. Kulbachinskiy</i>   | 929 |
| Regulation of Mammalian Thiamine (Vitamin B1)-Dependent Metabolism by p53<br><i>V. I. Bunik, V. A. Aleshin, X. Zhou, Sh. Krishnan, and A. Karlsson</i>   | 940 |
| Recombinant Spidroin Films Attenuate Individual Markers of Glucose Induced Aging in NIH 3T3 Fibroblasts<br><i>A. M. Moysenovich, M. M. Moisenovich, A. K. Sudina, V. V. Tatarskiy, A. I. Khamidullina, M. A. Yastrebova, L. I. Davydova, V. G. Bogush, V. G. Debabov, A. Yu. Arkhipova, K. V. Shaitan, A. A. Shtil, and I. A. Demina</i>   | 948 |
| Electric Cables of Living Cells. I. Energy Transfer along Coupling Membranes (Review)<br><i>V. V. Ptushenko</i>  | 963 |
| <b>HYPOTHESIS</b>  |     |
| Transcription Factor Nrf2 as a Therapeutic Target for the Prevention of Cytokine Storm in COVID-19<br><i>R. A. Zinovkin and O. A. Grebenchikov</i>   | 978 |

## СПЛАЙСОСОМНЫЕ ИНТРОНЫ: СВОЙСТВА, ФУНКЦИИ И ЭВОЛЮЦИЯ

### Обзор

© 2020 И.В. Поверенная<sup>1,2\*</sup>, М.А. Ройтберг<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991 Москва, Россия;  
электронная почта: ipoverennaya@gmail.com

<sup>2</sup> Институт математических проблем биологии РАН – филиал Института прикладной математики  
им. М.В. Келдыша РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия

<sup>3</sup> Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),  
141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

<sup>4</sup> Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 101000 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.03.2020

После доработки 25.05.2020

Принята к публикации 25.05.2020

Для большинства эукариотических генов свойственны сплайсосомные интроны – некодирующие последовательности, которые вырезаются из пре-мРНК генов с помощью специального комплекса сплайсосомы в процессе сплайсинга мРНК. Интроны бывают как в белок-кодирующих, так и в РНК-кодирующих генах, причем могут встречаться как в кодирующей области, так и в нетранслируемых областях генов. В связи с высоким уровнем полиморфизма последовательности интронов крайне изменчивы, поэтому долгое время функции интронов связывали только с альтернативным сплайсингом, а эволюцию интронов обычно рассматривали не как эволюцию отдельной единицы генома, а в рамках эволюции экзон-интронной структуры гена. В представленном обзоре рассмотрены теории происхождения интронов; эволюционные события в экзон-интронной структуре, такие как приобретение, потеря и слайдинг (смещение) интронов; функции интронов, известные к настоящему моменту; а также как изменение таких свойств интрона, как длина и фаза, могут влиять на регуляцию процессов с участием генов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** сплайсосомные интроны, фаза интрона, длина интрона, эволюция, слайдинг, экзон-интронная структура.

DOI: 10.31857/S0320972520070015

### ВВЕДЕНИЕ

Интроны были открыты в 1977 году в двух независимых исследованиях [1, 2], в которых было показано, что гены эукариот, в отличие от генов прокариот, содержат вставочные последовательности, которые удаляются из пре-мРНК вскоре после транскрипции во время созревания мРНК. Такие вставочные последовательности было предложено назвать интронами (от английского «INTRagenic regiON» – «внутригенный регион»), а разделяемые ими фрагменты гена – экзонами («EXpressed regiON» – «экспрессирующийся регион») [3].

Так как интроны относятся к некодирующей ДНК (нк-ДНК), которую раньше называли «му-

Принятые сокращения: ЭИС – экзон-интронная структура; нк – некодирующие последовательности; АС – альтернативный сплайсинг; ППИ – параллельное приобретение интронов.

\* Адресат для корреспонденции.

сорной», и считали, что она не несет особой смысловой нагрузки, то долгое время стоял вопрос о функциональной значимости интронов. Сейчас возможные функции интронов принято разделять на три категории: 1) функции, связанные со сплайсингом; 2) общие функции нк-ДНК; 3) хранение регуляторных элементов и белок-кодирующих генов внутри себя [4]. В первом случае, кроме участия интронов в альтернативном сплайсинге (АС) и их вклада в разнообразие и мультидоменность белковых структур, важна также регуляторная роль сплайсинга в других молекулярно-биологических процессах. Например, известно, что мРНК, из которых уже были вырезаны интроны, лучше экспортируются из ядра, чем их копии без вырезанных интронов [5]. Важным механизмом регуляции экспрессии генов, по-видимому, является скорость сплайсинга. Более того, само наличие интронов в гене влияет на регуляцию его экспрессии [6, 7]. Расположение интронов также важно: хотя

большинство интронов локализованы в кодирующей последовательности, точно установлено, что некоторые интроны расположены в 5'-нетранслируемой области, где участвуют в регуляции экспрессии генов у животных и растений [8]. Помимо всего, интроны, видимо, являются энхансерами мейотического кроссинговера между белок-кодирующими последовательностями, поскольку вероятность кроссинговера между экзонами, разделенными длинными интронами, гораздо больше, чем между такими же последовательностями, но без интронов [9]. И наконец, в качестве примера для третьей категории функций интронов можно привести следующее наблюдение: почти во всех эукариотических геномах в 5'-областях генов, кодирующих рибосомальные белки, есть интроны, содержащие регуляторные элементы [10].

В настоящий момент известно три типа интронов: интроны группы I и группы II, а также сплайсосомные интроны. Интроны групп I и II были обнаружены в ДНК некоторых бактерий и клеточных органелл. Интроны группы I были также найдены в рибосомальных РНК простейших и в ядрышках некоторых грибов. Для интронов групп I и II характерно наличие особых РНК структур, благодаря которым они способны к автосплайсингу (то есть, самовырезанию из незрелой мРНК). Основное отличие между интронами обеих групп заключается в разных механизмах автосплайсинга. У таких интронов также есть собственные открытые рамки считывания, содействующие как их удалению из РНК, так и распространению интронов по геному через процесс обратной транскрипции. В настоящий момент идентифицировано ~1500 интронов группы I и 200 представителей группы II [11].

Третий и самый многочисленный тип интронов – сплайсосомные интроны – были найдены в ядерных геномах почти всех известных эукариот (исключение составляет нуклеоморф) [12]. В отличие от интронов группы I и II, сплайсосомные интроны не имеют способностей к автосплайсингу, и для их вырезания из пре-мРНК нужен специальный аппарат – сплайсосома, которая представляет из себя сложный биомолекулярный комплекс, состоящий из 5 цепей малой ядерной РНК и сотни белков.

Несмотря на важные различия между разными типами интронов, сходство механизмов сплайсинга интронов группы II и сплайсосомных интронов указывает на возможность эволюционного родства между ними [13, 14].

Последовательность сплайсосомных интронов обычно квази-случайная и не имеет открытой рамки считывания, хотя внутри очень длин-

ных интронов могут быть вложенные гены, иногда на обратной цепи (подробнее в разделе «Функции интронов»). Длина данных интронов широко варьируется между видами: от нескольких десятков (у простейших) до сотен тысяч нуклеотидов у млекопитающих. Плотность интронов (то есть количество интронов на ген) в эукариотах также сильно варьируется: от нескольких интронов на геном до десятков интронов на ген [4]. Вследствие такого разброса плотности и длин интронов эукариотов условно стали разделять на интрон-бедные (большинство одноклеточных эукариот) и интрон-богатые (животные, растения и т.д.) геномы. Было показано [15], что для организмов с плотностью <3 интронов на 1000 п.н. в среднем характерна небольшая длина интронов и нет значимой корреляции между плотностью и длиной интронов, в то время как для более интрон-богатых геномов можно наблюдать сильную положительную корреляцию. Тем не менее даже среди интрон-богатых организмов выделяются позвоночные, которые имеют значительное количество очень длинных интронов. Несмотря на найденные корреляции, исключения были обнаружены как среди интрон-богатых, так и среди интрон-бедных геномов. Интрон-бедные и интрон-богатые организмы различаются не только разной плотностью интронов, но и распределением интронов в геноме: для интрон-богатых геномов характерно относительно равномерное распределение интронов по геному, в то время как в интрон-бедных геномах интроны перепредставлены в 5'-областях генов [16].

Интересно, что многочисленные интроны были также найдены в длинных нк-РНК. Сравнительный анализ более чем 3000 последовательностей РНК такого типа показал, что, возможно, для длинных нк-РНК свойственно сохранение экзон-интронной структуры (ЭИС) [17].

## ИНТРОНЫ И СПЛАЙСИНГ

Сплайсосомные интроны можно разделить на две группы в зависимости от того, какая сплайсосома принимает участие в вырезании интрона из пре-мРНК. Большая часть интронов вырезается с помощью U2 сплайсосомы, оставшаяся часть – с помощью U12 сплайсосомы. Для правильного распознавания и дальнейшего удаления интрона крайне важны консенсусные последовательности на экзон-интронных границах. Наиболее распространенные интроны U2 типа, то есть интроны, вырезаемые U2 сплайсосомой, содержат GT динуклеотид на

5'-донорном сайте сплайсинга (далее ДСС) и AG динуклеотид на 3'-акцепторном сайте сплайсинга (далее АСС).

Поскольку сайты сплайсинга с |GT в ДСС и AG| в АСС встречаются повсеместно, их стало принято называть каноническими. Среди неканонических сайтов самыми частыми являются |GC-AG| и |AT-AC| пары конечных динуклеотидов в интронах U2 типа и U12 типа соответственно. У человека такие сайты сплайсинга встречаются в ~0,9 и ~0,09% интронов [18]. У растений было показано схожее распределение сайтов сплайсинга (в среднем): 98,7% для |GT-AG|, 1,2% для |GC-AG|, 0,06% для |AT-AC| и 0,09% для всех остальных [19]. В геномах млекопитающих доля интронов с другими неканоническими вариантами, которые, как считается, имеют U2-U12-подобные сайты сплайсинга, например |GT-TG| или |AT-AG|, занимает всего порядка 0,02%, хотя, вероятно, их число сильно недооценено из-за несовершенства геномных аннотаций [20].

Катализ вырезания интронов с неканоническими сайтами сплайсинга осуществляет U12 сплайсосома, в то время как интроны с |GT-AG| обычно вырезаются U2 сплайсосомой (хотя известны случаи сплайсинга и U12 сплайсосомой). Вопрос о том, какая сплайсосома была первой, все еще остается актуальным. В данный момент наибольшую поддержку имеет гипотеза, что ранние интроны вырезались с помощью U2 сплайсосомы, тем не менее, согласно данным последних реконструкций, обе сплайсосомы были представлены в последнем общем предке эукариот (last common eukaryotic ancestor — LECA).

В настоящее время известны 2 основных механизма распознавания сигнала сплайсинга: определение по экзону и определение по интрону. Эффективность сплайсинга в первом случае зависит от длины экзонов и не зависит от длины интронов. Обратное верно для второго случая [21]. Можно предположить, что определение по экзону в какой-то момент замещается определением по интрону, так как в исследовании Sverdlov et al. [22] было показано, что в новых интронах сигнал сплайсинга базируется на концах соседних экзонов, но со временем он смещается на концы самого интрона.

В качестве сайта протосплайсинга, т.е. сайта, в который может встроиться интрон, была признана консенсусная последовательность (A/C)AG||G. Выбор сайта протосплайсинга для *de novo* интронов, по-видимому, происходит случайным образом, при этом скорость изменения сайта протосплайсинга не отличается от скорости изменения случайного сайта.

Подверженный ошибкам сплайсинг (вследствие слабого донорного сайта) мог в конечном итоге привести к функциональному альтернативному сплайсингу. Считается, что АС возник еще на ранних этапах эволюции эукариот путем накопления aberrантных сплайс-форм в условиях слабого отрицательного отбора. По-видимому, все альтернативные транскрипты в начале были неработающими, и функциональные АС-формы развивались постепенно и независимо в разных таксонах. При этом считается, что АС в значительной степени способствовал повышению уровня фенотипической сложности у млекопитающих, и что активное накопление интронов дало эволюционное преимущество, так как позволило увеличить потенциально возможное число белковых изоформ. [23].

## ПРОИСХОЖДЕНИЕ ИНТРОНОВ

Происхождение сплайсосомных интронов представляет большой интерес как в изучении интронов, как самостоятельных элементов генома, так и в изучении эволюции всего генома в целом. Эволюция экзон-интронной организации эукариотических генов до сих пор является предметом долгого ожесточенного спора между сторонниками двух теорий: раннего и позднего происхождения интронов. Теория раннего происхождения интронов утверждает, что уже на самых ранних этапах эволюции жизни белок-кодирующие последовательности содержали многочисленные интроны, и что эти интроны играли ключевую роль в создании новых белков путем рекомбинации последовательностей, кодирующих отдельные маленькие белковые или пептидные элементы. Теория позднего происхождения интронов гласит, что интроны образовались только в эукариотах и непрерывно накапливались в ходе эволюции эукариот. Недавние открытия показали несостоятельность теории ранних интронов (по крайней мере, в ее начальной формулировке) [24], хотя, по всей видимости, самосплайсирующие интроны существовали уже на ранних стадиях, и, вероятно, именно они стали предками сплайсосомных интронов в эукариотах [4]. Теория поздних интронов стала профилирующей, однако также претерпела некоторые изменения, так как было показано, что общий предок эукариот содержал значительное число интронов, и со временем происходило не только накопление интронов, но и их потеря [4].

Rogozin et al. [4] сформулировали синтетическую гипотезу, в основе которой лежит предположение, что заселение древнего эукариоти-

ческого генома интронами было запущено митохондриальным эндосимбиозом. Согласно этой гипотезе, альфа-протеобактериальный предок митохондрии содержал много интронов группы II (что согласовывается с данными о перепредставленности таких интронов в некоторых альфа-протеобактериях), которые мигрировали в ДНК хозяина, где стали сплайсосомными интронами. Эта гипотеза подтверждается данными реконструкции последнего общего эукариотического предка (LECA), которые показали, что ранние эукариотические геномы на 80% состояли из последовательностей, полученных из интронов группы II [15, 25]. Помимо этого, результаты реконструкции LECA показали, что плотность интронов в LECA сравнима с плотностью интронов в современных умеренно интрон-богатых геномах (предки, как минимум, 3 из 5 таксономических супергрупп — Chromalveolata, Plantae и Unikonta (животные, растения и амебоподобные) — вероятнее всего, имели интрон-богатые геномы, хотя геномных данных об оставшихся супергруппах недостаточно для каких-либо выводов). По всей вероятности, закреплению интронов в геноме должен был способствовать эффект бутылочного горлышка — сокращения генофонда популяции (т.е. ее генетического разнообразия) вследствие прохождения периода, во время которого по различным причинам происходит критическое уменьшение ее численности, в дальнейшем восстановленное. Бутылочное горлышко, в свою очередь, могло быть вызвано симбиозом пре-эукариотической клетки с альфа-протеобактерией [25]. Реконструкция LECA позволила сделать авторам вывод о том, что эволюция эукариотических генов в основном шла по пути потери интронов, значительное приобретение интронов происходило лишь на некоторых этапах разветвления эволюционного дерева. При этом силы отрицательного отбора для потери большинства интронов достаточно только для популяций больших размеров, таких как одноклеточные ( $N_e, \sim 10^7-10^8$ ), а не для высших растений и позвоночных животных ( $N_e, \sim 10^5-10^6$ ) и ( $N_e, \sim 10^4-10^5$  соответственно) [26], поэтому первые потеряли почти все интроны, в то время как у вторых большинство интронов все же сохранилось.

### ЭВОЛЮЦИЯ ИНТРОНОВ В РАМКАХ ЭКЗОН-ИНТРОННОЙ СТРУКТУРЫ

Позиция интрона — место между конкретными экзонами, в которое встраивается интрон, — также называется сайтом протосплайсинга. Различные эволюционные анализы выя-

вили, что позиция многих интронов является консервативной: в ортологичных генах животных, грибов и растений позиции интронов совпадают в 25–30% случаев [27]. Консервативность позиций интронов говорит о том, что либо сами интроны являются ортологичными, либо интроны любят встраиваться конкретно в этот сайт протосплайсинга. Вторым вариантом называется параллельным приобретением интронов (ППИ) и обычно наблюдается у эволюционно далеких организмов (например, между растениями и животными доля ППИ может достигать до 20% от всех позиций интронов) [28]. Надо отметить, что в 2016 г. вышла работа Roy [29], в которой опровергались ранее показанные случаи ППИ в геномах *Daphnia* и поддерживалась гипотеза, что одинаковая позиция интронов в ортологичных генах означает, что данные интроны произошли от общего предка. Так или иначе, значительное большинство интронов, находящихся в одной и той же позиции ортологичных генов, по-видимому, действительно являются наследственными.

Но несмотря на консервативность позиций, плотность интронов в эукариотах сильно варьируется, и расположение интронов в ортологичных генах не всегда совпадает даже в близких видах [30]. Различные реконструкции ЭИС привели к выводам, что в процессе эволюции генов и интронов происходили как значительные потери, так и значительные приобретения интронов (последние тяжело детектировать), но если процесс потери интронов преобладает на коротких эволюционных расстояниях, то массовые вставки интронов, скорее всего, происходили во время больших эволюционных событий (например, при возникновении царства Животных).

Тем не менее необходимо учитывать, что полученные выводы были сделаны по результатам реконструкции эволюции ЭИС высоко-консервативных генов, так как для других областей генома реконструкцию делать сложнее, и результаты часто получаются не очень точными. А в консервативных белок-кодирующих последовательностях приобретение интронов происходит редко, в то время как для слабо-консервативных белок-кодирующих последовательностей и генов, образованных из мобильных элементов и нетранслируемых регионов, приобретение интронов является довольно частым явлением [31].

Исследования генов-паралогов показали значительное численное превосходство ново-приобретенных интронов над потерянными, что приводит к предположению, что дупликация генов усилила вставку интронов. Сравнение ЭИС у ранних эукариотических генов-паралогов вы-

явило, что позиции интронов в этих генах не консервативны, что, по всей видимости, говорит о том, что эти гены образовались в начале эволюции эукариот, когда происходили интенсивная дупликация генов и активное заселение генов самосплайсирующимися интронами группы II [32].

**Молекулярные механизмы приобретения и потери интронов.** Как было упомянуто выше, в эволюции эукариотических организмов потери интронов происходили чаще, чем их приобретения [28]. Молекулярные механизмы этих двух основных эволюционных событий, связанных с интронами, остаются не до конца изученными, хотя в настоящий момент уже существуют несколько частично подтвержденных моделей. Основным предложенным механизмом потери интрона считается гомологичная рекомбинация между кДНК, полученными в итоге обратной транскрипции, и геномными копиями соответствующих генов, в результате чего образуется новая аллель без интрона. Этот механизм называют ретротранспозицией или RTMIL (*Reverse Transcriptase-Mediated Intron Loss* – в буквальном переводе потеря интрона через обратную транскрипцию). Экспериментально потеря интрона была показана в геноме дрожжей еще в 1991 году [33].

Среди моделей для приобретения интрона выделяют вставку интрона во время восстановления разрывов двухцепочечной ДНК, вставку интрона группы II, вставку интрон-подобного мобильного элемента, интронизацию (часть экзона становится интроном), перенос интрона из гена-паралогга, а также транспозицию интронов – модель с обратным сплайсингом, где интрон, не успевший полностью покинуть сплайсосома, включается в мРНК, не содержащую интронов (при этом данный интрон может быть из другой пре-мРНК). Последние две модели также предполагают гомологическую рекомбинацию, как один из этапов. Lee и Stevens [34] удалось экспериментально подтвердить два случая приобретения интрона через транспозицию интронов в генах дрожжей (до этого события приобретения интрона были только предсказаны с помощью филогенетического анализа). При этом, согласно исследованиям Sverdlov et al. [35] и Tarrío et al. [36], транспозиция интронов не является единственным механизмом вставки интрона для других организмов. Следует отметить, что механизмы массовых вставок интронов (например, у самых ранних эукариот) вполне могут отличаться от механизмов относительно медленного процесса приобретения интронов у ныне существующих эукариот, что усложняет определение точных механизмов вставок.

Интересно, но интронные потери являются наиболее частыми вариациями количества копий генов (CNV), кодирующих белки у человека: 12 986 интронных делеций были обнаружены в 4147 генах (включая 1154 основных генов и 1638 генов, связанных с болезнью) [37]. В итоге можно наблюдать чрезвычайно вариабельность популяции по размеру, где у 40 генов было найдено от 10 до 150 аллелей разной длины. Интронные потери нередки у эволюционно древних генов, которые высоко консервативны на уровне белковой последовательности. Судя по всему, изменчивость экзон-интронной структуры генов, кодирующих белки, вносит важный вклад в изменчивость экспрессии и сплайсинга генов в популяциях человека [37].

**Слайдинг интронов.** Помимо потери и приобретения существует еще такое событие эволюции интронов, как смещение (слайдинг) – фактически это перемещение интрон-экзонных границ на небольшие расстояния (1–60 п.н.). Существует предположение, что слайдинг возникает посредством альтернативного сплайсинга: в гене появляется новый сайт сплайсинга рядом со старым, что приводит к АС, а затем по каким-то причинам старый сайт сплайсинга исчезает [36].

Вследствие крайней редкости слайдинг интронов долгое время не рассматривался как отдельный объект изучения, а шел в дополнение к другим эволюционным событиям. Например, Yenerall et al. [38] в процессе изучения возможных механизмов приобретения и потери интронов среди 11 видов *Drosophila* обнаружили 189 случаев приобретения интрона, 297 случаев потери и 1 случай слайдинга. Lehmann et al. [39] выдвинули предположение, что некоторые новые позиции интронов в консервативных генах *Drosophila* появились благодаря слайдингу интронов или дупликации экзонов. Возможные случаи слайдинга были также описаны в работах Krauss et al. [40] и Поверенной и соавт. [41]. Поверенная и соавт. [41] также подняли вопрос о связи слайдинга интронов с присутствием неканонических сайтов сплайсинга.

Надо отметить, что само существование слайдинга интрона, как явления, долго было предметом многочисленных споров. Впервые слайдинг постулировался сторонниками гипотезы о раннем происхождении интронов для объяснения удивительного открытия: позиции ортологичных интронов иногда варьируются у ортологичных генов [42]. В то же время сторонники гипотезы о позднем происхождении интронов утверждали, что слайдинг интронов, если и происходит, то мало влияет на разнообразие позиций интронов [43]. Более того, Восо и Csűgös [44] оспаривали ранее показанные случаи слай-

динга, найденные в оомицетах, и заключали, что почти всегда слайдинг интрона является всего лишь артефактом аннотации. Но, согласно результатам статистического анализа позиций интрона в разных семействах генов по методу Монте-Карло, смещение интрона на одну позицию является достоверным эволюционным событием, даже несмотря на свою относительную редкость (встречается менее чем у 5% всех интронов). А вот доказательств о слайдинге интронов на большие расстояния получено не было [45].

Tarrío et al. [36] выдвинули предположение, что позиционное разнообразие интронов обусловлено двумя пересекающимися процессами: фоновым процессом непрерывного перемещения интронов путем слайдинга и всплесками обширного приобретения или потери новых интронных последовательностей. Таким образом, слайдинг является важным источником возникновения новых интронов (по крайней мере в некоторых филогенетических линиях), что подтверждается сравнительным анализом близкорасположенных интронов из 12 геномов рода *Drosophila*, где было показано, что слайдинг интронов является относительно частой причиной новых позиций интронов в данном виде [39].

Возникновение и фиксация случаев слайдинга в процессе эволюции, вероятно, происходит через АС [36]. Согласно данной гипотезе, слайдинг интрона часто встречается в низкоконсервативных регионах белок-кодирующих генов, где повышена частота АС (например, 5'- и 3'-областей многих генов), но редко в консервативных участках белок-кодирующих генов. Для слайдинга интрона на 1 нуклеотид Fekete et al. [46] предложили возможный молекулярный механизм, связанный с участием альтернативно сплайсированного промежуточного соединения: так называемого «stwintron» (в буквальном переводе, сплайсосомные близнецы-интроны) – структуры, в которой один интрон фактически представляет собой два вложенных друг в друга интрона. Пример сдвига интрона на 1 нуклеотид был описан для гена глобина в геномах амфибий и рыб [47].

Фактическое влияние слайдинга на эволюцию эукариотических генов будет точно определено только тогда, когда будут доступны многочисленные наборы близкородственных геномов и разработаны строгие методы статистического анализа.

## СВОЙСТВА ИНТРОНОВ

**Фаза интрона.** Одной из важных характеристик интрона является его фаза – положение

интрона относительно рамки считывания. Как известно, интрон, расположенный в кодирующей последовательности, может прерывать рамку считывания гена в любой позиции: между двумя кодонами, между первым и вторым нуклеотидами одного кодона и между вторым и третьим нуклеотидом кодона. В первом случае, если интрон расположен между двумя кодонами, ему присваивается фаза 0. Интроны, расположенные между первым и вторым или вторым и третьим нуклеотидами, имеют фазу 1 или 2 соответственно.

В ходе целого ряда научных работ, посвященных распределению фаз интронов, выяснилось, что почти во всех изученных организмах наблюдается количественное преобладание интронов фазы 0 над интронами других фаз (исключение – оболочник *Oikopleura* с равномерным распределением интронов разных фаз); более того, если фазу 0 имеют ~50% интронов, то фазу 1 и фазу 2 – 30 и 20% соответственно [42, 48]. Описанная закономерность получила название «правило 50/30/20» или «соотношение 5 : 3 : 2» и объяснялась процессом «перетасовки» экзонов [49], корреляцией интронов фазы 1 и 2 с консервативными участками последовательности [50], и даже особой структурой белка [51]. В рамках теории о раннем происхождении интронов преобладание интронов фазы 0 объяснялось тем, что часть существующих в настоящий момент интронов была представлена еще в последнем общем предке эукариот и прокариот и соединяла близлежащие мини-гены, которые позднее превратились в экзоны. Таким образом, данные интроны должны были иметь нулевую фазу. Однако данная теория никак не объясняла факт большей частоты интронов фазы 1 над интронами фазы 2. А вот, согласно теории поздних интронов, неравномерность распределения фаз интронов отражает неслучайность приобретения интронов в ходе эволюции [52]. Для некоторых видов было показано преобладание сайтов протосплайсинга в фазе 0, тем не менее этим нельзя полностью объяснить преобладание интронов фазы 0, т.к. предполагается, что интроны встраиваются в случайные сайты протосплайсинга.

Еще одно возможное объяснение «правила 50/30/20» было дано Long и Deutsch [53] в 1999 году. Они предложили использовать фазы сплайсосомных интронов для изучения эволюции экзон-интронной организации. Авторы обнаружили сильную корреляцию между распределением фаз интронов и консервативностью последовательности сигналов сплайсинга в близлежащих экзонах: наиболее представленная фаза 0 соответствовала высокому уровню консервативности, в то время как фаза 2, характер-

ная для меньшей части интронов, обычно встречалась в случаях с низким уровнем консервативности. Интроны фазы 1 занимали промежуточное положение. С учетом экспериментально показанного пагубного влияния мутаций в экзонах недалеко от сайтов сплайсинга авторами был предложен возможный генетический механизм эволюции экзон-интронной структуры, предполагающий, что недопредставленность интронов фазы 2 может являться результатом направленной потери интрона, вызванной наличием вредных мутаций [53].

Помимо количественного распределения фаз интронов было обнаружено, что интроны фазы 1 чаще всего встречаются в 5'-концевых участках гена, и их частота существенно снижается к 3'-концу. Строго обратная ситуация была показана для интронов фазы 0 [54].

Астахова и соавт. [55] показали нарушение «золотого правила» распределения фаз в генах с большим содержанием длинных интронов: такие интроны предпочитают иметь фазу 1, а не обычно перепредставленную фазу 0. Надо отметить, что перепредставленность фазы 0 также часто объясняется тем, что интроны фазы 0 создают большую гибкость для процесса кодирования белка, поскольку они не затрагивают концевые нуклеотиды экзонов, где обычно расположены сайты сплайсинга [56].

**Длина интрона.** Еще одним немаловажным свойством интрона является его длина. Согласно данным Halligan и Keightley [57], последовательности длиной <40 п.н. не могут сформировать полноценный интрон. Средняя длина интрона варьирует в разных организмах, но распределение длин интронов в интрон-богатых организмах имеет правый тяжелый хвост, показывающий наличие очень длинных интронов [55].

Одним из наиболее известных фактов про длины интронов является повышенная длина 1-го интрона [58]. Farlow et al. [59] и Shepard et al. [60] анализировали время протекания сплайсинга в зависимости от длины интрона. Особенности сплайсинга длинных интронов были описаны Sibley et al. [61]. Vinogradov [62] показал, что интроны в конститутивных генах короче, чем в тканеспецифичных. Также было показано, что альтернативные кассетные экзоны фланкируются более длинными, чем конститутивные, интронами; хотя это не наблюдается в случаях альтернативных акцепторного или донорного сайтов сплайсинга [23]. В исследовании Астахова и соавт. [55] была найдена корреляция между длинами соседних интронов в генах животных. Seoighe и Korir [63] показали консервативность суммарной длины интронов в генах эмбрионального развития у млекопитающих.

Длина интрона может оказывать влияние как на регуляцию экспрессии гена, так и на скорость эволюции данного гена. Щепеткова и Гельфанд [64] исследовали корреляцию между сигналами сплайсинга и длинами прилегающих экзонов и интронов. Было показано, что информационное содержание сайтов сплайсинга в генах *Caenorabditis elegans* и *Drosophila melanogaster* зависит от длины прилегающего интрона. Marais et al. [65] и Wu и Hurst [66] исследовали негативную корреляцию между длиной интрона и строгостью эволюционного отбора на уровне аминокислотных последовательностей. Существование негативной корреляции между внутривидовой дивергенцией и длиной интрона у *Drosophila melanogaster* и *Drosophila simulans* было показано Haddrill et al. [67], подтвердившими, что длинные интроны эволюционируют медленнее, чем короткие. Коэволюцию длины интронов можно наблюдать в коэкспрессирующихся генах и в генах, чьи продукты образуют единый белковый комплекс. Наиболее наглядно это можно увидеть в генах, участвующих в клеточном цикле [68].

По утверждению Pozzoli et al. [69] длина интрона и межгенных участков, сама по себе, не играет адаптивной роли в регуляции экспрессии генов, а отражает необходимость сохранения консервативных интронных элементов. Хотя количество некодирующих функциональных элементов может объяснить изменение размера генома, было показано, что на высоко экспрессированные интроны воздействует дополнительное давление, снижающее стоимость их транскрипции. С другой стороны, факт того, что в высоко экспрессируемых генах находятся маленькие интроны, подтверждает гипотезу о транскрипционной эффективности и/или экономии [70, 71]. Косвенным свидетельством может являться исследование [72], в котором было показано, что рептилии и птицы имеют более короткие интроны, чем млекопитающие, и что длина интрона у нелетающих птиц длиннее, чем у летающих, которые тратят большое количество энергии на полет.

Связь между длиной интрона и GC-составом впервые была упомянута Duret et al. [73], проанализировавшими несколько геномов позвоночных: было замечено, что в GC-богатых генах интроны короче. Это наблюдение также подтверждается Versteeg et al. [74]. В то же время в геномах костистых рыб не обнаружили никакой линейной корреляции между длиной интрона и его GC составом [75].

Интересная теория о механизме эволюции длины интрона была предложена Zhang et al. [76]. Авторы показали, что интроны могут ока-

зывать влияние на экспрессию и регуляцию гена посредством взаимодействия с соответствующими последовательностями мРНК. При этом интрон состоит из, как минимум, двух субъединиц (downstream и upstream части), соединенных между собой линкерами. Длина субъединицы довольно консервативна — ~60 п.н., а вот длина линкера может сильно варьировать. Длина всего интрона увеличивается не постепенно, а путем добавления новых структурных субъединиц и линкеров между ними. При этом 5'-область интрона или первая структурная субъединица — это уже зрелая последовательность, в то время как 3'-область — незрелый, т.е. еще эволюционирующий регион. Таким образом, эволюция длины интрона идет от 5' к 3'-концу, создавая новые субъединицы, посредством постепенного умножения фрагментов 3'-области. Интересно, что распределение длины и степень совпадения оптимальных фрагментов согласуются с особенностями последовательностей микроРНК и малой интерферирующей РНК. Эти результаты указывают на то, что взаимодействие между интронами и последовательностями мРНК является разновидностью функционального взаимодействия РНК–РНК [77]. В то же время интроны и мРНК, по-видимому, вместе коэволюционируют для успешного выполнения своих биологических функций.

### ФУНКЦИИ ИНТРОНОВ

Наличие интронов в геноме является энергетическим бременем для многих клеток, ведь для транскрипции интронов и их дальнейшего вырезания из пре-мРНК с помощью сложных сплайсосомных механизмов клеткам может потребоваться много энергии. Сохранение интронов в ходе эволюции может быть объяснено только при условии, что преимущества наличия интронов превосходят их негативное влияние на энергетические затраты. Однако, согласно исследованию Lynch [78], интроны — это просто эгоистичные ДНК, заселившие белок-кодирующие гены в эукариотических геномах и сумевшие сохраниться из-за эффекта бутылочного горлышка в популяциях. Тем не менее интроны все же могут давать некоторые преимущества в качестве мутационного буфера в эукариотических геномах, защищая кодирующие последовательности от воздействия случайно возникающих вредных мутаций. Так как интроны в среднем гораздо длиннее экзонов, большинство случайно встречающихся мутаций в генах попадают в интроны и не влияют на последовательности и функции белка. Надо признать, что остает-

ся неясным, насколько буферный эффект последовательностей интрона более выигрышен с точки зрения эволюционного преимущества над энергетическим бременем.

В последнее время во многих исследованиях описываются свидетельства преимуществ, приносимых интронами в эукариотические клетки, для оправдания всех энергетических затрат. В обзоре Jo и Choi [79] функциональные роли интронов разделены на две категории: прямые (такие как регуляция АС, усиление экспрессии генов, контроль транспорта мРНК или сборки хроматина) и непрямые (например, наличие в интронах связанных с признаком однонуклеотидных полиморфизмов или разных генов некодирующих функциональных РНК; изменение длины интрона в вопросе эффективности естественного отбора).

Основную функцию интронов часто связывают с возникновением АС: хотя интроны не вносят непосредственного вклада в протеом, одно их присутствие позволяет увеличить потенциально возможное количество продуктов белок-кодирующих генов благодаря альтернативному сплайсингу.

У многих эукариот, включая млекопитающих, растения, дрожжи и насекомых, интроны могут влиять на экспрессию генов даже при отсутствии сайта связывания для транскрипционных факторов. Этот феномен был назван «интрон-опосредованным усилением экспрессии» [80]. Само присутствие интронов влияет не только на скорость транскрипции, но также на стабильность мРНК и на ее экспорт из ядра. Более того, интроны также могут увеличить эффективность трансляции мРНК [80]. Например, Lim et al. [81] предсказали эффективность трансляции по наличию экзон-интронной структуры в 5'-нетранслируемой области гена.

Вырезанные из пре-мРНК последовательности интронов, по сути, являются нк-РНК, которые быстро разрушаются. Однако, согласно последним исследованиям [82, 83], такие вырезанные интроны успевают быть задействованными в TOR связанной сети сигнала роста в *Saccharomyces cerevisiae*. Систематическое удаление всех известных интронов в генах почкующихся дрожжей указывает на то, что в большинстве случаев клетки с делецией интронов разрушаются при истощении питательных веществ быстрее, чем нормальные клетки. Таким образом, интроны оказываются медиаторами клеточного ответа при голодании.

Длинные интроны, особенно в 5'-области, часто обогащены регуляторными элементами и, таким образом, могут являться предметом отбора [42, 84]. Некоторые интроны содержат не

только различные регуляторные элементы, но и последовательности, участвующие в формировании структуры хроматина, хотя остается неясным, есть ли существенные отличия в таком обогащении регуляторных и структурных элементов между последовательностью интрона и другими нк-ДНК [85]. В состав многих интронов также часто входят разнообразные гены нк-РНК, особенно много генов малой ядрышковой РНК [86] и генов — предшественников микроРНК [87].

В 2013 г. Vakhrusheva et al. [88] на ортологических интронах человека, мыши и рыб, иглобрюха и фугу, рассматривали связь длины интрона, его возможных функций и эволюции. Было показано, что если у интрона есть некий консервативный или регуляторный участок, то его ортолог тоже, скорее всего, будет иметь консервативный или регуляторный участок, даже если последовательности совершенно различаются. Также интроны с сохранившимися консервативными участками имеют большую длину, чем те их ортологи, которые эти участки потеряли.

Известны случаи, когда внутри последовательности интрона находятся отдельные белок-кодирующие гены. Такие вложенные гены были найдены у многих эукариотических организмов и встречаются относительно часто: у человека известно, как минимум, 158 белок-кодирующих генов, расположенных внутри интронов [89], а у плодовой мухи количество вложенных генов составляет почти 10% от общего числа генов [89]. При этом функционально ген-хозяин и вложенный ген могут быть совсем не связаны, их экспрессионные профили также могут мало коррелировать [90]. Сравнительный анализ вложенных генов у нематод, плодовых мух и позвоночных показал, что в ходе эволюции таких генов становится все больше, и их накопление увеличивает сложность организации геномов [91].

Суммируя вышенаписанное, сплайсосомные интроны, исторически относящиеся к «мусорной» ДНК, играют важную роль в жизни многих эукариотических клеток, и их закрепление в генах в ходе эволюции больше не вызывает удивления. Эволюция сплайсосомных интронов неразрывно связана с эволюцией экзон-

интронной структуры эукариотических генов, которая была предметом длительных и интенсивных научных споров. Наиболее актуальная теория происхождения сплайсосомных интронов предполагает, что они образовались из самосплайсирующихся интронов группы II, содержащихся в альфа-протеобактериальном предке митохондрии при заселении древнего предка эукариотических организмов, и с тех пор происходит как постепенная потеря интронов, так и их появление. При этом молекулярные механизмы потери и приобретения интронов могут отличаться у разных организмов. Третье эволюционное событие — слайдинг интронов — случается столь редко, что все еще есть сомнения в его достоверности.

Несмотря на то, что последовательность интрона крайне изменчива в связи со слабым действием отрицательного отбора, такие его характеристики, как фаза и длина, могут обладать неожиданной консервативностью и, в случае длин, могут даже влиять на регуляцию транскрипции.

Хотя основной функцией интронов считается создание потенциала для появления новых вариантов белка, интроны также могут влиять на скорость и эффективность экспрессии гена. Присутствие интронов в генах значительно усложняет не только структуру генома, но и регуляцию связанных с ним процессов, что в итоге создает большую гибкость для адаптации организма и дает достаточно преимуществ над всеми энергическими затратами, потраченными на содержание интронов и их сохранение в ходе эволюции.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-34-00932).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chow, L. T., Gelinis, R. E., Broker, T. R., and Roberts, R. J. (1977) An amazing sequence arrangement at the 5'-ends of adenovirus 2 messenger RNA, *Cell*, **12**, 1-8, doi: 10.1016/0092-8674(77)90180-5.
2. Berget, S. M., Moore, C., and Sharp, P. A. (1977) Spliced segments at the 5'-terminus of adenovirus 2 late mRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3171-3175.
3. Gilbert, W. (1978) Why genes in pieces, *Nature*, **271**, 501, doi: 10.1038/271501a0.
4. Rogozin, I. B., Carmel, L., Csuros, M., and Koonin, E. V. (2012) Origin and evolution of spliceosomal introns, *Biol. Direct.*, **7**, 11, doi: 10.1186/1745-6150-7-11.
5. Luo, M. J., and Reed, R. (1999) Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14937-14942.
6. Patel, A. A., and Steitz, J. A. (2003) Splicing double: insights from the second spliceosome, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 960-970, doi: 10.1038/nrm1259.

7. Patel, A. A., McCarthy, M., and Steitz, J. A. (2002) The splicing of U12-type introns can be a rate-limiting step in gene expression, *EMBO J.*, **21**, 3804-3815, doi: 10.1093/emboj/cdf297.
8. Chorev, M., and Carmel, L. (2012) The function of introns, *Front. Genet.*, **3**, 1-15, doi: 10.3389/fgene.2012.00055.
9. Fedorova, L., and Fedorov, A. (2003) Introns in gene evolution, *Genetica*, **118**, 123-131.
10. Parenteau, J., Durand, M., Morin, G., Gagnon, J., Lucier, J.-F., Wellinger, R. J., Chabot, B., and Abou Elela, S. (2011) Introns within ribosomal protein genes regulate the production and function of yeast ribosomes, *Cell*, **147**, 320-331, doi: 10.1016/j.cell.2011.08.044.
11. Cannone, J. J., Subramanian, S., Schnare, M. N., Collett, J. R., D'Souza, L. M., Du, Y., Feng, B., Lin, N., Madabusi, L. V., Müller, K. M., Pande, N., Shang, Z., Yu, N., and Gutell, R. R. (2002) The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs, *BMC Bioinformatics*, **3**, 2.
12. Lane, C. E., van den Heuvel, K., Kozera, C., Curtis, B. A., Parsons, B. J., Bowman, S., and Archibald, J. M. (2007) Nucleomorph genome of *Hemiselms andersenii* reveals complete intron loss and compaction as a driver of protein structure and function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 19908-19913, doi: 10.1073/pnas.0707419104.
13. Rogers, J. H. (1989) How were introns inserted into nuclear genes? *Trends Genet.*, **5**, 213-216.
14. Cavalier-Smith, T. (1991) Intron phylogeny: a new hypothesis, *Trends Genet.*, **7**, 145-148.
15. Csuros, M., Rogozin, I. B., and Koonin, E. V. (2011) A detailed history of intron-rich eukaryotic ancestors inferred from a global survey of 100 complete genomes, *PLoS Comput. Biol.*, **7**, 1-9, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002150.
16. Sakurai, A., Fujimori, S., Kochiwa, H., Kitamura-Abe, S., Washio, T., Saito, R., Carninci, P., Hayashizaki, Y., and Tomita, M. (2002) On biased distribution of introns in various eukaryotes, *Gene*, **300**, 89-95.
17. Ponjavic, J., Ponting, C. P., and Lunter, G. (2007) Functionality or transcriptional noise? Evidence for selection within long noncoding RNAs, *Genome Res.*, **17**, 556-565, doi: 10.1101/gr.6036807.
18. Parada, G. E., Munita, R., Cerda, C. A., and Gysling, K. (2014) A comprehensive survey of non-canonical splice sites in the human transcriptome, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 16.
19. Pucker, B., and Brockington, S. F. (2018) Genome-wide analyses supported by RNA-Seq reveal non-canonical splice sites in plant genomes, *BMC Genomics*, **19**, 980, doi: 10.1186/s12864-018-5360-z.
20. Alioto, T. S. (2007) U12DB: a database of orthologous U12-type spliceosomal introns, *Nucleic Acids Res.*, **35**, D110-D115, doi: 10.1093/nar/gkl796.
21. Schellenberg, M. J., Ritchie, D. B., and MacMillan, A. M. (2008) Pre-mRNA splicing: a complex picture in higher definition, *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 243-246, doi: 10.1016/j.tibs.2008.04.004.
22. Sverdlov, A. V., Rogozin, I. B., Babenko, V. N., and Koonin, E. V. (2003) Evidence of splice signal migration from exon to intron during intron evolution, *Curr. Biol.*, **13**, 2170-2174, doi: 10.1016/j.cub.2003.12.003.
23. Kim, E., Magen, A., and Ast, G. (2007) Different levels of alternative splicing among eukaryotes, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 125-131, doi: 10.1093/nar/gk1924.
24. Nguyen, H. D., Yoshihama, M., and Kenmochi, N. (2006) Phase distribution of spliceosomal introns: implications for intron origin, *BMC Evol. Biol.*, **6**, 69, doi: 10.1186/1471-2148-6-69.
25. Koonin, E. V. (2009) Intron-dominated genomes of early ancestors of eukaryotes, *J. Hered.*, **100**, 618-623, doi: 10.1093/jhered/esp056.
26. Charlesworth, B. (2009) Fundamental concepts in genetics: effective population size and patterns of molecular evolution and variation, *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 195-205, doi: 10.1038/nrg2526.
27. Fedorov, A., Merican, A. F., and Gilbert, W. (2002) Large-scale comparison of intron positions among animal, plant, and fungal genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16128-16133, doi: 10.1073/pnas.242624899.
28. Carmel, L., Rogozin, I. B., Wolf, Y. I., and Koonin, E. V. (2007) Patterns of intron gain and conservation in eukaryotic genes, *BMC Evol. Biol.*, **7**, 192, doi: 10.1186/1471-2148-7-192.
29. Roy, S. W. (2016) How common is parallel intron gain? rapid evolution versus independent creation in recently created introns in *Daphnia*, *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 1902-1906, doi: 10.1093/molbev/msw091.
30. Mourier, T., and Jeffares, D. C. (2003) Eukaryotic intron loss, *Science*, **300**, 1393, doi: 10.1126/science.1080559.
31. Hong, X., Scofield, D. G., and Lynch, M. (2016) Intron size, abundance, and distribution within untranslated regions of genes, *Mol. Biol. Evol.*, **23**, 2392-2404, doi: 10.1093/molbev/msl111.
32. Sverdlov, A. V., Csuros, M., Rogozin, I. B., and Koonin, E. V. (2007) A glimpse of a putative pre-intron phase of eukaryotic evolution, *Trends Genet.*, **23**, 105-108, doi: 10.1016/j.tig.2007.01.001.
33. Derr, L. K., Strathern, J. N., and Garfinkel, D. J. (1991) RNA-mediated recombination in *S. cerevisiae*, *Cell*, **67**, 355-364, doi: 10.1016/0092-8674(91)90187-4.
34. Lee, S., and Stevens, S. W. (2016) Spliceosomal intronogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 6514-6519, doi: 10.1073/pnas.1605113113.
35. Sverdlov, A. V., Babenko, V. N., Rogozin, I. B., and Koonin, E. V. (2004) Preferential loss and gain of introns in 3' portions of genes suggests a reverse-transcription mechanism of intron insertion, *Gene*, **338**, 85-91, doi: 10.1016/j.gene.2004.05.027.
36. Tarrío, R., Ayala, F. J., and Rodríguez-Trelles, F. (2008) Alternative splicing: a missing piece in the puzzle of intron gain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7223-7228, doi: 10.1073/pnas.0802941105.
37. Rigau, M., Juan, D., Valencia, A., and Rico, D. (2019) Intronic CNVs and gene expression variation in human populations, *PLoS Genet.*, **15**, e1007902, doi: 10.1371/journal.pgen.1007902.
38. Yenerall, P., Krupa, B., and Zhou, L. (2011) Mechanisms of intron gain and loss in *Drosophila*, *BMC Evol. Biol.*, **11**, 364, doi: 10.1186/1471-2148-11-364.
39. Lehmann, J., Eisenhardt, C., Stadler, P. F., and Krauss, V. (2010) Some novel intron positions in conserved *Drosophila* genes are caused by intron sliding or tandem duplication, *BMC Evol. Biol.*, **10**, 156, doi: 10.1186/1471-2148-10-156.
40. Krauss, V., Pecyna, M., Kurz, K., and Sass, H. (2005) Phylogenetic mapping of intron positions: a case study of translation initiation factor eIF2 $\gamma$ , *Mol. Biol. Evol.*, **22**, 74-84, doi: 10.1093/molbev/msh255.
41. Поверенная И. В., Горев Д. Д., Астахова Т. В., Цитович И. И., Яковлев В. В., Ройтберг, М. А. (2017) Слайдинг и вариабельность длины интронов для генов, обогащенных длинными интронами фазы I, *Матем. биология и биоинформ.*, **12**, 302-316, doi: 10.17537/2017.12.302.
42. De Souza, S. J., Long, M., Klein, R. J., Roy, S., Lin, S., and Gilbert, W. (1998) Toward a resolution of the introns early/late debate: only phase zero introns are correlated with the structure of ancient proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5094-5099.

43. Stoltzfus, A., Logsdon, J. M., Palmer, J. D., and Doolittle, W. F. (1997) Intron “sliding” and the diversity of intron positions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10739-10744.
44. Bocco, S. S., and Csűrös, M. (2016) Splice sites seldom slide: intron evolution in oomycetes, *Genome Biol. Evol.*, **8**, 2340-2350, doi: 10.1093/gbe/evw157.
45. Rogozin, I. B., Lyons-Weiler, J., and Koonin, E. V. (2000) Intron sliding in conserved gene families, *Trends Genet.*, **16**, 430-432, doi: 10.1016/s0168-9525(00)02096-5.
46. Fekete, E., Flippi, M., Ag, N., Kavalecz, N., Cerqueira, G., Scaccocchio, C., and Karaffa, L. (2017) A mechanism for a single nucleotide intron shift, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 9085-9092, doi: 10.1093/nar/gkx520.
47. Roesner, A., Fuchs, C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2005) A globin gene of ancient evolutionary origin in lower vertebrates: evidence for two distinct globin families in animals, *Mol. Biol. Evol.*, **22**, 12-20, doi: 10.1093/molbev/msh258.
48. Long, M., de Souza, S. J., Rosenberg, C., and Gilbert, W. (1998) Relationship between “proto-splice sites” and intron phases: evidence from dicodon analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 219-223.
49. Fedorov, A., Suboch, G., Bujakov, M., and Fedorova, L. (1992) Analysis of nonuniformity in intron phase distribution, *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2553-2557.
50. Endo, T., Fedorov, A., de Souza, S. J., and Gilbert, W. (2002) Do introns favor or avoid regions of amino acid conservation? *Mol. Biol. Evol.*, **19**, 521-522, doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004107.
51. Gilbert, W., de Souza, S. J., and Long, M. (1997) Origin of genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7698-7703.
52. Logsdon, J. M. (1998) The recent origins of spliceosomal introns revisited, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**, 637-648.
53. Long, M., and Deutsch, M. (1999) Association of intron phases with conservation at splice site sequences and evolution of spliceosomal introns, *Mol. Biol. Evol.*, **16**, 1528-1534.
54. Ruvinsky, A., Eskesen, S. T., Eskesen, F. N., and Hurst, L. D. (2005) Can codon usage bias explain intron phase distributions and exon symmetry? *J. Mol. Evol.*, **60**, 99-104, doi: 10.1007/s00239-004-0032-9.
55. Астахова Т. В., Ройтберг М. А., Цитович И. И., Яковлев В. В. (2014) Закономерности, связанные с распределением длин интронов, *Матем. биология и биоинформ.*, **9**, 482-490.
56. Ruvinsky, A., and Ward, W. (2008) Intron framing exonic nucleotides: a compromise between protein coding and splicing constraints, *Open Evol. J.*, **2**, 7-12, doi: 10.2174/1874404400802010007.
57. Halligan, D. L., and Keightley, P. D. (2006) Ubiquitous selective constraints in the *Drosophila* genome revealed by a genome-wide interspecies comparison, *Genome Res.*, **16**, 875-884, doi: 10.1101/gr.5022906.
58. Bradnam, K. R., and Korf, I. (2008) Longer first introns are a general property of eukaryotic gene structure, *PLoS One*, **3**, e3093, doi: 10.1371/journal.pone.0003093.
59. Farlow, A., Dolezal, M., Hua, L., and Schlötterer, C. (2012) The genomic signature of splicing-coupled selection differs between long and short introns, *Mol. Biol. Evol.*, **29**, 21-24, doi: 10.1093/molbev/msr201.
60. Shepard, S., Mc Creary, M., and Fedorov, A. (2009) The peculiarities of large intron splicing in animals, *PLoS One*, **4**, e7853, doi: 10.1371/journal.pone.0007853.
61. Sibley, C. R., Emmett, W., Blazquez, L., Faro, A., Haberman, N., Briese, M., Trabzuni, D., Ryten, M., Weale, M. E., Hardy, J., Modic, M., Curk, T., Wilson, S. W., Plagnol, V., and Ule, J. (2015) Recursive splicing in long vertebrate genes, *Nature*, **521**, 371-375, doi: 10.1038/nature14466.
62. Vinogradov, A. E. (2006) “Genome design” model: evidence from conserved intronic sequence in human-mouse comparison, *Genome Res.*, **16**, 347-354, doi: 10.1101/gr.4318206.
63. Seoighe, C., and Korir, P. K. (2011) Evidence for intron length conservation in a set of mammalian genes associated with embryonic development, *BMC Bioinformatics*, **12**, Suppl. 9, S16, doi: 10.1186/1471-2105-12-S9-S16.
64. Шепеткова И. Л., Гельфанд М. С. (1997) Некоторые статистические особенности сайтов сплайсинга позвоночных и беспозвоночных, *Биофизика*, **42**, 82-89.
65. Marais, G., Nouvellet, P., Keightley, P. D., and Charlesworth, B. (2005) Intron size and exon evolution in *Drosophila*, *Genetics*, **170**, 481-485, doi: 10.1534/genetics.104.037333.
66. Wu, X., and Hurst, L. D. (2015) Why selection might be stronger when populations are small: intron size and density predict within and between-species usage of exonic splice associated cis-motifs, *Mol. Biol. Evol.*, **32**, 1847-1861, doi: 10.1093/molbev/msv069.
67. Haddrill, P. R., Charlesworth, B., Halligan, D. L., and Andolfatto, P. (2005) Patterns of intron sequence evolution in *Drosophila* are dependent upon length and GC content, *Genome Biol.*, **6**, R67, doi: 10.1186/gb-2005-6-8-r67.
68. Keane, P. A., and Seoighe, C. (2016) Intron length coevolution across mammalian genomes, *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 2682-2691, doi: 10.1093/molbev/msw151.
69. Pozzoli, U., Menozzi, G., Comi, G. P., Cagliani, R., Bresolin, N., and Sironi, M. (2007) Intron size in mammals: complexity comes to terms with economy, *Trends Genet.*, **23**, 20-24, doi: 10.1016/j.tig.2006.10.003.
70. Castillo-Davis, C. I., Mekhedov, S. L., Hartl, D. L., Koonin, E. V., and Kondrashov, F. A. (2002) Selection for short introns in highly expressed genes, *Nat. Genet.*, **31**, 415-418, doi: 10.1038/ng940.
71. Rao, Y. S., Wang, Z. F., Chai, X. W., Wu, G. Z., Zhou, M., Nie, Q. H., and Zhang, X. Q. (2010) Selection for the compactness of highly expressed genes in *Gallus gallus*, *Biol. Direct*, **5**, 35, doi: 10.1186/1745-6150-5-35.
72. Zhang, Q., and Edwards, S. V. (2012) The evolution of intron size in amniotes: a role for powered flight? *Genome Biol. Evol.*, **4**, 1033-1043, doi: 10.1093/gbe/evs070.
73. Duret, L., Mouchiroud, D., and Gautier, C. (1995) Statistical analysis of vertebrate sequences reveals that long genes are scarce in GC-rich isochores, *J. Mol. Evol.*, **40**, 308-317, doi: 10.1007/bf00163235.
74. Versteeg, R., van Schaik, B. D. C., van Batenburg, M. F., Roos, M., Monajemi, R., Caron, H., Bussemaker, H. J., and van Kampen, A. H. C. (2003) The human transcriptome map reveals extremes in gene density, intron length, GC content, and repeat pattern for domains of highly and weakly expressed genes, *Genome Res.*, **13**, 1998-2004, doi: 10.1101/gr.1649303.
75. Chaurasia, A., Tarallo, A., Bernà, L., Yagi, M., Agnisola, C., and D’Onofrio, G. (2014) Length and GC content variability of introns among teleostean genomes in the light of the metabolic rate hypothesis, *PLoS One*, **9**, e103889, doi: 10.1371/journal.pone.0103889.
76. Zhang, Q., Li, H., Zhao, X.-Q., Xue, H., Zheng, Y., Meng, H., Jia, Y., and Bo, S.-L. (2016) The evolution mechanism of intron length, *Genomics*, **108**, 47-55, doi: 10.1016/j.ygeno.2016.07.004.
77. Sathe, L., Bolinger, C., Mannan, M. A., Dever, T. E., and Dey, M. (2015) Evidence that base-pairing interaction between intron and mRNA leader sequences inhibits initiation of HAC1 mRNA translation in yeast, *J. Biol. Chem.*, **290**, 21821-21832, doi: 10.1074/jbc.M115.649335.
78. Lynch, M. (2002) Intron evolution as a population-genetic process, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 6118-6123, doi: 10.1073/pnas.092595699.

79. Jo, B.-S., and Choi, S. S. (2015) Introns: the functional benefits of introns in genomes, *Genomics Inform.*, **13**, 112-118, doi: 10.5808/GI.2015.13.4.112.
80. Shaul, O. (2017) How introns enhance gene expression, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **91**, 145-155, doi: 10.1016/j.biocel.2017.06.016.
81. Lim, C. S., T Wardell, S. J., Kleffmann, T., and Brown, C. M. (2018) The exon-intron gene structure upstream of the initiation codon predicts translation efficiency, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 4575-4591, doi: 10.1093/nar/gky282.
82. Parenteau, J., Maignon, L., Berthoumieux, M., Catala, M., Gagnon, V., and Abou Elela, S. (2019) Introns are mediators of cell response to starvation, *Nature*, **565**, 612-617, doi: 10.1038/s41586-018-0859-7.
83. Morgan, J. T., Fink, G. R., and Bartel, D. P. (2019) Excised linear introns regulate growth in yeast, *Nature*, **565**, 606-611, doi: 10.1038/s41586-018-0828-1.
84. Majewski, J., and Ott, J. (2002) Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome, *Genome Res.*, **12**, 1827-1836, doi: 10.1101/gr.606402.
85. Glazko, G. V., Koonin, E. V., Rogozin, I. B., and Shabalina, S. A. (2003) A significant fraction of conserved noncoding DNA in human and mouse consists of predicted matrix attachment regions, *Trends Genet.*, **19**, 119-124, doi: 10.1016/S0168-9525(03)00016-7.
86. Tycowski, K. T., Shu, M. D., and Steitz, J. A. (1993) A small nucleolar RNA is processed from an intron of the human gene encoding ribosomal protein S3, *Genes Dev.*, **7**, 1176-1190.
87. Rearick, D., Prakash, A., McSweeney, A., Shepard, S. S., Fedorova, L., and Fedorov, A. (2011) Critical association of ncRNA with introns, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 2357-2366, doi: 10.1093/nar/gkq1080.
88. Vakhrusheva, O. A., Bazykin, G. A., and Kondrashov, A. S. (2013) Genome-level analysis of selective constraint without apparent sequence conservation, *Genome Biol. Evol.*, **5**, 532-541, doi: 10.1093/gbe/evt023.
89. Kumar, A. (2009) An overview of nested genes in eukaryotic genomes, *Eukaryot. Cell*, **8**, 1321-1329, doi: 10.1128/EC.00143-09.
90. Lee, Y. C. G., and Chang, H.-H. (2013) The evolution and functional significance of nested gene structures in *Drosophila melanogaster*, *Genome Biol. Evol.*, **5**, 1978-1985, doi: 10.1093/gbe/evt149.
91. Assis, R., Kondrashov, A. S., Koonin, E. V., and Kondrashov, F. A. (2008) Nested genes and increasing organizational complexity of metazoan genomes, *Trends Genet.*, **24**, 475-478, doi: 10.1016/j.tig.2008.08.003.

## SPLICEOSOMAL INTRONS: FEATURES, FUNCTIONS, AND EVOLUTION

### Review

I. V. Poverennaya<sup>1,2\*</sup> and M. A. Roytberg<sup>2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia; E-mail: ipoverennaya@gmail.com

<sup>2</sup> Institute of Mathematical Problems of Biology RAS — the Branch of Keldysh Institute of Applied Mathematics of Russian Academy of Sciences, 142290 Puschino, Moscow Region, Russia

<sup>3</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

<sup>4</sup> National Research University, Higher School of Economics, 101000 Moscow, Russia

Received March 26, 2020

Revised May 25, 2020

Accepted May 25, 2020

Spliceosomal introns contained in most eukaryotic genes are non-coding sequences excised from pre-mRNA by a special complex called spliceosome during mRNA splicing. Introns occur in both protein-coding and RNA-coding genes, and even more, can be found in the coding and untranslated regions of genes. Due to a high rate of polymorphism, the intron sequences may vary greatly and intron function used to be associated only with its presence for alternative splicing. Therefore, intron evolution has been seen not as the evolution of an individual genome element, but rather as the evolution of a gene intron-exon structure. Here we review the intron origin theories: evolutionary events in the exon-intron structure such as intron gain, loss, and sliding; intron functions known to date; and how changes of such intron features as length and phase can affect the regulation of processes involving genes.

**Keywords:** spliceosomal introns, intron phase, intron length, evolution, sliding, exon-intron-structure

УДК 577.2;616-006

## ИНАКТИВАЦИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРОВ ВСЛЕДСТВИЕ МУТАЦИЙ В СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЯХ

### Обзор

© 2020 М.В. Немцова<sup>1,2</sup>, Д.С. Михайленко<sup>1,2\*</sup>, Е.Б. Кузнецова<sup>1</sup>,  
И.И. Быков<sup>1</sup>, А.А. Замятнин (мл.)<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет),  
119991 Москва, Россия; электронная почта: dimserg@mail.ru

<sup>2</sup> ФГБНУ Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, 115478 Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.04.2020

После доработки 19.05.2020

Принята к публикации 19.05.2020

Основные события канцерогенеза связаны с соматическими мутациями в онкогенах и генах-супрессорах – событиями, представляющими собой изменение нуклеотидной последовательности ДНК. Не меньшую роль в развитии новообразований играют эпигенетические изменения, выражающиеся в aberrантном метилировании ДНК, модификациях гистоновых белков и перестройке структуры хроматина. В связи с этим особый интерес вызывают мутации в генах, которые кодируют ключевые участники эпигенетической регуляции: ферменты, метилирующие/деметирующие ДНК; ферменты, ковалентно присоединяющие или снимающие регуляторные метки с гистонов; компоненты мультипротеиновых комплексов ремоделирования нуклеосомы; вспомогательные белки и кофакторы указанных выше типов молекул. В настоящем обзоре описаны как герминальные, так и в большей мере соматические мутации основных эпигенетических регуляторов в солидных опухолях у человека, а также рассмотрены функциональные последствия этих мутаций на клеточном уровне. Отдельно охарактеризованы клинические ассоциации соматических мутаций в эпигенетических регуляторах, ДНК-диагностика врожденных онкологических синдромов при герминальных мутациях SMARCB1-белков, а также препараты для химиотерапии солидных новообразований, прямо воздействующие на измененные эпигенетические регуляторы. Обзор ориентирован на широкий круг молекулярных биологов, генетиков, онкологов и смежных специалистов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** мутация, ремоделирование хроматина, модификация гистонов, ген-супрессор, метилирование ДНК.

DOI: 10.31857/S0320972520070027

### ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные новообразования составляют существенную часть социально-значимых заболеваний, а также причин инвалидизации и смертности у человека. Согласно обобщенным статистическим данным, в 2018 г. в мире зарегистрировали ~18,1 млн впервые выявленных случаев онкозаболеваний и 9,6 млн смертей от них [1]. В России эти показатели в 2018 г. составили

624 тыс. и 293 тыс. соответственно [2]. Остаются актуальными исследования механизмов канцерогенеза и поиск новых диагностических и прогностических молекулярных маркеров, которые позволили бы расширить возможности лабораторной диагностики и лечения в онкологии, в том числе с применением молекулярно-генетических методов.

В основе канцерогенеза лежат генетические и эпигенетические изменения, которые приводят к изменениям в функционировании основных протоонкогенов и генов-супрессоров, модифицируют работу ключевых внутриклеточных сигнальных путей, регулирующих в норме клеточную пролиферацию. В большинстве генетических работ исследователи фокусируются на изучении онкогенов и генов-супрессоров, как основных регуляторов клеточной пролифера-

Принятые сокращения: ВПС – высокопроизводительное секвенирование, miРНК – малые интерферирующие РНК, нкРНК – длинные некодирующие РНК, НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого, РМЖ – рак молочной железы, РМП – рак мочевого пузыря, РПЖ – рак предстательной железы.

\* Адресат для корреспонденции.

ции, идентифицируют и характеризуют мутации в этих генах [3, 4]. Вместе с тем во многих типах опухолей описаны драйверные мутации в генах, отвечающих за дифференцировку клеток, организацию внеклеточного матрикса и опухолевого микроокружения, энергетический метаболизм и другие функции, не относящиеся непосредственно к регуляции прохождения клеточного цикла [5–8]. Отдельного внимания заслуживают гены, кодирующие участников эпигенетической регуляции генной экспрессии. Часть из них не охарактеризованы как классические онкогены или гены-супрессоры, и на протяжении предшествующих десятилетий исследователи уделяли им меньше внимания. Однако в последние годы показано, что 20–50% генов ремоделирования хроматина, метилирования ДНК, модифицирования гистонов и других эпигенетических регуляторов мутируют в процессе канцерогенеза [9–11]. Изучение функций этих генов в норме и значение обнаруженных в них мутаций для канцерогенеза может привести к более глубокому пониманию развития солидных опухолей у человека и формированию новых групп диагностических и прогностических молекулярных маркеров.

### МЕХАНИЗМЫ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

В общем виде эпигенетическими модификациями называют такие молекулярные изменения, которые приводят к изменению экспрессии генов без нарушения кодирующей последовательности ДНК. Это довольно широкое определение с некоторой долей условности; например, регулирование экспрессии генов конечными эффекторными звеньями в сигнальных путях факторов роста или воздействие на гормоночувствительные элементы в промоторе традиционно не рассматривают в качестве эпигенетических событий. В основном к эпигенетическому уровню регуляции относят изменения, которые влияют на конденсацию и структуру хроматина. Эти модификации хроматина определяют доступность энхансеров, промоторов и других важных для транскрипции участков гена для регуляторных белков. Выделяют четыре механизма эпигенетической регуляции: метилирование/деметилирование ДНК, модификация гистонов, ремоделирование нуклеосом и действие некодирующих РНК [12]. Несмотря на обратимый характер эпигенетических модификаций, все эти механизмы регулируют структуру хроматина и создают устойчивые закономерности экспрессии генов в клетках, причем паттерн ме-

тилирования ДНК может наследоваться в ряду митотических делений. С точки зрения патологии человека и значимости для медицинской генетики нарушения эпигенетической регуляции представляют наибольший интерес при болезнях импринтинга (синдромах Прадера–Вилли, Ангельмана и Видемана–Беквита) и других аномалиях развития, проявляющихся в раннем детском возрасте и возникающих вследствие ошибок время- и тканеспецифического паттерна экспрессии генов [13], а также при канцерогенезе. В последние годы показано, что нарушение всех четырех эпигенетических механизмов (аномальное метилирование ДНК, ковалентные модификации гистонов, изменение профиля некодирующих РНК, ремоделирование нуклеосом) часто происходит в солидных опухолях различных патоморфологических типов. Нарушение эпигенетической регуляции играет значительную роль в развитии первичной опухоли, ее прогрессии и метастазировании [14].

Если рассматривать регуляцию экспрессии на уровне РНК, то эпигенетические механизмы представлены в этом отношении малыми интерферирующими РНК (миРНК) и действием длинных некодирующих РНК (нкРНК). Первые из них – миРНК – являются короткими РНК длиной 19–25 н., которые специфическим образом подавляют экспрессию генов посредством связывания с таргетной мРНК и ее последующей деградации. Гены миРНК локализованы преимущественно в интронах структурных генов, реже – в их кодирующих последовательностях. Причем 98 из 186 ассоциированных с канцерогенезом генов миРНК локализованы в нестабильных участках генома, подверженных амплификации, делеции, разрывам и воссоединениям – все это вносит вклад в изменение паттерна экспрессии миРНК наряду с влиянием функциональных регуляторов [15]. В частности, амплификация *miR-30d* и делеция *miR-200b* ассоциированы с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) [16]. Такие комплексные изменения экспрессионного ландшафта миРНК при нарастании нестабильности генома описаны в тройном негативном раке молочной железы (РМЖ), опухолях головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциноме и других опухолях [15, 17, 18].

Второй класс регуляторных РНК, осуществляющих эпигенетическую регуляцию, представлен длинными нкРНК – молекулами РНК длиной более 200 н., которые не кодируют белок. В цитоплазме нкРНК препятствуют деградации мРНК, а в ядре осуществляют свои функции через механизмы посттрансляционной модификации белков – эпигенетических регуляторов, участвуют в модификации гистонов и мети-

лировании ДНК, ремоделировании хроматина. В частности, длинная нкРНК *HOTAIR*, транскрибируемая с локуса *HOXC*, взаимодействует с *PRC2*, способствует метилированию гистона H3 ( $H3K27me3$ ) и эпигенетическому сайленсингу локуса *HOXD* в РМЖ. Аналогичным образом через  $H3K27me3$  действует длинная нкРНК *LUCAT1* в отношении промоторов генов-супрессоров при НМРЛ и нкРНК *TUG1* – в глиомах. Локализованная внутри третьего CpG-островка гена-супрессора *TCF21* длинная нкРНК *TARID* участвует в деметилировании ДНК. *TARID* транскрибируется в обратном направлении, затем связывается с фактором репарации *GADD45A*, обладающим деметилирующей активностью, белками *TDG* и *TET*, после чего сформировавшийся комплекс узнает промотор *TCF21* и снимает его гиперметилированное состояние, что может снижать способность опухоли к прогрессии; эти исследования были выполнены на плоскоклеточных карциномах головы и шеи. Другой пример негативной регуляции – конкуренция за связывание с энхансером промоторов гена длинной нкРНК *PVT1* и онкогена *MYC* при РМЖ. Измененные профили экспрессии длинных нкРНК показаны при многих солидных опухолях: РМЖ, раке предстательной железы (РПЖ), НМРЛ, опухолях головы и шеи, колоректальном раке, раке пищевода и других опухолях у человека [19–22]. Однако нарушения эпигенетической регуляции на уровне миРНК и длинных нкРНК характеризуются в большей мере измененным паттерном экспрессии с разной воспроизводимостью у различных исследователей, а не точковыми мутациями в кодирующих их генах. Иным образом обстоит дело со структурными генами, кодирующими белки – эпигенетические регуляторы, реализующие свое действие непосредственно на уровне геномной ДНК и ее упаковки в хромосомах.

Использование высокопроизводительного секвенирования (ВПС) для анализа опухолевого экзона позволило выявить точковые мутации в генах, кодирующих эпигенетические факторы и хроматин-модифицирующие ферменты, в солидных опухолях у человека с частотой, которая сопоставима с онкогенами и генами-супрессорами. Поскольку эпигенетические нарушения являются ключевыми событиями канцерогенеза и возникают уже в предраковых изменениях и на ранних стадиях развития первичной опухоли, вопрос о механизмах, приводящих к этим изменениям, остается одним из наиболее актуальных в молекулярной онкогенетике [3]. Точковые соматические мутации в кодирующей последовательности генов эпигенетических регуляторов могут приводить к эпигенетическим изменени-

ям в геноме в целом и оказывать существенное влияние на инициацию развития новообразований. С помощью ВПС опухолевых экзотов обнаружены мутации в генах метилирования/деметилирования ДНК, регуляторов структуры хроматина *SMARCA4*, *PBRM1*, *ARID1A*, *ARID2*, *ARID1B*, *DNMT3A*, *TET2*, *MLL1/2/3*, *NSD1/2*, *SETD2*, *EZH2*, *BRD4* [23]. С точки зрения функциональных последствий мутаций можно условно выделить следующие группы генов эпигенетической регуляции: метилирования CpG-островков геномной ДНК, ковалентной модификации гистоновых белков, комплексов ремоделирования нуклеосом.

### МУТАЦИИ В ГЕНАХ, РЕГУЛИРУЮЩИХ МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК

Метилированием ДНК у человека называют присоединение метильной группы к цитозину в 5'-положении пиримидинового кольца. Эта модификация может быть осуществлена по отношению к цитозину, входящему в CpG-динуклеотид. В 5'-регуляторных районах и промоторах 70% генов у человека находятся скопления CpG-динуклеотидов, называемые CpG-островками (участок длиной не менее 200 п.н. с отношением наблюдаемого к ожидаемому количеству CpG-пар, превышающему 60%) [24]. Метилирование CpG-островков – основной механизм эпигенетического сайленсинга генов. Гиперметилированные последовательности привлекают метилцитозин-связывающие белки, затем гистоновые деацетилазы и их корепрессоры, которые вместе формируют конденсированную, транскрипционно не активную структуру хроматина. При метилировании ДНК донором метильной группы служит S-аденозилметионин, а саму реакцию осуществляют ферменты ДНК-метилтрансферазы; при этом метилирование ДНК в клетках носит обратимый характер. Мутации в генах, являющихся ключевыми участниками процессов метилирования или деметилирования ДНК, могут влиять на активность онкогенов и генов-супрессоров как через изменение доступности их промоторов для транскрипционных факторов, так и посредством конденсации/деконденсации хроматина на более протяженных участках, включающих эти гены. В целом, при канцерогенезе наблюдают локальное гиперметилирование CpG-островков в промоторах генов-супрессоров и тотальное гипометилирование генома, что повышает его нестабильность [25]. Гиперметилирование генов-супрессоров описано практически при всех солидных опухолях человека (табл. 1), для неко-

Таблица 1. Часто гиперметилированные гены в опухолях у человека

| Опухоль                      | Гиперметилированные гены   | Ссылка       |
|------------------------------|--|--------------|
| Меланома                     | <i>RASSF1, MLH1</i>  | [26]         |
| Немелкоклеточный рак легкого | <i>MGMT, RARB, DAPK1, KCNIP4, ZEB2, FOXF1, PTPRN2, CDKN2A, RASSF1, GSTP1, APC, SHOX2*, CDH13</i>   | [27, 28]     |
| Плоскоклеточные карциномы    | <i>RASSF1, DAPK1, CDKN2A, PTEN, MGMT, CDH1, PAX1/5, FANCB, FOXI2, NEIL1, SALL3, AGTR1, LXN, ZNF154, NDN, MINT1/2, HOXA9, SFRP1, PTPRD, CLDN11, TIMP3</i>         | [16, 27, 29] |
| Рак мочевого пузыря          | <i>NPTX2, ZIC4, MGMT, GDF15, HOXA9, VIM*, MSH6, TBX2/3, CCND2, CDKN2A/B, TWIST1*, NID2*, ONECUT2*, CCNA1*, BCL2*, EOMES*, PRSS3, SOX1*, IRAK3*, RASSF1, HIC1</i> | [30, 31]     |
| Светлоклеточный рак почки    | <i>VHL, RASSF1*, FHIT, BNC1, FBN2, SFRP1, APC, RARB*, CDH1, PTGS2</i>  | [28, 31, 32] |
| Рак простаты                 | <i>GSTP1*, APC*, RARB*, CDKN2A, MGMT, PTGS2, RPRM, TIG1, CD44</i>  | [28, 33]     |
| Колоректальный рак           | <i>APC, VIM*, MGMT, SEPTIN9*, BMP3, NDRG4, MLH1, SEPT9, ZNF331</i>   | [16, 28]     |
| Рак молочной железы          | <i>ITIH5, DKK3, RASSF1, BRCA1, PTEN, PITX2, PSAT1, CDO1, GHSR</i>  | [28, 34, 35] |
| Рак яичников                 | <i>BRCA1, PTEN, HIC1, CDH1, APC, MLH1, HIC1</i>  | [36]         |
| Рак шейки матки              | <i>MLH1/3, MGMT, BRCA1, FANCF</i>  | [36]         |
| Рак щитовидной железы        | <i>DAPK, PTEN, RARB, RAPIGAP, RASSF1A, SLC5A8, TIMP3</i>   | [37]         |
| Рак желудка                  | <i>CDKN2A, CDH1/6, RASSF1, XAF1, SFRP1/2</i>   | [38]         |
| Глиомы                       | <i>MGMT, XRCC5, ATM</i>  | [39]         |

Примечание. \* Гены, гиперметилирование которых определяют в составе диагностических тест-систем; полужирным шрифтом выделены гены, гиперметилирование которых высокоспецифично для данного типа опухоли.

торых генов — с частотой более 90%, что позволяет использовать их в качестве диагностических маркеров заболевания [26–39]. Вместе с тем использование профилей метилирования для диагностики имеет ограничения в силу разного уровня метилирования различных участков 5'-регуляторных районов и невысокой специфичности метилирования генов-супрессоров по отношению к конкретному патоморфологическому типу опухоли.

ДНК-метилтрансферазы кодируются семейством генов *DNMT*. Продукты генов *DNMT3A* и *DNMT3B* осуществляют метилирование *de novo*, тогда как основным ферментом, ответственным за поддержание паттерна метилирования ДНК после репликации, является ДНК-метилтрансфераза 1, которая связывается с гемиметилированными молекулами ДНК и кодируется геном *DNMT1* [40]. Первоначально соматические мутации в генах ДНК-метилтрансфераз были изучены не в солидных опухолях, а при онкогематологических заболеваниях. Так, 11% пациентов с Т-клеточной лимфомой несут мутации

*DNMT3A*, которые в 70% случаев сосуществуют с мутациями *TET2*, участвующими в окислении метилцитозина и деметилировании ДНК; такие случаи сочетанных мутаций могут быть чувствительны к деметилирующим агентам [41]. При остром миелолейкозе мутации *DNMT3A* встречались в 23% случаев и были ассоциированы со снижением общей выживаемости [42]. Онкогенная роль мутаций *DNMT3A* подтверждена на модельных организмах: мыши с нокаутом гомологичного гена *Dnmt3a* имели нарушения дифференцировки гемопоэтических клеток, что вместе с мутациями *c-Kit* приводило к их усиленной пролиферации (предлейкемическому фенотипу) [43].

В это же время были получены результаты, свидетельствующие о гиперэкспрессии ферментов *DNMT1*, *DNMT3A* и *DNMT3B* в различных солидных опухолях у человека, ассоциированной с прогрессией новообразований. Например, гиперэкспрессия *DNMT1* ассоциирована с aberrантным метилированием ДНК, метастазированием в лимфатические узлы и неблагоприятно

ятым прогнозом у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой [44]. Повышенная экспрессия DNMT3B связана с высоким уровнем интенсивно метилированного фенотипа – CpG island methylator phenotype) и прогрессией опухоли при колоректальном раке [45].

Соматические мутации в генах ДНК-метилтрансфераз в солидных опухолях были описаны в основном в раке легких, РПЖ и колоректальном раке [46]. Мутации DNMT3A также были выявлены в 1,2% случаев папиллярной тиреокарциномы, где они были ассоциированы с неблагоприятным прогнозом [47]. Из трех генов ДНК-метилтрансфераз в солидных опухолях точковые мутации встречаются в основном в DNMT3A. В настоящее время описано более 70 миссенс-мутаций, ассоциированных с пролиферацией и формированием колоний, миграцией и нарушениями дифференцировки несущих их клеток. Эти мутации распределены по всей кодирующей части гена, однако в DNMT3A описана горячая точка мутагенеза – кодон 882, в нем встречаются мутации R882H/C/P. Мутации в кодоне 882 меняют структуру каталитического домена ДНК-метилтрансферазы, они ассоциированы со всеми перечисленными выше онкогенными свойствами миссенс-мутаций DNMT3A [46].

Функция метилирования ДНК как эпигенетического регулятора зависит не только от ДНК-метилтрансфераз, но и в немалой мере от метилцитозин-связывающих белков, среди которых основным участником распознавания метилированной ДНК является MBD1. Он способен специфически связываться с метилированной ДНК, привлекать другие белки-репрессоры и подавлять транскрипцию с промоторов метилированных генов. Точковые соматические мутации MBD1, затрагивающие метилцитозин-связывающий домен, определены в раке легкого, колоректальном раке, эндометриоидном раке и раке поджелудочной железы; MBD2 и MBD3 – в некоторых клеточных линиях колоректального и эндометриоидного рака соответственно; мутации сдвига рамки считывания MBD4 – в широком спектре новообразований с микросателлитной нестабильностью (MSI – microsatellite instability); возможно, в этом случае их можно рассматривать как мутации-пассажиры. Внимание исследователей резистентности опухолей к терапии привлекает вовлеченный в процесс репарации ДНК MBD1. Его инактивация может быть связана с ответом на воздействия, вносящие разрывы в ДНК: чувствительности к лучевой терапии и химиотерапии цисплатином [48, 49].

Метилцитозин-связывающие белки и ДНК-метилтрансферазы задействованы в эпигенети-

ческой регуляции путем метилирования геномной ДНК и связанных с этим эффектов, однако немаловажную роль играет обратный процесс – деметилирование ДНК. Ключевым участником деметилирования является метилцитозин-деоксигеназа 2, которая переводит 5-метилцитозин в 5-гидроксиметилцитозин и кодируется геном TET2. Наиболее часто инактивация TET2 встречается при онкогематологических заболеваниях, при которых впервые была детально изучена его функция как гена-супрессора опухолевого роста. Потеря функции TET2 приводит к гиперметилированию ДНК и последующему нарушению генной экспрессии в гемопоэтических стволовых клетках, что рассматривается как начальный этап миелоидной злокачественной трансформации при миелодиспластическом синдроме и остром миелолейкозе, реже при лимфолейкозах [50, 51]. Мутации TET2 встречаются в 30–50% случаев хронического миелолейкоза, 10–30% случаев острого миелолейкоза и миелодиспластического синдрома. Имеются данные не только о деметилирующей, но и о другой биологической функции TET2 – привлечении белков, участвующих в репарации ДНК. Случаи лейкозов с мутацией TET2 более чувствительны к лечению гипометилирующими агентами (ГМА). Учитывая роль белка TET2 в обеспечении стабильности ДНК, потенциальной эффективностью при лечении ГМА-резистентных миелолейкозов могут обладать PARP-ингибиторы [52].

Соматические мутации TET2 были выявлены с помощью ВПС при секвенировании экзонов эндометриоидного рака [53], нейроэндокринных опухолях почек [54], делеции TET2 выявляют примерно в 70% светлоклеточных карцином яичников [55]. При исследовании TET2 в солидных опухолях были обнаружены его дополнительные функции. Показано, что инактивация TET2 приводит к снижению экспрессии каспазы 4, в результате гиперметилирования промотора кодирующего ее гена CASP4, что способствует пролиферации опухолевых клеток линии MCF-7. Иными словами, проапоптотическая каспаза 4 является мишенью для TET2 в клетках РМЖ [56]. Ассоциация инактивации TET2 с гиперметилированием регуляторных районов генов была также продемонстрирована на примере опухолей парашитовидных желез [57]. В другом эксперименте показано, что TET2 активирует сигнальный путь IFN- $\gamma$ /JAK/STAT для контроля экспрессии хемокинов и молекулы PD-L1, что связано с выраженностью инфильтрации опухоли лимфоцитами и эффективностью противоопухолевого иммунитета. Снижение активности TET ассоциировано со

снижением уровня хемокинов Th1-клеток, уменьшением количества инфильтрирующих опухоль лимфоцитов и прогрессией колоректального рака [58].

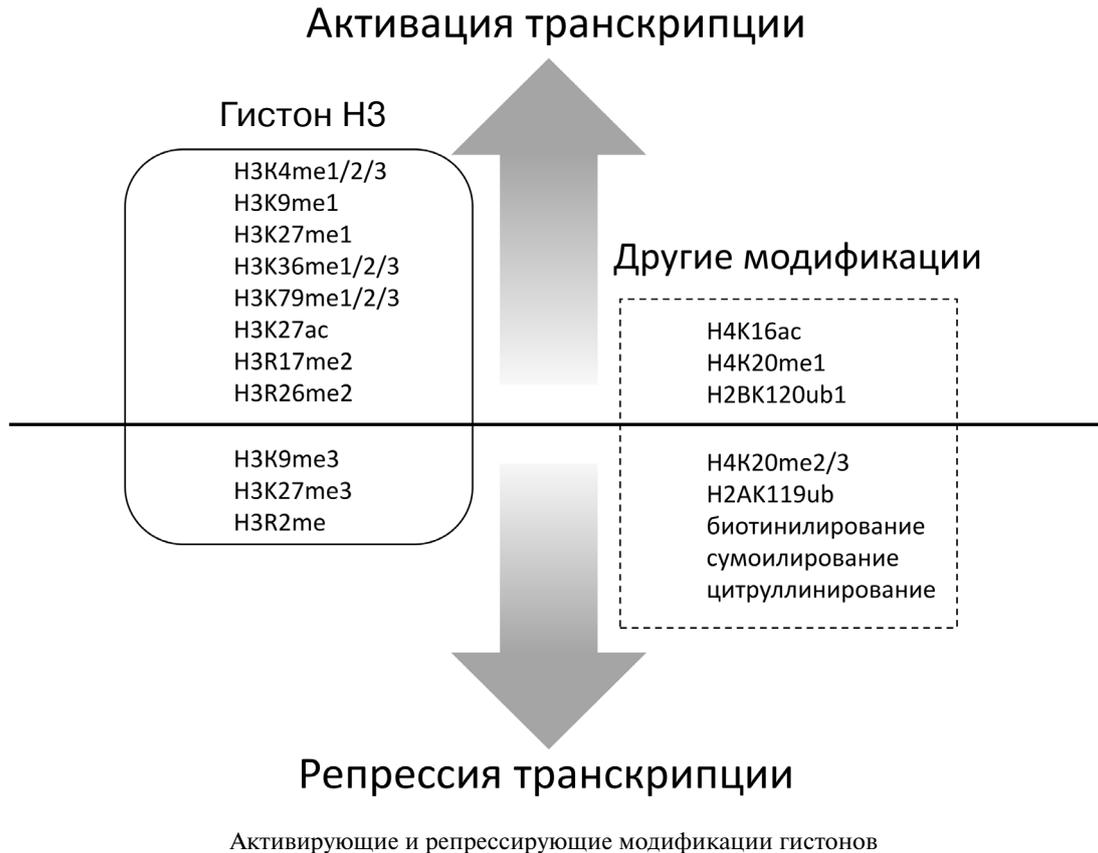
Повреждения *TET2* могут являться следствием вторичных соматических мутаций, возможно, влияя на резистентность к проводимой терапии. У 83 пациентов с НМРЛ проведено ВПС 416 онкогенов и генов-супрессоров в образцах опухолей с ранее идентифицированной мутацией, обеспечивающей чувствительность к ингибиторам EGFR. В исследуемой когорте большинство пациентов сохраняли первичную сенситизирующую мутацию, однако 36% опухолей приобрели вторичную мутацию T790M, связанную с резистентностью к ингибиторам EGFR I и II поколения, и у 12% наблюдали вторичную мутацию *TET2*, либо амплификацию *SOX2* в отсутствие T790M [59]. В недавнем исследовании секвенировали панель из 409 генов, вовлеченных в канцерогенез, и выявили вторичные мутации *TET2* в виде делеций, которые были ассоциированы с резистентностью к мультикиназному ингибитору сунитинибу при таргетной терапии почечно-клеточного рака [60]. Здесь следует отметить, что в подобных работах с ВПС важно проводить парное секвенирование как опухолевого образца, так и референсного образца периферической крови. Соматические генетические варианты *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *SF3B1*, *CBL*, *JAK2* и некоторых других генов могут образовываться в норме, присутствовать в лейкоцитах и лимфоцитах внутри среза опухоли и отражать клональность гемопоэза, а не канцерогенез. Сравнение с контрольным образцом показывает, что лишь 8% соматических вариантов в опухолевой ДНК, которые локализованы в связанных с гемопоэзом генах, представляют собой опухоль-специфические мутации [61]. Рассмотренные выше мутации локализованы в генах, модифицирующих азотистые основания нуклеотидов или непосредственно узнающих такие модификации. Вместе с тем комплексное изменение хроматина при канцерогенезе становится возможным при накоплении мутаций как в ферментах эпигенетической регуляции на уровне ДНК, так и в модификаторах гистоновых белков.

### ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛКОВ ХРОМАТИНА ВСЛЕДСТВИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, КОДИРУЮЩИХ ГИСТОНЫ И ИХ МОДИФИКАТОРЫ

Несмотря на эволюционную консервативность первичной структуры, гистоновые белки

человека обладают широкой изменчивостью благодаря обратимым посттрансляционным модификациям, которые важны для модулирования хроматина и транскрипции генов. Большинство из них локализованы в выступающих концевых участках гистонов (хвостах), гораздо меньшее количество — в гистоновом коре. Среди ковалентных модификаций встречаются метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, присоединение крупных химических соединений (сумоилирование, убиквитинилирование, биотинилирование) и некоторые другие изменения; одни из них действуют однонаправленно, тогда как другие могут активировать или репрессировать транскрипцию в данном участке ДНК в зависимости от того, какой именно аминокислотный остаток и в какой молекуле модифицируется. Комбинация модификаций гистонов создает гистоновый код, который наряду с метилированием ДНК и последовательностью нуклеотидов определяет транскрипционно активные участки генома [62]. Основные активирующие и репрессирующие модификации гистонов отражены на рисунке. Чаще всего химические группы присоединяются к хвосту гистона H3. Модификаторы гистонов условно делят на три группы: присоединяющие химические группы, удаляющие эти группы, и белки, связывающиеся с модифицированными гистонами [63].

В структуре мутационных профилей генов эпигенетической регуляции в опухолях у человека точковые мутации модификаторов гистонов составляют существенный сегмент. Например, ВПС экзона меланомы показал, что 30% мутаций приходится на эпигенетические регуляторы, из них в первых строках были гены, кодирующие ферменты модификации гистонов: *MECOM*, *MLL2*, *SETD2*, *IDH1*, а также гены ремоделирования хроматина (*ARID1B*, *ARID2*) и деметилирования ДНК (*TET2*). Биоинформатический анализ мутаций в меланоме по базе данных TCGA (The Cancer Genome Atlas) показал, что у 92% пациентов имеется не менее одной мутации в гене эпигенетического модулятора, а в 65% случаев имеются мутации в нескольких генах эпигенетической регуляции [64]. В настоящее время в различных типах опухолей описано немало соматических мутаций в генах, кодирующих ферменты модификации гистонов. Один из них — *EZH2*, кодирующий энзиматический компонент комплекса PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2). Каталитическая субъединица *EZH2* этого комплекса метилирует лизин 9 (H3K9me) и лизин 27 (H3K27me) в гистоне H3. Обе указанные метки являются репрессирующими модификациями и приводят к сайленсин-



гу гена-мишени. Существует моно-, ди- и три-метилирование лизина 27 гистона H3 с образованием H3K27me1, H3K27me2 и H3K27me3. В ряде опухолей наблюдали амплификацию гена *EZH2* и повышенный уровень H3K27me3. Это согласуется с исследованиями на мышах, в которых гиперэкспрессия гомологичного гена *Ezh2* индуцирует трансформацию лимфоидных клеток [65]. Интересно, что миссенс-мутация p.L27M в гистонах H3.3 и H3.1 в диффузных глиобластомах у детей приводят к ингибированию ферментативной активности *EZH2* и снижению количества H3K27me3 [66]. Отчасти плейотропное действие *EZH2* может объясняться тем, что, с одной стороны, мутации этого гена с усилением функции приводят к общегеномному увеличению H3K27me3, связанного с репрессией транскрипции. С другой стороны, обнаружено функциональное взаимодействие между организацией топологически ассоциированных хроматиновых доменов и транскрипционными изменениями, опосредованными мутацией *EZH2*. Мутация p.Y646\* приводит к молчанию целых доменов и одновременной инактивации множества генов-супрессоров. Иными словами, мутации *EZH2* могут изменять топологию и функцию хроматиновых доменов, способ-

ствуя канцерогенезу [46, 67]. На первый взгляд противоречивые экспериментальные данные о роли *EZH2* в канцерогенезе — это далеко не первый случай, когда задействованный в ключевых внутриклеточных процессах ген может проявлять онкогенные или, наоборот, онкосупрессорные свойства в зависимости от типа опухолевых клеток и активации различных сигнальных путей. Так, ген *SFRP1* был охарактеризован как опухолевый супрессор в клетках РПЖ, рака почки, колоректального рака и других опухолях; инактивация этого гена вследствие aberrантного метилирования или miРНК была сопряжена с пролиферацией, миграцией и инвазией опухолевых клеток. Однако в клетках рака желудка, базального и тройного негативного РМЖ, метастатического (но не первичного) рака почки наблюдали повышение экспрессии *SFRP1* по мере прогрессии опухоли. Отметим, что эволюционно древний сигнальный путь Wnt и, в частности, его участник — белок *SFRP1* — взаимодействуют с сигнальными путями трансформирующего фактора роста  $\beta$ , SHH/ $\beta$ -катенина, андрогенового рецептора. Возможно, супрессорные функции *SFRP1* на этапе инициации опухоли могут впоследствии по мере активации других внутриклеточных каскадов взаимодей-

ствий уступить место функциям SFRP1 как ко-фактора в перекрещивающихся сигнальных путях с онкогенными свойствами [68].

Гены гистоновых метилтрансфераз также приобретают мутации в канцерогенезе. В частности, ВПС образцов рака мочевого пузыря (РМП) показало, что среди генов 50 гистоновых метилтрансфераз ген *KMT2D* имел самую высокую частоту мутаций: соматические мутации этого гена выявлены в 28% случаев заболевания. Группа пациентов с мутациями *KMT2D* имела более длительную выживаемость, чем группа без мутаций [69]. Кодированный этим геном фермент KMT2D – основная монометилтрансфераза, вносящая модификацию в лизин 4 гистона H3 (H3K4) у млекопитающих, в том числе человека. Высокая частота драйверных мутаций и значимая роль инактивации *KMT2D* в канцерогенезе была ранее продемонстрирована и в других типах опухолей. Так, используя данные TCGA при НМРЛ, было охарактеризовано большое количество соматических мутаций в генах метилтрансфераз (*SETD1A*, *SMYD3*, *PRDM9*, *SETDB1*, *EZH2*, *SMYD2*) и деметилаз (*KDM5A/B*, *KDM6A/B*, *KDM2A*). Мутации в функционально значимых доменах ассоциированы с уровнем экспрессии или активностью белковых продуктов, которые, в свою очередь, ассоциированы с общей выживаемостью пациентов с НМРЛ. При гиперэкспрессии гистоновых деметилаз H3K4 (*KDM1A*, *KDM5A*, *KDM5B* и *KDM5D*) пациенты имеют неблагоприятный прогноз. Сниженная экспрессия гистоновой метилтрансферазы H3K4 – *SMYD3* – и повышение экспрессии *EZH2* и *KDM6A* обратно коррелирует с общей выживаемостью [70]. Другие гены гистоновых деметилаз, *KDM5A* и *KDM5B*, также идентифицированы как регуляторы плотности упаковки хроматина, гиперэкспрессирующиеся при канцерогенезе [71]. В приведенных примерах онкогенными свойствами обладали инактивирующие мутации в генах метилтрансфераз и точковые мутации с изменением функции в генах гистоновых деметилаз, хотя, как было отмечено выше, в различных типах опухолей эта тенденция может быть не столь однозначна. Помимо метилирования, не меньшую роль в изменении гистонового кода при канцерогенезе играет ацетилирование гистоновых белков.

Ген *EP300* кодирует гистонацетилтрансферазу, которая ацетирует гистоны и регулирует транскрипцию в ходе пролиферации и дифференцировки клеток. Опубликована работа с применением ВПС, в которой исследовали мутации в 44 ассоциированных с РМЖ генах. Кластерный анализ выявил когорту пациентов с тройным негативным РМЖ, которая при наибо-

лее низком уровне патогенных соматических мутаций характеризовалась наличием точковой мутации p.G211S в гене *EP300*. Мутация p.G211S ассоциирована с низким риском рецидивов и увеличением безрецидивной выживаемости у пациентов с РМЖ [72]. Ген *EP300* состоит в одном семействе с паралогиным геном *CREBBP*, также участвующим в эпигенетической регуляции. Суммарно соматические мутации в этих генах могут достигать 30% при уротелиальной карциноме. При РМП более половины всех миссенс-мутаций кластеризуются в гистон-ацетилтрансферазном домене, катализирующем перенос ацетильной группы на молекулы-мишени. В опухолях с соматическими миссенс-мутациями *EP300* или *CREBBP* нарушается ацетилирование гистонов, что влияет на гистоновый код и упаковку хроматина в целом, коррелирует с инвазией опухоли [73]. Осуществляющие метилирование и ацетилирование гистонов ферменты непосредственно вносят изменения в гистоновый код и регулируют структуру хроматина. Вместе с тем описаны ферменты, которые оказывают значимое опосредованное влияние на эпигенетические процессы, мутации в кодирующих их генах также существенны для канцерогенеза.

Изоцитратдегидрогеназы 1/2, кодируемые генами *IDH1/2*, являются участниками цикла трикарбоновых кислот (цикла Кребса). В опухолях выявлены миссенс-мутации *IDH1/2*. Продукты экспрессии мутантных аллелей способствуют синтезу R-2-гидроксиглутаровой кислоты (R-2HG), которая ингибирует  $\alpha$ -кетоглутарат-зависимые ферменты. В том числе ингибируются необходимые для деметилирования ДНК и гистонов TET2 гистоновые деметилазы [74]. *IDH1/2* мутируют в 70–80% высокодифференцированных глиом и в большинстве вторичных глиобластом. Горячая точка мутагенеза *IDH1* локализована в 132 кодоне, и в 90% случаев обнаруживают мажорную мутацию R132H. Опухоли без мутации *IDH1* часто содержат точковую мутацию в 172 кодоне митохондриального NADP-зависимого фермента, кодируемого геном *IDH2*. Мутации *IDH1/2* входят в стандартный протокол обследования пациентов с глиомами II–III степени дифференцировки, где в зависимости от результатов дополнительного тестирования ко-делетий 1p/19q указывают на относительно благоприятный или промежуточный прогноз заболевания [75, 76]. Изменения не только в модификаторах гистонов, но и в самих гистонах также привлекают внимание исследователей канцерогенеза.

Ограниченное количество мутаций-драйверов на сегодняшний день описано в наиболее

часто эпигенетически модифицируемом гистоне H3, который существует в двух формах H3.1 и H3.3 и содержит консервативные остатки лизина в 4, 9, 27 и 36 положениях. H3.1 – распространенный по всему хроматину канонический гистон на S-стадии клеточного цикла, тогда как H3.3 – вариантный гистон, временно включаемый ремоделирующим комплексом в состав промоторов активно транскрибируемых генов. Описанные при канцерогенезе соматические мутации p.K27M, p.K36M, p.G34V/R затрагивают консервативные участки в обеих формах H3 и именно те остатки лизина, которые подвергаются эпигенетическим модификациям. Первая из них, p.K27M, обнаружена в глиомах у детей и локализуется в генах *HIST1H3B* и *H3F3A*, которые кодируют H3.1 и H3.3 соответственно (реже в гомологах *HIST1H3C* и *HIST2H3C*). Мутация p.K27M имеет разные фенотипические проявления: в H3.1 она ассоциирована только с глиомами моста головного мозга, мезенхимальным профилем экспрессии, наличием мутации *ACVR1*, а в H3.3 – неспецифической локализацией в головном мозге, олигодендроглиальным фенотипом, отличным от H3.1 профилем экспрессии и более низкой медианой выживаемости, мутацией *TP53* и амплификацией *MYC*, *PDGFRA* и *CCND2* [77]. Замена лизина на метионин нарушает формирование как репрессивной H3K27me<sub>3</sub>, так и активирующей H3K27ac меток, хотя более выраженной в геноме является утрата H3K27me<sub>3</sub>. Вторая соматическая мутация, p.K36M, описана в 90% случаев хондробластомы у детей и подростков, локализуется в одном из двух генов, кодирующих H3.3 – *H3F3B*. Мутация сопровождается снижением уровня H3K36me<sub>2</sub> в межгенных спейсерах и потерей H3K36me<sub>3</sub> в последовательностях генов [78]. Наконец, соматические мутации в 34 кодоне гистона H3.3 были выявлены в глиобластоме и остеосаркоме (p.G34R/V), гигантоклеточной опухоли костной ткани (p.G34W/L). В отличие от мутаций p.K27M и p.K36M, которые могут реализовать свой эффект в *транс*-положении, мутации p.G34R/V приводят к снижению метилирования H3K36me<sub>2/3</sub> в *цис*-положении только в тех гистонах H3.3, которые несут указанные мутации [12, 77].

Сегодня продолжается активное изучение генов эпигенетических модификаторов, их мутаций и экспрессии. Интересно, что ряд авторов опубликовали различия в спектре соматических мутаций в зависимости от этнических характеристик, что, возможно, связано с наличием разных аллелей генов, влияющих на метаболизм ксенобиотиков и эффективность репарации ДНК. Показано, что частоты соматических му-

таций генов *ARID1A* и *KMT2A* различаются у европеоидных и азиатских больных раком желудка [79]. Рассмотренные выше мутации в генах метилирования ДНК и модификации гистонов нарушают механизмы непосредственного внесения или удаления эпигенетических меток в компоненты хроматина. Однако изменение структуры хроматина и доступности транскрипционных факторов требует деконденсации и ремоделирования нуклеосом.

### НАРУШЕНИЯ В СИСТЕМЕ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА

Деконденсирование хроматина и формирование транскрипционно активных участков зачастую требует не только снятия репрессивных меток с ДНК и гистонов и/или присоединения к гистонам активирующих меток, но и мобилизации белков нуклеосом. Эту перестройку – ремоделирование хроматина – осуществляют специальные мультипротеиновые комплексы, компоненты которых также могут изменяться при канцерогенезе. Эти комплексы используют энергию АТФ для того, чтобы разобщить гистоны и ДНК, а затем производят замещение компонентов нуклеосомы. У млекопитающих известно пять типов ремоделирующих комплексов: SWI/SNF, ISWI, NuRD/Mi2/CHD, INO80 и SWR1. У человека основную роль в реструктуризации нуклеосомы играет комплекс SWI/SNF. Он содержит фермент АТФазу (BRM или BRG1, кодируемые генами *SMARCA2* или *SMARCA4* соответственно), три основных субъединицы (BAF47, BAF155 и BAF170, кодируемые генами *SMARCB1*, *SMARCC2* и *SMARCC1* соответственно) и от 7 до 15 дополнительных субъединиц. Комплекс SWI/SNF в зависимости от состава дополнительных субъединиц представлен BAF-комплексом (содержит продукт гена *ARID1A* – субъединицу BAF250a) или PBAF-комплексом, который вместо BAF250a содержит субъединицы BAF180 и BAF200, экспрессирующиеся с генов *PBRM1* и *ARID2* соответственно [80]. Мутации компонентов комплекса SWI/SNF описаны во многих солидных опухолях у человека (табл. 2). Первым геном ремоделирования нуклеосомы с идентифицированными драйверными мутациями при канцерогенезе стал ген *SMARCB1*. Инактивирующие герминальные мутации *SMARCB1* вызывают синдром предрасположенности к рабдоидным опухолям 1 типа (RTPS1 – Rhabdoid Tumor Predisposition Syndrome, type 1, OMIM 609322). RTPS1 – высокопенетрантное врожденное онкологическое заболевание, при котором уже внутриутробно или в первые 3–4

года жизни развиваются злокачественные рабдоидные опухоли почек, головного мозга, реже в других локализациях. Большинство мутаций при RTPS1 представлены мутациями сдвига рамки считывания, делециями различной протяженности, мутациями сплайсинга, нонсенс-мутациями в экзонах 2–7 [81]. Ряд герминальных мутаций в первом экзоне или 3'-нетранслируемой области (мажорные – p.P14H и c.\*82C/T), ряд мутаций кодирующей последовательности по типу изменения функции (миссенс-мутации и некоторые мутации сплайсинга) не приводят к RTPS1 в раннем детстве, но после

20 лет манифестируют как шванноматоз в виде множественных доброкачественных опухолей периферических нервов. Наконец, миссенс-мутации в 8–9 экзонах на коротком участке рядом с кодирующей последовательностью SNF5-домена не связаны с канцерогенезом, а приводят к классической форме синдрома Коффина–Сириса с неврологическими нарушениями. Приведенные факты еще раз подчеркивают время- и тканеспецифичность функций эпигенетических регуляторов в онтогенезе.

Соматические мутации *SMARCB1* присутствуют в спорадических рабдоидных опухолях

**Таблица 2.** Мутации компонентов комплексов SWI/SNF в солидных опухолях человека

| Субъединица                            | Ген                | Точковые мутации в опухоли   |
|--|--------------------|--|
| Общие коровые субъединицы              |                    |  |
| BRG1                                   | <i>SMARCA4</i>     | немелкоклеточный рак легкого (10–20%), рак яичников, недифференцированная саркома матки, рак пищевода, медуллобластома |
| BAF47                                  | <i>SMARCB1</i>     | рабдоидные опухоли (97%), шваннома, менингиома, эпителиоидная саркома  |
| BAF155                                 | <i>SMARCC1</i>     | колоректальный рак, аденокарцинома простаты  |
| BAF170                                 | <i>SMARCC2</i>     | рак желудка, колоректальный рак  |
| BAF-специфические коровые субъединицы  |                    |  |
| BRM                                    | <i>SMARCA2</i>     | немелкоклеточный рак легкого (20–30%),   |
| BAF250a                                | <i>ARID1A</i>      | рак яичников (49%), эндометриоидная карцинома (38%), гепатоцеллюлярный рак (16%), рак пищевода                         |
| BAF250b                                | <i>ARID1B</i>      | нейробластома  |
| PBAF-специфическая коровая субъединица |                    |  |
| BAF200                                 | <i>ARID2</i>       | гепатоцеллюлярная карцинома, немелкоклеточный рак легкого, рак поджелудочной железы, меланома, рак молочной железы     |
| Дополнительные субъединицы             |                    |  |
| BAF180                                 | <i>PBRM1</i>       | светлоклеточная карцинома почки (40%), холангиокарцинома, рак пищевода   |
| BAF57                                  | <i>SMARCE1</i>     | спинальная менингиома  |
| BRD7                                   | <i>BRD7</i>        | рак яичников, колоректальный рак, плоскоклеточная карцинома  |
| BAF45a                                 | <i>PHF10</i>       | гепатоцеллюлярная карцинома, колоректальный рак  |
| BAF53a/b                               | <i>ACTL6A/B</i>    | уротелиальная карцинома, колоректальный рак, гепатоцеллюлярная карцинома, немелкоклеточный рак легкого                 |
| BAF60a/b/c                             | <i>SMARCD1/2/3</i> | рак желудка, рак молочной железы, колоректальный рак, немелкоклеточный рак легкого, нейробластома                      |

Примечание. Табл. 2 составлена на основе источников [80, 82, 91], для опухолей с частотами точковых мутаций гена более 10% в скобках указана частота мутаций, в таблице отражены не все дополнительные субъединицы комплексов SWI/SNF.

различной локализации, шванноме, менингиоме, эпителиоидной саркоме, опухолях яичника [82, 83]. В частности, делеция *SMARCB1* часто отмечается в недифференцированных желудочно-кишечных карциномах, часть из которых имеет признаки рабдоидных опухолей. Впоследствии в этих опухолях были обнаружены делеции *SMARCA2*, также кодирующего компонент комплекса SWI/SNF [84]. Герминальные мутации как причина наследственного онкологического синдрома отмечены также в гене *SMARCA4*: как и в случае *SMARCB1*, они приводят к развитию рабдоидных опухолей и второму типу RTPS (RTPS2, OMIM 613325). Мутации *SMARCE1* идентифицированы в семьях с множественными спинальными менингиомами. Герминальные мутации в других субъединицах SWI/SNF (*ARID1A/B*, *SMARCA2*) отмечены только при разных формах синдрома Коффина–Сириса и неврологических нарушениях, но не при канцерогенезе [80, 82]. Все остальные описанные мутации генов комплекса SWI/SNF при канцерогенезе относятся к соматическим aberrациям в спорадических опухолях (табл. 2).

Мутации участника комплекса SWI/SNF, гена *PBRM1*, встречаются в более чем 40% спорадических светлоклеточных карцином почки [85]. Ген *PBRM1* охарактеризован в качестве гена-супрессора, инактивирующие его изменения являются мутациями-драйверами в патогенезе светлоклеточного рака почки. Частота точковых соматических мутаций *PBRM1* (40%) при этом типе опухолей, по данным COSMIC и TCGA, уступает лишь гену *VHL* (60%). Мутации этих двух генов, *VHL* и *PBRM1*, лежат в основе филогенетических деревьев клональной эволюции светлоклеточных карцином почки [86, 87].

Ген *ARID1A* кодирует другой ключевой компонент комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF. Соматические мутации в этом гене определены в различных типах опухолей, частота их составляет 10–17% в гепатоцеллюлярной карциноме, 29% – в раке желудка, 4–13% – РМЖ, 13% – РМП [88]. Немалое количество работ посвящено мутациям *ARID1A* в раке желудка. Так, ВПС позволило установить, что до 47% аденокарцином желудка содержат мутации генов ремоделирования хроматина, причем наибольшей частотой характеризовались соматические мутации *ARID1A*. Дефицит *ARID1A* ассоциирован с наличием MSI. Потеря экспрессии *ARID1A* коррелировала с размерами первичной опухоли, инвазией, метастазами в лимфатические узлы и неблагоприятным прогнозом. Показана высокая иммуногенность опухолей с мутациями *ARID1A*, что связывают с увеличенной мутационной нагрузкой [89, 90]. Кроме того,

рак желудка с мутациями *ARID1A* характеризуется более интенсивной экспрессией молекулы PD-L1, чем рак желудка без мутаций этого гена. Гиперэкспрессия PD-L1 ассоциирована с ответом на таргетную иммунотерапию и увеличением общей выживаемости при опухолях желудочно-кишечного тракта. Предполагают, что мутации *ARID1A* могут служить потенциальным биомаркером для выявления группы больных, чувствительных к иммунотерапии [91].

### ЗНАЧЕНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОНКОЗАБОЛЕВАНИЙ

Выявление эпигенетических изменений и приводящих к ним механизмов на уровне геномной ДНК и гистоновых белков позволило целенаправленно воздействовать на эпигенетические регуляторы и предложить практической онкологии новые химиотерапевтические препараты. Некоторые из них уже зарегистрированы FDA (Food and Drug Administration) и используются в протоколах лечения, другие находятся на различных стадиях клинических испытаний. Условно можно классифицировать препараты, направленные на эпигенетические процессы в геноме, на несколько групп: ингибиторы ДНК-метилтрансфераз, ингибиторы гистоновых ацетилаз и блокаторы связывания с ацетилированными лизинами, ингибиторы гистоновых деацетилаз, ингибиторы гистоновых метилаз/деметилаз, ингибиторы бромодоменов и других компонентов комплекса SWI/SNF. Необходимо учесть, что во многих протоколах эпигенетические препараты применяют в комбинации с другими противоопухолевыми средствами [92, 93]. Одними из первых эпигенетических противоопухолевых препаратов, одобренных FDA, стали ингибиторы ДНК-метилтрансфераз азациитидин и 5-аза-2-дезоксцитидин. Их применяют для лечения миелодиспластического синдрома и острого миелоидного лейкоза, а их комбинации с другими противоопухолевыми агентами испытывают в качестве вариантов лечения при солидных опухолях, таких как колоректальный рак, рак легких и рак яичников [94, 95]. Тем не менее терапевтические проблемы от применения ингибиторов DNMT включают развитие резистентности и побочные эффекты, которые наблюдают почти у 50% пациентов. В основе этих явлений может лежать и побочное влияние на эпигенетические механизмы. В частности, охарактеризованы 638 метилированных CpG-динуклеотидов в ответ на лечение децитабином в клеточных линиях HCT116, кото-

рые сохранялись до нескольких дней после отмены препарата. Результаты затем были подтверждены в работах с клеточными линиями РМП, РМЖ и рака яичника. Авторы связывают чувствительность к препарату с этими новыми гиперметилированными сайтами [96].

Недавно было показано, что терапия ингибиторами ДНК-метилтрансфераз и гистоновых деацетилаз приводит не только к деметилированию и активации промоторов генов-супрессоров, но и повышает иммуногенность опухоли. Это происходит вследствие снижения плотности метилирования генома и активации эндогенных ретровирусов человека, что, в свою очередь, приводит к активации механизмов РНК-интерференции, продукции цитокинов и интенсификации презентации антигенов Т-клеткам в опухолевом микроокружении для цитотоксического ответа [97]. На момент написания обзора насчитывали несколько десятков препаратов, прямо воздействующих на эпигенетические механизмы, зарегистрированных FDA для применения в клинике при лечении пациентов с солидными опухолями, либо находящихся на стадиях доклинических или клинических испытаний; более полная их характеристика приведена в соответствующих обзорах 2019–2020 гг. [92, 93, 97–99]. В этом контексте выглядит вполне закономерным то, что от характеристики профилей метилирования ДНК и гистоновых кодов в различных типах солидных опухолей исследователи перешли к изучению соматических мутаций и механизмов эпигенетической регуляции структуры хроматина, а затем к разработке и внедрению в клиническую практику ингибиторов определенных эпигенетических регуляторов.

Таким образом, гены эпигенетической регуляции часто мутируют в солидных опухолях.

Профиль соматических мутаций генов, вовлеченных в изменение структуры хроматина, представляет собой ничуть не менее сложный и важный для понимания канцерогенеза у человека ландшафт молекулярных изменений, чем профили метилирования ДНК или гистоновый код. При этом в различных патоморфологических типах опухолей aberrантно функционирующие эпигенетические регуляторы могут осуществлять как супрессорную, так и онкогенную функции. Сегодня определение герминальных мутаций в генах комплекса SWI/SNF используют для диагностики ряда врожденных онкологических синдромов, а часть соматических мутаций в генах эпигенетических регуляторов ассоциирована с клиническими прогностическими критериями в онкологии. Поскольку эпигенетические механизмы имеют плейотропное действие, попытки таргетно воздействовать на составляющие их компоненты в опухолевых клетках приводят к дальнейшему накоплению генетических и эпигенетических повреждений, что, с одной стороны, может усиливать нестабильность опухолевого генома и накопление новых мутаций, а с другой стороны – увеличивать эффективность химио- или иммунотерапии.

**Финансирование.** Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-09020) и государственного задания Минобрнауки России на 2020 г.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.*, **68**, 394–324, doi: 10.3322/caac.21492.
2. Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В. (2019) *Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность)*, МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва.
3. Красильников М. А., Зборовская И. Б. (2016) *Молекулярный канцерогенез*, ИД АБВ-пресс, Москва, с. 84–322.
4. Patterson, A. D., Gonzalez, F. J., Perdew, G. H., and Peters, J. M. (2018) Molecular regulation of carcinogenesis: friend and foe, *Toxicol. Sci.*, **165**, 277–283, doi: 10.1093/toxsci/kfy185.
5. Linehan, W. M., and Ricketts, C. J. (2019) The Cancer Genome Atlas of renal cell carcinoma: findings and clinical implications, *Nat. Rev. Urol.*, **16**, 539–552, doi: 10.1038/s41585-019-0211-5.
6. Creighton, C. J. (2018) The clinical applications of The Cancer Genome Atlas project for bladder cancer, *Expert Rev. Anticancer. Ther.*, **18**, 973–980, doi: 10.1080/14737140.2018.1508999.
7. Bertucci, F., Ng, C. K., Patsouris, A., Droin, N., Piscuoglio, S., et al. (2019) Genomic characterization of metastatic breast cancers, *Nature*, **569**, 560–564, doi: 10.1038/s41586-019-1056-z.
8. Yuan, Y., Ju, Y. S., Kim, Y., Li, J., Wang, Y., Yoon, C. J., Yang, Y., Martincorena, I., Creighton, C. J., Weinstein, J. N., Xu, Y., Han, L., Kim, H. L., Nakagawa, H., Park, K., Campbell, P. J., Liang, H., and PCAWG Consortium. (2020) Comprehensive molecular characterization of

- mitochondrial genomes in human cancers, *Nat. Genet.*, **52**, 342-352, doi: 10.1038/s41588-019-0557-x.
9. Biegel, J. A., Busse, T. M., and Weissman, B. E. (2014) SWI/ SNF chromatin remodeling complexes and cancer, *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, **166**, 350-366, doi: 10.1002/ajmg.c.31410.
  10. Cancer Genome Atlas Research Network, Linehan, W. M., Spellman, P. T., Ricketts, C. J., Creighton, C. J., et al. (2016) Comprehensive molecular characterization of papillary renal-cell carcinoma, *N. Engl. J. Med.*, **374**, 135-145, doi: 10.1056/NEJMoa1505917.
  11. Gui, Y., Guo, G., Huang, Y., Hu, X., Tang, A., et al. (2011) Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder, *Nat. Genet.*, **43**, 875-878, doi: 10.1038/ng.907.
  12. Maleszewska, M., Wojtas, B., and Kaminska, B. (2018) Deregulation of epigenetic mechanisms in cancer, *Postepy Biochem.*, **64**, 148-156, doi: 10.18388/pb.2018\_125.
  13. Kalish, J. M., Jiang, C., and Bartolomei, M. S. (2014) Epigenetics and imprinting in human disease, *Int. J. Dev. Biol.*, **58**, 291-298, doi: 10.1387/ijdb.140077mb.
  14. Thomas, M. L., and Marcatto, P. (2018) Epigenetic modifications as biomarkers of tumor development, therapy response, and recurrence across the Cancer Care Continuum, *Cancers (Basel)*, **10**, E101, doi: 10.3390/cancers10040101.
  15. Ding, L., Gu, H., Xiong, X., Ao, H., Cao, J., Lin, W., Yu, M., Lin, J., and Cui, Q. (2019) MicroRNAs involved in carcinogenesis, prognosis, therapeutic resistance and applications in human triple-negative breast cancer, *Cells*, **8**, E1492, doi: 10.3390/cells8121492.
  16. Kaminska, K., Nalejska, E., Kubiak, M., Wojtysiak, J., Zolna, L., Kowalewski, J., and Lewandowska, M. A. (2019) Prognostic and predictive epigenetic biomarkers in oncology, *Mol. Diagn. Ther.*, **23**, 83-95, doi: 10.1007/s40291-018-0371-7.
  17. Gazdzicka, J., Golabek, K., Strzelczyk, J. K., and Ostrowska, Z. (2020) Epigenetic modifications in head and neck cancer, *Biochem. Genet.*, **58**, 213-244, doi: 10.1007/s10528-019-09941-1.
  18. Cozma, A., Fodor, A., Vulturar, R., Sitar-Taut, A. V., Orasan, O. H., Muresan, F., Login, C., and Suharoschi, R. (2019) DNA methylation and micro-RNAs: the most recent and relevant biomarkers in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma, *Medicina (Kaunas)*, **55**, E607, doi: 10.3390/medicina55090607.
  19. Begolli, R., Sideris, N., and Giakountis, A. (2019) LncRNAs as chromatin regulators in cancer: from molecular function to clinical potential, *Cancers (Basel)*, **11**, E1524, doi: 10.3390/cancers11101524.
  20. Cossu, A. M., Mosca, L., Zappavigna, S., Misso, G., Bocchetti, M., De Micco, F., Quagliuolo, L., Porcelli, M., Caraglia, M., and Boccellino, M. (2019) Long non-coding RNAs as important biomarkers in laryngeal cancer and other head and neck tumors, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, E3444, doi: 10.3390/ijms20143444.
  21. Siddiqui, H., Al-Ghafari, A., Choudhry, H., and Al Doghaither, H. (2019) Roles of long non-coding RNAs in colorectal cancer tumorigenesis: a review, *Mol. Clin. Oncol.*, **11**, 167-172, doi: 10.3892/mco.2019.1872.
  22. Xiao, Y., Su, M., Ou, W., Wang, H., Tian, B., Ma, J., Tang, J., Wu, J., Wu, Z., Wang, W., and Zhou, Y. (2019) Involvement of noncoding RNAs in epigenetic modifications of esophageal cancer, *Biomed. Pharmacother.*, **117**, 109192, doi: 10.1016/j.biopha.2019.109192.
  23. Feinberg, A. P., Koldobskiy, M. A., and Gondor, A. (2016) Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression, *Nat. Rev. Genet.*, **17**, 284-299, doi: 10.1038/nrg.2016.13.
  24. Bouras, E., Karakioulaki, M., Bougioukas, K. I., Aivaliotis, M., Tzimagiorgis, G., and Chourdakis, M. (2019) Gene promoter methylation and cancer: an umbrella review, *Gene*, **710**, 333-340, doi: 10.1016/j.gene.2019.06.023.
  25. Mendelsohn, J., Howley, P. M., Thompson, C. B., Gray, J. W., and Israel, M. A. (2014) *The Molecular Basis of Cancer* (4th Edn.), Saunders-Elsevier Inc., Philadelphia.
  26. Sang, Y., and Deng, Y. (2019) Current insights into the epigenetic mechanisms of skin cancer, *Dermatol. Ther.*, **32**, e12964, doi: 10.1111/dth.12964.
  27. Quintanal-Villalonga, A., and Molina-Pinelo, S. (2019) Epigenetics of lung cancer: a translational perspective, *Cell. Oncol. (Dordr.)*, **42**, 739-756, doi: 10.1007/s13402-019-00465-9.
  28. Costa-Pinheiro, P., Montezuma, D., Henrique, R., and Jeronimo, C. (2015) Diagnostic and prognostic epigenetic biomarkers in cancer, *Epigenomics*, **7**, 1003-1015, doi: 10.2217/epi.15.56.
  29. Gazdzicka, J., Golabek, K., Strzelczyk, J. K., and Ostrowska, Z. (2020) Epigenetic modifications in head and neck cancer, *Biochem. Genet.*, **58**, 213-244, doi: 10.1007/s10528-019-09941-1.
  30. Porten, S. P. (2018) Epigenetic alterations in bladder cancer, *Curr. Urol. Rep.*, **19**, 102, doi: 10.1007/s11934-018-0861-5.
  31. Martinez, V. G., Munera-Maravilla, E., Bernardini, A., Rubio, C., Suarez-Cabrera, C., Segovia, C., Lodewijk, I., Duenas, M., Martinez-Fernandez, M., and Paramio, J. M. (2019) Epigenetics of bladder cancer: where biomarkers and therapeutic targets meet, *Front. Genet.*, **10**, 1125, doi: 10.3389/fgene.2019.01125.
  32. Linehan, W. M., and Ricketts, C. J. (2019) The Cancer Genome Atlas of renal cell carcinoma: findings and clinical implications, *Nat. Rev. Urol.*, **16**, 539-552, doi: 10.1038/s41585-019-0211-5.
  33. Михайленко Д. С., Залетаев Д. В. (2013) *Молекулярно-генетическая диагностика в онкоурологии*, LAP Lambert Academic Publishing, Saarbrücken.
  34. Yamashita, K., Hosoda, K., Nishizawa, N., Katoh, H., and Watanabe, M. (2018) Epigenetic biomarkers of promoter DNA methylation in the new era of cancer treatment, *Cancer Sci.*, **109**, 3695-3706, doi: 10.1111/cas.13812.
  35. Bhat, S. A., Majid, S., Wani, H. A., and Rashid, S. (2019) Diagnostic utility of epigenetics in breast cancer – a review, *Cancer Treat. Res. Commun.*, **19**, 100125, doi: 10.1016/j.ctarc.2019.100125.
  36. Kumar, R., Paul, A. M., Rameshwar, P., and Pillai, M. R. (2019) Epigenetic dysregulation at the crossroad of women's cancer, *Cancers (Basel)*, **11**, E1193, doi: 10.3390/cancers11081193.
  37. Ahmed, A. A., and Essa, M. E. (2019) Potential of epigenetic events in human thyroid cancer, *Cancer Genet.*, **239**, 13-21, doi: 10.1016/j.cancergen.2019.08.006.
  38. Ebrahimi, V., Soleimani, A., Ebrahimi, T., Azargun, R., Yazdani, P., Eyvazi, S., and Tarhriz, V. (2020) Epigenetic modifications in gastric cancer: focus on DNA methylation, *Gene*, **742**, 144577, doi: 10.1016/j.gene.2020.144577.
  39. Guo, M., Peng, Y., Gao, A., Du, C., and Herman, J. G. (2019) Epigenetic heterogeneity in cancer, *Biomark. Res.*, **7**, 23, doi: 10.1186/s40364-019-0174-y.
  40. Пальцев М. А., Залетаев Д. В. (2009) *Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний*, Изд-во «Медицина», Москва.
  41. Couronne, L., Bastard, C., and Bernard, O. A. (2012) TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma, *N. Engl. J. Med.*, **366**, 95-96, doi: 10.1056/NEJMc1111708.
  42. Ribeiro, A. F., Pratorcorona, M., Erpelinck-Verschueren, C., Rockova, V., Sanders, M., Abbas, S., Figueroa, M. E.,

- Zeilemaker, A., Melnick, A., Lowenberg, B., Valk, P. J., and Delwel, R. (2012) Mutant DNMT3A: a marker of poor prognosis in acute myeloid leukemia, *Blood*, **119**, 5824-5831, doi: 10.1182/blood-2011-07-367961.
43. Celik, H., Mallaney, C., Kothari, A., Ostrander, E. L., Eultgen, E., Martens, A., Miller, C. A., Hundal, J., Klco, J. M., and Challen, G. A. (2015) Enforced differentiation of Dnmt3a-null bone marrow leads to failure with c-Kit mutations driving leukemic transformation, *Blood*, **125**, 619-628, doi: 10.1182/blood-2014-08-594564.
  44. Saito, Y., Kanai, Y., Nakagawa, T., Sakamoto, M., Saito, H., Ishii, H., and Hirohashi, S. (2003) Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas, *Int. J. Cancer*, **105**, 527-532, doi: 10.1002/ijc.11127.
  45. Ibrahim, A. E., Arends, M. J., Silva, A. L., Wyllie, A. H., Greger, L., Ito, Y., Vowler, S. L., Huang, T. H., Tavaré, S., Murrell, A., and Brenton, J. D. (2011) Sequential DNA methylation changes are associated with DNMT3B overexpression in colorectal neoplastic progression, *Gut*, **60**, 499-508, doi: 10.1136/gut.2010.223602.
  46. Han, M., Jia, L., Lv, W., Wang, L., and Cui, W. (2019) Epigenetic enzyme mutations: role in tumorigenesis and molecular inhibitors, *Front. Oncol.*, **9**, 194, doi: 10.3389/fonc.2019.00194.
  47. Siraj, A. K., Pratheeshkumar, P., Parvathareddy, S. K., Bu, R., Masoodi, T., Iqbal, K., Al-Rasheed, M., Al-Dayel, F., Al-Sobhi, S. S., Alzahrani, A. S., Al-Dawish, M., and Al-Kuraya, K. S. (2019) Prognostic significance of DNMT3A alterations in Middle Eastern papillary thyroid carcinoma, *Eur. J. Cancer*, **117**, 133-144, doi: 10.1016/j.ejca.2019.05.025.
  48. Du, Q., Luu, P. L., Stirzaker, C., and Clark, S. J. (2015) Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome, *Epigenomics*, **7**, 1051-1073, doi: 10.2217/epi.15.39.
  49. Xu, J., Zhu, W., Xu, W., Cui, X., Chen, L., Ji, S., Qin, Y., Yao, W., Liu, L., Liu, C., Long, J., Li, M., and Yu, X. (2013) Silencing of MBD1 reverses pancreatic cancer therapy resistance through inhibition of DNA damage repair, *Int. J. Oncol.*, **42**, 2046-2052, doi: 10.3892/ijco.2013.1901.
  50. Madzo, J., Liu, H., Rodriguez, A., Vasanthakumar, A., Sundaravel, S., Caces, D. B., Looney, T. J., Zhang, L., Lepore, J. B., Macrae, T., Duszynski, R., Shih, A. H., Song, C. X., Yu, M., Yu, Y., Grossman, R., Raumann, B., Verma, A., He, C., Levine, R. L., Lavelle, D., Lahn, B. T., Wickrema, A., and Godley, L. A. (2014) Hydroxymethylation at gene regulatory regions directs stem/early progenitor cell commitment during erythropoiesis, *Cell Rep.*, **6**, 231-244, doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.044.
  51. Kaasinen, E., Kuusmin, O., Rajamaki, K., Ristolainen, H., Aavikko, M., et al. (2019) Impact of constitutional TET2 haploinsufficiency on molecular and clinical phenotype in humans, *Nat. Commun.*, **10**, 1252, doi: 10.1038/s41467-019-09198-7.
  52. Feng, Y., Li, X., Cassady, K., Zou, Z., and Zhang, X. (2019) TET2 function in hematopoietic malignancies, immune regulation, and DNA repair, *Front. Oncol.*, **9**, 210, doi: 10.3389/fonc.2019.00210.
  53. Chang, Y. S., Huang, H. D., Yeh, K. T., and Chang, J. G. (2016) Genetic alterations in endometrial cancer by targeted next-generation sequencing, *Exp. Mol. Pathol.*, **100**, 8-12, doi: 10.1016/j.yexmp.2015.11.026.
  54. Pivovarcikova, K., Agaimy, A., Martinek, P., Alaghebandan, R., Perez-Montiel, D., Alvarado-Cabrero, I., Rogala, J., Kuroda, N., Rychly, B., Gasparov, S., Michalova, K., Michal, M., Hora, M., Pitra, T., Tuckova, I., Laciok, S., Mareckova, J., and Hes, O. (2019) Primary renal well-differentiated neuroendocrine tumour (carcinoid): next-generation sequencing study of 11 cases, *Histopathology*, **75**, 104-117, doi: 10.1111/his.13856.
  55. Kim, S. I., Lee, J. W., Lee, M., Kim, H. S., Chung, H. H., Kim, J. W., Park, N. H., Song, Y. S., and Seo, J. S. (2018) Genomic landscape of ovarian clear cell carcinoma via whole exome sequencing, *Gynecol. Oncol.*, **148**, 375-382, doi: 10.1016/j.ygyno.2017.12.005.
  56. Zhu, X., and Li, S. (2018) TET2 inhibits tumorigenesis of breast cancer cells by regulating caspase-4, *Sci. Rep.*, **8**, 16167, doi: 10.1038/s41598-018-34462-z.
  57. Barazeghi, E., Gill, A. J., Sidhu, S., Norlen, O., Dina, R., Palazzo, F. F., Hellman, P., Stalberg, P., and Westin, G. (2017) A role for TET2 in parathyroid carcinoma, *Endocr. Relat. Cancer*, **24**, 329-338, doi: 10.1530/ERC-17-0009.
  58. Xu, Y. P., Lv, L., Liu, Y., Smith, M. D., Li, W. C., Tan, X. M., Cheng, M., Li, Z., Bovino, M., Aube, J., and Xiong, Y. (2019) Tumor suppressor TET2 promotes cancer immunity and immunotherapy efficacy, *J. Clin. Invest.*, **130**, 4316-4331, doi: 10.1172/JCI129317.
  59. Jin, Y., Shao, Y., Shi, X., Lou, G., Zhang, Y., Wu, X., Tong, X., and Yu, X. (2016) Mutational profiling of non-small-cell lung cancer patients resistant to first-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors using next generation sequencing, *Oncotarget*, **7**, 61755-61763, doi: 10.18632/oncotarget.11237.
  60. Elgandy, M., Fusco, J. P., Segura, V., Lozano, M. D., Minucci, S., Echeveste, J. I., Gurrpide, A., Andueza, M., Melero, I., Sanmamed, M. F., Ruiz, M. R., Calvo, A., Pascual, J. I., Velis, J. M., Minana, B., Valle, R. D., Pio, R., Agorreta, J., Abengozar, M., Colecchia, M., Brich, S., Renne, S. L., Guruceaga, E., Patino-Garcia, A., and Perez-Gracia, J. L. (2019) Identification of mutations associated with acquired resistance to sunitinib in renal cell cancer, *Int. J. Cancer*, **145**, 1991-2001, doi: 10.1002/ijc.32256.
  61. Coombs, C. C., Gillis, N. K., Tan, X., Berg, J. S., Ball, M., et al. (2018) Identification of clonal hematopoiesis mutations in solid tumor patients undergoing unpaired next-generation sequencing assays, *Clin. Cancer Res.*, **24**, 5918-5924, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1201.
  62. Drake, T. M., and Soreide, K. (2019) Cancer epigenetics in solid organ tumours: a primer for surgical oncologists, *Eur. J. Surg. Oncol.*, **45**, 736-746, doi: 10.1016/j.ejso.2019.02.005.
  63. Zhao, Z., and Shilatifard, A. (2019) Epigenetic modifications of histones in cancer, *Genome Biol.*, **20**, 245, doi: 10.1186/s13059-019-1870-5.
  64. Lee, J. J., Sholl, L. M., Lindeman, N. I., Granter, S. R., Laga, A. C., Shivdasani, P., Chin, G., Luke, J. J., Ott, P. A., Hodi, F. S., Mihm, M. C., Lin, J. Y., Werchaniak, A. E., Haynes, H. A., Bailey, N., Liu, R., Murphy, G. F., and Lian, C. G. (2015) Targeted next-generation sequencing reveals high frequency of mutations in epigenetic regulators across treatment-naive patient melanomas, *Clin. Epigenetics*, **7**, 59, doi: 10.1186/s13148-015-0091-3.
  65. Beguelin, W., Popovic, R., Teater, M., Jiang, Y., Bunting, K. L., et al. (2013) EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation, *Cancer Cell*, **23**, 677-692, doi: 10.1016/j.ccr.2013.04.011.
  66. Lewis, P. W., Muller, M. M., Koletsy, M. S., Cordero, F., Lin, S., Banaszynski, L. A., Garcia, B. A., Muir, T. W., Becher, O. J., and Allis, C. D. (2013) Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma, *Science*, **340**, 857-861, doi: 10.1126/science.1232245.
  67. Donaldson-Collier, M. C., Sungalee, S., Zufferey, M., Tavernari, D., Katanayeva, N., Battistello, E., Mina, M.,

- Douglass, K. M., Rey, T., Raynaud, F., Manley, S., Ciriello, G., and Oricchio, E. (2019) EZH2 oncogenic mutations drive epigenetic, transcriptional, and structural changes within chromatin domains, *Nat. Genet.*, **51**, 517-528, doi: 10.1038/s41588-018-0338-y.
68. Baharudin, R., Tieng, F. Y., Lee, L. H., and Ab Mutalib, N. S. (2020) Epigenetics of SFRP1: the dual roles in human cancers, *Cancers (Basel)*, **12**, E445, doi: 10.3390/cancers12020445.
69. Ding, B., Yan, L., Zhang, Y., Wang, Z., Zhang, Y., Xia, D., Ye, Z., and Xu, H. (2019) Analysis of the role of mutations in the KMT2D histone lysine methyltransferase in bladder cancer, *FEBS Open Bio.*, **9**, 693-706, doi: 10.1002/2211-5463.12600.
70. Li, J., Tao, X., Shen, J., Liu, L., Zhao, Q., Ma, Y., Tao, Z., Zhang, Y., Ding, B., and Xiao, Z. (2019) The molecular landscape of histone lysine methyltransferases and demethylases in non-small cell lung cancer, *Int. J. Med. Sci.*, **16**, 922-930, doi: 10.7150/ijms.34322.
71. Gale, M., Sayegh, J., Cao, J., Norcia, M., Gareiss, P., Hoyer, D., Merkel, J. S., and Yan, Q. (2016) Screen-identified selective inhibitor of lysine demethylase 5A blocks cancer cell growth and drug resistance, *Oncotarget*, **7**, 39931-39944, doi: 10.18632/oncotarget.9539.
72. Bemanian, V., Noone, J. C., Sauer, T., Touma, J., Vétvik, K., Soderberg-Naucler, C., Lindstrom, J. C., Bukholm, I. R., Kristensen, V. N., and Geisler, J. (2018) Somatic EP300-G211S mutations are associated with overall somatic mutational patterns and breast cancer specific survival in triple-negative breast cancer, *Breast Cancer Res. Treat.*, **172**, 339-351, doi: 10.1007/s10549-018-4927-3.
73. Duex, J. E., Swain, K. E., Dancik, G. M., Pauczek, R. D., Owens, C., Churchill, M. E., and Theodorescu, D. (2018) Functional impact of chromatin remodeling gene mutations and predictive signature for therapeutic response in bladder cancer, *Mol. Cancer Res.*, **16**, 69-77, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0260.
74. M'Gagne, L., Boulay, K., Topisirovic, I., Huot, M. E., and Mallette, F. A. (2017) Oncogenic activities of IDH1/2 mutations: from epigenetics to cellular signaling, *Trends Cell Biol.*, **27**, 738-752, doi: 10.1016/j.tcb.2017.06.002.
75. Deng, L., Xiong, P., Luo, Y., Bu, X., Qian, S., Zhong, W., and Lv, S. (2018) Association between IDH1/2 mutations and brain glioma grade, *Oncol. Lett.*, **16**, 5405-5409, doi: 10.3892/ol.2018.9317.
76. Tan, D., and Lynch, H. T. (2013) *Principles of Molecular Diagnostics and Personalized Cancer Medicine*, Lippincott Wilkins/Wolters Kluwer, Philadelphia.
77. Wan, Y. C., Liu, J., and Chan, K. M. (2018) Histone H3 mutations in cancer, *Curr. Pharmacol. Rep.*, **4**, 292-300, doi: 10.1007/s40495-018-0141-6.
78. Klein, B. J., Krajewski, K., Restrepo, S., Lewis, P. W., Strahl, B. D., and Kutateladze, T. G. (2018) Recognition of cancer mutations in histone H3K36 by epigenetic writers and readers, *Epigenetics*, **13**, 683-692, doi: 10.1080/15592294.2018.1503491.
79. Jia, F., Teer, J. K., Knepper, T. C., Lee, J. K., Zhou, H. H., He, Y. J., and McLeod, H. L. (2017) Discordance of somatic mutations between Asian and Caucasian patient populations with gastric cancer, *Mol. Diagn. Ther.*, **21**, 179-185, doi: 10.1007/s40291-016-0250-z.
80. Masliah-Planchon, J., Bieche, I., Guinebretiere, J. M., Bourdeaut, F., and Delattre, O. (2015) SWI/SNF chromatin remodeling and human malignancies, *Annu. Rev. Pathol.*, **10**, 145-171, doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040445.
81. Михайленко Д. С., Телешова М. В., Перепечин Д. В., Ефремов Г. Д., Качанов Д. Ю., Райкина Е. В., Бобрынина В. О., Лаврина С. Г., Митрофанова А. М., Коновалов Д. М., Варфоломеева С. Р., Алексеев Б. Я. (2017) Гермhнальные нонсенс-мутации в гене SMARCB1 у российских пациентов с рабдоидными опухолями почек, *Онкоурология*, **13**, 14-19, doi: 10.17650/1726-9776-2017-13-2-14-19.
82. Михайленко Д. С., Телешова М. В., Ефремов Г. Д., Алексеев Б. Я. (2016) Мутации гена SMARCB1 в опухолях различной локализации, *Альманах Клин. Мед.*, **44**, 558-567, doi: 10.18786/2072-0505-2016-44-5-558-567.
83. Agaimy, A., Daum, O., Markl, B., Lichtmanegger, I., Michal, M., and Hartmann, A. (2016) SWI/SNF complex-deficient undifferentiated/rhabdoid carcinomas of the gastrointestinal tract: a series of 13 cases highlighting mutually exclusive loss of SMARCA4 and SMARCA2 and frequent co-inactivation of SMARCB1 and SMARCA2, *Am. J. Surg. Pathol.*, **40**, 544-553, doi: 10.1097/PAS.0000000000000554.
84. Wang, J., Xi, Z., Xi, J., Zhang, H., Li, J., Xia, Y., and Yi, Y. (2018) Somatic mutations in renal cell carcinomas from Chinese patients revealed by whole exome sequencing, *Cancer Cell Int.*, **18**, 159, doi: 10.1186/s12935-018-0661-5.
85. Hogner, A., Krause, H., Jandrig, B., Kasim, M., Fuller, T. F., Schostak, M., Erbersdobler, A., Patzak, A., and Kilic, E. (2018) PBRM1 and VHL expression correlate in human clear cell renal cell carcinoma with differential association with patient's overall survival, *Urol. Oncol.*, **36**, 94.e1-94.e14, doi: 10.1016/j.urolonc.2017.10.027.
86. Wu, J. N., and Roberts, C. W. (2013) ARID1A mutations in cancer: another epigenetic tumor suppressor? *Cancer Discov.*, **3**, 35-43, doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0361.
87. Carril-Ajuria, L., Santos, M., Roldan-Romero, J. M., Rodriguez-Antona, C., and de Velasco, G. (2019) Prognostic and predictive value of PBRM1 in clear cell renal cell carcinoma, *Cancers (Basel)*, **12**, E16, doi: 10.3390/cancers12010016.
88. Katona, B. W., and Rustgi, A. K. (2017) Gastric cancer genomics: advances and future directions, *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **3**, 211-217, doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.01.003.
89. Yamamoto, H., Watanabe, Y., Maehata, T., Morita, R., Yoshida, Y., Oikawa, R., Ishigooka, S., Ozawa, S., Matsuo, Y., Hosoya, K., Yamashita, M., Taniguchi, H., Noshio, K., Suzuki, H., Yasuda, H., Shinomura, Y., and Itoh, F. (2014) An updated review of gastric cancer in the next-generation sequencing era: insights from bench to bedside and vice versa, *World J. Gastroenterol.*, **20**, 3927-3937, doi: 10.3748/wjg.v20.i14.3927.
90. Li, L., Li, M., Jiang, Z., and Wang, X. (2019) ARID1A mutations are associated with increased immune activity in gastrointestinal cancer, *Cells*, **8**, E678, doi: 10.3390/cells8070678.
91. Wang, Y., Hoang, L., Ji, J. X., and Huntsman, D. G. (2020) SWI/SNF complex mutations in gynecologic cancers: molecular mechanisms and models, *Annu. Rev. Pathol.*, **15**, 467-492, doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012917.
92. Cheng, Y., He, C., Wang, M., Ma, X., Mo, F., Yang, S., Han, J., and Wei, X. (2019) Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **4**, 62, doi: 10.1038/s41392-019-0095-0.
93. Chabanon, R. M., Morel, D., and Postel-Vinay, S. (2020) Exploiting epigenetic vulnerabilities in solid tumors: Novel therapeutic opportunities in the treatment of SWI/SNF-defective cancers, *Semin. Cancer Biol.*, **61**, 180-198, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.09.018.
94. Bohl, S. R., Bullinger, L., and Rucker, F. G. (2018) Epigenetic therapy: azacytidine and decitabine in acute myeloid leukemia, *Expert Rev. Hematol.*, **11**, 361-371, doi: 10.1080/17474086.2018.1453802.

95. Lee, V., Wang, J., Zahurak, M., Gootjes, E., Verheul, H. M., Parkinson, R., Kerner, Z., Sharma, A., Rosner, G., De Jesus-Acosta, A., Laheru, D., Le, D. T., Oganessian, A., Lilly, E., Brown, T., Jones, P., Baylin, S., Ahuja, N., and Azad, N. (2018) A phase I trial of a guadecitabine (SGI-110) and irinotecan in metastatic colorectal cancer patients previously exposed to irinotecan, *Clin. Cancer Res.*, **24**, 6160-6167, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0421.
96. Giri, A. K., and Aittokallio, T. (2019) DNMT inhibitors increase methylation in the cancer genome, *Front. Pharmacol.*, **10**, 385, doi: 10.3389/fphar.2019.00385.
97. Loo Yau, H., Ettayebi, I., and De Carvalho, D. D. (2019) The cancer epigenome: exploiting its vulnerabilities for immunotherapy, *Trends Cell Biol.*, **29**, 31-43, doi: 10.1016/j.tcb.2018.07.006.
98. Berdasco, M., and Esteller, M. (2019) Clinical epigenetics: seizing opportunities for translation, *Nat. Rev. Genet.*, **20**, 109-127, doi: 10.1038/s41576-018-0074-2.
99. Park, J. W., and Han, J. W. (2019) Targeting epigenetics for cancer therapy, *Arch. Pharm. Res.*, **42**, 159-170, doi: 10.1007/s12272-019-01126-z.

## INACTIVATION OF EPIGENETIC REGULATORS DUE TO MUTATIONS IN SOLID TUMORS

### Review

M. V. Nemtsova<sup>1,2</sup>, D. S. Mikhaylenko<sup>1,2\*</sup>, E. B. Kuznetsova<sup>1</sup>,  
I. I. Bykov<sup>1</sup>, and A. A. Zamyatnin, Jr.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular Medicine of the Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991 Moscow, Russia; E-mail: dimserg@mail.ru

<sup>2</sup> Research Centre for Medical Genetics, 115478 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, 119991 Moscow, Russia

Received April 27, 2020

Revised May 19, 2020

Accepted May 19, 2020

Main factors involved in carcinogenesis are associated with somatic mutations in oncogenes and tumor suppressor genes representing changes in the DNA nucleotide sequence. Epigenetic changes, such as aberrant DNA methylation, modifications of histone proteins, and chromatin remodeling, are equally important in the development of human neoplasms. From this perspective, mutations in the genes encoding key participants of epigenetic regulation are of particular interest including enzymes that methylate/demethylate DNA, enzymes that covalently attach or remove regulatory signals from histones, components of nucleosome remodeling multiprotein complexes, auxiliary proteins and cofactors of the above-mentioned molecules. This review describes both germline and somatic mutations in the key epigenetic regulators with emphasis on the latter ones in the solid human tumors, as well as considers functional consequences of these mutations on the cellular level. In addition, clinical associations of the somatic mutations in epigenetic regulators are presented, as well as DNA diagnostics of hereditary cancer syndromes due to germline mutations in the SMARC proteins and chemotherapy drugs directly affecting the altered epigenetic mechanisms for treatment of patients with solid neoplasms. The review is intended for a wide range of molecular biologists, geneticists, oncologists, and associated specialists.

**Keywords:** mutation, chromatin remodeling, histone modification, tumor suppressor gene, DNA methylation

УДК 577.217.5

## **bta-miRNA-1271 БЫКА СПОСОБСТВУЕТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ПРЕАДИПОЦИТОВ, НАПРАВЛЕННО ВОЗДЕЙСТВУЯ НА ФАКТОР АКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ 3\***

© 2020 Х.Ю. Сюй<sup>1#</sup>, Ж. Шао<sup>1#</sup>, Б.З. Инь<sup>1</sup>, Л.М. Чжан<sup>1</sup>,  
Ж.К. Фан<sup>2</sup>, Ж.С. Чжан<sup>1</sup>, Г.Ж. Ся<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup> Agriculture College, Yanbian University, 133002 Yanji, Jilin, China; E-mail: ybuac@ybu.edu.cn

<sup>2</sup> Hirosaki University, Faculty of Agriculture and Life Science, 036-8560 Hirosaki, Japan

Поступила в редакцию 04.03.2020

После доработки 21.05.2020

Принята к публикации 21.05.2020

Желтый крупный рогатый скот Яньбянь является одной из пяти наиболее многочисленных пород крупного рогатого скота в Китае. Ранее нами были обнаружены различия в степени экспрессии микроRNA bta-miR-1271 в длинных мышцах спины быков и бычков желтого крупного рогатого скота Яньбянь. Однако при этом не был получен ответ на вопрос о влиянии этой микроRNA (miRNA) на процесс образования бычьего жира. Для определения роли bta-miR-1271 в процессе адипогенеза в настоящей работе нами были использованы методы предсказания генов-мишеней, репортерного теста двойной люциферазы и повышенной в результате трансфекции экспрессии и ингибирования bta-miR-1271 в клеточных культурах преадипоцитов желтого крупного рогатого скота Яньбянь. Нами было показано, что bta-miR-1271 целенаправленно воздействует на 3'-нетранслируемый участок фактора активации транскрипции 3 (ATF3), вызывая снижения уровня экспрессии гена *ATF3*. Повышенная экспрессия bta-miR-1271 усиливалась в результате использования имитаторов miRNA, вызывающих накопление триглицеридов. Кроме того, используя RT-qPCR и вестерн-блоттинг, мы показали, что повышенная экспрессия bta-miR-1271 приводит к значительному увеличению экспрессии гена адипогенного пероксисомального пролифератор-активированного рецептора  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) и ССААТ энхансер-связывающего белка  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) как на уровне белка, так и на уровне mRNA. Ингибирование экспрессии bta-miR-1271 приводило к обратному эффекту. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что bta-miR-1271 регулирует дифференцировку преадипоцитов желтого рогатого скота Яньбянь путем ингибирования экспрессии гена *ATF3*, что указывает на важную роль miRNA-опосредованной регуляции процесса адипогенеза. Кроме того, miR-1271 и ее ген(-ы)-мишени могут стать объектами для развития нового направления исследований для изучения биологических агентов, влияющих на внутримышечное отложение жира у крупного рогатого скота.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ATF3, bta-miR-1271, дифференцировка преадипоцитов, желтый крупный рогатый скот Яньбянь.

**DOI:** 10.31857/S0320972520070039

### **ВВЕДЕНИЕ**

Желтый крупный рогатый скот Яньбянь входит в пятерку наиболее многочисленных пород крупного рогатого скота в Китае. Это крупные,

легко приспособляемые, холодостойкие, крепкие животные, которые обладают стабильными генетическими характеристиками и производят говядину с уникальным вкусом. Из-за религиозных убеждений и привычек потребителей, а также в связи с производством говядины, отличающейся высоким содержанием белка и ненасыщенных жирных кислот, этот сорт мяса набирает популярность среди потребителей [1].

Внутримышечное содержание жира оказывает большое влияние на качество и вкус мяса. В свою очередь, на него влияют многие факторы, включая породу, пол животного и состав используемого корма [2, 3]. Отложение жира в мышцах обусловлено повышением количества и объема адипоцитов. Адипоциты берут начало от мезенхимальных стволовых клеток (MSC – mesenchymal stem cells), которые сначала диффе-

Принятые сокращения: miRNA – микроRNA; UTR – нетранслируемый участок; PPAR $\gamma$  – пероксисомальный рецептор активации пролиферации; C/EBP $\alpha$  – ССААТ энхансер-связывающего белка  $\alpha$ ; ATF3 – фактор активации транскрипции 3; NC – отрицательный контроль; FBS – фетальная бычья сыворотка; MUT – мутантный тип; WT – дикий тип.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», BM20-055, 15.06.2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

# Авторы внесли равный вклад в работу.

ренцируются в адипобласты, затем в преадипоциты и, наконец, в зрелые адипоциты [4, 5]. Процесс дифференцировки преадипоцитов включает четыре этапа: пролиферация, митотическое клонирование, ранняя дифференцировка и терминальная дифференцировка [6]. Рост преадипоцитов в конечном итоге приводит к высокой плотности клеточек, которая вызывает эффект контактного ингибирования клеточного роста. В результате клетки постепенно прекращают пролиферировать и начинают подвергаться дифференцировке [7]. Процесс дифференцировки клеток строго регулируется различными факторами транскрипции. Так, например C/EBP $\beta$  индуцирует экспрессию PPAR $\gamma$ , а PPAR $\gamma$  активирует C/EBP $\alpha$ , который, в свою очередь, способствует дифференцировке преадипоцитов. В конечном итоге преадипоциты дифференцируются с образованием зрелых адипоцитов, в которых содержатся крупные липидные капли [8].

МикроRNA (miRNA), впервые обнаруженные Lee в клетках *Caenorhabditis elegans* в 1993 г., широко экспрессируются в различных эукариотических клетках [9]. MiRNA транскрибируются из геномной DNA, но не подвергаются процессу трансляции с образованием молекул белка (т.е., они являются некодирующими RNA). Вместо этого они связываются с целевыми mRNA и регулируют экспрессию генов-мишеней, ингибируя трансляцию транскрибируемых mRNA или вызывая их деградацию [10]. MiRNA проявляют свои биологические функции на уровне mRNA и участвуют в регуляции различных типов физиологической активности, включая обмен жиров и дифференцировку клеток [11]. Например, было показано, что miR-16-5p [12], miR-26b [13] и miR-181a [14] способствуют развитию ангиогенеза, в то время как miR-124-3p [15], miR-375 [16] и miR-127 [17] этот процесс ингибируют. Ранее мы проанализировали экспрессию miRNA в широчайшей мышце спины (latissimus dorsi muscle) быков и бычков желтого крупного рогатого скота Яньбянь с использованием набора Affymetrix GeneChip miRNA 3.0 и обнаружили в этой мышце дифференциальную экспрессию bta-miR-1271 [18]. Мы также использовали методы секвенирования следующего поколения (miRNA-seq и RNA-seq) для анализа длинной мышцы спины (longissimus dorsi muscle) бычков желтого крупного рогатого скота Яньбянь в возрасте 30 месяцев, отличающихся высоким и низким содержанием жира (по три особи из каждой группы). Было показано, что уровни экспрессии bta-miR-1271 и гена *ATF3* в группах с высоким и низким содержанием в мясе жира отличаются друг от друга (рис. S1

в Приложении). С помощью программы Targetscan ген *ATF3* предсказан, как целевой ген bta-miR-1271. Нами было высказано предположение, что bta-miR-1271 и *ATF3* могут повлиять на внутримышечные отложения жира желтого крупного рогатого скота Яньбянь, хотя, по нашим сведениям, до сих пор не было сообщений, подтверждающих наличия связи между bta-miR-1271 и каким-либо из ее генов-мишеней и процессом адипогенеза.

В настоящем исследовании мы изучали адипогенез в преадипоцитах новорожденной особи желтого крупного рогатого скота Яньбянь. Бычьи преадипоциты дают значительные преимущества для изучения процесса адипогенеза у представителей желтого крупного рогатого скота Яньбянь по сравнению с более широко используемой клеточной линией мышцей 3T3-L1, поскольку уникальные видоспецифичные пути синтеза и метаболизма жира в бычьих клетках не могут быть точно воспроизведены в мышечных клетках [19]. Целью настоящего исследования явилось выяснение роли bta-miR-1271 в дифференцировке преадипоцитов и создание основы для дальнейших исследований miRNA-опосредованной физиологической регуляции в жировой ткани крупного рогатого скота.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клеточная культура и дифференцировка преадипоцитов.** Преадипоциты, выделенные из представителей желтого крупного рогатого скота Яньбянь были получены от отделения животноводства Цилинской Академии сельскохозяйственных наук, Гунчжулин (Jilin Gongzhuling Animal Husbandry Branch), клеточная линия HepG2 гепатоцитов человека была получена от фармацевтического факультета Яньбяньского университета (Yanbian University School of Pharmacy). Клетки культивировали при 37 °C в инкубаторе в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в модифицированной среде Дульбекко (DMEM, «Gibco», Китай), дополненной 10%-ой фетальной бычьей сывороткой (FBS) («BI», Израиль). Когда преадипоциты выросли до 70–80% слияния, их рассеивали в 6-луночные культуральные планшеты. Когда слияние клеток достигало 100%, культуральную среду заменяли DMEM, содержащим 10 мкг/мл инсулина, 0,5 мМ 3-изобутил-1-метилксантина, 1,0 мкМ дексаметазона («Sigma-Aldrich», Китай) и 10% FBS. Через два дня среда была заменена DMEM, содержащим 10 мкг/мл инсулина и 10% FBS, а затем через два дня снова заменена DMEM, содержащим 10% FBS. Клетки выращивали в культуре в течение 9 дней.

**Биоинформатика.** Последовательность зрелой bta-miR-1271 была получена из базы данных miRBase (<http://www.mirbase.org/>). Гены, которые могут быть мишенями для miRNA, были предсказаны с помощью программы TargetScan ([http://www.targetscan.org/vert\\_71/](http://www.targetscan.org/vert_71/)).

**Трансфицирование преадипоцитов быка.** Преадипоциты быка рассеивали в 6-луночные культуральные планшеты при плотности  $1 \times 10^6$  клеток в лунку в 2 мл среды DMEM, содержащей 10% FBS. Для трансфекции 5 мкл Lipofectamine™ 2000 («Invitrogen», Китай) и 10 мкл 20 мкМ раствора имитатора bta-miR-1271 или эквивалентное количество имитатора отрицательного контроля (NC) (ингибитора miRNA или ингибитора отрицательного контроля) добавляли в 100 мкл среды Opti-MEM («Gibco», США). Эти реагенты смешивали друг с другом и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, и затем их добавляли к клеткам, культивируемым в среде DMEM, содержащей 10% FBS. Все препараты miRNA были приобретены в компании «Jiangsu GenePharma», Китай. Последовательности miRNA перечислены в табл. S1 в Приложении.

**Репортерный тест двойной люциферазы.** На основании последовательности 3'-нетранслируемого участка (3'UTR) гена *ATF3* крупного рогатого скота, которая была получена от Национального центра биотехнологической информации (NCBI, National Center for Biotechnology Information), были сконструированы праймеры, которые использовали для амплификации фрагмента гена, полностью соответствующего последовательности затравки bta-miR-1271 (от 2-го до 8-го нуклеотида на 5'-конце miRNA). Последовательности, кодирующие сайты эндонуклеазы рестрикции SacI и XbaI, были добавлены к 5'-концам прямого и обратного праймеров соответственно. Полученный продукт ПЦР лигировали в вектор pmirGLO («Promega», Китай). Мутации в предполагаемый сайт связывания (3 нуклеотида) вводили с помощью мутационных праймеров; мутантные последовательности амплифицировали методом ПЦР и клонировали в вектор pmirGLO. Последовательности праймеров приведены в табл. S2 в Приложении.

Клетки HerG2 рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты, и их трансфицировали совместно с 0,1 мкг репортерного вектора двойной люциферазы и 0,5 мкл 20 мкМ имитатора bta-miR-1271 или NC с использованием реагента Lipofectamine™ 3000 («Invitrogen», Китай). Через 48 ч после проведения трансфекции активность люциферазы определяли с использованием набора Dual-Glo™ «Luciferase Assay System», («Promega», Китай) и рассчитывали ак-

тивность с использованием люминометра «GloMax 20/20» («Promega», Китай). Все эксперименты выполнялись по три раза и независимо друг от друга.

**Окрашивание клеток с помощью красителя «Oil Red O» и анализ триглицеридов.** Клетки дважды промывали фосфатным солевым буфером (PBS) и фиксировали *in situ* в 4%-м растворе параформальдегида при комнатной температуре в течение 30 мин. Фиксированные клетки дважды промывали с помощью PBS. Концентрированный раствор красителя «Oil Red O» («Sigma-Aldrich», Китай) (0,5 г красителя растворяли в 100 мл изопропанола и затем фильтровали) смешивали со стерильной водой в соотношении 6/4. Полученный раствор добавляли в ячейки 6-луночного культурального планшета, где проводили окрашивание клеток при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем раствор красителя «Oil Red O» удаляли, и клетки три раза промывали водой и наблюдали под микроскопом. Для определения содержания триглицеридов в адипоцитах использовали набор «Triglyceride Assay Kit» («NanJing Jiancheng Bioengineering Institute», Китай).

**Экстракция RNA и количественная ПЦР-в реальном времени (RT-qPCR).** RNA была извлечена из клеток с помощью набора «Easyprep® Super Total RNA Extraction Kit» («Promega», Китай). MiRNA были извлечены с помощью набора «Mircute miRNA Isolation Kit» («Tiangen», Китай). RT-qPCR проводили с использованием набора «SYBR Premix Ex Taq II kit» («Takara», Китай). Для определения количества miRNA осуществляли обратную транскрипцию с использованием набора «miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA Kit» («Tiangen», Китай), и RT-qPCR выполняли с помощью наборов «miRcute Plus miRNA qPCR Kit» (SYBR Green) («Tiangen», Китай) и «SYBR Premix Ex Taq II kit» («Takara», Китай). Реакции RT-qPCR проводили на приборе «PCRmax Eco 48 real-time PCR machine» («PCRmax», Великобритания). Все эксперименты были выполнены три раза независимо друг от друга. Для расчета относительного уровня экспрессии соответствующей mRNA или miRNA использовали формулу  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . В качестве домашнего гена (housekeeping gene) и нормализации уровня экспрессии других белок-кодирующих генов использовали ген  $\beta$ -актина, в то время как для нормализации экспрессии miRNA использовали miРНК let-7a. Последовательности праймеров, используемых для проведения ПЦР (qPCR), представлены в табл. S3 в Приложении.

**Экстракция белка и вестерн-блоттинг.** Клетки лизировали путем инкубации с буфером лизиса

RIPA («Beoyotime», Китай), содержащим 1 мМ PMSF («Beoyotime», Китай) на льду. Общую концентрацию белка в клеточных лизатах измеряли с помощью усиленного набора «BCA Protein Assay Kit» («Beoyotime», Китай) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы белков подвергали электрофорезу в 12%-м SDS-ПААГ (20 мкг белка на полосу) и переносили на мембрану из поливинилидендифторида (PVDF) («Millipore», США) в соответствии с инструкциями производителя («Bio-Rad», США). Мембрану PVDF промывали TBS, содержащим 0,1% Tween 20 (TBST), и блокировали 5%-м овалбумином («Solarbio», Китай) в TBST в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем мембрану инкубировали с первичными антителами в блокирующем буфере в течение ночи при 4 °С, пять раз промывали TBST и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, при 4 °С в течение 2 ч. После 5× промывания TBST получали иммуноблоты с использованием раствора хемилюминесценции и анализировали с помощью системы визуализации «Alliance MINI HD9 AUTO Western Blot Imaging System» («UVITEC», США). Интенсивность полос целевого белка была нормализована к интенсивности полосы β-актина и вычислена с помощью программы «ImageJ». Кроличьи анти-ATF3 (bs-0519R), кроличьи анти-СЕРР $\alpha$  (bs-1630R) и кроличьи анти-PPAR $\gamma$  (bs-0530R) антитела были получены от компании «Bioss», Китай; мышиные анти-АС-актин (BS6007M) антитела были получены от компании «Bioworld Technology», США. Все эксперименты проводились в трех независимых повторах.

**Статистическая обработка полученных результатов.** Все полученные результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Данные были обработаны с использованием критерия Стьюдента (количественная ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг, тест определения триглицеридов) или с помощью метода ANOVA (репортерный тест двойной люциферазы). Различия между группами рассматривались как статистически достоверные при условии, что значение  $p < 0,05$ . Статистическая обработка данных была выполнена с помощью программного пакета «SPSS 20 software».

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**miR-1271 является высоко консервативной miРНК клеток млекопитающих.** В клетках быка ген (*bta*) miR-1271 локализован на хромосоме 7,

и он кодирует только одну молекулу зрелой miRNA — *bta*-miR-1271, в то время как ген (*hsa*) miR-1271 человека локализован на хромосоме 5 и генерирует две зрелых miRNA (*hsa*-miR-1271-5p и *hsa*-miR-1271-3p). Интересно, что *hsa*-miR-1271-5p и *bta*-miR-1271 являются гомологичными miRNA. Последовательность зрелой miRNA является высоко консервативной для клеток млекопитающих, включая горилл, других обезьян, свиней, козлов и т.д. Хотя существуют некоторые небольшие различия в последовательностях miRNA, исходные последовательности оказались одними и теми же (рис. 1, *a*). Целевой сайт на молекуле *bta*-miR-1271, который был предсказан в последовательности mRNA *ATF3*, показан на рис. 1, *b*. Далее мы сравнили гены-мишени, которые были предсказаны с помощью программы TargetScan, с другими в различной степени экспрессируемыми генами, выявленными в результате ранее проведенного анализа с использованием программы «RNAseq» (рис. S1 в Приложении). Было показано, что ген *ATF3* является кандидатным геном-мишенью *bta*-miR-1271.

***bta*-miR-1271 способствует дифференцировке преадипоцитов у особей желтого крупного рогатого скота Яньбянь.** Чтобы выяснить роль *bta*-miR-1271 в процессе дифференцировки преадипоцитов, меченые FAM имитаторы *bta*-miR-1271 или miRNA, служащие в качестве NC, были трансфицированы в преадипоциты особей желтого крупного рогатого скота Яньбянь. Эффективность трансфекции была высокой, что определяли измерением флуоресценции меченых FAM нуклеиновых кислот через 6 ч после трансфекции (рис 2, *a*). Эффективность трансфекции составила более 60% и существенно не отличалась между имитаторами *bta*-miR-1271 и NC (рис. 2, *b*). Через 48 ч после проведения трансфекции уровень miR-1271 был количественно определен методом RT-qPCR. Оказалось, что экспрессия miR-1271 была значительно повышена в случае проведения трансфекции имитатором miRNA в сравнении с клетками, которые были трансфицированы имитатором NC (рис. 2, *c*). Через 0, 2, 4, 6 и 8 дней культивирования клеток из них выделяли mRNA, чтобы охватить все стадии процесса дифференцировки преадипоцитов, и затем с помощью RT-qPCR измеряли уровни экспрессии генов-маркеров процесса адипогенеза — генов *PPAR $\gamma$*  и *С/ЕВР $\alpha$* . Уровни экспрессии mRNA *PPAR $\gamma$*  и *С/ЕВР $\alpha$*  достигали пиковых значений на 6-ой день индуцированной дифференцировки преадипоцитов (рис. 2, *d*). Поэтому содержание mRNA *PPAR $\gamma$*  и *С/ЕВР $\alpha$*  и количество соответствующих белков в клетках из разных групп, различающихся по

способу их обработки, оценивали методом RT-qPCR и вестерн-блоттинга соответственно, на 6-й день индуцированной дифференцировки. Клетки, трансфицированные bta-miR-1271, демонстрировали повышенное накопление триглицеридов в липидных каплях на 9-й день дифференцировки, что было подтверждено окрашиванием красителем «Oil Red O» (рис. 2, e и f) и количественным определением триглицеридов (рис. 2, g). По сравнению с имитатором отрицательного контроля, повышенная экспрессия bta-miR-1271, усиленная трансфекцией имитатора этой miRNA, приводила к существенному повышению экспрессии PPAR $\gamma$  и С/ЕВР $\alpha$  на уровне mRNA и белка. Уровни mRNA и белка PPAR $\gamma$  были соответственно в 1,71 и 1,23 раза выше, а уровни mRNA и белка С/ЕВР $\alpha$  – соответственно в 1,72 и 1,89 раза выше, чем в клетках, трансформированных с помощью NC-имитаторов ( $p < 0,05$ ) (рис. 2, h и i). Использование ингибитора bta-miR-1271 приводило к противоположному результату. В этом случае уровни mRNA и белка PPAR $\gamma$  были понижены. Они были равны 0,83 и 0,48 от соответствующих значений в группе ингибитора NC. В случае С/ЕВР $\alpha$  уровни mRNA и белка по сравнению с группой NC были равны 0,66 и 0,54 от соответствующих значений для контрольной группы ( $p < 0,05$ ) (рис. 2, j и k). В целом, представленные результаты позволяют сделать предположение, что bta-miR-1271 способствует развитию процесса адипогенеза в культуре преадипоцитов желтого крупного рогатого скота Яньбянь.

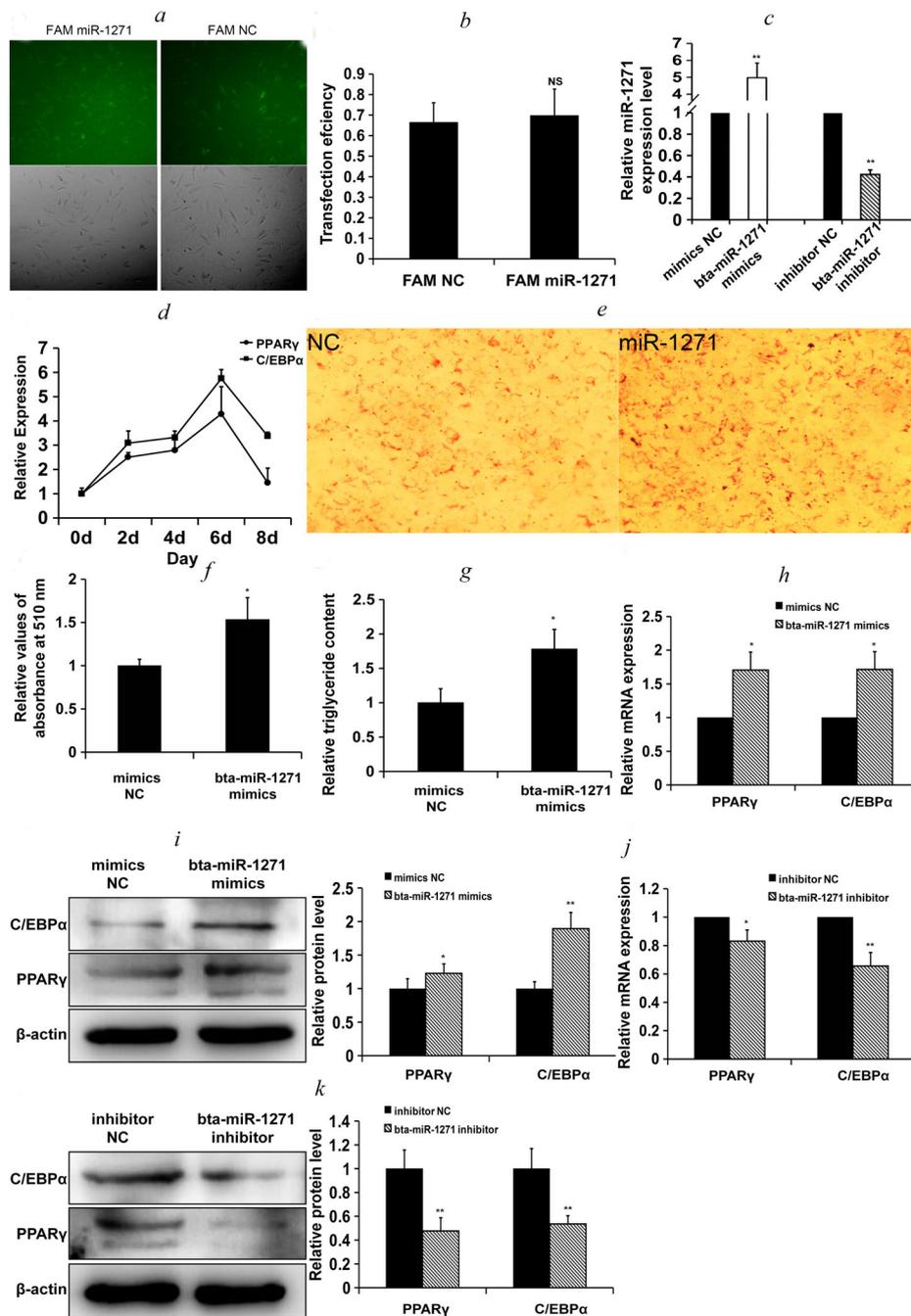
**bta-miR-1271 взаимодействует непосредственно с mRNA 3'UTR ATF3.** Чтобы выяснить, действительно ли bta-miR-1271 непосредственно взаимодействует с mRNA ATF3, нами был создан вектор дикого типа pmirGLO-wild type (WT) и мутантный вектор (pmirGLO-mutant type (MUT) (рис. 3, a и b). Клетки HepG2 были подвергнуты совместной трансфекции имитатором bta-miR-1271 или имитатором NC, а также или с вектором pmirGLO дикого типа (pmirGLO-WT) или с вектором pmirGLO-MUT. Через 24 ч после трансфекции активность люциферазы в клетках, трансфицированных имитаторами bta-miR-1271, была ниже, чем в клетках, трансфицированных имитаторами NC (рис. 3, c).

Экспрессия гена ATF3 во время дифференцировки преадипоцитов понижается и достигает минимальных значений на 4-й день культивирования клеток (рис. 3, d). Чтобы проверить предположение о том, что bta-miR-1271 может способствовать процессу адипогенеза через подавление экспрессии гена ATF3, нами была осуществлена кратковременная трансфекция пре-

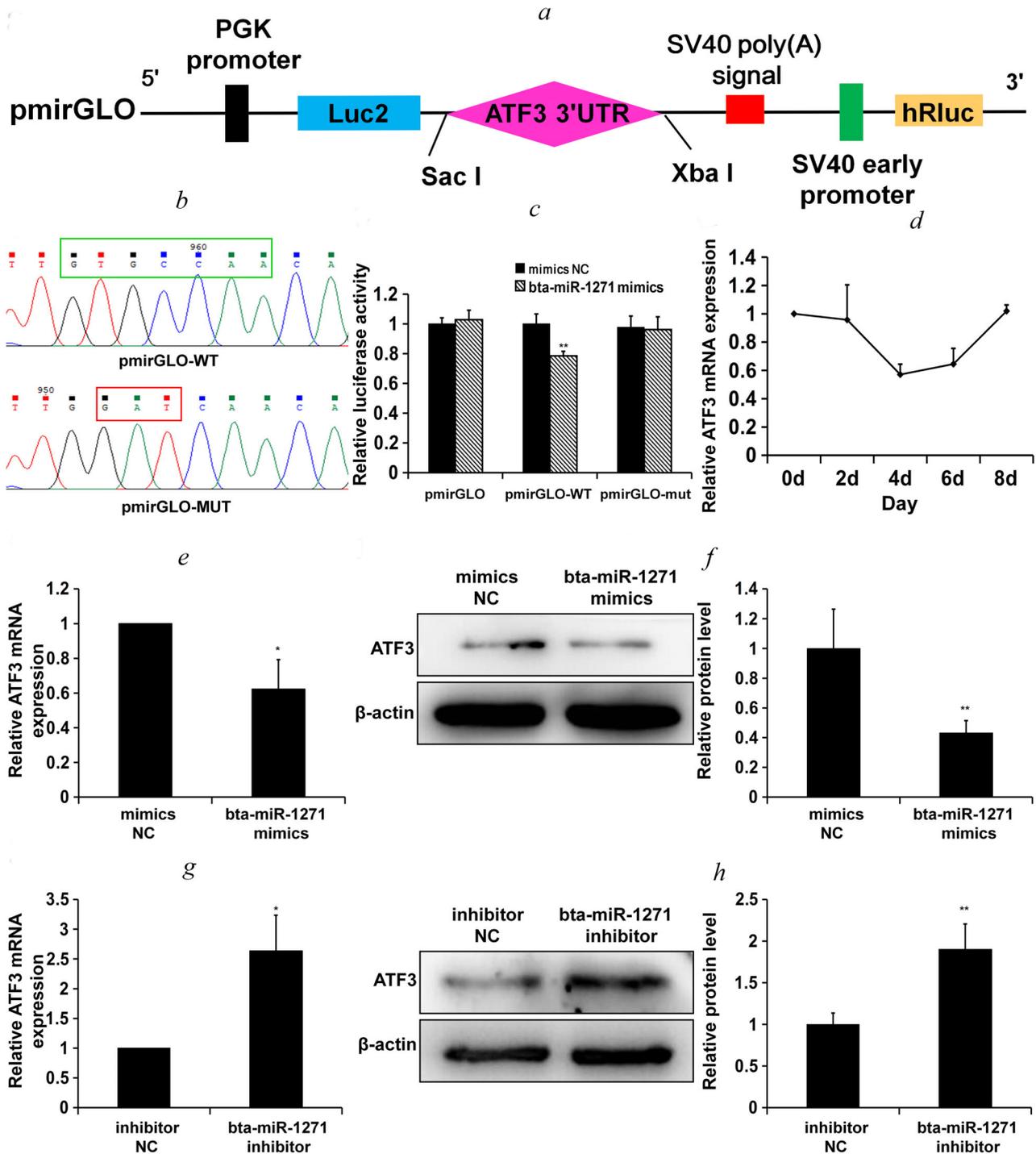


**Рис. 1.** Гомологичные последовательности miR-1271 и предсказание гена-мишени для этой miRNA с помощью биоинформатических подходов. a – Последовательность miR-1271 клеток млекопитающих с исходными участками последовательности, выделенными желтым цветом. Звездочками отмечены положения строго консервативных остатков. b – Сайт-мишень на молекуле bta-miR-1271 внутри 3'UTR транскрипта mRNA гена ATF3 (выделен красным цветом). (С цветными вариантами рис. 1–3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm>)

адипоцитов быка имитатором bta-miR-1271 или ее ингибитором. Было показано, что на средних стадиях процесса дифференцировки преадипоцитов (4 дня после индукции процесса дифференцировки клеток) уровни mRNA и белка ATF3 были значительно понижены вследствие усиленной имитаторами повышенной экспрессии bta-miR-1271 (рис. 3, e и f). Подавление экспрессии bta-miR-1271 с помощью ингибитора bta-miR-1271, напротив, приводило к повышенной экспрессии ATF3 (рис. 3, g и h). В целом полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ген ATF3 является непосредственной мишенью bta-miR-1271.



**Рис. 2.** bta-miR-1271 способствует дифференцировке преадипоцитов желтого крупного рогатого скота Яньбянь. *a* – Меченый FAM имитатор NC и имитатор miR-1271 были кратковременно трансфицированы в преадипоциты. Эффективность трансфекции определяли через 6 ч после проведения трансфекции с помощью яркой световой визуализации и флуоресцентной микроскопии. Зелёным цветом представлены имитатор NC или имитатор miR-1271, трансфицированные в клетку (увеличение 100×), *b* – эффективность трансфекции FAM-меченой miRNA ( $n = 3$ ; NS – незначительные различия). *c* – Уровни bta-miR-1271, выявленные методом RT-qPCR через 48 ч после проведения трансфекции ( $n = 3$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). *d* – Изменения уровня mRNA PPAR $\gamma$  и C/EBP $\alpha$  во время дифференцировки преадипоцитов ( $n = 3$ ; \*  $p < 0,05$ ). *e* – Образование липидных капель в клетках, трансфицированных имитаторами NC и bta-miR-1271 через 9 дней после индукции процесса дифференцировки преадипоцитов, определенное с помощью окрашивания клеток красителем «Oil Red O» (увеличение 200×). *f* – Содержание липидов определяли после экстракции изопропанолом красителя «Oil Red O» и последующего измерения поглощения при 510 нм ( $n = 3$ ). *g* – Содержание триглицеридов в клетках, трансфицированных NC или имитатором ( $n = 3$ ). *h* и *i* – Влияние повышенной экспрессии bta-miR-1271, индуцированной в результате трансфекции имитатором, на уровни mRNA (*h*) и белка PPAR $\gamma$  (*i*) C/EBP $\alpha$ , рассчитанные по результатам RT-qPCR и вестерн-блоттинга соответственно ( $n = 3$ ). *j* и *k* – Влияние нокдауна bta-miR-1271 на экспрессию PPAR $\gamma$  и C/EBP $\alpha$  после проведения трансфекции ингибитором этой miRNA, определенное на уровне mRNA (*j*) и белка (*k*) в сравнении с клетками, трансфицированными ингибитором NC ( $n = 3$ ); \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$



**Рис. 3.** Ген *ATF3* – мишень bta-miR-1271. *a* – Схематическое представление стратегии клонирования целевой последовательности гена *ATF3*, нижележащей по отношению к гену люциферазы светлячков в векторе pmirGLO. *b* – Участок связывания bta-miR-1271 (он выделен зелёным цветом) в 3'UTR участке гена *ATF3*, который был клонирован в вектор pmirGLO для создания вектора дикого типа, pmirGLO-WT. Три нуклеотида в участке связывания bta-miR-1271 (они выделены красным цветом) были заменены, чтобы создать мутантный вектор pmirGLO-MUT. *c* – Активность люциферазы в клетках линии НерГ2, трансфицированных векторами pmirGLO с репортером двойной люциферазы. Относительную активность люциферазы рассчитывали на основе соотношения люминесценции светлячков (Firefly) с люминесценцией Renilla ( $n = 3$ ; \*  $p < 0,05$ ). *d* – Экспрессия гена *ATF3* во время дифференцировки преадипоцитов из особой желтого крупного рогатого скота Яньбянь ( $n = 3$ ). *e* и *f* – Влияние повышенной экспрессии bta-miR-1271 (усиленной имитатором bta-miR-1271) или ее нокдауна (с помощью ингибитора bta-miR-1271) в адипоцитах быка на уровень mRNA (*e*) ( $n = 4$ ) и белка (*f*) ( $n = 3$ ). *g* и *h* – Влияние нокдауна bta-miR-1271 (с помощью ингибитора bta-miR-1271) в адипоцитах крупного рогатого скота на количество мРНК *ATF3* (*g*) ( $n = 4$ ) и белка (*h*) ( $n = 3$ ); \*  $p \approx 0,05$ ; \*\*  $p \approx 0,01$

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Желтый крупный рогатый скот Яньбянь является высоко производительным источником мяса с уникальными вкусовыми качествами. Он занимает передовые позиции на рынке говядины. Это всемирно известная порода мясного скота, несмотря на очевидные недостатки, такие как низкий уровень убоя и недостаточный уровень производства говядины высшего качества. Понимание молекулярных механизмов, которые регулируют синтез жиров у особей желтого крупного рогатого скота Яньбянь, стало важной частью программы по его молекулярному разведению. В последние годы широкое внимание привлекло культивирование преадипоцитов *in vitro* в связи с тем, что появилась возможность непосредственно контролировать процесс адипогенеза в ответ на воздействие различных регуляторных факторов и тем самым получить представление о механизмах образования жировой ткани в клетках преадипоцитов *in vivo* [20]. Количество жировых клеток, их объем и накопление в них липидных капель оказывают прямое влияние на уровень отложения жира в тканях. В свою очередь, тип и содержание жировой ткани быка непосредственно сказывается на нежности и аромате мяса [21]. MiRNA являются важнейшими регуляторами процесса адипогенеза и метаболизма липидов, а некоторые из них, такие как miR-214-3p, miR-20a-5p и miR-144-3p, способствуют адипогенезу [22–24], в то время как другие miRNA отрицательно регулируют адипогенез (miR-18b-3p и miR-27) [25, 26].

В то время как во многих работах было показано, что miR-1271 регулирует некоторые ключевые биологические функции, включая пролиферацию опухолевых клеток [27, 28] и нейромодуляцию [29], до сих пор не было работ, предполагающих участие miR-1271 в процессе адипогенеза. В наших предыдущих работах с помощью анализа miRNA-seq и RNA-seq мы показали, что miR-1271 дифференцированно экспрессировался в длинных мышцах спины у особей желтого крупного рогатого скота Яньбянь, отличающихся высоким или низким содержанием жира. Среди генов-мишеней miR-1271, предсказанных методами биоинформатики, ген *ATF3* также был дифференцированно экспрессирован в этих двух группах крупного рогатого скота. Поэтому мы предположили, что miR-1271 регулирует липидный обмен, нацеливаясь на mRNA *ATF3*. В настоящей работе исследовали регулируют ли bta-miR-1271 адипогенез в культивируемых *in vitro* преадипоцитах желтого крупного рогатого скота Яньбянь. Установлено, что сверхэкспрессия bta-miR-1271, усиленная трансфекцией кле-

ток с имитацией bta-miR-1271, способствует дифференцировке адипоцитов и образованию липидных капель. Кроме того, во время дифференцировки преадипоцитов повышение экспрессии bta-miR-1271 приводило к повышению экспрессии адипогенных генов *PPAR $\gamma$*  и *C/EBP $\alpha$* . Для проведения сравнения уровня экспрессии miRNA в длинных мышцах спины у 30-месячных бычков желтого крупного рогатого скота Яньбянь с различным содержанием жира в мышцах нами был использован метод miRNA-seq. Было показано, что уровень экспрессии miR-1271 выше среднего уровня miRNA, экспрессируемых в различной степени. Это подтвердило, что уровень эндогенной экспрессии miR-1271 тоже выше среднего уровня. Поэтому, чтобы подавить эндогенную экспрессию bta-miR-1271, клетки были нами трансфицированы ингибитором bta-miR-1271. Полученные нами результаты свидетельствовали о том, что ингибирование синтеза эндогенной miR-1271 может привести к снижению уровня экспрессии *PPAR $\gamma$*  и *C/EBP $\alpha$*  и повысить экспрессию *ATF3* в адипоцитах. В целом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что bta-miR-1271 может способствовать метаболизму липидов у особей желтого крупного рогатого скота Яньбянь.

*ATF3* представляет собой ген раннего ответа на стресс, который принадлежит к семейству факторов транскрипции ATF/CREB [30]. Было показано, что *ATF3* ингибирует адипогенную дифференцировку мышечных клеток линии 3T3-L1, снижая уровень экспрессии *PPAR $\gamma$*  и *C/EBP $\alpha$*  [31, 32]. Кроме того, было показано, что *ATF3* ингибирует экспрессию гена адипонектина в клетках 3T3-L1 [33]. Далее было обнаружено, что *ATF3* участвует в активации Wnt/ $\beta$ -катенин-зависимого сигнального пути [34], который принято рассматривать, как основной негативный регулятор процесса дифференцировки преадипоцитов. Считается, что передача сигнала через этот путь вызывает ингибирование процесса адипогенеза [35, 36]. Jang et al. [37] показали, что уровень экспрессии гена *ATF3* в белой жировой ткани у страдающих ожирением мышей, получавших обогащенную жирами пищу, был выше по сравнению с контрольными животными. Следовательно, экспрессия *ATF3* может быть связана с образованием липидных капель, что соответствовало увеличению уровня экспрессии *ATF3* после 5-го дня. Нами также была изучена относительная экспрессия *ATF3* во время дифференцировки преадипоцитов у особей желтого крупного рогатого скота Яньбянь. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что экспрессия *ATF3* во время на-

чальной стадии процесса дифференцировки преадипоцитов понижается и достигает минимального значения на 4-й день процесса дифференцировки. Затем уровень экспрессии постепенно возрастает до завершения процесса созревания адипоцитов. В целом ATF3 экспрессировался на низком уровне до образования липидных капель. После 4-х дней дифференцировки в адипоцитах образовывались липидные капли, и уровень экспрессии ATF3 также повышался. В настоящей работе с помощью метода репортерной двойной люциферазы мы показали, что bta-miR-1271 ингибирует экспрессию гена *ATF3*, связываясь с его 3'UTR участком. Далее нами были получены доказательства того, что повышенная экспрессия bta-miR-1271 вызывает ингибирование экспрессии mRNA и белка ATF3, в то время как нокдаун bta-miR-1271 способствует экспрессии гена *ATF3*, что подтверждает роль гена *ATF3* как гена-мишени bta-miR-1271.

Несмотря на то, что до сих пор не опубликованы исследования, посвященные роли miR-1271 в процессе дифференцировки преадипоцитов, есть сообщения, свидетельствующие о том, что miR-1271 может опосредованно ингибировать Wnt/ $\beta$ -катенин-зависимый сигнальный путь и ингибировать TGF $\beta$ -опосредованную передачу сигнала, целенаправленно воздействуя на другие гены [38, 39]. Мы предполагаем, что bta-miR-1271 способствует экспрессии PPAR $\gamma$  и C/EBP $\alpha$  путем ингибирования экспрессии гена

*ATF3*, тем самым способствуя дифференцировке жировых клеток. Понимание молекулярных механизмов, регулирующих процесс адипогенеза у крупного рогатого скота, может дать необходимую информацию для разработки программ молекулярного разведения. Кроме того, miR-1271 и ее гены-мишени могут играть роль в патогенезе ожирения, открывая новое направление исследований для изучения биологических методов лечения заболеваний, связанных с ожирением.

**Финансирование.** Выполнение данной работы было поддержано Программой Развития Науки и Технологий провинции Цзилинь Китайской Народной Республики (грант № 20160204017NY).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в какой-либо сфере деятельности.

**Соблюдение этических норм.** При выполнении настоящей работы были соблюдены все требования международных, национальных и/или ведомственных руководств по работе с лабораторными животными.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 7, 2020.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yun, J., Jin, H., Cao, Y., Zhang, L., Zhao, Y., Jin, X., and Yu, Y. (2018) RNA-Seq analysis reveals a positive role of HTR2A in adipogenesis in yan yellow cattle, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1760, doi: 10.3390/ijms19061760.
2. Han, J., Lee, J. E., Jin, J., Lim, J. S., Oh, N., Kim, K., Chang, S., Shibuya, M., Kim, H., and Koh, G. Y. (2011) The spatiotemporal development of adipose tissue, *Development*, **138**, 5027-5037, doi: 10.1242/dev.067686.
3. Tang, W., Zeve, D., Suh, J. M., Bosnakovski, D., Kyba, M., Hammer, R. E., Tallquist, M. D., and Graff, J. M. (2008) White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature, *Science*, **322**, 583-586, doi: 10.1126/science.1156232.
4. Dani, C., Smith, A., Dessolin, S., Leroy, P., Staccini, L., Villageois, P., Darimont, C., and Ailhaud, G. (1997) Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes *in vitro*, *J. Cell Sci.*, **110**, 1279-1285, doi: 10.1159/000244147.
5. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, **284**, 143-147, doi: 10.1126/science.284.5411.143.
6. Gregoire, F. M., Smas, C. M., and Sul, H. S. (1998) Understanding adipocyte differentiation, *Physiol. Rev.*, **78**, 783-809, doi: 10.1152/physrev.1998.78.3.783.
7. Otto, T. C., and Lane, M. D. (2005) Adipose development: from stem cell to adipocyte, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **40**, 229-242, doi: 10.1080/10409230591008189.
8. Gregoire, F. M. (2001) Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell, *Exp. Biol. Med.*, **226**, 997-1002, doi: 10.1177/153537020122601106.
9. Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, **116**, 281-297, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
10. Bartel, D. P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, **136**, 215-233, doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
11. Vishnoi, A., and Rani, S. (2017) MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview, *Methods Mol. Biol.*, **1509**, 1-10, doi: 10.1007/978-1-4939-6524-3\_1.
12. Xu, J., Zhang, L., Shu, G., and Wang, B. (2019) MicroRNA-16-5p promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through regulating EPT1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **514**, 1251-1256, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.04.179.
13. Li, G., Ning, C., Ma, Y., Jin, L., Tang, Q., Li, X., Li, M., and Liu, H. (2017) miR-26b Promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through targeting *P TEN*, *DNA Cell Biol.*, **36**, 672-681, doi: 10.1089/dna.2017.3712.

14. Zhang, Z., Gao, Y., Xu, M., Wang, C., Fu, X., Liu, J., Han, D., Jiang, H., Yuan, B., and Zhang, J. (2019) miR-181a regulate porcine preadipocyte differentiation by targeting TGFBR1, *Gene*, **681**, 45-51, doi: 10.1016/j.gene.2018.09.046.
15. Pan, Y., Jing, J., Qiao, L., Liu, J., An, L., Li, B., Ren, D., and Liu, W. (2018) MiRNA-seq reveals that miR-124-3p inhibits adipogenic differentiation of the stromal vascular fraction in sheep via targeting C/EBP $\alpha$ , *Domest. Anim. Endocrinol.*, **65**, 17-23, doi: 10.1016/j.domaniend.2018.05.002.
16. Liu, S., Sun, G., Yuan, B., Zhang, L., Gao, Y., Jiang, H., Dai, L., and Zhang, J. (2016) miR-375 Negatively regulates porcine preadipocyte differentiation by targeting BMPR2, *FEBS Lett.*, **590**, 1417-1427, doi: 10.1002/1873-3468.12169.
17. Gao, Y., Wang, Y., Chen, X., Peng, Y., Chen, F., He, Y., Pang, W., Yang, G., and Yu, T. (2019) MiR-127 attenuates adipogenesis by targeting MAPK4 and HOXC6 in porcine adipocytes, *J. Cell. Physiol.*, **234**, 21838-21850, doi: 10.1002/jcp.28660.
18. Xia, G. (2014) *Screening of Candidate Genes Associated to Meat Quality Traits of Yanbian Yellow Cattle by a Combination of miRNA and Functional Genes Transcriptome*, PhD Thesis, Yanji, Yanbian University [in Chinese].
19. Tran, K., Gealekman, O., Frontini, A., Zingaretti, M. C., Morroni, M., Giordano, A., Smorlesi, A., Perugini, J., De Matteis, R., and Sbarbati, A. (2012) The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells, *Cell Metab.*, **15**, 222-229, doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.008.
20. Fernyhough, M. E., Vierck, J. L., Hausman, G. J., Mir, P. S., Okine, E. K., and Dodson, M. V. (2004) Primary adipocyte culture: adipocyte purification methods may lead to a new understanding of adipose tissue growth and development, *Cytotechnology*, **46**, 163-172, doi: 10.1007/s10616-005-2602-0.
21. Carnevalli, L. S., Masuda, K., Frigerio, F., Bacquer, O. L., Um, S. H., Gandin, V., Topisirovic, I., Sonenberg, N., Thomas, G., and Kozma, S. C. (2010) S6K1 plays a critical role in early adipocyte differentiation, *Dev. Cell*, **18**, 763-774, doi: 10.1016/j.devcel.2010.02.018.
22. Xi, F., Wei, C., Xu, Y., Ma, L., He, Y., Shi, X., Yang, G., and Yu, T. (2019) MicroRNA-214-3p targeting Ctnnb1 promotes 3T3-L1 preadipocyte differentiation by interfering with the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 1816, doi: 10.3390/ijms20081816.
23. Zhu, E., Zhang, J., Zhou, J., Yuan, H., Zhao, W., and Wang, B. (2018) miR-20a-5p promotes adipogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells via targeting Kruppel-like factor 3, *J. Mol. Endocrinol.*, **60**, 225-237, doi: 10.1530/JME-17-0183.
24. Shen, L., Li, Q., Wang, J., Zhao, Y., Niu, L., Bai, L., Shuai, S., Li, X., Zhang, S., and Zhu, L. (2018) miR-144-3p promotes adipogenesis through releasing C/EBP $\alpha$  from Klf3 and CtBP2, *Front. Genet.*, **9**, doi: 10.3389/fgene.2018.00677.
25. Sun, G., Li, F., Ma, X., Sun, J., Jiang, R., Tian, Y., Han, R., Li, G., Wang, Y., and Li, Z. (2019) gga-miRNA-18b-3p inhibits intramuscular adipocytes differentiation in chicken by targeting the *ACOT13* gene, *Cells*, **8**, 556, doi: 10.3390/cells8060556.
26. Jang, S. Y., Chae, M. K., Lee, J. H., Lee, E. J., and Yoon, J. S. (2019) MicroRNA-27 inhibits adipogenic differentiation in orbital fibroblasts from patients with Graves' orbitopathy, *PLoS One*, **14**, e0221077, doi: 10.1371/journal.pone.0221077.
27. Lin, M., Yang, Y., Peng, Z., Zhang, M., Liang, J., Chen, W., Liu, X., and Zheng, Y. (2017) FOXK2, regulated by miR-1271-5p, promotes cell growth and indicates unfavorable prognosis in hepatocellular carcinoma, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **88**, 155-161, doi: 10.1016/j.biocel.2017.05.019.
28. Liu, X., Ma, L., Rao, Q., Mao, Y., Xin, Y., Xu, H., Li, C., and Wang, X. (2015) MiR-1271 inhibits ovarian cancer growth by targeting cyclin G1, *Med. Sci. Monit.*, **21**, 3152-3158, doi: 10.12659/MSM.895562.
29. Jensen, K. P., and Covault, J. (2011) Human miR-1271 is a miR-96 paralog with distinct non-conserved brain expression pattern, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 701-711, doi: 10.1093/nar/gkq798.
30. Hai, T., Wolfgang, C. D., Marsee, D. K., Allen, A. E., and Sivaprasad, U. (1999) ATF3 and stress responses, *Gene Express.*, **7**, 321-335, doi: 10.1248/bpb.29.2502.
31. Jang, M., and Jung, M. H. (2014) ATF3 represses PPAR $\gamma$  expression and inhibits adipocyte differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **454**, 58-64, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.028.
32. Jang, M. K., Kim, C. H., Seong, J. K., and Jung, M. H. (2012) ATF3 inhibits adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **421**, 38-43, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.104.
33. Kim, H. B., Kong, M., Kim, T. M., Suh, Y. H., Kim, W. H., Lim, J. H., Song, J. H., and Jung, M. H. (2006) NFATc4 and ATF3 negatively regulate adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes, *Diabetes*, **55**, 1342-1352, doi: 10.2337/db05-1507.
34. Yan, L., Coletta, L. D., Powell, K. L., Shen, J., Thames, H. D., Aldaz, C. M., and Macleod, M. C. (2011) Activation of the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in ATF3-induced mammary tumors, *PLoS One*, **6**, e0016515, doi: 10.1371/journal.pone.0016515.
35. Laudes, M. (2011) Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes, *J. Mol. Endocrinol.*, **46**, R65-R72, doi: 10.1530/JME-10-0169.
36. Ross, S. E., Hemati, N., Longo, K. A., Bennett, C. N., Lucas, P. C., Erickson, R. L., and Macdougald, O. A. (2000) Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling, *Science*, **289**, 950-953, doi: 10.1126/science.289.5481.950.
37. Jang, M., Son, Y., and Jung, M. H. (2013). ATF3 plays a role in adipocyte hypoxia-mediated mitochondria dysfunction in obesity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **431**, 421-427, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.154.
38. Li, J., Xu, J., Yan, X., Jin, K., Li, W., and Zhang, R. (2018) Suppression of Capn4 by microRNA-1271 impedes the proliferation and invasion of colorectal cancer cells, *Biomed. Pharmacother.*, **99**, 162-168, doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.107.
39. Xiang, X., Deng, J., Liu, Y., Wan, L., Feng, M., Chen, J., and Xiong, J. (2015) MiR-1271 inhibits cell proliferation, invasion and EMT in gastric cancer by targeting FOXQ1, *Cell. Physiol. Biochem.*, **36**, 1382-1394, doi: 10.1159/000430304.

**BOVINE bta-microRNA-1271 PROMOTES  
PREADIPOCYTE DIFFERENTIATION BY TARGETING  
ACTIVATION TRANSCRIPTION FACTOR 3\*****H. Y. Xu<sup>1#</sup>, J. Shao<sup>1#</sup>, B. Z. Yin<sup>1</sup>, L. M. Zhang<sup>1</sup>, J. C. Fang<sup>2</sup>, J. S. Zhang<sup>1</sup>, and G. J. Xia<sup>1\*\*</sup>**<sup>1</sup> *Agriculture College, Yanbian University, 133002 Yanji, Jilin, China; E-mail: ybuac@ybu.edu.cn*<sup>2</sup> *Hirosaki University, Faculty of Agriculture and Life Science, 036-8560 Hirosaki, Japan*

Received March 4, 2020

Revised May 21, 2020

Accepted May 21, 2020

Yanbian yellow cattle are one of the top five largest breeds of cattle in China. We had previously found that bta-miR-1271 is differentially expressed in the longissimus dorsi muscles of Yanbian yellow bulls and steers. However, whether bta-miR-1271 affects bovine fat formation is unclear. In this study, we used target gene prediction, dual-luciferase reporter assay, and transfection-mediated overexpression and inhibition of bta-miR-1271 in a culture of Yanbian yellow cattle preadipocytes to investigate the role of bta-miR-1271 in adipogenesis. We showed that bta-miR-1271 directly targets the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the activating transcription factor 3 (ATF3) mRNA and down-regulates its expression. Overexpression of bta-miR-1271 enforced by the miRNA mimics promoted triglyceride accumulation and significantly upregulated expression of the adipogenic peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and CCAAT enhancer-binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) genes at both the protein and mRNA levels, as demonstrated by RT-qPCR and Western blot analyses. Conversely, inhibition of bta-miR-1271 expression produced the opposite effect. Our results show that bta-miR-1271 regulates differentiation of Yanbian yellow cattle preadipocytes by inhibiting *ATF3* expression, which highlights the importance of microRNA-mediated regulation of adipogenesis. miR-1271 and its target gene(s) may provide a new research direction for investigating biological agents affecting intramuscular fat deposition in cattle.

*Keywords:* ATF3, bta-miR-1271, preadipocyte differentiation, Yanbian yellow cattle

УДК 577.2

## МАРКЕРЫ АКТИВАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПУТЕЙ СВЯЗАНЫ С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ТЕРАПИИ ТРАСТУЗУМАБОМ ПРИ HER2-ПОЗИТИВНОМ МЕТАСТАТИЧЕСКОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛУЧШЕ, ЧЕМ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ОТДЕЛЬНЫХ ГЕНОВ\*

© 2020 М. Сорокин<sup>1,2,3</sup>, К. Игнатъев<sup>4</sup>, В. Барбара<sup>4</sup>, У. Владимиров<sup>1,3</sup>, А. Муравьева<sup>3</sup>, М. Сунцова<sup>1</sup>, Н. Гайфуллин<sup>5</sup>, И. Воротников<sup>6</sup>, Д. Камашев<sup>1,3</sup>, А. Бондаренко<sup>7</sup>, М. Баранова<sup>7,8</sup>, Е. Поддубская<sup>3,7</sup>, А. Буздин<sup>1,2,3,9\*\*</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, 117997 Москва, Россия; электронная почта: [buzdin@oncobox.com](mailto:buzdin@oncobox.com)

<sup>2</sup> *OmicWay Corp.*, 91789 Walnut, CA, США

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991 Москва, Россия

<sup>4</sup> ГБУЗ Республики Карелия «Республиканский онкологический диспансер», 185016 Петрозаводск, Россия

<sup>5</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119991 Москва, Россия

<sup>6</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478 Москва, Россия

<sup>7</sup> Многопрофильный медицинский центр «ВитаМед», 121309 Москва, Россия

<sup>8</sup> ФГБНУ «Российский Научный Центр Хирургии им. акад. Б.В. Петровского», 119991 Москва, Россия

<sup>9</sup> ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 31.03.2020

После доработки 29.05.2020

Принята к публикации 31.05.2020

Повышенная экспрессия или амплификация гена *ERBB2*, кодирующего тирозинкиназу HER2, — хорошо известный и широко используемый прогностический биомаркер назначения таргетного противоопухолевого препарата трастузумаб и его аналогов при раке молочной железы (РМЖ). Поскольку часть опухолей с повышенной экспрессией HER2 все же не отвечает на трастузумаб, мы провели клиническое исследование NCT03521245 для выявления дополнительных экспрессионных биомаркеров трастузумаба при HER2-позитивных РМЖ. С помощью РНК-секвенирования мы профилировали генную экспрессию для 23-х образцов фиксированной в формалине парафинизированной ткани HER2-позитивного РМЖ, полученных от пациентов с известным статусом ответа на трастузумаб. Для групп пациентов-ответчиков и неответчиков на лечение мы обнаружили ряд дифференциально регулируемых генов и молекулярных путей. Мы сравнили эти результаты с 42-мя профилями РНК-секвенирования пациентов-ответчиков и неответчиков на терапию трастузумабом, ранее опубликованными по итогам клинических исследований NCT00513292 и NCT00353483. Мы не нашли корреляции между статусом ответа и уровнем экспрессии самого гена *ERBB2* в HER2-положительных образцах РМЖ. Сравнение дифференциально регулируемых генов и молекулярных путей в объединенном наборе данных выявило 15 активированных и 27 подавленных у ответчиков на трастузумаб генов и 15/25 молекулярных путей соответственно. Тем не менее по сравнению с моделью случайного распределения статистически значимым оказалось только пересечение молекулярных путей, активированных у ответчиков по сравнению с неответчиками. Классификатор, построенный нами на основе наиболее сильно активированного дифференциального молекулярного пути «сAMP Pathway Protein Retention», показал наилучшую эффективность для прогнозирования ответа на трастузумаб HER2-положительного РМЖ как для наших, так и для ранее опубликованных данных. Этот путь также статистически достоверно ( $p = 0,041$ ) предсказывал время до рецидивирования заболевания в комбинированном наборе данных.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** рак молочной железы, HER2, *ERBB2*, транскриптомика, РНК-секвенирование, трастузумаб, таргетная терапия, персонализированная медицина, NCT03521245.

DOI: 10.31857/S0320972520070040

Принятые сокращения: РМЖ — рак молочной железы, PR — прогестероновый рецептор, AUC — площадь под ROC-кривой, УАП — уровень активации пути, ER — эстрогеновый рецептор.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-089, 24.06.2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

## ВВЕДЕНИЕ

На исследования и лечение рака молочной железы (РМЖ) сильно повлияло открытие таких мощных прогностических биомаркеров, как сверхэкспрессия или амплификация тирозинкиназы HER2, экспрессия эстрогенового (ER) и прогестеронового (PR) рецепторов. Злокачественные опухоли молочной железы, где отсутствует значительная экспрессия ER и PR, с базальным уровнем HER2 классифицируют как тройной отрицательный РМЖ. При РМЖ амплификация *ERBB2* и повышенная экспрессия кодируемого им белка HER2 наблюдаются в 15–35% случаев [1–3]. Амплификация *ERBB2* и избыточная экспрессия HER2, называемая «HER2-положительным» фенотипом опухоли, хорошо коррелирует с ответом пациента на лечение трастузумабом – HER2-специфичным моноклональным антителом, применяемым для таргетной терапии РМЖ и рака желудка [4]. Для HER2-положительных онкологических заболеваний таргетная терапия трастузумабом обычно рекомендуется независимо от статуса ER и PR, что привело к значительному увеличению выживаемости больных в последние годы. HER2-таргетная терапия часто сочетается со стандартными режимами химиотерапии или с гормональной терапией. И наоборот, подавляющее большинство HER2-отрицательных опухолей оказываются нечувствительны к HER2-таргетным препаратам [5, 6].

Тем не менее клиническая практика показывает, что только 25–80% женщин с HER2-положительным РМЖ (согласно иммуногистохимическим тестам и/или гибридизации *in situ*) отвечают на трастузумаб [7–9]. В целом, уровень ответа оказывается выше, когда трастузумаб используется в сочетании с химиотерапией или другими таргетными препаратами, и ниже – в случае метастатического рака [10].

Следовательно, поиск дополнительных молекулярных биомаркеров, связанных с ответом на трастузумаб при HER2-положительном РМЖ, представляет большой фундаментальный и практический интерес. Молекулярные биомаркеры могут включать диагностически значимые мутации или уровни генной экспрессии на уровне мРНК или белка [11]. Кроме того, биомаркерами нового поколения могут служить уровни активации молекулярных путей, рассчитанные на основе профилей генной экспрессии [5, 12, 13]. Они показывают большую диагностическую значимость, чем уровни экспрессии единичных генов или наличие отдельных мутаций [14–17].

Данное преимущество молекулярных путей в качестве биомаркеров обусловлено их фунда-

ментальным свойством объединения экспрессии отдельных генов в результирующий показатель, называемый уровнем активации пути (УАП). Объединение генных продуктов по функциональному признаку в молекулярные пути позволяет использовать УАП вместо уровней экспрессии отдельных генов [5, 18]. Для многих видов рака было показано, что использование УАП вместо уровней отдельных генов позволяет нивелировать артефакты измерения генной экспрессии за счет уменьшения значимости технических ошибок основных экспериментальных платформ [19, 20]. Значения активации молекулярных путей могут быть преобразованы в клинически действенную оценку индивидуального ответа опухоли на таргетную терапию, например моноклональными антителами [21] или ингибиторами тирозинкиназ [22–24].

Для поиска дополнительных биологических маркеров ответа на трастузумаб при HER2-положительном метастатическом РМЖ мы инициировали клиническое исследование NCT03521245, нацеленное на измерение экспрессии генов и УАП в раковых тканях ответчиков и неответчиков на терапию. Для определения генной экспрессии мы использовали метод РНК-секвенирования, считающийся в настоящее время золотым стандартом транскриптомики [11].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Биологический материал исследования.** Иммуногистохимическая диагностика образцов РМЖ (HER2, PR, ER) была выполнена в ГБУЗ Республики Карелия «Республиканский онкологический диспансер» (Петрозаводск, Россия) с использованием наборов антител («Roche Diagnostics», США). Для интерпретации статуса HER2 была использована следующая шкала: (i) базовое окрашивание (0), (ii) «+» (1), (iii) «++» (2) и (iv) «+++» (3). Результаты «++» и «+++» были подтверждены с помощью набора «ISH DNA Probe Cocktail» («Roche Diagnostics», США). При оценке рецепторного статуса стероидных гормонов (PR и ER) была использована шкала от 0 до 8.

Биоматериал был получен от 23-х женщин с HER2-положительным РМЖ, средний возраст которых составил 53,3 г. (диапазон 33–77 лет). Пациентки получали монотерапию трастузумабом или трастузумаб в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами: доцетаксел, или паклитаксел + карбоплатин, или паклитаксел, или доцетаксел + карбоплатин, или ингибитор ароматазы, или пертузумаб, или капецитабин,

или винорелбин, или гемцитабин; из них 19 пациенток получали адъювантную терапию, 4 — неадъювантную. Более подробные клинические характеристики представлены в табл. S1 в Приложении.

Все исследованные образцы представляли собой фиксированные в формалине парафинизированные ткани РМЖ, содержание опухолевых клеток в которых превышало 70%, из них 19 образцов были получены в ГБУЗ Республики Карелия «Республиканский онкологический диспансер» (Петрозаводск) и 4 образца — в Многопрофильном медицинском центре «ВитаМед» (Москва). 21 образец РМЖ представлял собой фрагменты первичных опухолей и 2 — метастазы в лимфатических узлах.

РНК-секвенирование было проведено для всех 23-х образцов РМЖ, однако только 9 из них соответствовали критериям включения в следующий этап работ: адъювантная терапия, отрицательный ER/PR-статус, метастазирование. Также из дальнейших анализов были исключены образцы с люминальным подтипом В (HER2-положительные, ER/PR-положительные), поскольку для него характерен лучший прогноз, чем для остальной части HER2-положительных опухолей молочной железы [25, 26].

В итоге 9 образцов, отобранных для дальнейшего анализа, были получены от женщин с HER2-положительным ER/PR-отрицательным РМЖ, средний возраст которых составлял 55,2 г. (диапазон 44–77 лет). Больные получали монотерапию трастузумабом в адъювантном режиме или трастузумаб в сочетании с другими терапевтическими средствами: доцетаксел или паклитаксел, + карбоплатин или паклитаксел или доцетаксел, + карбоплатин или капецитабин или винорелбин или гемцитабин (табл. 1). Восемь отобранных образцов были получены в ГБУЗ Республики Карелия «Республиканский онкологический диспансер» (Петрозаводск), и один образец — в Многопрофильном медицинском центре «ВитаМед» (Москва).

Восемь образцов соответствовали первичным опухолям и один — метастазированию в лимфатический узел (BC-20). Данная проба была включена в анализ, поскольку мы стремились определить надежные биомаркеры устойчивости к трастузумабу, которые потенциально могли бы быть применимы не только для биопсий, полученных из первичного очага, но и для метастазов. Пациентов считали ответчиками на терапию, если ремиссия регистрировалась, по крайней мере, за период до 25-го месяца после биопсии включительно. Пять пациентов были классифицированы как ответчики и четыре — как неответчики на терапию.

**Подготовка библиотек и РНК-секвенирование.** РНК выделяли из срезов парафиновых блоков толщиной 10 мкм с использованием набора RNeasy FFPE («Qiagen», Нидерланды) в соответствии с протоколом производителя. Для измерения концентрации РНК использовали наборы RNA 6000 Nano Assay («Agilent Technologies», Германия). Целостность РНК (RIN) оценивали с использованием биоанализатора Agilent 2100 («Agilent Technologies», Германия). Для удаления рибосомной РНК и конструирования библиотек использовали набор KAPA RNA Hyper («Roche Sequencing Solutions Inc», США) с деpleцией рибосомальной РНК. Для увеличения количества анализируемых образцов за один цикл секвенирования использовали лигирование адаптеров с баркодами. Концентрации и качество библиотеки измеряли с использованием набора Qubit dsDNA HS («Thermo Fisher Scientific», США) и Agilent TapeStation («Agilent Technologies», Германия). Всего было получено не менее 30 млн одноконцевых прочтений на каждый исследованный образец. РНК-секвенирование было выполнено компанией «Омикс-Лаб», Россия и Кафедрой патологии и лабораторной медицины Калифорнийского университета (Department of Pathology and Laboratory Medicine, University), США с использованием секвенатора Illumina HiSeq 3000 («Illumina, Inc.», США). Проверку качества данных проводили с помощью программного обеспечения (ПО) Illumina SAV («Illumina, Inc.», США), а демультимплексирование — с помощью ПО Illumina bcl2fastq2 v 2.17 («Illumina, Inc.», США). Данные секвенирования были депонированы в NCBI Sequencing Read Archive (SRA) с кодами доступа PRJNA565016 и PRJNA578290.

**Обработка данных РНК-секвенирования.** Полученные в результате РНК-секвенирования FASTQ-файлы обрабатывались с помощью ПО STAR aligner [27] в режиме «GeneCounts» с аннотацией транскриптома человека Ensembl (версия GRCh38.89). Генные идентификаторы Ensembl были преобразованы в генные символы с использованием набора данных HGNC (<https://www.genenames.org/>, версия базы данных от 13 июля 2017 г.). Всего были определены уровни экспрессии для 36 596 генов с уникальными идентификаторами HGNC. Минимальное число уникально картированных прочтений составило 1,40 млн со средним значением 7,35 млн. для 9 отобранных образцов (8,03 — для всех 23-х образцов). Дифференциальный анализ генной экспрессии был выполнен с использованием ПО DESeq2 [28]. Дифференциально экспрессированные гены у ответчиков и неответчиков на терапию использовали для дальнейшего анализа.

Таблица 1. Клинические данные 9 отобранных для эксперимента пациентов

| №     | Возраст | Стадия       | Ответчик/<br>неответчик<br>на терапию<br>(О/НО) | Продолжи-<br>тельность<br>безрецидивного<br>периода (мес.) | Продолжи-<br>тельность<br>ремиссии<br>(мес.) | Схема терапии   |
|-------|---------|--------------|---|--|--|---|
| BC-3  | 55      | T2N1M0, IIIa | О   | –  | 29   | 2 курса: доксорубин + циклофосфамид, затем 6 курсов: доцетаксел + трастузумаб; монотерапия трастузумабом (каждые 3 недели, 18 инъекций) |
| BC-4  | 58      | T2N1M0, IIb  | О   | –  | 33   | 6 курсов: паклитаксел + доксорубин; монотерапия трастузумабом (18 инъекций)   |
| BC-7  | 53      | T2N3M0, IIIc | НО  | 25   | без<br>ремиссии                              | 3 курса: адьювантная химиотерапия, лучевая терапия; монотерапия трастузумабом   |
| BC-14 | 49      | T2N2M0, IIIa | О   | –  | 27   | 6 курсов: доксорубин + циклофосфамид; паклитаксел (12 инъекций); монотерапия трастузумабом каждые 21 день                               |
| BC-20 | 51      | T2N0M0, II   | О   | –  | 28   | 6 курсов: доцетаксел + карбоплатин + трастузумаб; монотерапия трастузумабом (каждые три недели в течение 12 мес.)                       |
| BC-21 | 49      | T1N3M0, IIIc | НО  | 10   | без<br>ремиссии                              | 2 курса: паклитаксел + доксорубин; 3 курса: паклитаксел; монотерапия трастузумабом (5 мес.)   |
| BC-25 | 77      | T1N1M0, IIa  | НО  | 14   | без<br>ремиссии                              | 6 курсов: доксорубин + циклофосфамид; паклитаксел + карбоплатин + трастузумаб; монотерапия трастузумабом                                |
| BC-27 | 44      | T2N0M0, IIa  | О   | –  | 26   | паклитаксел (12 инъекций) + трастузумаб   |
| BC-71 | 61      | T2N0M0       | НО  | 13   | без<br>ремиссии                              | 5 курсов AC (доксорубин + циклофосфамид); паклитаксел + трастузумаб; монотерапия трастузумабом  |

**Литературные данные генной экспрессии.** Данные генной экспрессии пациентов с РМЖ были получены из Базы данных генотипов и фенотипов (dbGAP), код доступа: phs001291.v1.p1 [4]. 31 случай РМЖ был изучен в исследовании Z1041 Американской коллегии хирургов-онкологов (NCT00513292), где сравнивали частоту полного патологического ответа пациентов с HER2-положительным РМЖ. В исследование были включены небеременные женщины с инвазивным РМЖ со средним возрастом 50,14 г. (диапазон 36–70 лет), которые получали неоадьювантную химиотерапию и трастузумаб. Пациенты были случайным образом разделены на

2 группы. Первая получала фторурацил 500 мг/м<sup>2</sup>, эпирубицин 75 мг/м<sup>2</sup> и циклофосфамид 500 мг/м<sup>2</sup> (FEC-75) в 1-й день 21-дневного цикла для четырех циклов с последующим паклитакселом 80 мг/м<sup>2</sup> и трастузумабом 2 мг/кг (после нагрузки 4 мг/кг) один раз в неделю в течение 12 недель. Вторая группа получала паклитаксел и трастузумаб один раз в неделю в течение 12 недель, а затем – четыре цикла FEC-75 (в 1-й день каждого 21-дневного цикла) и один раз в неделю трастузумаб, в той же дозировке, что и для первой группы. Помимо пациентов из исследования Z1041, в phs001291.v1.p1 были включены также профили для 11 HER2-поло-

жительных случаев РМЖ, участвующих в исследовании Медицинской школы Вашингтонского университета (NCT00353483), получавших неоадьювантную терапию трастузумабом в сочетании с химиотерапией: трастузумаб + паклитаксел + карбоплатин, или доксорубицин + карбоплатин, затем трастузумаб + паклитаксел, или FEC-75, затем трастузумаб + паклитаксел [4].

HER2-положительный статус для всех случаев определялся иммуногистохимически и/или с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Образцы РНК выделяли из замороженных биоптатов опухоли, полученных до лечения пациентов, и секвенировали. Опубликованный набор данных (табл. S2 в Приложении) содержал профили РНК-секвенирования для 42-х пациентов, из которых 17 соответствовали критериям включения в исследование – двойной отрицательный ER и PR статус. Из них 12 пациентов продемонстрировали полный патологический ответ (ППО) после лечения, а у 5 обнаружили остаточное заболевание. Клиническая аннотация исследованного набора образцов приведена в табл. 2.

**Анализ молекулярных путей.** Уровни активации молекулярных путей были рассчитаны с использованием метода и аналитического ПО

Oncobox [29]. Для анализа были отобраны 1754 пути, содержащие по крайней мере 10 генных продуктов, доступные в открытых базах данных Reactome [30], NCI Pathway Interaction Database [31], Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [32], HumanCyc [33], Biocarta [34] и Qiagen Pathway Central, перечисленных в табл. S3 в Приложении.

Для расчета УАП все экспериментальные профили генной экспрессии для ответчиков были нормализованы на профили неответчиков. Таким же образом были нормализованы и литературные профили генной экспрессии. Молекулярные пути были визуализированы с использованием методов визуализации путей Oncobox [16, 29, 35–37].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящем исследовании мы сравнили экспериментальные и литературные данные по дифференциальной экспрессии генов и активации молекулярных путей при РМЖ в зависимости от успешности лечения трастузумабом.

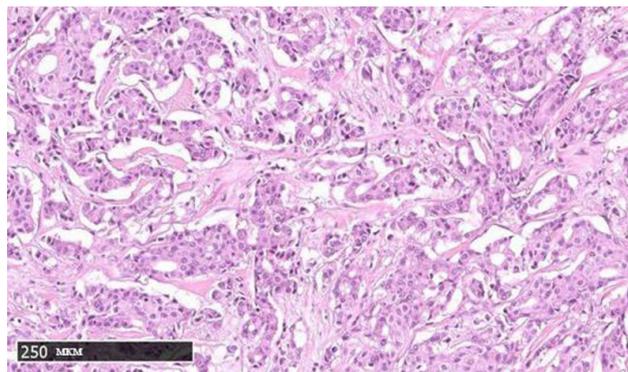
**Клинические данные.** В ходе клинического испытания NCT03521245 «Маркеры активации

**Таблица 2.** Клиническая аннотация 17-ти HER2+/ER-/PR- образцов РМЖ из литературного набора phs001291.v1.p1

| №      | Источник    | Возраст | T-стадия | N-стадия | Гистологическая степень злокачественности | Полный патологический ответ (да/нет) | Идентификатор | Время до рецидива болезни (дни) |
|--------|-------------|---------|----------|----------|---|--------------------------------------|---------------|---------------------------------|
| BRC251 | Z1041       | 52      | T2       | N1       | 3   | да                                   | SRR6447437    | 1679                            |
| BRC261 | Z1041       | 61      | T2       | N1       | 2   | да                                   | SRR6498562    | 1665                            |
| BRC262 | Z1041       | 45      | T4       | N1       | 3   | да                                   | SRR6447573    | 1674                            |
| BRC263 | Z1041       | 49      | T3       | N0       | 3   | да                                   | SRR6447580    | 1582                            |
| BRC271 | Z1041       | 70      | T4       | N2       | 3   | да                                   | SRR6447458    | 1285                            |
| BRC272 | Z1041       | 47      | T2       | N0       | 3   | нет                                  | SRR6447472    | 112                             |
| BRC274 | Z1041       | 52      | T3       | N0       | 3   | нет                                  | SRR6447567    | 1064                            |
| BRC276 | Z1041       | 39      | T2       | N0       | 2   | да                                   | SRR6498531    | NA                              |
| BRC277 | Z1041       | 57      | T2       | N0       | 2   | да                                   | SRR6498535    | 936                             |
| BRC278 | Z1041       | 53      | T3       | N1       | 3   | да                                   | SRR6498552    | 874                             |
| BRC279 | Z1041       | 61      | T1       | N1       | 3   | да                                   | SRR6498528    | 352                             |
| BRC280 | Z1041       | 48      | T3       | N1       | 3   | нет                                  | SRR6498538    | 216                             |
| BRC284 | NCT00353483 | 50      | T2       | N2       | 3   | нет                                  | SRR6498557    | NA                              |
| BRC286 | NCT00353483 | 47      | T3       | N1       | 3   | да                                   | SRR6447563    | NA                              |
| BRC288 | NCT00353483 | 61      | T2       | N1       | 3   | нет                                  | SRR6447558    | NA                              |
| BRC290 | NCT00353483 | 50      | T3       | N0       | 2   | да                                   | SRR6447556    | NA                              |
| BRC295 | Z1041       | 54      | T2       | N2       | 3   | да                                   | SRR6447565    | 1674                            |

молекулярных путей, прогнозирующие эффективность терапии трастузумабом «HER2-положительного рака молочной железы» мы получили набор экспериментальных данных для настоящего исследования. Пациенты были жителями Северо-Западной и Центральной частей Российской Федерации, которые проходили лечение в ГБУЗ Республики Карелия «Республиканский онкологический диспансер» (Петрозаводск) или Многопрофильном медицинском центре «ВитаМед» (Москва). Использовали следующие критерии включения: взрослые женщины с гистологически подтвержденным HER2-положительным РМЖ и доступными образцами опухоли молочной железы; пациенты, получавшие трастузумаб отдельно или в комбинации с другими схемами химиотерапии с известным ответом, согласно критериям RECIST 1.1; пациенты с РМЖ II или более поздней стадии, которые подписали информированное добровольное согласие на участие в этом клиническом исследовании. Критерием исключения являлось наличие менее 70% опухолевых клеток в доступных образцах ткани РМЖ (рис. 1). На первом этапе в исследование было включено 23 пациента, опухолевые образцы которых профилировали с помощью РНК-секвенирования (табл. S1 в Приложении). Средний возраст в группе пациентов составил 53 года. В качестве критерия ответа опухоли на терапию использовали ремиссию в течение не менее 25 мес. после биопсии. В соответствии с этим пациенты были классифицированы как отвечающие или не отвечающие (ответчики/неответчики) на лечение трастузумабом. Тем не менее мы не могли напрямую сравнивать статусы ответа на трастузумаб для всех включенных пациентов, поскольку они принадлежали к разным подтипам HER2-положительного РМЖ: люминальный В или ER-/PR- фенотип. Эти два подтипа имеют существенно различающиеся прогнозы по ответу на терапию и общую выживаемость [25, 26], что препятствует их объединению в одну группу. Для дальнейшего анализа мы отобрали группу из 9 пациентов, которые имели ER-/PR- фенотип, получали адъювантную терапию и имели метастазы: пять ответчиков и четыре неответчика. Все пациенты получали трастузумаб в различных схемах лечения. Наиболее распространенные комбинации с трастузумабом (табл. 1) включали таксаны (паклитаксел или доцетаксел, n = 7) и доксорубицин (n = 6).

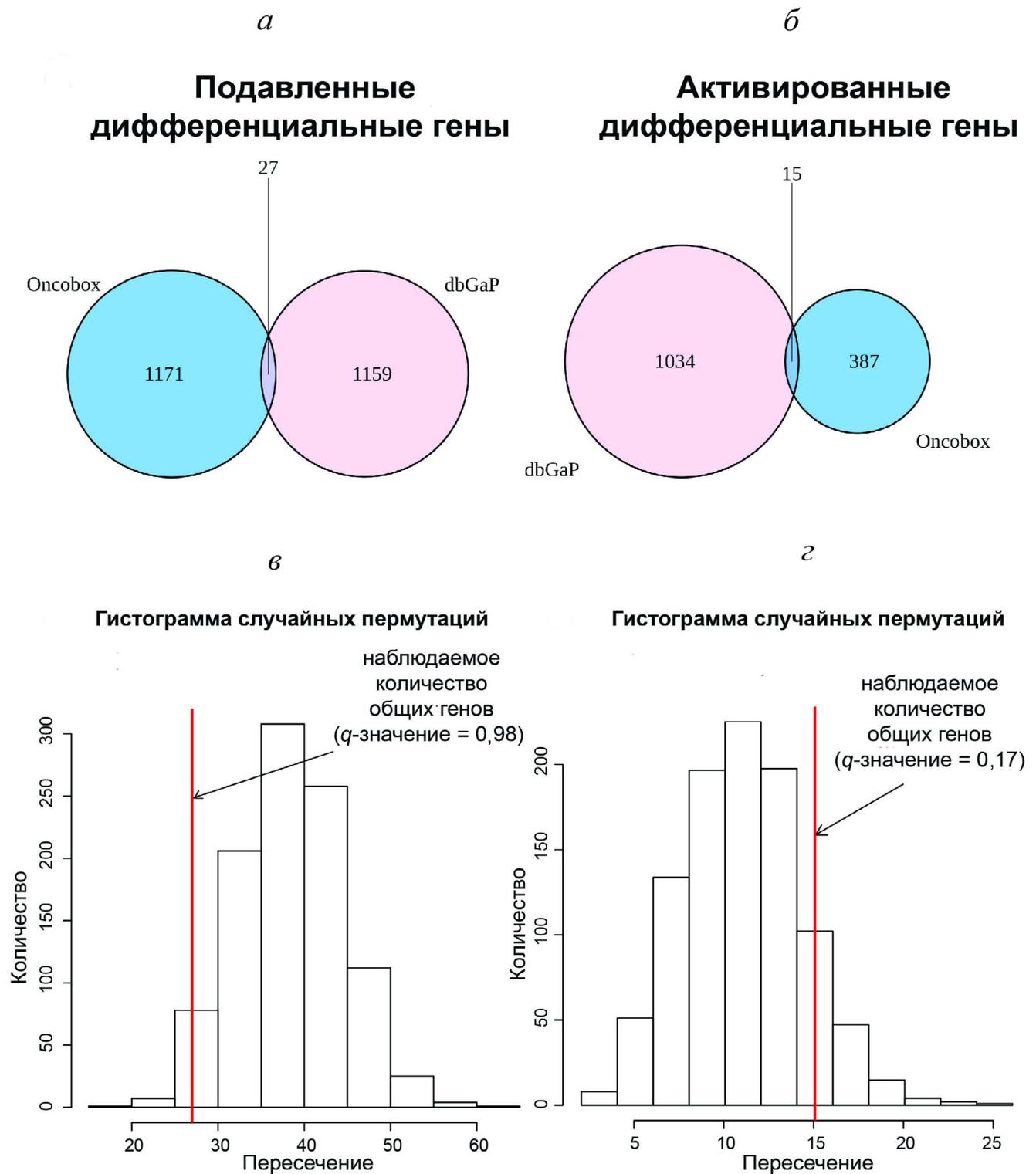
В качестве данных для сравнения мы использовали ранее опубликованную коллекцию [4] из 42-х клинически аннотированных профилей РНК-секвенирования РМЖ, доступных в базе данных генотипов и фенотипов (dbGAP) с



**Рис. 1.** Репрезентативная гистологическая микрофотография исследуемой ткани РМЖ. Показан умеренно дифференцированный инфильтрированный протоковый рак (образец BC71; HER2+/ER-/PR-). Окрашивание гематоксилином и эозином, масштабный отрезок приведен на рисунке. (С цветными вариантами рис. 1–6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

кодом доступа phs001291.v1.p1 (табл. S2 в Приложении). Из них 31 случай был описан в исследовании Американской коллегии хирургов Z1041 (NCT00513292). В этом исследовании пациенты были случайным образом распределены между двумя группами, где первая получала терапию в режиме FEC-75 (фторурацил, эпирубицин, циклофосфамид), затем паклитаксел + трастузумаб, а вторая – в режиме паклитаксел + трастузумаб, затем трастузумаб + FEC-75. Кроме того, набор phs001291.v1.p1 содержал 11 профилей HER2-положительного РМЖ, включенных в исследование Медицинского университета штата Вашингтон (NCT00353483), участники которого получали неoadъювантную терапию трастузумабом в сочетании с химиотерапией в режимах: трастузумаб + паклитаксел + карбоплатин, или доксорубицин + карбоплатин, затем трастузумаб + паклитаксел, или FEC, затем трастузумаб + паклитаксел [4]. Пациентами были женщины с инвазивным РМЖ, средний возраст группы составлял 50 лет. Для дальнейшего исследования мы отобрали образцы с ER-/PR- статусом. Пациенты также были классифицированы как ответчики (патологический полный ответ) и неответчики (остаточное заболевание). Всего для последующего анализа было отобрано 17 литературных профилей, соответствующих 12 ответчикам и пяти неответчикам на терапию (табл. 2).

**Дифференциально регулируемые гены и молекулярные пути.** На массивах экспериментальных и литературных данных мы отобрали гены, дифференциально экспрессируемые при РМЖ у ответчиков и неответчиков на терапию. Для экс-



**Рис. 2.** Пересечение групп дифференциально экспрессируемых генов между экспериментальными и литературными наборами данных. Диаграммы Венна показывают количество дифференциально экспрессируемых подавленных (а) и активированных (б) генов между экспериментальным набором данных (NCT03521245) и литературным набором данных (dbGaP: phs001291.v1.p1). Гистограммы (в и г) показывают фактически наблюдаемое, а также теоретически ожидаемое количество дифференциально регулируемых генов исходя из модели случайного распределения, число случайных перестановок 1000. в — Распределение пересечения подавленных генов,  $q$ -значение для реально наблюдаемого пересечения составляет 0,98. г — Распределение пересечения активированных генов,  $q$ -значение для реально наблюдаемого пересечения составляет 0,17

периментальных данных статистический уровень значимости ( $p < 0,05$ ) был пройден для 1600 генов, из которых 402 были активированы и 1198 подавлены в группе ответчиков на терапию. Для литературных данных было выявлено 2235 дифференциальных генов ( $p < 0,05$ ), где 1049 были активированы и 1186 – подавлены у ответчиков (табл. S4 в Приложении). В свою очередь, пересечение экспериментальных и литературных данных дало 15 активированных и 27 подавленных генов в группе ответчиков (рис. 2, а и б).

Статистическая значимость этого пересечения была исследована путем пересечения случайных групп генов того же размера со случайной перестановкой названий генов. Как для активированных, так и для подавленных генов мы обнаружили, что число пересекшихся генов соответствовало модели случайного распределения и не показало статистически значимого обогащения (рис. 2, в и г). Мы также сравнили экспрессию гена *ERBB2*, кодирующего молекулярную мишень трастузумаба, между ответчиками и неответчиками, но не обнаружили существенных различий как для экспериментальных, так и для литературных данных (рис. S1 в Приложении).

Для дифференциально регулируемых генов с помощью ПО OncoBox [29] мы вычислили УАП для 1754 внутриклеточных молекулярных путей, имеющих, по крайней мере, 10 генных продуктов в своем составе. Мы провели поиск статистически значимо дифференциально регулируемых путей ( $p < 0,05$ ) и обнаружили 246 путей для экспериментальных данных (79 активированных и 167 подавленных в группе ответчиков) и 424 – для литературных данных (161 активированных и 263 подавленных в группе ответчиков), (табл. S5 в Приложении). При пересечении дифференциально регулируемых путей для групп ответчиков и неответчиков мы получили случайное значение для подавленных путей, но неслучайное ( $q$ -значение = 0,002) для 15 активированных путей (рис. 3).

Среди этих 15 активированных путей (табл. 3) наиболее статистически значимыми по критерию Уилкоксона–Манна–Уитни были следующие два: «PPAR Pathway» и «сAMP Protein Retention Pathway». Профиль активации пути для «сAMP Protein Retention Pathway», который также был связан со временем до прогрессирования в последующем анализе, представлен для ответчиков и неответчиков на рис. 4.

Кроме того, среди пересечения молекулярных путей, подавленных в группе ответчиков, присутствовал путь «ErbB Family Pathway», включающий продукт гена *ERBB2* (рис. 5). Од-

нако как было указано ранее, пересечение подавленных путей между экспериментальной и литературной выборками имеет признаки случайного совпадения (рис. 3, в).

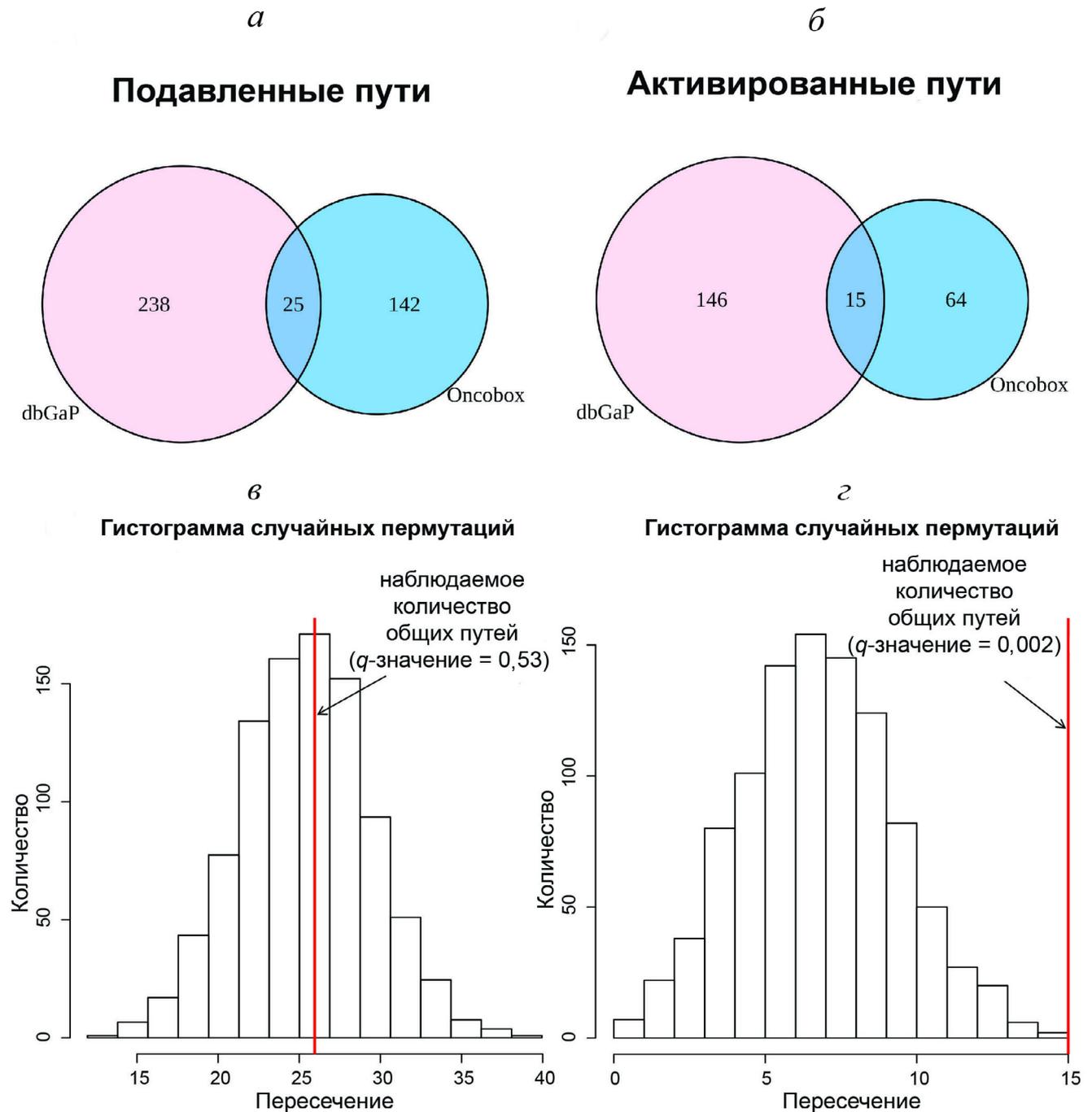
Затем для каждого из 15 общих путей, активированных у ответчиков, мы исследовали способность дискриминировать ответчиков от неответчиков на терапию трастузумабом. Для этого вычисляли отношения рисков (от англ. Hazard Ratio) и  $p$ -значения теста Log-rank. Для этого анализа мы объединили пациентов из обеих выборок, для которых была доступна информация о времени до прогрессии заболевания. Затем пациенты были разделены на две группы с уровнями активации пути выше и ниже, чем медианное значение. Мы обнаружили, что 12 исследованных дифференциально активированных путей могут служить маркерами выживаемости без прогрессирования заболевания. Для путей «PPAR», «noradrenaline and adrenaline degradation» и «Drug metabolism cytochrome P450 pathway»  $p$ -значение Log-rank теста превышало 0,05 (табл. 3). При этом путь «сAMP Protein Retention pathway» показал лучшую эффективность как для предсказания ответа на терапию, так и для прогнозирования времени до прогрессии (рис. 6). Дополнительно мы рассчитали площадь под ROC-кривой (AUC), которая является универсальной характеристикой качества биомаркеров, основанной на значениях чувствительности и специфичности [38]. Этот статистический подход широко применим к различным типам биомаркеров в онкологии [14, 16, 17, 39–41]. AUC положительно коррелирует с качеством биомаркера и изменяется в интервале 0,5–1. Стандартный порог дискриминации составляет 0,7, и биомаркеры с большим значением AUC считаются высококачественными, и наоборот [42]. Путь «сAMP Pathway Protein Retention» показал самое высокое значение AUC и самое низкое наблюдаемое отношение рисков [AUC равно 1 для экспериментального и 0,867 – для литературного набора данных; отношение рисков 0,34 (95% доверительный интервал: 0,11–1,  $p$ -значение = 0,05)] (табл. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

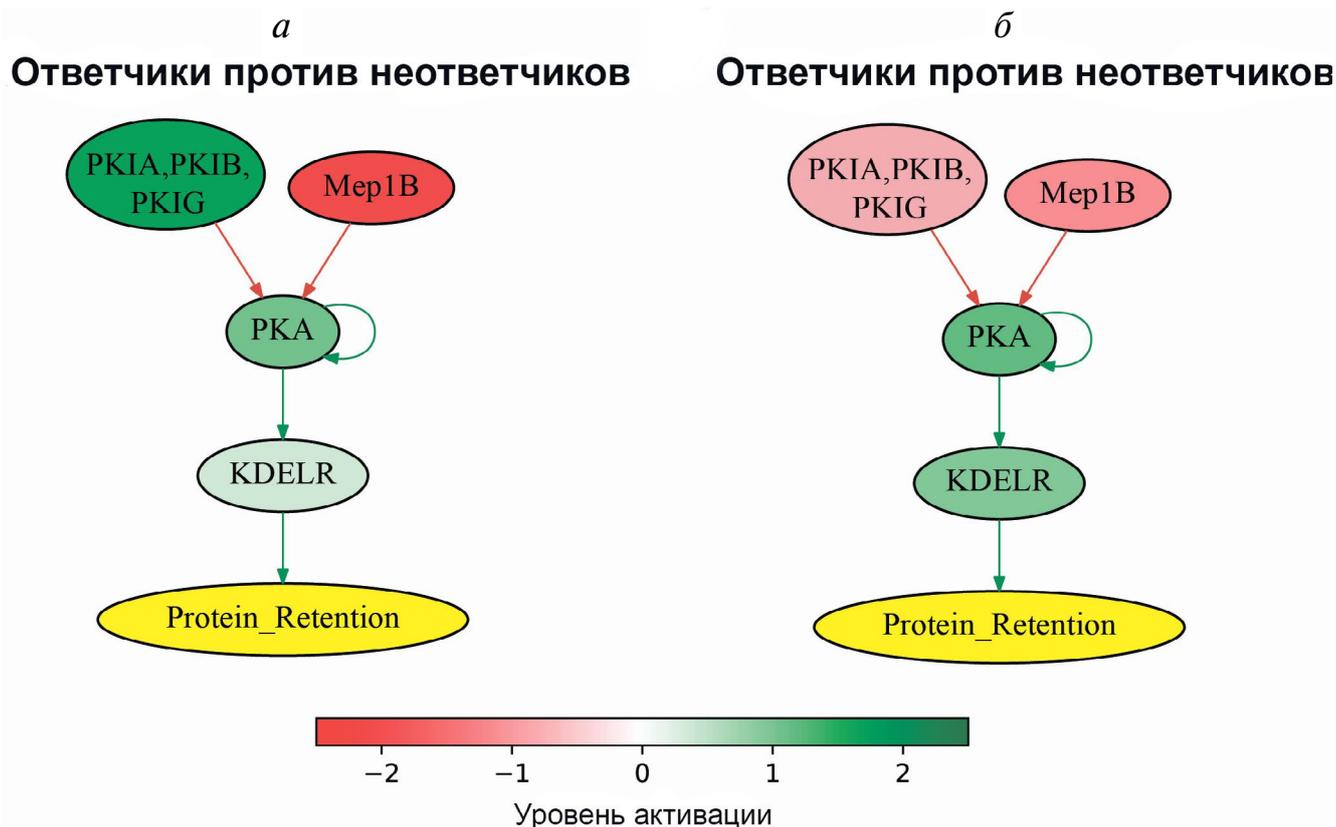
В этой статье мы получили экспрессионные профили для 23 образцов фиксированной в формалине парафинизированной ткани РМЖ, полученных от HER2-положительных пациентов-ответчиков или неответчиков на лечение трастузумабом. Для групп, отвечающих и не отвечающих на лечение, мы определили дифференциально регулируемые гены и молекулярные

пути. Затем мы сравнили полученные результаты с 42 опубликованными профилями РНК-секвенирования тканей РМЖ пациентов с известным статусом ответа на терапию трастузума-

бом, которые ранее участвовали в клинических исследованиях NCT00513292 и NCT00353483 [4]. Интересно, что мы не обнаружили корреляции между статусом ответа и уровнем экспрес-



**Рис. 3.** Пересечение дифференциально регулируемых молекулярных путей между экспериментальными и литературными наборами данных. Диаграммы Венна показывают пересечение групп подавленных (*а*) и активированных (*б*) путей между экспериментальным (NCT03521245) и литературным (dbGaP: phs001291.v1.p1) наборами данных. Гистограммы (*в* и *г*) показывают фактически наблюдаемое, а также теоретически ожидаемое количество дифференциально регулируемых путей исходя из модели случайного распределения, число случайных перестановок 1000. *в* – Распределение пересечения подавленных путей,  $q$ -значение для реально наблюдаемого пересечения составляет 0,53. *г* – Распределение пересечения активированных путей,  $q$ -значение для реально наблюдаемого пересечения составляет 0,002



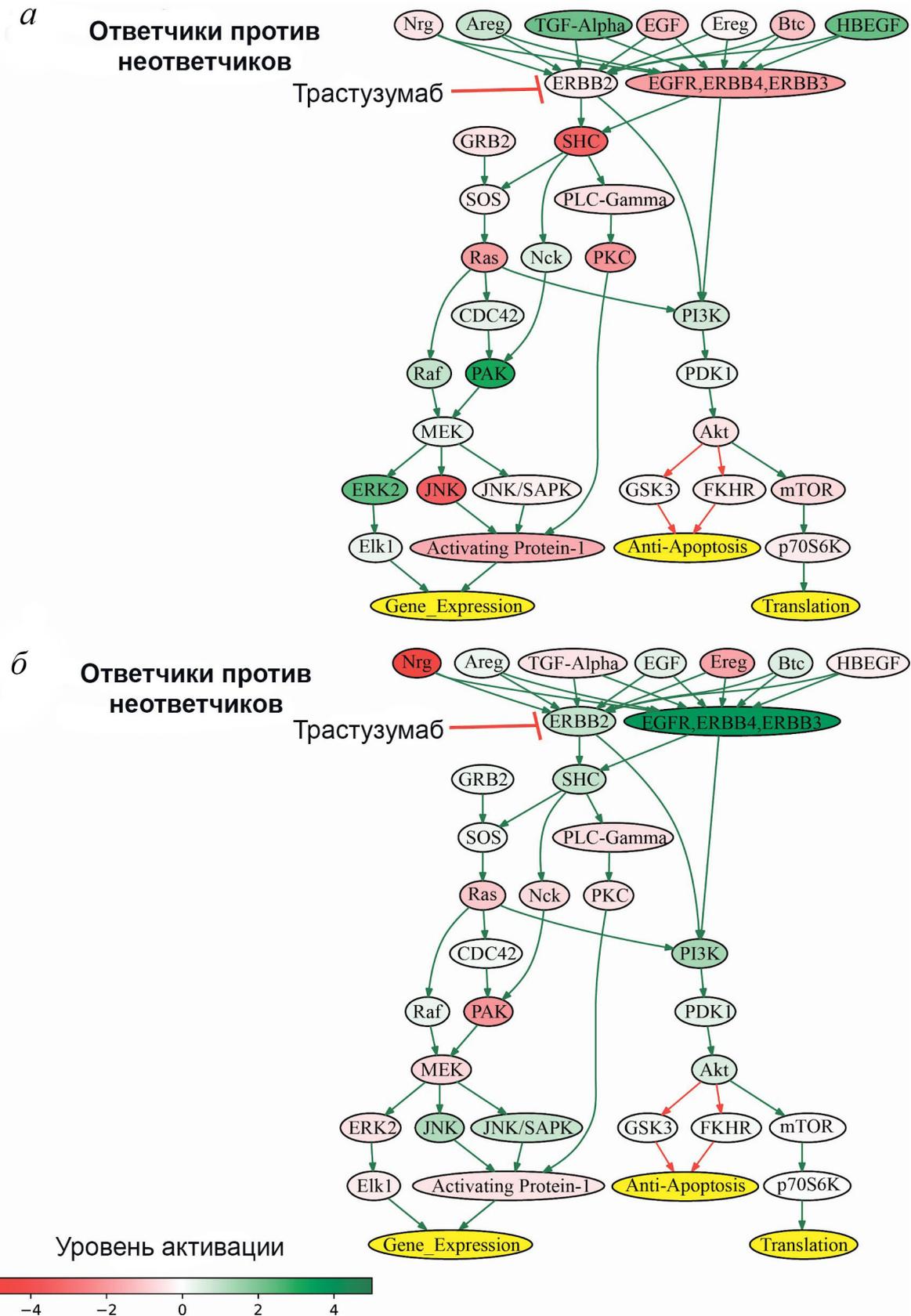
**Рис. 4.** Профиль дифференциальной активации молекулярного пути «сAMP Protein Retention Pathway» у ответчиков на терапию трастузумабом против неотвеччиков в экспериментальном (а) и литературном (б) наборах данных

сии гена *ERBB2*. При пересечении наборов выявленных дифференциально регулируемых генов и молекулярных путей в обеих выборках, мы обнаружили 15 активированных и 27 подавленных генов и 15/25 путей соответственно. Тем не менее статистически значимым по сравнению с моделью случайного распределения оказалось только пересечение молекулярных путей, активированных у ответчиков по сравнению с неотвечниками. При использовании классификатора, построенного на основе наиболее активированного молекулярного пути «сAMP Pathway Protein Retention», мы получили AUC равное 1 и 0,87 для прогнозирования ответа HER2-положительного метастатического РМЖ на трастузумаб в экспериментальной и литературной выборках соответственно. При объединении выборок этот путь также являлся прогностическим маркером времени до рецидивирования ( $p = 0,041$ ).

Опубликовано множество исследований, где профилировали экспрессию генов для образцов пациентов с РМЖ, получавших трастузумаб [40, 43, 44]. Но лишь малая их часть содержит статус ответа на терапию, связанный с профилем экспрессии, а также данные о выживаемости для зарегистрированных клинических случаев.

Кроме того, в большинстве таких исследований для молекулярного профилирования использовали технологию микрочипирования [45–47]. В нашем исследовании для этого применяли РНК-секвенирование, которое в настоящее время считается золотым стандартом профилирования генной экспрессии [48, 49]. Кроме того, мы использовали секвенирование тотальной РНК без поли(А) обогащения, и в будущих исследованиях наш набор данных может быть использован также для изучения связи некодирующих РНК с устойчивостью к трастузумабу. Наконец, это единственный набор данных по образцам РМЖ, связанным с ответом на трастузумаб, который полностью совместим с базой данных здоровых нормальных тканей ANTE в силу использования того же экспериментального протокола [50].

Мы сравнили гены и пути, которые разделяли ответчиков и неотвеччиков на терапию трастузумабом, как по нашим экспериментальным, так и по литературным данным [4]. Предыдущее исследование было направлено на выявление биомаркеров ответа на трастузумаб на геномном и транскриптомном уровне. Авторы не нашли гены или их сигнатуры, связанные с ответом на



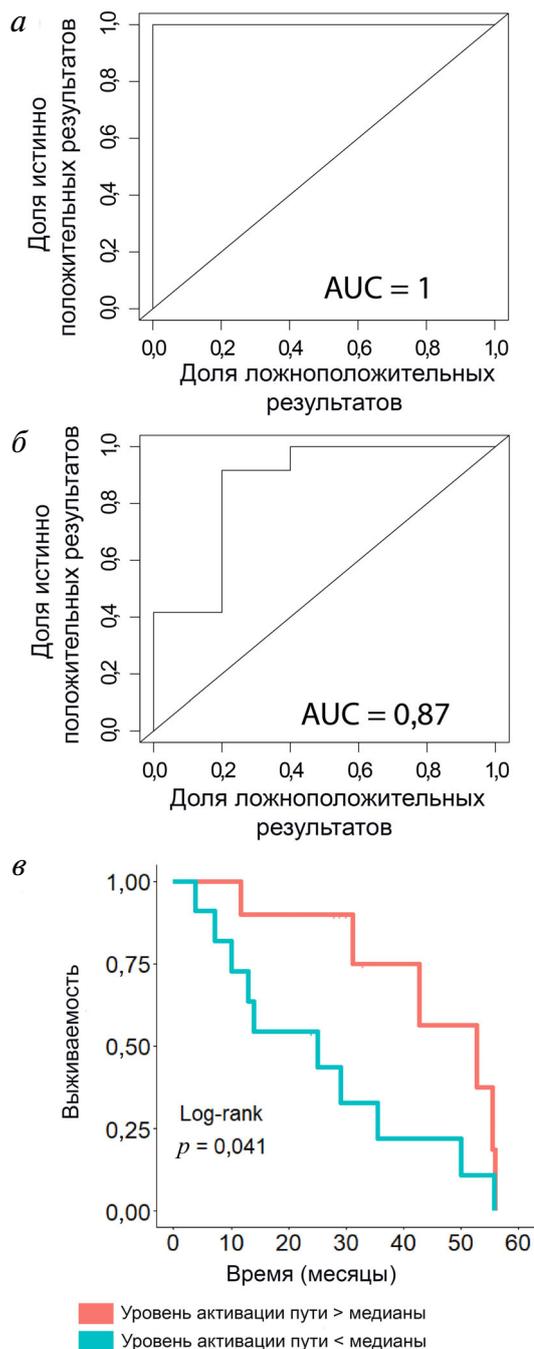
**Рис. 5.** Профиль дифференциальной активации молекулярного пути «ErbB Family Pathway» у ответчиков на терапию трастузумабом против неотвеччиков в экспериментальном (а) и литературном (б) наборах данных

трастузумаб по данным секвенирования РНК [4]. Вероятно, это связано с тем, что авторы не стратифицировали пациентов по статусу рецепторов гормонов ER и PR, как было сделано в настоящем исследовании. Тогда как общие для обеих групп данных дифференциальные гены с высокой вероятностью представляют результат случайного совпадения, фактическое число активированных у ответчиков молекулярных путей оказалось существенно выше, чем можно было бы ожидать исходя из модели случайного пересечения. В частности, лучшая связь с чувствительностью к трастузумабу наблюдалась для одной из ветвей сигнального пути цАМФ (табл. 3).

цАМФ является первым описанным вторичным мессенджером, который играет фундаментальную роль в клеточном ответе на самые разные внешние стимулы [51]. Одной из функций молекулярного пути цАМФ является активация рецептора KDE1 (Lys-Asp-Glu-Leu), отвечающего за ретроградный транспорт белков из комплекса Гольджи в эндоплазматический ретикулум, что необходимо для поддержания устойчивого гомеостаза клетки [52]. Ранее было показано, что изменения в этом комплексе процессов могут приводить к метастазированию РМЖ посредством измененной локализации рецепторов [53]. Кроме того, внутренние дефекты механизма эндоцитоза, ответственного за деградацию HER2, коррелируют с невосприимчивостью к терапии трастузумабом [54]. Однако, насколько нам известно, настоящее исследование впервые указывает на возможную связь между ретроградным транспортом и устойчивостью к трастузумабу.

Предыдущие исследования показали несколько других возможных механизмов устойчивости к трастузумабу при раке молочной железы [55]. Во-первых, с такой резистентностью могут быть связаны другие рецепторы семейства HER, например HER2-позитивные, но негативные по HER3 пациенты в основном выживают без метастазирования [56]. Рецепторы семейств, отличных от HER, такие как FGFR и IGF-1R, также могут играть важную роль в устойчивости к трастузумабу [57, 58]. Существует также возможная роль андрогенного рецептора (AR), поскольку экспрессия AR отрицательно коррелирует с инфильтрацией иммунными клетками, что, в свою очередь, связано с устойчивостью к трастузумабу [59, 60].

В нашем исследовании уровень активации пути «сAMP Pathway Protein Retention» оказался надежным биомаркером, разделяющим ответчиков и неответчиков на терапию трастузумабом. Более того, активация этого пути оказалась



**Рис. 6.** Прогностическая значимость УАП молекулярного пути «сAMP Pathway Protein Retention» для ответа РМЖ на терапию трастузумабом и предсказания времени до прогрессии. Площадь под ROC-кривой (AUC) для разделения ответчиков и неответчиков для экспериментальной (а) и литературной (б) выборки пациентов. в – Прогностическая значимость уровня активации пути «сAMP Pathway Protein Retention» для предсказания времени до прогрессии пациентов с РМЖ для объединенной экспериментальной и литературной выборки. Отдельно показаны группы пациентов с УАП ниже или выше медианы. Отношение рисков (Hazard ratio) = 0,34 (95% доверительный интервал: 0,11–1; *p*-значение = 0,05). Общее количество генов в путях, а также количество дифференциальных генов в обоих наборах приведены в табл. S6 в Приложении

**Таблица 3.** Характеристика качества биомаркеров для 15 пересекающихся молекулярных путей, дифференциально активированных в группе ответчиков на терапию трастузумабом

| Название молекулярного пути   | AUC, экспериментальная выборка | AUC, литературная выборка | Соотношение рисков (95% CI) | p-значение соотношения рисков | p-значение теста Log-rank |
|---|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| cAMP Pathway Protein Retention                                      | 1                              | 0,867                     | 0,34 (0,11–1)               | 0,05                          | 0,041                     |
| PPAR Pathway  | 1                              | 0,867                     | 0,46 (0,16–1,4)             | 0,16                          | 0,155                     |
| cAMP Pathway Cell Proliferation                                     | 1                              | 0,85                      | 0,34 (0,11–1)               | 0,05                          | 0,041                     |
| cAMP Pathway eNOS Signaling Cardiovascular Homeostasis              | 1                              | 0,85                      | 0,34 (0,11–1)               | 0,05                          | 0,041                     |
| cAMP Pathway Glycogen Synthesis                                     | 1                              | 0,85                      | 0,17 (0,043–0,64)           | 0,0094                        | 0,004                     |
| cAMP Pathway Lipolysis  | 1                              | 0,85                      | 0,34 (0,11–1)               | 0,05                          | 0,041                     |
| cAMP Pathway Oncogenesis  | 1                              | 0,85                      | 0,34 (0,11–1)               | 0,05                          | 0,041                     |
| Noradrenaline and adrenaline degradation                            | 0,95                           | 0,9                       | 0,59 (0,21–1,7)             | 0,32                          | 0,316                     |
| Reactome PRC2 methylates histones and DNA Main Pathway              | 1                              | 0,85                      | 0,17 (0,045–0,66)           | 0,01                          | 0,004                     |
| cAMP Pathway Degradation of Cell Cycle Regulators                   | 1                              | 0,817                     | 0,34 (0,11–1)               | 0,05                          | 0,041                     |
| Reactome Amyloids Main Pathway                                      | 0,95                           | 0,85                      | 0,17 (0,045–0,66)           | 0,01                          | 0,004                     |
| Reactome Condensation of Prophase Chromosomes Main Pathway          | 0,95                           | 0,85                      | 0,17 (0,045–0,66)           | 0,01                          | 0,004                     |
| Reactome DNA Damage Telomere Stress Induced Senescence Main Pathway | 0,95                           | 0,85                      | 0,17 (0,045–0,66)           | 0,01                          | 0,004                     |
| Reactome Packaging of Telomere Ends Main Pathway                    | 0,95                           | 0,85                      | 0,17 (0,045–0,66)           | 0,01                          | 0,004                     |
| KEGG Drug metabolism cytochrome P450 Main Pathway                   | 0,95                           | 0,817                     | 0,47 (0,16–1,4)             | 0,17                          | 0,158                     |

связана с благоприятным прогнозом в плане предсказания времени до рецидива опухоли. Мы предполагаем, что уровень активации этого пути может служить для дальнейшей разработки молекулярно-диагностических инструментов для раннего выявления пациентов, не отвечающих на HER2-таргетную терапию. Этот путь содержит 14 генов; таким образом, такой диагностический инструмент может основываться на RT-PCR, таргетном РНК-секвенировании, подходе NanoString или любой другой платформе для профилирования экспрессии генов. Тем не менее для продвижения по этому пути потребуются дальнейшая клиническая валидация этого подхода.

**Финансирование.** Это исследование было поддержано Российским научным фондом (грант № 18-15-00061) (Антон Буздин, Дмитрий Камашев, Ульяна Владимирова, Максим Сорокин, Мария Сунцова) и исследовательской программой OmicsWay в области онкологии.

**Конфликт интересов.** Авторы М. Сорокин и А. Буздин работают в компании OmicsWay Corp., США. Это исследование получило финансирование от компании Omicsway Corp., США. Компания принимала участие в анализе данных, их интерпретации и написании текста. Компания не принимала участия в разработке дизайна исследования, сборе данных и решении опубликовать данную статью. Остальные авто-

ры заявляют, что исследование проводилось в отсутствие каких-либо коммерческих или финансовых отношений, которые могут быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

**Соблюдение этических норм.** От всех пациентов, биоматериал которых был включен в клиническое исследование NCT03521245, озаглавленное «Маркеры активации молекулярных путей, прогнозирующие эффективность терапии трастузумабом HER2-позитивного рака молочной железы», было получено информированное добровольное согласие на участие в исследова-

нии и публикацию его результатов в обезличенной форме. Форма информированного согласия и дизайн исследования были одобрены этическими комитетами ГБУЗ Республики Карелия «Республиканский онкологический диспансер» (г. Петрозаводск) и Многопрофильного медицинского центра «ВитаМед» (г. Москва).

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 7, 2020.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Press, M. F., Bernstein, L., Thomas, P. A., Meisner, L. F., Zhou, J. Y., Ma, Y., Hung, G., Robinson, R. A., Harris, C., El-Naggar, A., Slamon, D. J., Phillips, R. N., Ross, J. S., Wolman, S. R., and Flom, K. J. (1997) HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas, *J. Clin. Oncol.*, **15**, 2894-2904, doi: 10.1200/JCO.1997.15.8.2894.
2. Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene, *Science*, **235**, 177-182, doi: 10.1126/science.3798106.
3. Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., et al. (2010) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **134**, 907-922, doi: 10.1043/1543-2165-134.6.907.
4. Lesurf, R., Griffith, O. L., Griffith, M., Hundal, J., Trani, L., Watson, M. A., Aft, R., Ellis, M. J., Ota, D., Suman, V. J., Meric-Bernstam, F., Leitch, A. M., Boughey, J. C., Unzeitig, G., Buzdar, A. U., Hunt, K. K., and Mardis, E. R. (2017) Genomic characterization of HER2-positive breast cancer and response to neoadjuvant trastuzumab and chemotherapy—results from the ACOSOG Z1041 (Alliance) trial, *Ann. Oncol.*, **28**, 1070-1077, doi: 10.1093/annonc/mdx048.
5. Buzdin, A., Sorokin, M., Garazha, A., Sekacheva, M., Kim, E., Zhukov, N., Wang, Y., Li, X., Kar, S., Hartmann, C., Samii, A., Giese, A., and Borisov, N. (2018) Molecular pathway activation – New type of biomarkers for tumor morphology and personalized selection of target drugs, *Semin. Cancer Biol.*, **53**, 110-124, doi: 10.1016/j.semcancer.2018.06.003.
6. Artemov, A., Aliper, A., Korzinkin, M., Lezhnina, K., Jellen, L., Zhukov, N., Roumiantsev, S., Gaifullin, N., Zhavoronkov, A., Borisov, N., and Buzdin, A. (2015) A method for predicting target drug efficiency in cancer based on the analysis of signaling pathway activation, *Oncotarget*, **6**, 29347-29356, doi: 10.18632/oncotarget.5119.
7. Pagani, O., Klingbiel, D., Ruhstaller, T., Nolè, F., Eppenberger, S., Oehlschlegel, C., Bernhard, J., Brauchli, P., Hess, D., Mamot, C., Munzone, E., Pestalozzi, B., Rabaglio, M., Aebi, S., Ribl, K., Rochlitz, C., Rothgiesser, K., Thürlimann, B., von Moos, R., Zaman, K., Goldhirsch, A., and Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) (2017) Do all patients with advanced HER2 positive breast cancer need upfront-chemo when receiving trastuzumab? Randomized phase III trial SAKK 22/99, *Ann. Oncol.*, **28**, 305-312, doi: 10.1093/annonc/mdw622.
8. Schmid, S., Klingbiel, D., Aebi, S., Goldhirsch, A., Mamot, C., Munzone, E., Nolè, F., Oehlschlegel, C., Pagani, O., Pestalozzi, B., Rochlitz, C., Thürlimann, B., von Moos, R., Weder, P., Zaman, K., and Ruhstaller, T. (2019) Long-term responders to trastuzumab monotherapy in first-line HER-2+ advanced breast cancer: characteristics and survival data, *BMC Cancer*, **19**, 902, doi: 10.1186/s12885-019-6105-3.
9. Zhu, X., and Verma, S. (2015) Targeted therapy in her2-positive metastatic breast cancer: a review of the literature, *Curr. Oncol.*, **22**, S19-28, doi: 10.3747/co.22.2363.
10. Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., and Norton, L. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2, *N. Engl. J. Med.*, **344**, 783-792, doi: 10.1056/NEJM200103153441101.
11. Buzdin, A., Sorokin, M., Garazha, A., Glusker, A., Aleshin, A., Poddubskaya, E., Sekacheva, M., Kim, E., Gaifullin, N., Giese, A., Seryakov, A., Rumiantsev, P., Moshkovskii, S., and Moiseev, A. (2019) RNA sequencing for research and diagnostics in clinical oncology, *Semin. Cancer Biol.*, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.07.010.
12. Artibasova, A. V., Korzinkin, M. B., Sorokin, M. I., Shegay, P. V., Zhavoronkov, A. A., Gaifullin, N., Alekseev, B. Y., Vorobyev, N. V., Kuzmin, D. V., Kaprin, A. D., Borisov, N. M., and Buzdin, A. A. (2016) MiRImpact, a new bioinformatic method using complete microRNA expression profiles to assess their overall influence on the activity of intracellular molecular pathways, *Cell Cycle*, **15**, 689-698, doi: 10.1080/15384101.2016.1147633.
13. Buzdin, A. A., Prassolov, V., Zhavoronkov, A. A., and Borisov, N. M. (2017) Bioinformatics meets biomedicine: OncoFinder, a quantitative approach for interrogating molecular pathways using gene expression data, *Methods Mol. Biol.*, **1613**, 53-83, doi: 10.1007/978-1-4939-7027-8\_4.
14. Borisov, N. M., Terekhanova, N. V., Aliper, A. M., Venkova, L. S., Smirnov, P. Y., Roumiantsev, S., Korzinkin, M. B., Zhavoronkov, A. A., and Buzdin, A. A. (2014) Signaling pathways activation profiles make better markers of cancer than expression of individual genes, *Oncotarget*, **5**, 10198-10205, doi: 10.18632/oncotarget.2548.

15. Buzdin, A., Sorokin, M., Poddubskaya, E., and Borisov, N. (2019) High-throughput data now complement transcriptomic profiling: advances in molecular pathway activation analysis approach in cancer biology, *Cancer Inform.*, **18**, 1176935119838844, doi: 10.1177/1176935119838844.
16. Zolotovskaia, M. A., Sorokin, M. I., Roumiantsev, S. A., Borisov, N. M., and Buzdin, A. A. (2018) Pathway instability is an effective new mutation-based type of cancer biomarkers, *Front. Oncol.*, **8**, 658, doi: 10.3389/fonc.2018.00658.
17. Lezhnina, K., Kovalchuk, O., Zhavoronkov, A. A., Korzinkin, M. B., Zabolotneva, A. A., Shegay, P. V., Sokov, D. G., Gaifullin, N. M., Rusakov, I. G., Aliper, A. M., Roumiantsev, S. A., Alekseev, B. Y., Borisov, N. M., and Buzdin, A. A. (2014) Novel robust biomarkers for human bladder cancer based on activation of intracellular signaling pathways, *Oncotarget*, **5**, 9022-9032, doi: 10.18632/oncotarget.2493.
18. Ozerov, I. V., Lezhnina, K. V., Izumchenko, E., Artemov, A. V., Medintsev, S., Vanhaelen, Q., Aliper, A., Vijg, J., Osipov, A. N., Labat, I., West, M. D., Buzdin, A., Cantor, C. R., Nikolsky, Y., Borisov, N., Irincheeva, I., Khokhlovich, E., Sidransky, D., Camargo, M. L., and Zhavoronkov, A. (2016) *In silico* Pathway Activation Network Decomposition Analysis (iPANDA) as a method for biomarker development, *Nat. Commun.*, **7**, 13427, doi: 10.1038/ncomms13427.
19. Buzdin, A. A., Zhavoronkov, A. A., Korzinkin, M. B., Roumiantsev, S. A., Aliper, A. M., Venkova, L. S., Smirnov, P. Y., and Borisov, N. M. (2014) The OncoFinder algorithm for minimizing the errors introduced by the high-throughput methods of transcriptome analysis, *Front. Mol. Biosci.*, **1**, 8, doi: 10.3389/fmolb.2014.00008.
20. Borisov, N., Suntsova, M., Sorokin, M., Garazha, A., Kovalchuk, O., Aliper, A., Il'nitskaya, E., Lezhnina, K., Korzinkin, M., Tkachev, V., Saenko, V., Saenko, Y., Sokov, D. G., Gaifullin, N. M., Kashintsev, K., Shirokorad, V., Shabalina, I., Zhavoronkov, A., Mishra, B., Cantor, C. R., and Buzdin, A. (2017) Data aggregation at the level of molecular pathways improves stability of experimental transcriptomic and proteomic data, *Cell Cycle*, **16**, 1810-1823, doi: 10.1080/15384101.2017.1361068.
21. Zhu, Q., Izumchenko, E., Aliper, A. M., Makarev, E., Paz, K., Buzdin, A. A., Zhavoronkov, A. A., and Sidransky, D. (2015) Pathway activation strength is a novel independent prognostic biomarker for cetuximab sensitivity in colorectal cancer patients, *Hum. Genome Var.*, **2**, 15009, doi: 10.1038/hgv.2015.9.
22. Poddubskaya, E. V., Baranova, M. P., Allina, D. O., Sekacheva, M. I., Makovskaia, L. A., Kamashev, D. E., Suntsova, M. V., Barbara, V. S., Kochergina-Nikitskaya, I. N., and Aleshin, A. A. (2019) Personalized prescription of imatinib in recurrent granulosa cell tumor of the ovary: case report, *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.*, **5**, doi: 10.1101/mcs.a003434.
23. Poddubskaya, E. V., Baranova, M. P., Allina, D. O., Smirnov, P. Y., Albert, E. A., Kirilchev, A. P., Aleshin, A. A., Sekacheva, M. I., and Suntsova, M. V. (2018) Personalized prescription of tyrosine kinase inhibitors in unresectable metastatic cholangiocarcinoma, *Exp. Hematol. Oncol.*, **7**, 21, doi: 10.1186/s40164-018-0113-x.
24. Poddubskaya, E., Bondarenko, A., Boroda, A., Zotova, E., Glusker, A., Sletina, S., Makovskaia, L., Kopylov, P., Sekacheva, M., Moisseev, A., and Baranova, M. (2019) Transcriptomics-guided personalized prescription of targeted therapeutics for metastatic ALK-positive lung cancer case following recurrence on ALK inhibitors, *Front. Oncol.*, **9**, 1026, doi: 10.3389/fonc.2019.01026.
25. Howlader, N., Cronin, K. A., Kurian, A. W., and Andridge, R. (2018) Differences in breast cancer survival by molecular subtypes in the United States, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **27**, 619-626, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-17-0627.
26. Prat, A., Carey, L. A., Adamo, B., Vidal, M., Taberero, J., Cortés, J., Parker, J. S., Perou, C. M., and Baselga, J. (2014) Molecular features and survival outcomes of the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, **106**, doi: 10.1093/jnci/dju152.
27. Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner, *Bioinformatics*, **29**, 15-21, doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
28. Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2, *Genome Biol.*, **15**, 550, doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
29. Sorokin, M., Kholodenko, R., Suntsova, M., Malakhova, G., Garazha, A., Kholodenko, I., Poddubskaya, E., Lantsov, D., Stilidi, I., Arhiri, P., Osipov, A., and Buzdin, A. (2018) Oncobox bioinformatical platform for selecting potentially effective combinations of target cancer drugs using high-throughput gene expression data, *Cancers*, **10**, doi: 10.3390/cancers10100365.
30. Croft, D., Mundo, A. F., Haw, R., Milacic, M., Weiser, J., Wu, G., Caudy, M., Garapati, P., Gillespie, M., Kamdar, M. R., Jassal, B., Jupe, S., Matthews, L., May, B., Palatnik, S., Rothfels, K., Shamovsky, V., Song, H., Williams, M., Birney, E., Hermjakob, H., Stein, L., and D'Eustachio, P. (2014) The Reactome pathway knowledgebase, *Nucleic Acids Res.*, **42**, D472-477, doi: 10.1093/nar/gkt1102.
31. Schaefer, C. F., Anthony, K., Krupa, S., Buchhoff, J., Day, M., Hannay, T., and Buetow, K. H. (2009) PID: the Pathway Interaction Database, *Nucleic Acids Res.*, **37**, D674-D679, doi: 10.1093/nar/gkn653.
32. Kanehisa, M. (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 27-30, doi: 10.1093/nar/28.1.27.
33. Romero, P., Wagg, J., Green, M. L., Kaiser, D., Krummenacker, M., and Karp, P. D. (2005) Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome, *Genome Biol.*, **6**, R2, doi: 10.1186/gb-2004-6-1-r2.
34. Nishimura, D. (2001) BioCarta, *Biotech Software and Internet Report*, **2**, 117-120, doi: 10.1089/152791601750294344.
35. Igol'kina, A. A., Zinkevich, A., Karandasheva, K. O., Popov, A. A., Selifanova, M. V., Nikolaeva, D., Tkachev, V., Penzar, D., Nikitin, D. M., and Buzdin, A. (2019) H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, H3K27me3 and H3K9me3 histone tags suggest distinct regulatory evolution of open and condensed chromatin landmarks, *Cells*, **8**, doi: 10.3390/cells8091034.
36. Marggraf, M. B., Panteleev, P. V., Emelianova, A. A., Sorokin, M. I., Bolosov, I. A., Buzdin, A. A., Kuzmin, D. V., and Ovchinnikova, T. V. (2018) Cytotoxic potential of the novel horseshoe crab peptide polyphemusin III, *Mar. Drugs*, **16**, doi: 10.3390/md16120466.
37. Buzdin, A., Garazha, A., Sorokin, M., Glusker, A., Aleshin, A., Allina, D., Suntsova, M., Tkachev, V., Borger, P., Borisov, N., and Gaifullin, N. (2019) RNA sequencing analysis for profiling activation of cancer-associated molecular pathways, *J. Clin. Oncol.*, **37**, e13032-e13032, doi: 10.1200/jco.2019.37.15\_suppl.e13032.
38. Green, D. M., Swets, J. A. (1966) *Signal Detection Theory and Psychophysics*, New York.

39. Chen, L., Zhou, Y., Tang, X., Yang, C., Tian, Y., Xie, R., Chen, T., Yang, J., Jing, M., Chen, F., Wang, C., Sun, H., and Huang, Y. (2019) EGFR mutation decreases FDG uptake in non-small cell lung cancer via the NOX4/ROS/GLUT1 axis, *Int. J. Oncol.*, **54**, 370-380, doi: 10.3892/ijo.2018.4626.
40. Tanioka, M., Fan, C., Parker, J. S., Hoadley, K. A., Hu, Z., Li, Y., Hyslop, T. M., Pitcher, B. N., Soloway, M. G., Spears, P. A., Henry, L. N., Tolane, S., Dang, C. T., Krop, I. E., Harris, L. N., Berry, D. A., Mardis, E. R., Winer, E. P., Hudis, C. A., Carey, L. A., and Perou, M. (2018) Integrated analysis of RNA and DNA from the phase III trial CALGB 40601 identifies predictors of response to trastuzumab-based neoadjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer, *Clin. Cancer Res.*, **24**, 5292-5304, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3431.
41. Liu, T., Cheng, G., Kang, X., Xi, Y., Zhu, Y., Wang, K., Sun, C., Ye, J., Li, P., and Yin, H. (2018) Noninvasively evaluating the grading and IDH1 mutation status of diffuse gliomas by three-dimensional pseudo-continuous arterial spin labeling and diffusion-weighted imaging, *Neuroradiology*, **60**, 693-702, doi: 10.1007/s00234-018-2021-5.
42. Boyd, J. C. (1997) Mathematical tools for demonstrating the clinical usefulness of biochemical markers, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, **227**, 46-63.
43. Hendricks, W. P. D., Briones, N., Halperin, R. F., Facista, S., Heaton, P. R., Mahadevan, D., and Kim, S. (2019) PD-1-associated gene expression signature of neoadjuvant trastuzumab-treated tumors correlates with patient survival in HER2-positive breast cancer, *Cancers*, **11**, doi: 10.3390/cancers11101566.
44. Okuma, H. S., Koizumi, F., Hirakawa, A., Nakatochi, M., Komori, O., Hashimoto, J., Kodaira, M., Yunokawa, M., Yamamoto, H., Yonemori, K., Shimizu, C., Fujiwara, Y., and Tamura, K. (2016) Clinical and microarray analysis of breast cancers of all subtypes from two prospective preoperative chemotherapy studies, *Br. J. Cancer*, **115**, 411-419, doi: 10.1038/bjc.2016.184.
45. Popovici, V., Chen, W., Gallas, B. G., Hatzis, C., Shi, W., Samuelson, F. W., Nikolsky, Y., Tsyganova, M., Ishkin, A., Nikolskaya, T., Hess, K. R., Valero, V., Booser, D., Delorenzi, M., Hortobagyi, G. N., Shi, L., Symmans, W. F., and Pusztai, L. (2010) Effect of training-sample size and classification difficulty on the accuracy of genomic predictors, *Breast Cancer Res.*, **12**, R5, doi: 10.1186/bcr2468.
46. Shi, L., Campbell, G., Jones, W. D., Campagne, F., Wen, Z., et al. (2010) The MicroArray Quality Control (MAQC)-II study of common practices for the development and validation of microarray-based predictive models, *Nat. Biotechnol.*, **28**, 827-838, doi: 10.1038/nbt.1665.
47. Sonnenblick, A., Brohée, S., Fumagalli, D., Rothé, F., Vincent, D., Ignatiadis, M., Desmedt, C., Salgado, R., Sirtaine, N., Loi, S., Neven, P., Loibl, S., Denkert, C., Joensuu, H., Piccart, M., and Sotiriou, C. (2015) Integrative proteomic and gene expression analysis identify potential biomarkers for adjuvant trastuzumab resistance: analysis from the Fin-her phase III randomized trial, *Oncotarget*, **6**, 30306-30316, doi: 10.18632/oncotarget.5080.
48. Nault, R., Fader, K. A., and Zacharewski, T. (2015) RNA-Seq versus oligonucleotide array assessment of dose-dependent TCDD-elicited hepatic gene expression in mice, *BMC Genomics*, **16**, 373, doi: 10.1186/s12864-015-1527-z.
49. SEQC/MAQC-III Consortium (2014) A comprehensive assessment of RNA-seq accuracy, reproducibility and information content by the Sequencing Quality Control Consortium, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 903-914, doi: 10.1038/nbt.2957.
50. Suntsova, M., Gaifullin, N., Allina, D., Reshetun, A., Li, X., Mendeleeva, L., Surin, V., Sergeeva, A., Spirin, P., Prassolov, V., Morgan, A., Garazha, A., Sorokin, M., and Buzdin, A. (2019) Atlas of RNA sequencing profiles for normal human tissues, *Sci. Data*, **6**, 36, doi: 10.1038/s41597-019-0043-4.
51. Kumar, N., Prasad, P., Jash, E., Saini, M., Husain, A., Goldman, A., and Sehrawat, S. (2018) Insights into exchange factor directly activated by cAMP (EPAC) as potential target for cancer treatment, *Mol. Cell. Biochem.*, **447**, 77-92, doi: 10.1007/s11010-018-3294-z.
52. Capitani, M., and Sallese, M. (2009) The KDEL receptor: new functions for an old protein, *FEBS Lett.*, **583**, 3863-3871, doi: 10.1016/j.febslet.2009.10.053.
53. Maisel, S. A., and Schroeder, J. (2019) Wrong place at the wrong time: how retrograde trafficking drives cancer metastasis through receptor mislocalization, *J. Cancer Metastasis Treat.*, **2019**, doi: 10.20517/2394-4722.2018.82.
54. Valabrega, G., Montemurro, F., Sarotto, I., Petrelli, A., Rubini, P., Tacchetti, C., Aglietta, M., Comoglio, P. M., and Giordano, S. (2005) TGF $\alpha$  expression impairs Trastuzumab-induced HER2 downregulation, *Oncogene*, **24**, 3002-3010, doi: 10.1038/sj.onc.1208478.
55. Ahmad, A. (2019) Current updates on trastuzumab resistance in HER2 overexpressing breast cancers, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1152**, 217-228, doi: 10.1007/978-3-030-20301-6\_10.
56. Adamczyk, A., Kruczak, A., Harazin-Lechowska, A., Ambicka, A., Grela-Wojewoda, A., Domagala-Haduch, M., Janecka-Widla, A., Majchrzyk, K., Cichocka, A., Rys, J., and Niemiec, J. (2018) Relationship between HER2 gene status and selected potential biological features related to trastuzumab resistance and its influence on survival of breast cancer patients undergoing trastuzumab adjuvant treatment, *Onco Targets Ther.*, **11**, 4525-4535, doi: 10.2147/OTT.S166983.
57. Hanker, A. B., Garrett, J. T., Estrada, M. V., Moore, P. D., Ericsson, P. G., et al. (2017) HER2-overexpressing breast cancers amplify FGFR signaling upon acquisition of resistance to dual therapeutic blockade of HER2, *Clin. Cancer Res.*, **23**, 4323-4334, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2287.
58. Lenz, G., Hamilton, A., Geng, S., Hong, T., Kalkum, M., Momand, J., Kane, S. E., and Huss, J. M. (2018) t-Darpp activates IGF-1R signaling to regulate glucose metabolism in trastuzumab-resistant breast cancer cells, *Clin. Cancer Res.*, **24**, 1216-1226, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0824.
59. Martinez, V. G., O'Neill, S., Salimu, J., Breslin, S., Clayton, A., Crown, J., and O'Driscoll, L. (2017) Resistance to HER2-targeted anti-cancer drugs is associated with immune evasion in cancer cells and their derived extracellular vesicles, *Oncoimmunology*, **6**, e1362530, doi: 10.1080/2162402X.2017.1362530.
60. Van Rooijen, J. M., Qiu, S. Q., Timmer-Bosscha, H., van der Vegt, B., Boers, J. E., Schroder, C. P., and de Vries, E. G. E. (2018) Androgen receptor expression inversely correlates with immune cell infiltration in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer, *Eur. J. Cancer*, **103**, 52-60, doi: 10.1016/j.ejca.2018.08.001.

## MOLECULAR PATHWAY ACTIVATION MARKERS ARE LINKED WITH EFFICACY OF TRASTUZUMAB THERAPY IN METASTATIC HER2-POSITIVE BREAST CANCER BETTER THAN INDIVIDUAL GENE EXPRESSION LEVELS\*

M. Sorokin<sup>1,2,3</sup>, K. Ignatev<sup>4</sup>, V. Barbara<sup>4</sup>, U. Vladimirova<sup>1,3</sup>, A. Muraveva<sup>3</sup>, M. Suntsova<sup>1</sup>,  
N. Gaifullin<sup>5</sup>, I. Vorotnikov<sup>6</sup>, D. Kamashev<sup>1,3</sup>, A. Bondarenko<sup>7</sup>, M. Baranova<sup>7,8</sup>,  
E. Poddubskaya<sup>3,7</sup>, and A. Buzdin<sup>1,2,3,9\*\*</sup>

<sup>1</sup> Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, 117997 Moscow, Russia; E-mail: buzdin@oncobox.com

<sup>2</sup> OmicsWay Corp., 91789 Walnut, CA, USA

<sup>3</sup> Institute of Molecular Medicine of the Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991 Moscow, Russia

<sup>4</sup> Republican Oncological Dispensary of Karelia Republic, 185016 Petrozavodsk, Russia

<sup>5</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, 119991 Moscow, Russia

<sup>6</sup> Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478 Moscow, Russia

<sup>7</sup> VitaMed Medical Center, 121309 Moscow, Russia

<sup>8</sup> Russian Scientific Center of Surgery named after B. V. Petrovsky, 119991 Moscow, Russia

<sup>9</sup> Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

Received March 31, 2020

Received May 29, 2020

Accepted May 31, 2020

Increased expression or amplification of HER2 receptor tyrosine kinase gene *ERBB2* is well-known and widely used as a prognostic biomarker of breast cancer (BC) response to the targeted treatment with trastuzumab and its analogs. Considering that part of the BC patients overexpressing HER2 does not respond to trastuzumab, clinical trial NCT03521245 was initiated to identify additional gene expression and molecular pathway activation response biomarkers to trastuzumab treatment in HER2-positive BC. Using RNA sequencing gene expression in 23 formalin-fixed, paraffin embedded HER2 positive BC tissue blocks from patients who either responded or not responded to trastuzumab treatment was profiled. Differentially regulated genes and molecular pathways were identified in the groups of trastuzumab responders and non-responders. These results were next compared with the 42 previously published BC trastuzumab responder and non-responder RNA sequencing profiles from the clinical trials NCT00513292 and NCT00353483. No correlation was observed between the response status and the expression levels of *ERBB2* gene in the HER2 positive BC samples. Analysis of the differentially expressed genes and molecular pathways in the combined dataset revealed 15/27 commonly up/down regulated genes and 15/25 pathways, respectively. However, only the intersection of molecular pathways upregulated in trastuzumab responders vs non-responders was statistically significantly enriched compared to the random expectation model. A classifier built using the most significantly upregulated molecular pathway—cAMP Pathway Protein Retention—demonstrated the best performance for prediction of the HER2 positive BC response to trastuzumab for both our experimental and previously reported data. This pathway also predicted time to recurrence in the combined dataset with Log-rank p-value 0.041.

**Keywords:** breast cancer, HER2, *ERBB2*, transcriptomics, RNA sequencing, trastuzumab, targeted therapy, personalized medicine, NCT03521245

УДК 577.32

## ФИТОФЛУИН – ЭФФЕКТИВНЫЙ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР ОБРАЗОВАНИЯ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА ПОД ДЕЙСТВИЕМ УФ-А ИЗЛУЧЕНИЯ\*

© 2020 А.А. Ашихмин<sup>1</sup>, А.С. Бендикис<sup>2</sup>, А.А. Москаленко<sup>1</sup>, А.А. Красновский (мл.)<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup> Институт фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: AshikhminAA@gmail.com

<sup>2</sup> Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071 Москва, Россия; электронная почта: phoal@mail.ru

Поступила в редакцию 29.04.2020

После доработки 26.05.2020

Принята к публикации 04.06.2020

Известно, что фитонин и фитофлуин, бесцветные  $C_{40}$  каротиноиды с короткой цепью сопряженных двойных связей (3 и 5 соответственно), являются универсальными предшественниками в биосинтезе окрашенных каротиноидов в фотосинтезирующих организмах. Общепринято представление о том, что  $C_{40}$  каротиноиды играют роль фотопротекторов клеток и тканей. Используя измерение фотосенсибилизированной фосфоресценции синглетного кислорода ( $^1O_2$ ), мы обнаружили, что фитофлуин является исключением из этого правила, так как эффективно (с квантовым выходом  $85 \pm 5\%$ ) фотосенсибилизирует образование  $^1O_2$  в азрированных растворах под действием УФ-А излучения. При этом фитонин почти неактивен в качестве фотосенсибилизатора. Показано, что оба каротиноида тушат  $^1O_2$  в темноте. Полученные константы скорости тушения ( $(4 \pm 1) \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$  для фитонина и  $(2 \pm 0,5) \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$  для фитофлуина) на 2–3 порядка меньше, чем константы скорости контролируемых диффузией реакций. Таким образом, протекторные свойства обоих каротиноидов относительно слабо выражены. Более того, фитофлуин, благодаря его высокой фотосенсибилизирующей активности, можно рассматривать как потенциальный фотостимулятор повреждения клеток и перспективный УФ-А фотосенсибилизатор для медицинских целей.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** фитофлуин, фитонин, синглетный кислород, фотосенсибилизация, УФ-А.

DOI: 10.31857/S0320972520070052

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что фотосинтезирующие организмы синтезируют окрашенные каротиноиды, содержащие 9 и более сопряженных двойных связей (СДС), которые служат эффективными протекторами живых тканей, защищая их от фотоокислительного стресса. Показано, что протекторные свойства основаны на способности каротиноидов эффективно дезактивировать триплетные состояния хлорофиллов и бактериохлорофиллов, тушить синглетный кислород ( $^1O_2$ ) и нейтрализовать свободные радикалы [1, 2]. Напротив, зрительный пигмент ретиналь, представ-

ляющий собой полиен с короткой цепью СДС (6 СДС), является эффективным фотосенсибилизатором образования  $^1O_2$  в неполярной среде [2, 3]. Этот процесс, вероятно, вызывает фотодинамическое повреждение сетчатки и различные заболевания глаз [4].

Известно, что  $C_{40}$  каротиноиды с короткими цепями СДС (3–7 СДС) (фитонин, фитофлуин,  $\zeta$ -каротин) образуются в фотосинтезирующих бактериях, зеленых растениях и водорослях, поскольку являются универсальными предшественниками в биосинтезе окрашенных каротинов и ксантофиллов, имеющих длинную цепь СДС [1]. Исходя из этих представлений, было высказано предположение, что полиены с короткими цепями СДС могут вызывать фотодинамическое повреждение фотосинтетических тканей [5]. Кроме того, недавно было обнаружено, что под действием сине-зеленого света, который преимущественно поглощается каротиноидами, в мембранах пурпурных бактерий наблюдается фотоокисление бактериохлорофилла В-850 кислородом и образование  $^1O_2$  [6–10]. С

Принятые сокращения:  $^1O_2$  – синглетный кислород, УФ – ультрафиолет, СДС – сопряженная двойная связь,  $\Phi_{\Delta}$  – квантовый выход генерации  $^1O_2$ .

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», ВМ20-107, 19.06.2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

другой стороны, фитоин и фитофлуин обнаруживаются в широко употребляемых продуктах питания и являются преобладающими каротиноидами в плазме крови и тканях человека. Было показано, что они реагируют со свободными радикалами, и поэтому применяются в качестве протекторов кожи и продуктов питания от окислительного стресса и ультрафиолетового (УФ) излучения [11, 12]. Тем не менее, насколько нам известно, систематический анализ генерации  $^1\text{O}_2$   $\text{C}_{40}$  каротиноидами – предшественниками в биосинтезе  $\beta$ -каротина – никогда не проводился, хотя триплетные состояния некоторых соединений этой группы были исследованы методом импульсного фотолиза [13, 14]. Недавно в предварительных тестовых измерениях, проведенных нашей группой, обнаружилось, что фитофлуин является исключительно эффективным фотосенсибилизатором образования  $^1\text{O}_2$ , который превосходит по этой способности транс-ретиаль. Это наблюдение стимулировало нас к детальному исследованию генерации  $^1\text{O}_2$  этим каротиноидом и его биосинтетическим предшественником – фитоином. Для анализа применяли измерение фотосенсибилизированной фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  [15]. Полученные результаты представлены в настоящей работе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Транс формы фитоина и фитофлуина были выделены из клеток двух серных фотосинтезирующих бактерий *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* (штамм ATCC 51935<sup>T</sup>) и *Allochrochromatium vinosum* (штамм МГУ<sup>T</sup>, старое название *Allochrochromatium minutissimum*). Культура клеток *E. haloalkaliphila* получена от профессора J. F. Imhoff («Helmholtz Centre for Ocean Research», Германия), культура *A. vinosum* была предоставлена кафедрой микробиологии МГУ имени М. В. Ломоносова. Бактериальные клетки были выращены в анаэробных условиях в присутствии 53 и 71 мкМ дифениламина (ДФА) («Реахим», Россия) на белом свете интенсивностью 90 Вт/м<sup>2</sup> на средах Пфеннига и Ларсена [16, 17]. Собранные клетки были разрушены с помощью ультразвука с использованием генератора УЗГ13-0.1-22 («Ультразвуковая техника», Россия). Неповрежденные клетки и фрагменты клеточных стенок удаляли центрифугированием в центрифуге K24 («Janetzki», Германия) в течение 10 мин при 4500 об./мин и 10 000 об./мин для *E. haloalkaliphila* и *A. vinosum* соответственно [16–18].

Каротиноиды экстрагировали из бактериальных мембран, используя смесь ацетона, ме-

танолола и петролейного эфира, и затем очищали, используя методы хроматографии. Более подробная информация о процедуре выделения каротиноидов была описана ранее [18].

Синглетный кислород исследовали путем измерения его собственной инфракрасной фосфоресценции при 1270 нм, которая возникает в результате переноса энергии от триплетного состояния молекул фотосенсибилизатора на кислород с последующим заселением возбужденного синглетного ( $^1\Delta_g$ ) состояния молекул кислорода. Измерения проводили с использованием нового лазерного/светодиодного спектрометра, недавно сконструированного в институте биохимии им. А.Н. Баха РАН [19]. Спектрометр позволял регистрировать фосфоресценцию при стационарном возбуждении светодиодами с максимумами излучения при 281, 350 и 371,5 нм («AQMEPAN», Китай) и 399,5 нм («Полироник», Москва, Россия) и при импульсном возбуждении светодиодом с максимумом излучения при 405 нм («Альком Медика», Санкт-Петербург, Россия). Излучение светодиодов фокусировали в пятно диаметром 5 мм на поверхности кварцевой кюветы (1 см) с исследуемым раствором. Интенсивность возбуждающего света контролировали измерителем мощности ThorLabs PM-100D с сенсорной головкой S120VC («ThorLabs», США). Фосфоресценцию  $^1\text{O}_2$  измеряли под углом 90° с помощью охлаждаемого фотоумножителя ФЭУ-112 («Экран оптические системы», Новосибирск, Россия) со спектральной характеристикой С-1 через отсекающие фильтры, которые пропускают ИК-свет на  $\lambda \geq 1000$  нм, и один из трех сменных интерференционных фильтров с максимумами пропускания при 1230, 1270 и 1310 нм и полушириной 10 нм. Стационарную интенсивность фосфоресценции измеряли цифровым милливольтметром («Эконикс-Эксперт», Россия).

Для кинетических измерений образцы облучали импульсами синего света при 405 нм. Длительность импульса изменяли от 1 до 10 мкс, частота повторения импульсов 5–100 Гц [19]. Сигнал фотоумножителя через предварительный усилитель поступал на USB-плату, работающую в режиме разрешенного во времени счета фотонов («Парсек», Россия). Постоянная времени записи системы составляла ~10 нс. Счетная плата, которая запускалась от дополнительного импульса блока управления, синхронизированного с импульсом светодиода, делила временной интервал между вспышками на 512 или 1024 канала. Кинетические кривые были получены путем накопления импульсов фотоумножителя в каждом канале. Квантовый выход генерации  $^1\text{O}_2$  ( $\Phi_\Delta$ ) измеряли, используя в качестве

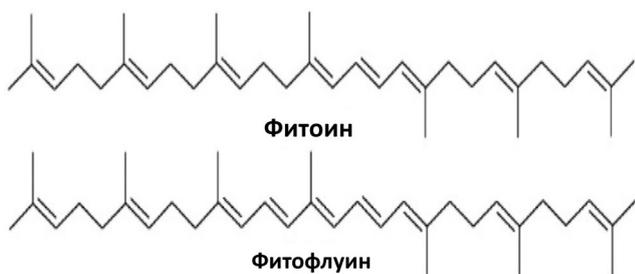


Рис. 1. Структурные формулы изучаемых каротиноидов.

ве эталона органический фотосенсибилизатор феноленон (perinaphthenone, 1H-phenalen-1-one) («Merk», Германия), который имеет широкую полосу поглощения с максимумом при 350 нм и заметное поглощение при 405 нм. Известно, что квантовый выход фотогенерации <sup>1</sup>O<sub>2</sub> феноленоном близок к 1 (0,95 ± 0,05) [20, 21]. Эксперименты проводили, используя в качестве растворителей гексафторбензол (C<sub>6</sub>F<sub>6</sub>) и перфторгексан, специально очищенные для наших экспериментов («Пиминвест», Россия).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

На рис. 1 показана химическая структура исследуемых каротиноидов. Видно, что фитоин имеет 3 СДС, а фитофлуин – 5 СДС.

Спектры поглощения каротиноидов приведены на рис. 2. Видно, что максимумы поглощения фитоина находятся в УФ-В области

250–310 нм, поэтому фитоин растворяли в перфторгексане, который достаточно прозрачен в этой области спектра. Максимумы поглощения фитофлуина лежат в УФ-А области 320–400 нм. Кроме того, фитофлуин плохо растворяли в перфторгексане, поэтому его растворяли в гексафторбензоле, который достаточно прозрачен в УФ-А области, но не прозрачен в области УФ-В. Именно поэтому спектры поглощения каротиноидов измеряли в разных растворителях. Были и другие причины использования гексафторбензола и перфторгексана в качестве растворителей. Молекулы этих соединений не имеют атомов водорода и поэтому слабо тушат <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. По этой причине время жизни <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (τ<sub>Δ</sub>) и интенсивности фосфоресценции <sup>1</sup>O<sub>2</sub> в несколько сотен раз больше, чем в органических растворителях, содержащих атомы водорода, в которых времена жизни <sup>1</sup>O<sub>2</sub> обычно составляют 10–300 мкс [19]. Использование менее дорогих растворителей, содержащих вместо водорода атомы хлора, (CCl<sub>4</sub> и фреоны), оказалось невозможным для наших исследований, поскольку при облучении в хлорсодержащих растворителях происходило быстрое фоторазрушение каротиноидов вследствие эффективной фотохимической реакции. Фторсодержащие растворители не реагировали с возбужденными молекулами каротиноидов. Для расчета концентраций пигментов были использованы следующие молярные коэффициенты поглощения (в М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>): фитоин, 50 000 (при 282 нм); фитофлуин, 73 000 (при 350 нм) [22] и феноленон, 97 000 (при 351 нм) [20, 21].

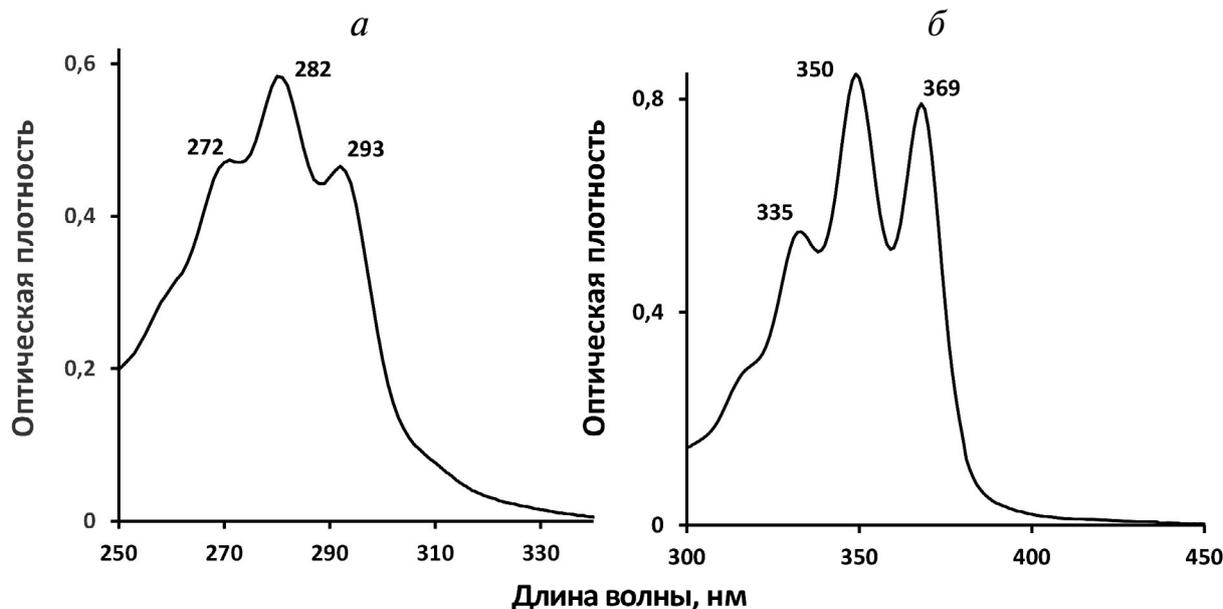


Рис. 2. Спектры поглощения фитоина в перфторгексане (а) и фитофлуина в гексафторбензоле (б) в кварцевой кювете (1 см) после вычитания фонового поглощения растворителей

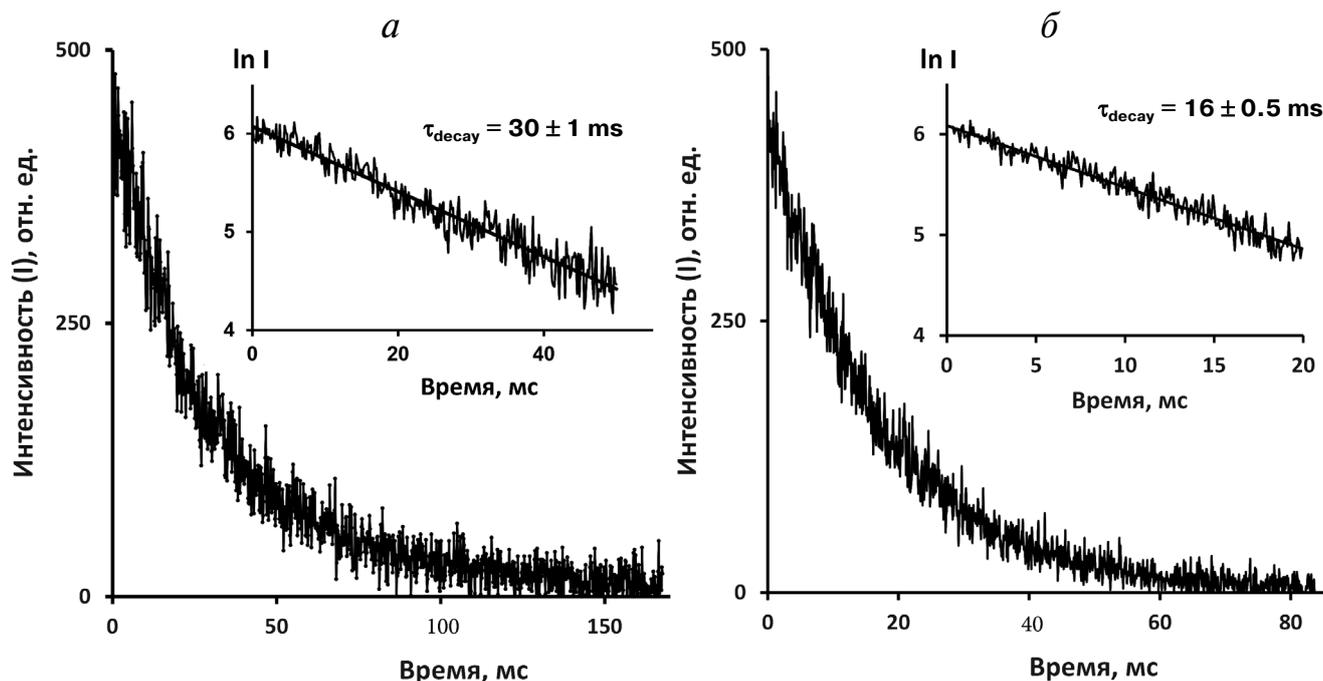


Рис. 3. Кривые затухания фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворах феноаленона ( $\sim 3$  мкМ) в перфторгексане (а) и гексафторбензоле (б) после облучения 10 мкс светодиодными импульсами (405 нм) в присутствии воздуха. Кривые получены при частоте повторения импульсов 5 и 10 Гц путем 30 и 15-минутного накопления сигнала. Средняя мощность возбуждающего света составляла 20 и 40 мкВт соответственно. На врезках показаны кривые затухания в полулогарифмическом масштабе

Кинетические кривые фотосенсибилизированной фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в перфторгексане и гексафторбензоле после возбуждения короткими импульсами фиолетового светодиода (405 нм) показаны на рис. 3. В качестве фотосенсибилизатора использовали феноаленон. Видно, что кривые затухания хорошо описываются экспонентами с временем жизни 16 мс в гексафторбензоле и 30 мс в перфторгексане.

Как фитоин, так и фитофлуин практически не поглощают свет на длине волны использованного нами импульсного светодиода (405 нм), поэтому для возбуждения этих каротиноидов применяли стационарное излучение светодиодов при 281 и 371 нм. При облучении этими светодиодами растворы феноаленона в обоих растворителях излучали достаточно сильную фосфоресценцию  $^1\text{O}_2$  с максимумом при 1270 нм.

Рис. 4 иллюстрирует относительные квантовые выходы фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворах фитоина и феноаленона. Фитоин изучали в перфторгексане при возбуждении при 281 нм (3,5 мВт). В этих условиях растворы фитоина излучали очень слабую люминесценцию при 1270 нм. Феноаленон почти не поглощал свет в области 281 нм, поэтому для получения надежных результатов феноаленон облучали светодиодом при 371 нм. Поглощение обоих соединений

равно 0,13 на длинах волн возбуждения. Это соответствовало концентрациям 2,6 мкМ фитоина и 1,7 мкМ феноаленона. После нормирования на число падающих фотонов и вычитания фонового сигнала люминесценции, испускаемой растворителем без фотосенсибилизатора, мы получили, что интенсивность фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворе фитоина примерно в 100 раз меньше, чем в растворе феноаленона. Известно, что фитоин и фитофлуин способны тушить  $^1\text{O}_2$ , хотя константы скорости этого процесса невелики, причем их точные значения ранее измерить не удалось [23]. Тушение  $^1\text{O}_2$  феноаленоном очень слабо выражено [19]. Чтобы выяснить, как тушение  $^1\text{O}_2$  фитоином влияет на общий выход фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворах фитоина, мы провели измерение константы скорости тушения  $^1\text{O}_2$  фитоином. Это было сделано путем измерения скорости затухания фотосенсибилизированной феноаленоном фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  при добавлении разных концентраций фитоина. В качестве растворителя был использован гексафторбензол, так как оба соединения – фитоин и феноаленон – растворимы в этом растворителе и недостаточно хорошо растворимы в перфторгексане. Из рис. 4, б видно, что тушение  $^1\text{O}_2$  фитоином подчиняется уравнению Штерна–Фольмера:

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_q[\text{Car}], \quad (1)$$

где  $k_{\text{obs}}$  – наблюдаемая константа скорости затухания фосфоресценции (в  $\text{с}^{-1}$ ) ( $k_{\text{obs}} = 1/\tau_{\Delta}$ , где  $\tau_{\Delta}$  – время жизни  $^1\text{O}_2$ ) после импульсов светодиода в растворах, содержащих как фотосенсибилизатор, так и каротиноиды;  $k_0$  – константа скорости затухания фосфоресценции в растворах фенолалена без каротиноида;  $k_q$  – бимолекулярная константа скорости тушения  $^1\text{O}_2$  каротиноидом;  $[\text{Car}]$  – молярная концентрация каротиноида.

Из рис. 4, б следует, что для фитоина  $k_q = (4 \pm 1) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$ . Это значение согласуется с данными работы Mathews-Roth et al., которые получили, что  $k_q < 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$  [23]. Следовательно, фитоин является относительно слабым тушителем  $^1\text{O}_2$ . При концентрации 2,6 мкМ фитоин увеличивает скорость затухания фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в гексафторбензоле в 1,16 раза ( $k_q[\text{Car}]/k_0 = 0,16$ ). Для стационарной интенсивности фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  уравнение (1) может быть представлено в виде:

$$I_0/I_q = 1 + k_q/k_0 [\text{Car}], \quad (2)$$

где  $I_0$  и  $I_q$  – стационарная интенсивность фотосенсибилизированной фенолаленом фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в отсутствие и в присутствии фитоина. Из этого уравнения следует, что в присут-

ствии 2,6 мкМ фитоина стационарная интенсивность фосфоресценции уменьшается на 16% по сравнению с раствором фенолалена без каротиноида.

Поскольку время жизни  $^1\text{O}_2$  в перфторгексане в два раза больше, т.е.  $k_0$  соответственно в два раза меньше, чем в гексафторбензоле (рис. 4), а константа  $k_q$  одинакова в обоих растворителях, используя уравнение (2) можно рассчитать, что при тушении фитоином в перфторгексане интенсивность фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  должна уменьшиться в 1,3 раза ( $(k_q[\text{Car}]/k_0) \approx 0,3$ ). Следовательно, тушение  $^1\text{O}_2$  фитоином не может объяснить низкую интенсивность фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворе фитоина (рис. 4). Отсюда следует, что этот эффект – результат низкой величины квантового выхода генерации  $^1\text{O}_2$  фитоином ( $\Phi_{\Delta}$ ). Исходя из этого, можно утверждать, что для фитоина  $\Phi_{\Delta} < 2\%$ . Эта величина коррелирует с данными импульсного фотолиза, полученными Bensaïsson et al. [14], согласно которым выход триплетного состояния фитоина очень низок и составляет  $\leq 0,002$ . Для подробного изучения фитоина необходимы дальнейшие измерения.

Фитофлуин исследовали в гексафторбензоле при возбуждении непрерывным светом светодиодов при 371 нм (2–3 мВт). После облучения раствора фитофлуина наблюдали достаточно сильную инфракрасную фосфоресценцию со

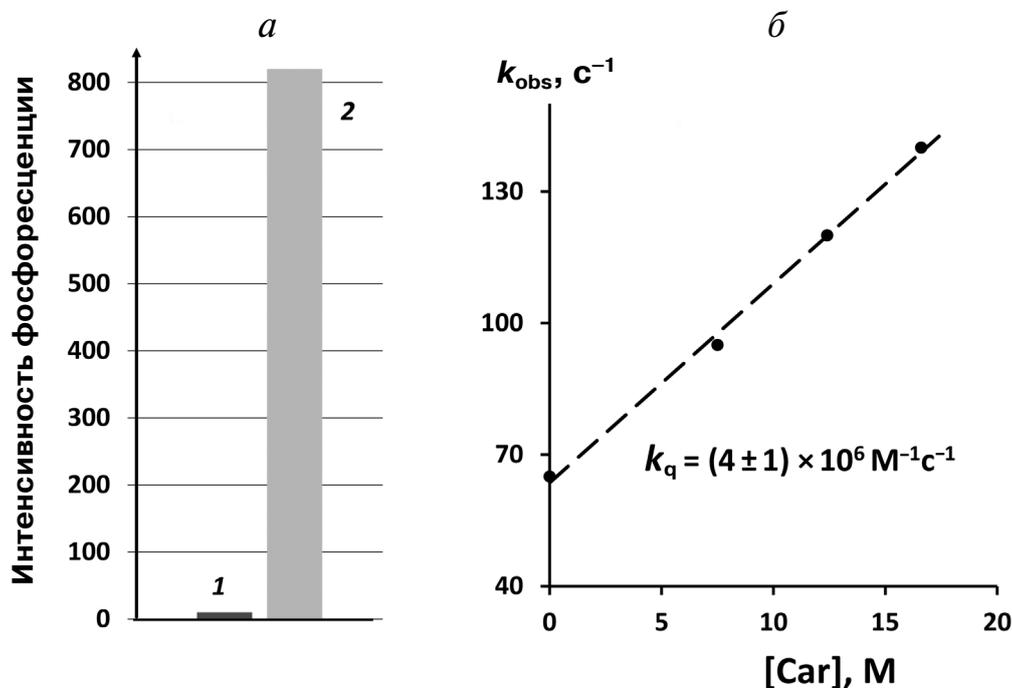


Рис. 4. Генерация и тушение  $^1\text{O}_2$  фитоином: а – относительная интенсивность фотосенсибилизированной фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворах фитоина (1) и фенолалена (2) в перфторгексане при фотовозбуждении соответственно при 281 нм и 371 нм. Оптическая плотность одинакова (0,13) в области возбуждения; б – тушение фотосенсибилизированной фенолаленом фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в гексафторбензоле при добавлении фитоина, длина волны возбуждения 405 нм

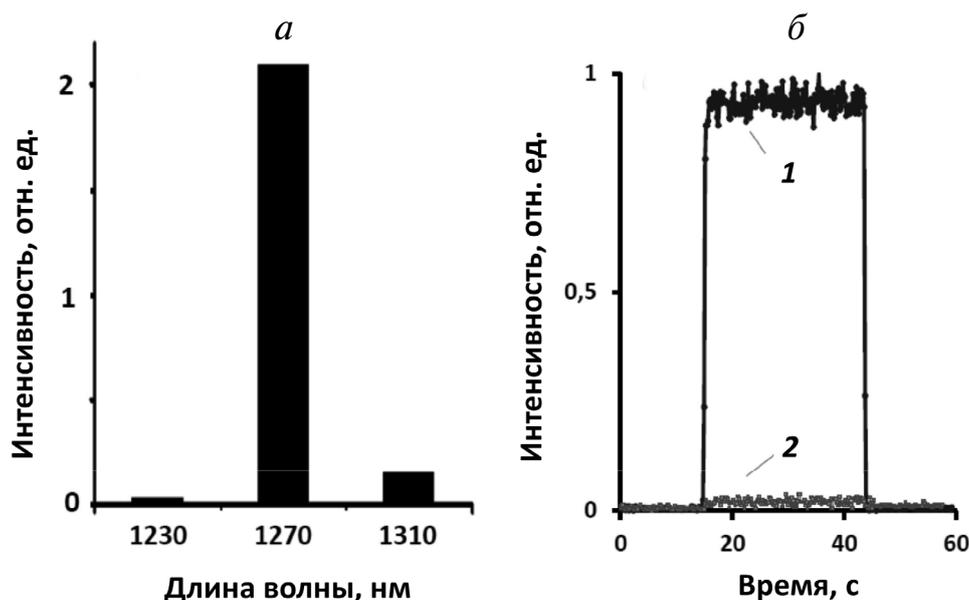


Рис. 5. Параметры фосфоресценции  $^1\text{O}_2$ , фотосенсибилизированной фитофлуином в гексафторбензоле. *a* – Спектр фосфоресценции; *б* – интенсивность фосфоресценции до (1) и после (2) добавления 50% ацетона. Фосфоресценцию возбуждали непрерывным светом светодиода при 371 нм ( $\approx 3,5$  мВт)

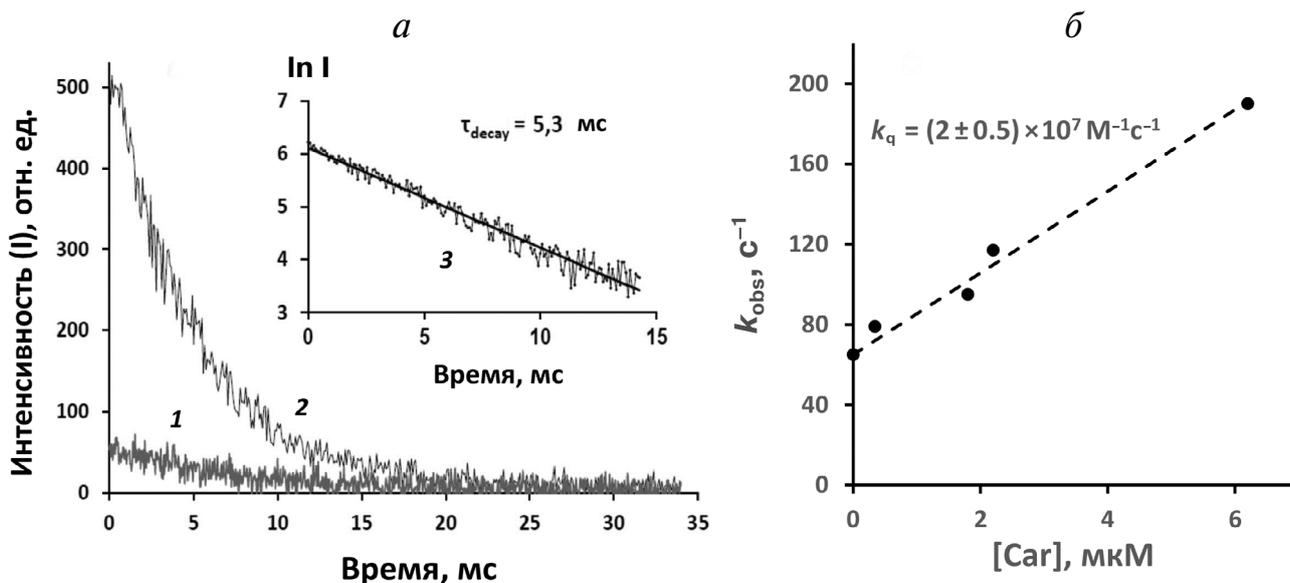


Рис. 6. Генерация и тушение фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  фитофлуином в гексафторбензоле. *a* – Кривые затухания фосфоресценции после возбуждения светодиодными импульсами (10 мкс, 405 нм) в растворе фитофлуина (6,2 мкМ) (1) и в растворе феналена с добавлением 6,2 мкМ фитофлуина (2) (частота повторения импульсов 30 Гц; время усреднения 15 мин); на врезке показана кривая 2 в полулогарифмических координатах (3). *б* – Тушение фотосенсибилизированной феналеном (2 мкМ) фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  при добавлении фитофлуина

спектральным максимумом при 1270 нм (рис. 5). После добавления 50% ацетона, что приводило к резкому уменьшению времени жизни  $^1\text{O}_2$ , фотосенсибилизированная фосфоресценция ослаблялась примерно в 500 раз (рис. 5). Аналогичный эффект наблюдался в растворах фенале-

нона в гексафторбензоле [18]. Спектр действия этой фосфоресценции, оцененный с использованием трех светодиодов с фиксированными длинами волн 350, 371 и 399 нм (данные не показаны), соответствовал спектру поглощения фитофлуина.

Из-за малой оптической плотности фитофлуина на длине волны нашего импульсного светодиода (405 нм) точное измерение временных параметров фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  представляло большие трудности. Тем не менее из рис. 6 видно, что нам удалось зарегистрировать слабый кинетический сигнал фосфоресценции  $^1\text{O}_2$ , возникающий при импульсном облучении достаточно концентрированного (6,2 мкМ) раствора фитофлуина с поглощением  $\sim 0,01$  при 405 нм. Время затухания составило  $\sim 5$  мс, что примерно в 3 раза меньше, чем в разбавленном растворе феналенона в отсутствие каротиноида (рис. 3). Это показывает, что при использованной концентрации фитофлуина происходит тушение  $^1\text{O}_2$ . Чтобы проверить это предположение, был приготовлен раствор, который содержал фитофлуин той же концентрации, что и в предыдущем эксперименте и феналенон с поглощением 0,1 при 405 нм. В этом растворе наблюдалась сильная фосфоресценция  $^1\text{O}_2$  при 1270 нм. Установлено, что ее время жизни совпадает с временем жизни фосфоресценции в растворе чистого фитофлуина (рис. 6). Более того, начальная интенсивность фосфоресценции в растворе феналенона увеличена примерно в 10 раз по сравнению с раствором фитофлуина, т.е. относительная интенсивность фосфоресценции примерно пропорциональна значениям оптической плотности пигментов в области возбуждения. Этот факт говорит о том, что квантовые выходы генерации  $^1\text{O}_2$  фитофлуином и феналеноном примерно одинаковы.

Дальнейшие эксперименты были направлены на более детальное исследование способности фитофлуина генерировать и тушить  $^1\text{O}_2$ . Рисунок 6, б показывает, что тушение фотосенсибилизированной феналеноном (2 мкМ) фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  при добавлении фитофлуина хорошо описывается уравнением Штерна–Фольмера (1). Из рис. 6 следует, что константа скорости тушения  $^1\text{O}_2$  фитофлуином составляет  $(2,0 \pm 0,5) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ . Это значение согласуется с оценкой, приведенной в работе Mathews-Roth et al. [23], согласно которой  $k_q < 10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ .

Для определения квантового выхода генерации синглетного кислорода фитофлуином сравнивали интенсивности фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворах фитофлуина и феналенона в гексафторбензоле, имеющих равное поглощение (0,15) при 371 нм, что соответствует концентрациям фитофлуина и феналенона, равным примерно 2 и 1,4 мкМ. В этих условиях интенсивность фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  в растворе фитофлуина составляла  $\sim 60\%$  от интенсивности фосфоресценции в растворе феналенона. Уменьшение интенсивности фосфоресценции в растворе фи-

Квантовые выходы генерации  $^1\text{O}_2$  и константы скорости тушения  $^1\text{O}_2$  каротиноидами, полученные в настоящей работе

| Каротиноид | СДС | $\Phi_\Delta$   | $k_q, \text{M}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ |
|------------|-----|-----------------|--|
| Фитоин*    | 3   | $< 0,02$        | $(4 \pm 1) \pm 10^6$                   |
| Фитофлуин  | 5   | $0,85 \pm 0,05$ | $(2 \pm 0,5) \pm 10^7$                 |

\*  $\Phi_\Delta$  для фитоина получена в перфторгексане, другие данные – в гексафторбензоле.

тофлуина частично связано с тушением  $^1\text{O}_2$  этим каротиноидом (рис. 6, б). Используя уравнение (2) и полученное для фитофлуина значение  $k_q$ , можно рассчитать, что при концентрации фитофлуина 2 мкМ интенсивность фосфоресценции  $^1\text{O}_2$  уменьшается в 1,5 раза по сравнению с раствором феналенона в отсутствие каротиноида. Учитывая это тушение и значение  $\Phi_\Delta$  для феналенона, равное 0,95 [20, 21], мы получаем для фитофлуина величину  $\Phi_\Delta = 0,95 \times 0,6 \times 1,5 = 0,85$ . По нашей оценке, статистическая погрешность составляет  $\pm 5\%$ . Полученные данные обобщены в таблице.

Таким образом, наши данные показывают, что фитоин и фитофлуин, которые являются универсальными предшественниками в биосинтезе окрашенных каротиноидов у растений и бактерий, сильно различаются по своей способности фотосенсибилизировать и тушить  $^1\text{O}_2$ . Фитоин менее эффективен в обоих этих процессах. При этом способность обоих каротиноидов тушить  $^1\text{O}_2$  выражена на 2–3 порядка слабее, чем у ликопина или  $\beta$ -каротина [2, 5, 15]. В то же время фитофлуин проявляет очень высокую фотосенсибилизирующую активность. Насколько нам известно, в настоящей работе это свойство фитофлуина было обнаружено впервые. Полученные данные свидетельствуют о том, что при фотовозбуждении фитофлуин эффективно заселяет достаточно долгоживущее триплетное состояние, способное передавать энергию кислороду. В настоящее время информация о квантовом выходе и времени жизни триплетов фитофлуина отсутствует. По крайней мере, нам эту информацию в литературе найти не удалось. Тем не менее энергия триплетного состояния ( $E_T$ ) может быть оценена, исходя из линейной зависимости между  $E_T^{-1}$  и числом СДС, приведенной в работе Bensasson et al. [14]. С помощью этой зависимости мы получили, что для фитофлуина энергия  $E_T = 1,45$  эв, т.е. выше, чем энергия  $^1\Delta_g$  состояния кислорода (1 эв). Таким образом, образование  $^1\text{O}_2$  триплетным фитофлуином энергетически разрешено.

Кроме того, известно, что фитофлуин испускает довольно сильную флуоресценцию при 500 нм с квантовым выходом  $0,05 \pm 0,01$  при комнатной температуре [24, 25]. Это необычно для  $C_{40}$  каротиноидов, выход флуоресценции которых обычно составляет менее  $10^{-3}$  [24, 25]. Следовательно, по фотофизическим свойствам фитофлуин напоминает больше хлорофилл *a* и порфирины, чем  $C_{40}$  полиены. Исходя из этого можно предположить, что фитофлуин, как и порфириновые макроциклы, может быть эффективным фотосенсибилизатором фотохимических процессов. По нашему мнению, это наблюдение сильно изменяет представление о биологической роли этого соединения. В частности, не исключено участие фитофлуина в биологических эффектах УФ-А света [26] и в фотостимуляции повреждения фотосинтетического аппарата растений и тканей кожи человека и животных. Кроме того, фитофлуин потенциально пригоден в качестве фотосенсибилизатора УФ-А излучения в косметологии и медицине. Однако, учитывая высокую фотосенсибили-

зирующую активность фитофлуина, вызывает сомнение целесообразность его применения для защиты кожи от ультрафиолетового излучения.

**Финансирование.** Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 18-04-00684-а и 19-04-00331-а) и государственных заданий ФИЦ Биотехнологии РАН и ФИЦ ПНЦБИ РАН.

**Благодарности.** Авторы благодарят ООО «Полироник» (Москва), ООО «Алком Медика» (Санкт-Петербург) за техническую помощь и ООО «Пиминвест» (Москва) за предоставление и очистку растворителей.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Britton, G. (2008) Functions of Intact Carotenoids., in *Carotenoids. Natural Functions* (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfänger, H. eds.) Birkhauser Verlag, Switzerland, pp. 265-308.
2. Edge, R., and Truscott, T. G. (2018) Singlet oxygen and free radical reactions of retinoids and carotenoids – a review, *Antioxidants*, **7**, 5-16.
3. Krasnovsky, A. A., Jr., and Kagan, V. E. (1979) Photosensitization and quenching of singlet oxygen by pigments and lipids of photoreceptor cells of the retina, *FEBS Lett.*, **108**, 152-154.
4. Ostrovskii, M. A., and Fedorovich, I. B. (1994) Retinal as sensitizer of photodamage of retinal-containing proteins in the retina of the eye, *Biophysica*, **39**, 13-25.
5. Krasnovskii, A. A., Jr. (1986) Singlet oxygen in photosynthesizing organisms, *Zhurn. Vsesoyuz. Khim. Obsch. im. D. I. Mendeleeva*, (*Mendeleev Chemical Journal*), **31**, 562-567.
6. Makhneva, Z. K., Erokhin, Yu. E., and Moskalenko, A. A. (2007) Carotenoid-photosensitized oxidation of bacteriochlorophyll dimers in light-harvesting complexes B800-850 in *Allochrochromatium minutissimum* cells, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **416**, 256-259.
7. Makhneva, Z. K., Bolshakov, M. A., Ashikhmin, A. A., Erokhin, Y. E., and Moskalenko, A. A. (2009) Influence of blue light on the structure stability of antenna complexes from *Allochrochromatium minutissimum* with different content of carotenoids, *Biochemistry Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.*, **3**, 123-127.
8. Makhneva, Z. K., Ashikhmin, A. A., Bolshakov, M. A., and Moskalenko, A. A. (2020) Carotenoids are probably involved in singlet oxygen generation in the membranes of purple photosynthetic bacteria under light irradiation, *Microbiology*, **89**, 164-173.
9. Makhneva, Z. K., Ashikhmin, A. A., Bolshakov, M. A., and Moskalenko, A. A. (2019) Bacteriochlorophyll interaction with singlet oxygen in membranes of purple photosynthetic bacteria: does the protective function of carotenoids exist? *Dokl. Biochem. Biophys.*, **486**, 216-219.
10. Makhneva, Z. K., Ashikhmin, A. A., Bolshakov, M. A., and Moskalenko, A. A. (2019) Quenchers protect BChl850 from action of singlet oxygen in the membranes of a sulfur photosynthetic bacterium *Allochrochromatium vinosum* Strain MSU, *Microbiology*, **88**, 79-86.
11. Meléndez-Martínez, A. J., Stinco, C. M., and Mapelli-Brahm, P. (2019) Skin carotenoids in public health and nutraceuticals: the emerging roles and applications of the UV radiation-absorbing colourless carotenoids phytoene and phytofluene, *Nutrients*, **11**, 1093.
12. Meléndez-Martínez, A. J., Mapelli-Brahm, P., and Stinco, C. M. (2018) The colourless carotenoids phytoene and phytofluene: From dietary sources to their usefulness for the functional foods and nutraceuticals industries, *J. Food Compos. Anal.*, **67**, 91-103.
13. Mathis, P., and Kleo, J. (1973) The triplet state of  $\beta$ -carotene and of analog polyenes of different length, *Photochem. Photobiol.*, **18**, 343-346.
14. Bensasson, R., Land, E. J., and Maudinas, B. (1976) Triplet states of carotenoids from photosynthetic bacteria studied by nanosecond ultraviolet pulse irradiation, *Photochem. Photobiol.*, **23**, 189-193.
15. Krasnovsky, A. A., Jr. (1979) Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions, *Photochem. Photobiol.*, **29**, 29-36.
16. Moskalenko, A. A., and Makhneva, Z. K. (2012) Light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria *Allochrochromatium minutissimum* assembled without carotenoids, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **108**, 1-7.
17. Ashikhmin, A., Makhneva, Z., Bolshakov, M., and Moskalenko, A. (2014) Distribution of colored carotenoids between light-harvesting complexes in the process of recovering carotenoid biosynthesis in *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* cells, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **141**, 59-66.

18. Ashikhmin, A., Makhneva, Z., Bolshakov, M., and Moskalenko, A. (2017) Incorporation of spheroidene and spheroidenone into light-harvesting complexes from purple sulfur bacteria, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **170**, 99-107.
19. Krasnovsky, A. A., Jr., Benditkis, A. S., and Kozlov, A. S. (2019) Kinetic measurements of singlet oxygen phosphorescence in the solvents lacking hydrogen atoms using the method of time resolved photon counting, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 153-163.
20. Oliveros, E., Suardi-Murasecco, P., Aminian-Saghafi, T., and Braun, A. M. (1991) 1H-Phenalen-1-one: photophysical properties and singlet oxygen production, *Helv. Chim. Acta*, **74**, 79-90.
21. Schmidt, R., Tanelian, C., Dunsbach, R., and Wolf, C. (1994) Phenalenone, a universal compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) sensitization, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **79**, 11-17.
22. Britton, G. (1995) UV/visible spectroscopy, in *Carotenoids* (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H., eds.) vol. 1B, Birkhäuser Verlag, Basel.
23. Mathews-Roth, M. M., Wilson, T., Fujimori, E., and Krinsky, N. I. (1974) Carotenoid chromophore length and protection against photosensitization, *Photochem. Photobiol.*, **19**, 217-222.
24. Cogdell, R. J., Gillbro, T., Andersson, P. O., Liu, R. S. H., and Asato, A. E. (1994) Carotenoids as accessory light-harvesting pigments, *Pure Appl. Chem.*, **66**, 1041-1046.
25. Andersson, P. O., Takaichi, S., Cogdell, R. J., and Gillbro, T. (2001) Photophysical characterization of natural cis-carotenoids, *Photochem. Photobiol.*, **74**, 549-557.
26. Fraikin, G. Y., and Rubin, L. B. (1979) Some physiological effects of near-ultraviolet light on microorganisms, *Photochem. Photobiol.*, **29**, 185-187.

## PHYTOFLUENE AS A HIGHLY EFFICIENT UVA PHOTOSENSITIZER OF SINGLET OXYGEN GENERATION\*

A. A. Ashikhmin<sup>1</sup>, A. S. Benditkis<sup>2</sup>, A. A. Moskalenko<sup>1</sup>, and A. A. Krasnovsky, Jr.<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Basic Biological Problems, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: AshikhminAA@gmail.com*

<sup>2</sup> *Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; E-mail: phoal@mail.ru*

Received April 29, 2020

Revised May 26, 2020

Accepted June 4, 2020

Phytoene and phytofluene – uncolored C<sub>40</sub> carotenoids with short chain of conjugated double bonds (3 and 5, respectively) – are known to be universal precursors in biosynthesis of colored carotenoids in photosynthesizing organisms. It is commonly recognized that C<sub>40</sub> carotenoids are photoprotectors of cells and tissues. We have shown that phytofluene is an exception to this rule. By measuring photosensitized phosphorescence of singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) we found out that phytofluene was very effective photosensitizer of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> formation in aerated solutions under UVA irradiation (quantum yield of 85 ± 5%), whereas phytoene was almost inactive in this process. It was demonstrated that both carotenoids quench singlet oxygen in the dark. The obtained quenching rate constants [(4 ± 1) × 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> for phytoene and (2 ± 0.5) × 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> for phytofluene] were lower than the rate constant of the diffusion-controlled reactions by 3-4 orders of magnitude. Thus, both carotenoids displayed rather weak protector properties. Moreover, phytofluene due to its high photosensitizing activity might be considered as a promoter of cell photodamage and a promising UVA photosensitizer for medical purposes.

**Keywords:** phytofluene, phytoene, singlet oxygen, photosensitization, UVA

УДК 577.1

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА ХИМОЗИНА АЛТАЙСКОГО МАРАЛА [*Cervus Elaphus Sibiricus* (Severtzov, 1873)], НАРАБОТКА ЕГО РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ И АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛУЧЕННОГО ФЕРМЕНТА\*

© 2020 С.В. Беленькая<sup>1,2\*\*</sup>, А.А. Бондарь<sup>3</sup>, Т.А. Кургина<sup>2,3</sup>, В.В. Ельчанинов<sup>4</sup>, А.Ю. Бакулина<sup>1,2</sup>, Е.А. Рухлова<sup>2</sup>, О.И. Лаврик<sup>3</sup>, А.А. Ильичев<sup>1</sup>, Д.Н. Щербаков<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559 р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия; электронная почта: belenkaya.sveta@gmail.com

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия, 656910 Барнаул, Россия

<sup>5</sup> Алтайский государственный университет, 656049 Барнаул, Россия

Поступила в редакцию 05.05.2020

После доработки 05.05.2020

Принята к публикации 19.05.2020

Впервые идентифицирован ген химозина (СУМ) алтайского марала (далее – марала). С помощью сравнительного анализа нуклеотидной последовательности установлена его экзон/интронная организация и реконструирована последовательность мРНК СУМ, кодирующая препрохимозин марала. На основе нуклеотидной последовательности мРНК СУМ марала разработан экспрессионный вектор, обеспечивающий наработку рекомбинантного фермента. Рекомбинантный прохимозин (рПроХн) марала получен в системе экспрессии *Escherichia coli* (штамм BL21(DE3)). Общая молокосвертывающая активность (МА) рекомбинантного химозина марала (рХн Сег) составила 2330 УЕ/мл, удельная активность равнялась 52 955 УЕ/мг. В диапазоне температур 30–50 °С рХн Сег проявлял 100–81% МА, порог термостабильности составил 50 °С, при 70 °С фермент полностью инактивировался. В качестве образцов сравнения использовали препараты рекомбинантного химозина одногорбого верблюда (рХн Сам) и рекомбинантного химозина коровы (рХн Vos). Константа Михаэлиса ( $K_m$ ), число оборотов фермента ( $k_{cat}$ ) и каталитическая эффективность ( $k_{cat} / K_m$ ) для рХн Сег составили  $1,18 \pm 0,1$  мкМ,  $2,68 \pm 0,08$  с<sup>-1</sup> и  $2,27 \pm 0,10$  мкМ<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup> соответственно.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** рекомбинантный химозин, марал, молокосвертывающая активность, термостабильность, параметры кинетики Михаэлиса–Ментен.

DOI: 10.31857/S0320972520070064

### ВВЕДЕНИЕ

Химозин (ЕС 3.4.23.4) является представителем группы пепсиноподобных аспартатных эндопептидаз [1]. Он синтезируется клетками слизистой оболочки желудка в форме препрохимозина с сигнальным пептидом размером 16 а.о., необходимым для его внутриклеточного транспорта. Фермент секретируется в просвет желудка в виде зимогена – прохимозина. В кислой среде происходит активация зимогена, в ходе которой с N-концевого участка элиминируется пропептид, состоящий из 42 а.о., который блокирует активный центр фермента. В результате прохимозин превращается в активный фермент – химозин (Хн). В отличие от пепсинов большинство изученных химозинов характеризуются узкой специфичностью. Их главным биологическим субстратом является к-казеин (к-КЗ) – белок молока, который находится на поверхности казеиновых мицелл и стабилизирует их. В молекуле к-казеина Хн с высокой скоростью гидролизует определенную пептидную

Принятые сокращения: СУМ – ген химозина; к-КЗ – к-казеин; МФ – молокосвертывающий фермент; МФП – молокосвертывающий ферментный препарат; рПроХн – рекомбинантный прохимозин, рХн Сам – рекомбинантный химозина одногорбого верблюда, рХн Vos – рекомбинантный химозина коровы, ТС – термостабильность, Хн, рХн – химозин и рекомбинантный химозин.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), в рубрике «Papers in Press», BM20-113, 24.06.2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

зина с сигнальным пептидом размером 16 а.о., необходимым для его внутриклеточного транспорта. Фермент секретируется в просвет желудка в виде зимогена – прохимозина. В кислой среде происходит активация зимогена, в ходе которой с N-концевого участка элиминируется пропептид, состоящий из 42 а.о., который блокирует активный центр фермента. В результате прохимозин превращается в активный фермент – химозин (Хн). В отличие от пепсинов большинство изученных химозинов характеризуются узкой специфичностью. Их главным биологическим субстратом является к-казеин (к-КЗ) – белок молока, который находится на поверхности казеиновых мицелл и стабилизирует их. В молекуле к-казеина Хн с высокой скоростью гидролизует определенную пептидную

связь (у коровы — это F<sub>105</sub>—M<sub>106</sub>), что приводит к дестабилизации и агрегации казеиновых мицелл. В результате происходит свертывание молока.

Способность Хн вызывать агрегацию казеиновых мицелл используется в пищевой промышленности для получения молочного сгустка, что является основой производства сычужных сыров. До недавнего времени по совокупности технологических свойств Хн коровы (*Bos taurus taurus* L) считался единственным эталонным и универсальным молокосвертывающим ферментом (МФ) для сыроделия [2, 3]. Другие природные протеазы, способные коагулировать молоко, применяются ограниченно, в основном из-за избыточной общей протеолитической активности (ПА), а также слишком высокой термостабильности (ТС) [2–6].

В настоящее время все большую долю на рынке коагулянтов молока начинают занимать препараты рекомбинантного химозина (рХн) [7, 8]. Результаты первых экспериментов по получению коровьего рХн в клетках *Escherichia coli* опубликованы в 1980 году [9]. Примерно через 10 лет рХн коровы впервые использовали при промышленной выработке сыра [10]. Фактически, с конца 1990-х и по настоящее время рХн коровы используется как адекватная технологическая альтернатива натуральному сычужному ферменту [1].

В период 1980–2019 гг. были получены и охарактеризованы рХн овцы [11, 12], козы [13, 14] одnogорбого верблюда [15, 16], яка [17, 18], буйвола [19], альпака [20]. При исследовании биохимических и технологических свойств было установлено, что рХн верблюда по удельной молокосвертывающей активности (МА) и специфичности (соотношению МА и неспецифической ПА) превосходит Хн коровы, но имеет более высокую ТС [16, 21, 22]. Примечательно, что первичные структуры к-КЗ верблюда и коровы имеют различия, в том числе, в непосредственном взаимодействующем с химозином районе.

Пространственные структуры Хн коровы и верблюда были определены экспериментально [16]. Химозины, как и другие пепсиноподобные эндопептидазы, состоят из двух доменов, имеющих преимущественно бета-складчатую структуру, в каждом из которых находится по одному каталитическому остатку аспарагиновой кислоты. Субстрат-связывающая щель расположена между доменами.

Помимо решения прикладной задачи — поиска новых МФ — изучение различных видов Хн помогает понять, как специфичность и ТС фермента зависят от его структуры. Хн является привлекательным объектом для исследования,

так как в природе имеется множество вариантов этого фермента, адаптированных к разным субстратам — к-КЗ различных видов млекопитающих.

Целью данной работы была идентификация гена Хн алтайского марала [*Cervus elaphus sibiricus* (Severtzov, 1873)], наработка его рекомбинантного аналога в прокариотической системе экспрессии и анализ некоторых биохимических свойств полученного молокосвертывающего фермента. Достижение этой цели расширяет спектр известных Хн и открывает новые возможности для сравнительного анализа данной группы ферментов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение нуклеотидной последовательности прохимозина алтайского марала.** Общую ДНК выделяли из лимфоцитов крови здорового 3-х годовалого самца алтайского марала (далее — марала). Кровь была получена сотрудниками ветеринарной службы предприятия ФГУП «Новоталицкое» Чарышского района Алтайского края в ходе планового обследования животных. Для забора крови использовались вакутейнеры, содержащие динатриевую соль ЭДТА в качестве ингибитора коагуляции.

Для выделения лимфоцитов кровь наслаивали на среду LCM («Thermo Fisher Scientific», США), центрифугировали 10 мин при 900 г («Eppendorf», Германия) и собирали лимфоцитарное кольцо. Из полученной таким способом суспензии лимфоцитов при помощи TRIzol реагента («Thermo Fisher Scientific», США) выделяли препарат геномной ДНК, согласно рекомендациям производителя. Концентрация суммарной ДНК в полученном препарате составляла 10 мкг/мл.

Предполагаемая длина гена препрохимозина ~11 000 п.н., поэтому были рассчитаны две пары олигонуклеотидных праймеров («Биоссет», Россия) для получения ампликонов этой последовательности (табл. 1). Две пары, CYM\_GL\_9840F + CYM\_GL\_16024R и CYM\_GR\_15342F + CYM\_Gene\_21717R, необходимы для получения левого и правого перекрывающихся фрагментов (примерно по 6000 п.н.). Амплификацию, согласно рекомендациям производителя, проводили с использованием полимеразы Q5 («New England Biolabs», США), имеющей пониженный уровень ошибок амплификации.

В дальнейшем ДНК обоих фрагментов гена была наработана в препаративном количестве, очищена от компонентов ПЦР с помощью сорбции на магнитных частицах AMPure XP

**Таблица 1.** Праймеры, использованные для получения ДНК фрагментов гена препрохимозина марала

| Название        | 5'–3' последовательность праймеров | Назначение        |
|-----------------|------------------------------------|-------------------|
| CYM_GL_9840F    | TGTCCTTTGTTTTCCCTTTARCC            | ПЦР левое плечо   |
| CYM_GL_16024R   | GCTGGTGGTTTTCTGGAACAC              | ПЦР левое плечо   |
| CYM_GR_15342F   | CAACCATCTTGGGAAATCGG               | ПЦР правое плечо  |
| CYM_Gene_21717R | AGCCAGACTTTGCAGAAAGACAA            | ПЦР правое плечо  |
| CYM_sqR_19650F  | CATTTAGCCACTGCTGAGTTGG             | ПЦР 3'-конец гена |
| gCYM_22011R     | CATTCTCTACTCAATCCACCTCAAG          | ПЦР 3'-конец гена |

(«Beckman Coulter», США) и подвергнута прямому секвенированию с обеих сторон с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Thermo Fisher Scientific», США), и проанализирована на автоматическом генном анализаторе ABI3130XL («Applied Biosystems», США). Полученные секвенограммы последовательностей гена Хн марала длиной 850–950 п.н. анализировали, затем выравнивали с известными для других китопарнокопытных структурами генов *CYM* из базы данных GenBank для подтверждения принадлежности к гену химозина и расчета праймеров для следующего шага секвенирования. Таким образом, шаг за шагом в итоге мы получили набор перекрывающихся секвенограмм и собрали контиг перекрывающихся фрагментов гена. Для контроля корректности сборки центральная область гена была дополнительно амплифицирована и секвенирована напрямую. Дополнительно, для уточнения последовательности 3'-конца гена мы аналогичным образом рассчитали и использовали в ПЦР и секвенировании по Сэнгеру праймеры *CYM\_sqR\_19650F* и *gCYM\_22011R* (табл. 1). Структуры праймеров, использованных для пошагового секвенирования, предоставляются по запросу.

**Получение нуклеотидной последовательности цитохрома В алтайского марала.** Для амплификации фрагмента митохондриального генома, перекрывающего ген *MT-CYB*, использовали праймеры (*MTCB\_F* – 5'-CCGCCATAAATAGGNGAAGG-3' и *MTCB\_R* – 5'-WAGAAATT-CAGCTTTGGG-3'). ДНК фрагмента была наработана в препаративном количестве, очищена от компонентов ПЦР с помощью сорбции на магнитных частицах AMPure XP и подвергнута прямому секвенированию с обеих сторон по методу Сэнгера на автоматическом генном анализаторе ABI3130XL. Полученную нами нуклеотидную последовательность гена *MT-CYB C.e. sibiricus* (рег. номер GenBank MT331597) мы сравнили со структурами соответствующих участков митохон-

дриальной ДНК 12 подвидов благородного оленя *Cervis elaphus*, доступных в базе данных GenBank.

**Клонирование фрагментов гена Хн марала в составе вектора pJET.** Клонирование фрагментов гена Хн марала в составе вектора pJET осуществляли с использованием набора Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit («Thermo Fisher Scientific», США), согласно рекомендациям производителя. Для этого ПЦР продукты разделяли в геле агарозы и выделяли при помощи набора QIAquick Gel Extraction Kit («Thermo Fisher Scientific», США). ДНК фрагмент смешивали с вектором и проводили лигазную реакцию в течение 5 мин при температуре 22 °С. Далее продуктами реакции трансформировали клетки *E. coli*, штамм NEB Stable («New England Biolabs», США).

**Получение препарата рекомбинантного прохимозина марала.** После установления интрон-экзонной структуры гена была определена кодирующая последовательность гена прохимозина (ПроХн). Кодонный состав гена оптимизировали под выбранную систему экспрессии при помощи онлайн-сервиса Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/CodonOpt>). Синтезированная нуклеотидная последовательность была встроена в состав экспрессионного вектора pET21a («Novagen», Германия) по уникальным сайтам рестрикции *VamNI* и *HindIII*.

Для получения целевого белка проводили химическую трансформацию штамма BL21(DE3) *E. coli* полученной конструкцией. Индивидуальные колонии *E. coli*, содержащие рекомбинантные плазмиды, культивировали в течение ночи на орбитальном шейкере («Biosan», Латвия) в среде LB («AppliChem», США), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, при 37 °С и 180 об./мин. Инокулят в соотношении 1/100 переносили в колбу Эрленмейера, содержащую среду LB, и растили до поглощения 0,8 (при  $\lambda = 600$  нм). Добавляли индуктор изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ)

(«Anatrace Products», США) до конечной концентрации 1 мМ. Культуру дополнительно культивировали на шейкере в течение 12 ч при 25 °С и 180 об./мин. Для выделения телец включения биомассу осаждали центрифугированием («Beckman Coulter», США) в течение 20 мин при 5000 г и 4 °С. Полученный осадок растворяли в буфере STET («AppliChem», США) (8%-ная сахароза; 50 мМ Tris-HCl; 20 мМ EDTA; 5% (w/v) Triton X-100 рН 8,0) из расчета 20 мл на 1 грамм биомассы и инкубировали в течение ночи при 4 °С. После завершения инкубации клетки разрушали с использованием ультразвукового гомогенизатора Soniprep 150 Plus («MSE», КНР), тельца включения осаждали центрифугированием («Beckman Coulter», США) при 20 000 г в течение 20 мин при 4 °С [23]. Осажденные тельца включения солибилизовали в буфере А (50 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 150 мМ NaCl, рН 10,7), содержащем 8 М мочевины, инкубировали 24 ч при 15 °С и центрифугировали при 20 000 г в течение 20 мин. Для дальнейшей работы использовали супернатант, содержащий рекомбинантный ПроХн (рПроХн) марала. Ренатурацию целевого белка проводили по методу Wei et al. [23]. Супернатант разбавляли 3× буфером А и инкубировали 12 ч при 15 °С. По завершении инкубации разбавленный щелочным буфером супернатант доводили до рН 8,0 с помощью 1,0 М HCl, выдерживали при 15 °С в течение 1 ч и диализировали против буфера В (50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, рН 8,0) в течение ночи при 4 °С [23]. В результате был получен экспериментальный препарат рПроХн марала.

Производство рекомбинантного белка в клетках *E. coli* анализировали при помощи электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (ЭФ-ДСН) по методу Лэммли [24]. Для анализа электрофоретической подвижности белка и определения размера использовали маркер молекулярных масс PageRuler Unstained Protein Ladder («Thermo Scientific», США). Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда [25].

**Активация препаратов рекомбинантного химозина марала.** Активацию рПроХн марала проводили путем ступенчатого изменения рН [26]. В образец рПроХн при постоянном перемешивании вносили 2,0 М HCl до рН 3,0, после чего останавливали перемешивание и инкубировали смесь при рН 3,0 в течение 2 ч. По истечении времени инкубации доводили рН образца до 5,8 используя 0,5М NaOH.

**Определение молокосвертывающей активности.** В качестве субстрата использовали 10%-ный раствор стандартизованного сухого обезжиренного молока (ОАО «МЗСФ», Россия) в 5 мМ

$\text{CaCl}_2$ , рН 6,5. Стандартом служил 1%-ный водный раствор сухого контрольного образца сычужного фермента (ОАО «МЗСФ», Россия), аттестованного по МА. Перед определением МА контрольный образец и жидкие препараты рХн выдерживали на водяной бане при температуре 35 °С в течение 15 мин и охлаждали до комнатной температуры.

Процедуру определения МА проводили на водяной бане при температуре 35 °С. В стеклянную пробирку помещали 2,5 мл субстрата и прогревали при 35 °С в течение 5 мин. В субстрат вносили 0,25 мл исследуемого фермента, включали секундомер, полученную реакционную смесь сразу же тщательно перемешивали. Временем свертывания считали появление первых хлопьев коагуляции субстрата, образование которых контролировали путем периодического нанесения капли реакционной смеси на стенку пробирки. Молокосвертывающую активность выражали в условных единицах на 1 мл (УЕ/мл) и рассчитывали по формуле (1):

$$\text{МА (УЕ/мл)} = 0,01 \times A \times T_1/T_2, \quad (1)$$

где А – аттестованная молокосвертывающая активность контрольного образца сычужного фермента, в условных единицах на 1 грамм;  $T_1$  – время свертывания с контрольного образца сычужного фермента;  $T_2$  – время свертывания с исследуемым образцом.

Определение общей МА в каждом образце проводили в трех повторениях ( $n = 3$ ). Удельную МА препарата рХн марала рассчитывали после определения общей МА и концентрации белка. В качестве препаратов сравнения использовали коммерческие препараты рХн коровы (гранулированная сухая форма, заявленная производителем МА – 2235 IMCU/r) и рХн верблюда (жидкая форма, заявленная МА – 1000 IMCU/мл) («Chr. Hansen», Дания). Для перевода значений IMCU (International Milk Clotting Units) в УЕ использовали повышающий коэффициент 130. Для оценки удельной МА эталонных коммерческих препаратов готовили 1,0%-ный водный раствор рХн коровы, а жидкий препарат рХн верблюда разводили в 10 раз дистиллированной водой. В полученных растворах определяли концентрацию белка по Бредфорду. Для расчета удельной МА коммерческих эталонных ферментов использовали значения МА, заявленные производителем. Удельную МА выражали в УЕ/мг.

**Сравнение структур химозинов марала, коровы и верблюда.** Для сравнения первичных структур белковые последовательности выравнивали с помощью программы BioEdit [27].

Для сравнения третичных структур использовали структуру Хн коровы из базы PDB (идентификатор 4AA8) и построенную нами модель Хн марала. Построение производили методом моделирования по гомологии на сервере Swiss-Model [28], в качестве шаблона для моделирования использовали структуру Хн коровы, все параметры моделирования были оставлены по умолчанию. Визуальный анализ структур проводился в программе Chimera [29].

**Определение параметров кинетики Михаэлиса–Ментен рекомбинантных химозин методом флуоресцентной спектрофотометрии.** В качестве субстрата использовали синтетический пептид следующего состава: Dabcyl-NRHPHLSF-MAIPK(5-FAM)KK-NH<sub>2</sub> (Dabcyl = 4-(dimethylaminoazo) benzene-4-carboxylic acid, 5-FAM = 5-carboxyfluorescein) («CPC Scientific», США), соответствующий Хн-чувствительному участку к-казеина коровы. В районе С-концевого участка субстрата находится флуорофор – 5-FAM, на N-конце – тушитель Dabcyl, причем тушитель и флуорофор сближены таким образом, что за счет резонансного диполь-дипольного переноса энергии (FRET) от 5-FAM к Dabcyl флуоресценция 5-карбоксифлуоресцеина минимальна. Гидролиз субстрата химозином приводит к разгоранию флуоресценции из-за удаления флуорофора от тушителя. Скорость увеличения флуоресценции отражает скорость ферментативной реакции. Все измерения проводили на планшетном флуориметре CLARIOstar («BMG LABTECH», Германия). Длины волн возбуждения – 495 нм, эмиссии – 520 нм.

Реакционные смеси готовили во льду в 384-луночном планшете, после чего инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Все измерения проводили при 25 °С. Каждая лунка содержала одну реакционную смесь. Калибровку прибора проводили по раствору пептида с концентрацией 20 мкМ, подвергнутого полному гидролизу. Значение флуоресценции данной смеси принимали за 80%. Измерение проводили в режиме кинетического сканирования. Длительность цикла и количество циклов определяли индивидуально в зависимости от количества сканируемых лунок. Все опыты повторяли трижды ( $n = 3$ ). В качестве образцов сравнения использовали препараты коммерческих рекомбинантных Хн коровы и верблюда («Chr. Hansen», Дания).

Реакционные смеси объемом 5 мкл содержали 50 мМ ацетатный буфер (рН 5,6) и пептид различной концентрации (0–20 мкМ). Реакцию запускали добавлением 5 мкл раствора Хн с помощью встроенного во флуориметр насоса. Конечная концентрация Хн составляла 5 нМ.

Для расчета констант использовали сопутствующее программное обеспечение MARS Data Analysis («BMG LABTECH», Германия). Константу Михаэлиса ( $K_m$ ) определяли по уравнению Михаэлиса–Ментен [30], константа скорости реакции гидролиза или число оборотов фермента ( $k_{cat}$ ) рассчитывалась по формуле (2):

$$k_{cat} = V_{max}/[E], \quad (2)$$

где  $k_{cat}$  – константа скорости реакции гидролиза;  $V_{max}$  – максимальная скорость реакции, полученная из уравнения Михаэлиса–Ментен;  $[E]$  – концентрация исследуемого рекомбинантного химозина.

Каталитическую эффективность (константу специфичности) определяли, как соотношение  $k_{cat}/K_m$ .

**Определение термостабильности.** Растворы молокосвертывающих ферментов прогревали на водяной бане в диапазоне температур 30–70 °С в течение 30 мин и определяли в них остаточную МА. За 100% принимали значения МА, полученные в образцах, прогретых при 30 °С. Термостабильность рХн марала сравнивали с сухим коммерческим препаратом рекомбинантного химозина коровы (рХн Vos) и с жидким коммерческим препаратом рХн одногорбого верблюда (рХн Cam), которые производятся в эукариотической системе экспрессии *Aspergillus niger var. Awamori* [1, 16]. Перед проведением теста готовили 0,5%-ный водный раствор рХн коровы; рХн верблюда разводили дистиллированной водой в 100 раз. Молокосвертывающую активность растворов рХн коровы и рХн одногорбого верблюда нормировали по активности рХн марала (рХн Cer). Порогом ТС считали температуру, при которой исследуемый МФ сохранял не менее 80% от максимальной МА.

Статистическую обработку полученных данных проводили в вычислительной среде табличного процессора Excell 2008 («Microsoft Corporation», США). Для количественных переменных результаты представлены в виде среднего арифметического с указанием среднеквадратического отклонения ( $M \pm SD$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Получение нуклеотидной последовательности гена СУМ марала.** Для того, чтобы выбрать ПЦР праймеры, ориентированные на амплификацию гена препрохимозина (СУМ), с помощью ресурса BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)) был проведен поиск геномных последовательностей ДНК, гомологичных мРНК химозина коровы. В ре-

зультате мы выявили последовательности генов *СУМ* яка (NW\_005393277), коровы (JH880704.1), одногорбого верблюда (LOC105085668), овцы (NC\_019458.2) и обезьяны (NC\_013902). Мы провели выравнивание и определение наиболее консервативных участков в области, которая полностью перекрывает экзоны гена *СУМ*. В таких консервативных районах были выбраны несколько сочетающихся пар праймеров, в том числе с выродженными позициями в структуре, для амплификации *СУМ* на геномной ДНК марала. Условия амплификации подбирали с помощью температурного градиента на стадии отжига (рис. 1) и варьирования концентрации свободного магния в реакционной смеси.

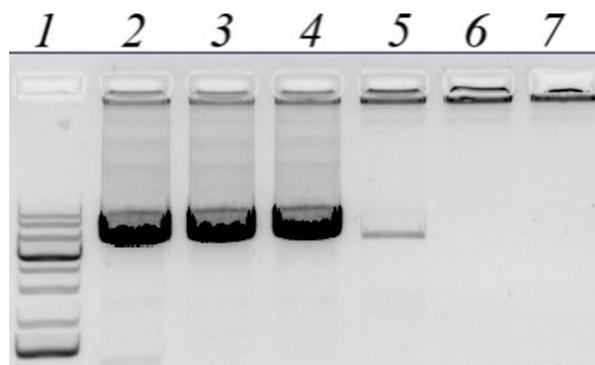
В процессе подбора условий ПЦР был выбран оптимальный алгоритм, включающий амплификацию двух перекрывающихся протяженных участка гена химозина марала. ДНК двух таких фрагментов гена, после препаративной наработки и очистки, использовали для прямого секвенирования с обеих сторон по методу Сэнгера. Множество перекрывающихся секвеннограмм были собраны в контиг, включающий оба фрагмента гена. Для контроля правильности сборки была амплифицирована и секвенирована напрямую центральная область гена.

В последовательности левой половины гена *СУМ* марала при прямом секвенировании продуктов амплификации были выявлены две области точечных делеций в белок-некодирующей области и пара синонимичных однонуклетидных полиморфизмов в белок-кодирующей области. Для того, чтобы точно определить сцепление, мы произвели разделение аллелей гена с помощью клонирования полученного ПЦР фрагмента гена *СУМ* в составе вектора pJET и секвенировали ряд соответствующих ДНК клонов.

В итоге мы впервые идентифицировали два аллельных варианта гена химозина (*СУМ*) марала размером 11 161 п.н. Полученная нуклеотидная последовательность была депонирована в GenBank под номером MT225406. Нуклеотидная последовательность гена с указанием экзон-интронной структуры представлена на рис. S1 в Приложении.

Используя сравнение с последовательностями известных мРНК, кодирующими Хн у млекопитающих, мы локализовали границы экзонов/интронов исследуемого гена *СУМ* и вывели структуру мРНК *СУМ* марала.

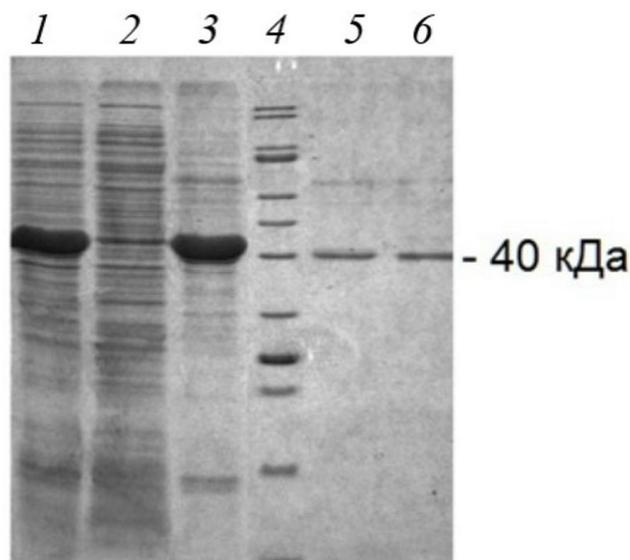
**Подтверждение видоспецифичности.** В качестве дополнительного контроля принадлежности выделенной нами геномной ДНК к подвиду *Cervis elaphus sibiricus* (Severtzov, 1873) мы амплифицировали и секвенировали фрагмент митохон-



**Рис. 1.** Электрофореграмма продуктов ПЦР амплификации фрагмента гена *СУМ* марала с парой праймеров *СУМ*\_GL\_9840F и *СУМ*\_GL\_16024R: 1 – маркеры молекулярных масс, 2–7 – температуры на стадии отжига 54, 57, 60, 63, 66 и 69 °С соответственно

дриального генома, как описано ранее [31]. Необходимо отметить, что в базе данных GenBank присутствуют несколько структур *MT-CYB* подвида *Cervis elaphus maral*, в названии которых латинское «maral» упоминается как общее название благородного оленя, обитающего на территории Ирана и Турции, что перекликается с алтайским маралом, но не означает генетической с ним идентичности. Полученную нами нуклеотидную последовательность гена *MT-CYB C.e. sibiricus* (рег. номер GenBank MT331597) мы сравнили со структурами соответствующего участка митохондриальной ДНК для 12 подвидов благородного оленя *Cervis elaphus* доступных в базе данных GenBank. Результаты выравнивания в виде филогенетического древа представлены на рис. S2 в Приложении. Как и предполагалось, секвенированная структура гена *MT-CYB C.e. sibiricus* соответствует алтайскому маралу и почти идентична структуре, известной для подвида *C.e. canadensis*, который является синонимом *C.e. sibiricus*, согласно систематике Павлинова [32], и образует с ним отдельную кладу на филогенетическом древе цитохрома В *Cervis elaphus*.

**Получение препарата рПроХн марала.** Для получения рекомбинантного аналога Хн марала мы использовали систему на основе штамма BL21(DE3) *E. coli* и плазмидного экспрессионного вектора серии pET. Эта система является одной из наиболее эффективных для достижения высокой продукции гетерологичных белков в прокариотах. Выход целевого белка может достигать 40% от общего белка клеток. Использование вектора pET21 в сочетании со штаммом BL21(DE3) *E. coli* позволило добиться подобного уровня при экспрессии генов химозина коровы [33] и альпака [21]. Нуклеотидная последова-



**Рис. 2.** Результаты ЭФ-ДСН белковых препаратов, полученных из клеток штамма-продуцента: 1 – биомасса клеток *E. coli*, содержащих плазмиду рЕТ21-СУМ-Сег, через 24 ч после добавления индуктора, 2 – растворимая фракция биомассы клеток *E. coli* после обработки буфером STET и центрифугирования, 3 – нерастворимая фракция биомассы клеток *E. coli* после обработки лизирующим буфером и центрифугирования (тельца включения), 4 – маркеры молекулярных масс, 5 – рХн марала, 6 – рХн верблюда

тельность, соответствующая ПроХн марала, с кодонным составом, оптимизированным для экспрессии в системе *E. coli*, была встроена в экспрессионный вектор рЕТ21а таким образом, чтобы *N*-концевая часть содержала последовательность экспрессионного тага Т7.

После трансформации плазмидой рЕТ21-СУМ-Сег компетентных клеток был получен рекомбинантный штамм-продуцент. Для наработки целевого белка использовали стандартный протокол, включающий добавление индуктора ИПТГ. С целью оценки эффективности синтеза рПроХн марала, а также определения его локализации, был проведен электрофоретический анализ различных белковых препаратов, полученных из клеток рекомбинантного штамма-продуцента (рис. 2).

Анализ клеток *E. coli*, содержащих плазмиду рЕТ21-СУМ-Сег, после добавления индуктора показал высокое содержание белка, по электрофоретической подвижности совпадающего с расчетной для рПроХн марала (41 кДа). Его содержание составило  $\geq 30\%$  (рис. 2, дорожка 1) от общего количества белков клетки. Видно, что растворимая фракция биомассы *E. coli* после обработки буфером STET и центрифугирования (рис. 2, дорожка 2) почти не содержит целевого белка, в то время как фракция телец включения практически полностью представлена рПроХн марала (рис. 2, дорожка 3). Таким образом, условия экспрессии гена химозина марала в системе *E. coli* приводят к высокоэффективному синтезу целевого белка, при этом почти весь он накапливается в нерастворимой форме в тельцах включения. Поэтому обязательной процедурой был рефолдинг белка при помощи ступенчатого диализа.

До проведения диализа активированные препараты рПроХн марала не проявляли коагуляционной активности. После процедуры диализа активированные препараты рПроХн марала демонстрировали высокую удельную МА (см. ниже), которая свидетельствовала о том, что зимоген успешно восстанавливает корректную третичную структуру.

#### Активация рПроХн и получение рХн марала.

Во избежание аутокаталитической активации [34] препараты рПроХн марала после выделения и очистки хранили в слабощелочном буфере (50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 8,0). Для активации рПроХн была выбрана процедура титрования до pH 3,0 [26]. Исходная МА препарата рПроХн составляла  $< 1,0$  УЕ/мл, после активации МА была равна 2329,8 УЕ/мл. Таким образом, в результате активации общая МА препарата увеличилась более чем в 2300 раз, что свидетельствует об эффективности превращения рПроХн в активный рХн марала. Выход рХн марала составил  $\sim 44$  мг/л, что сопоставимо с выходом рХн верблюда (37 мг/л) при его получении в системе *Pichia pastoris* [35].

Сравнение МА препарата рХн марала и коммерческих рекомбинантных коагулянтов молока представлено в табл. 2.

**Таблица 2.** Общие и удельные молокосвертывающие активности рекомбинантных химозинов марала, коровы и верблюда

| Препарат рХн      | Общая МА (УЕ/мл) | Концентрация белка (мг/мл) | Удельная МА (УЕ/мг) |
|-------------------|------------------|----------------------------|---------------------|
| Корова (1,0% р-р) | 2750*            | 0,033 ± 0,005              | 83 333 ± 12 925     |
| Верблюд           | 130 000*         | 0,928 ± 0,029              | 140 086 ± 4382      |
| Марал             | 2330 ± 10        | 0,044 ± 0,002              | 52 955 ± 2184       |

\* Значения МА, заявленные производителем.

Удельная МА рХн марала оказалась ниже, чем удельная активность рХн коровы и верблюда примерно в 1,6 и 2,6 раза соответственно. Вероятно, это объясняется тем, что рХн Сам и рХн Vos производится в системе экспрессии *Aspergillus niger var. Awamori* (штамм dgr246purG) [15], которая обеспечивает более эффективный рефолдинг и качественно иной уровень посттрансляционной модификации ферментов эукариот.

Общая МА используемых в сыроделии жидких коммерческих препаратов: натурального сычужного фермента «Naturen® Premium 225» («Chr. Hansen», Дания), «Clerici 96/04» («Caglificio Clerici», Италия) и генно-инженерных химозин коровы и верблюда «Chy-Max® Extra», «Chy-Max® M 1000» («Chr. Hansen», Дания) составляет 225–1000 ИМСУ/мл, что соответствует  $\approx (30–130) \times 10^3$  УЕ/мл. Для производства жидких молокосвертывающих ферментных препаратов (МФП) с активностью больше  $30 \times 10^3$  УЕ/мл применяется концентрирование исходных разбавленных растворов ферментов методом ультрафильтрации (УФ). В некоторых технологиях рПроХн секретируется продуцентом в культуральную жидкость [19, 34, 36, 37], и если ее компоненты коагуляционно неактивны, не содержат токсинов продуцента, то выделение и очистка рХн не требуется. Активация профермента и превращение его в активный рХн производится непосредственно в культуральной жидкости, которую впоследствии осветляют и концентрируют методом УФ до необходимой МА. Значения МА рХн-содержащих культуральных жидкостей могут колебаться в диапазоне  $\approx (400–12\ 480)$  УЕ/мл [36, 37], и для достижения активности, сравнимой с МА коммерческих МФП, их необходимо сконцентрировать в 10–75 раз. Чтобы увеличить МА полученного нами препарата рХн марала до  $\approx (30–130) \times 10^3$  УЕ/мл, его необходимо сконцентрировать в 13–56 раз.

Таким образом, препарат рХн марала обладал коагуляционной активностью, сопоставимой с активностью препаратов, используемых на промежуточных технологических стадиях производства коммерческих МФП.

**Сравнение структур химозин марала, коровы и верблюда.** Мы провели сравнительный анализ аминокислотной последовательности Хн марала с последовательностями Хн коровы и верблюда. Первичные структуры зрелых Хн коровы и марала имеют идентичность 92,6% и выравниваются без вставок или делеций (рис. 3).

Это позволяет предполагать, что третичные структуры этих белков также близки и результаты моделирования по гомологии имеют высокую степень достоверности. Известно, что химозины коровы и верблюда имеют схожие

пространственные структуры, при этом идентичность их первичных последовательностей составляет только 84,8% [38].

Хн коровы содержит 32 отрицательно заряженных а.о. и 19 – положительно заряженных а.о., Хн марала – 36 и 22 соответственно. Суммарные заряды этих химозин практически не отличаются (–13 у коровы и –14 у марала). В то же время у Хн верблюда общий заряд составляет –7, у него 33 отрицательно заряженных а.о. и 26 – положительно заряженных а.о. И у Хн верблюда, и у Хн марала суммарное число заряженных а.о. больше, чем у Хн коровы.

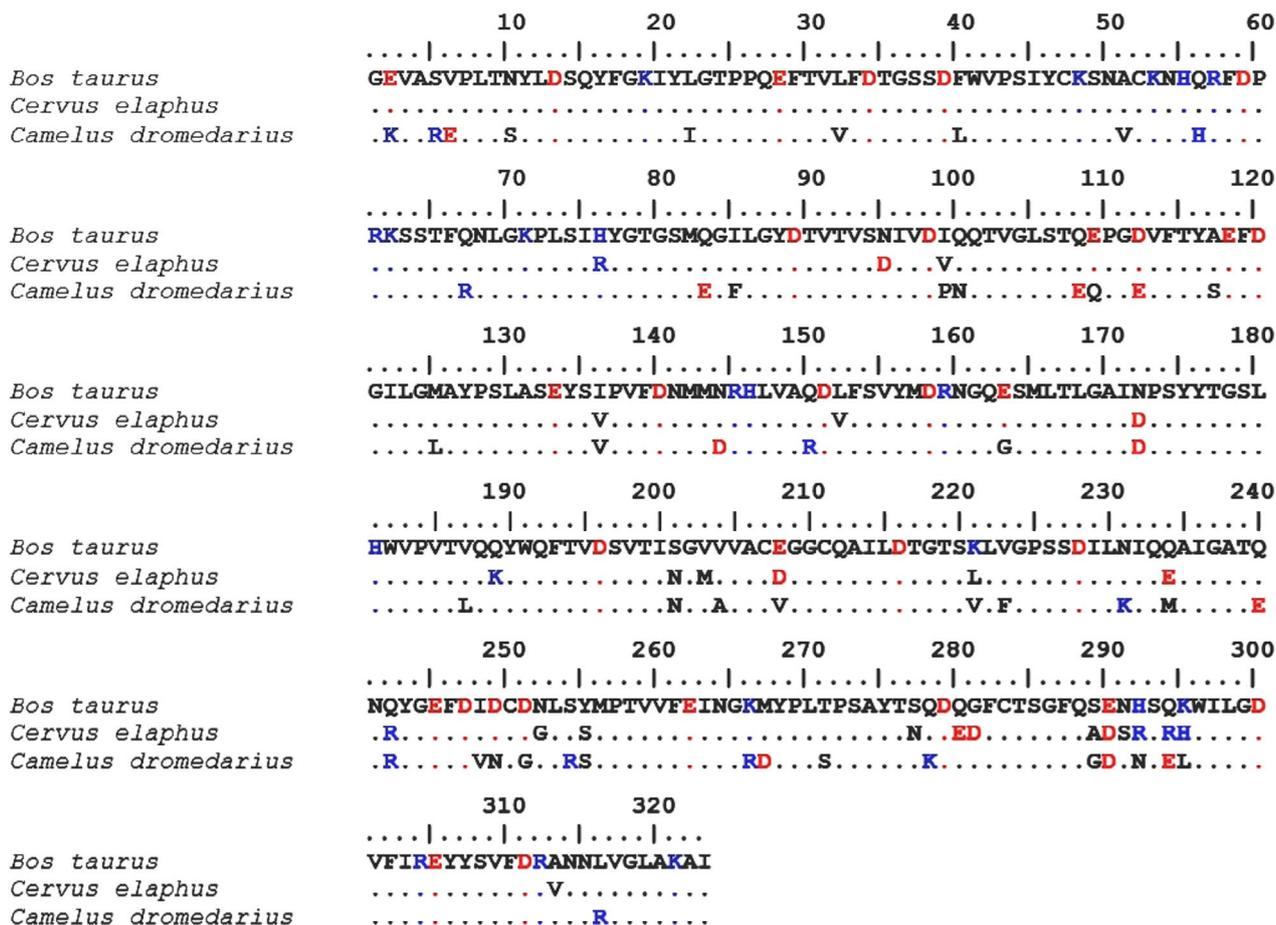
Химозин, как и другие подобные пептидазы, состоит из двух доменов, имеющих преимущественно бета-складчатую структуру, в каждом из которых находится по одному каталитическому остатку аспарагиновой кислоты (рис. 4).

При сравнении структур Хн коровы и марала видно, что большинство замен сконцентрировано в С-концевом домене. В N-концевом домене все замены находятся достаточно далеко от каталитически значимого остатка D13, а в С-концевом домене целых три замены, из них две с изменением заряда (Q280E и G281D), расположены в одной петле с каталитически значимым остатком D279. Можно предположить, что эти замены серьезно влияют на каталитические свойства химозина. Интересно, что у Хн верблюда в этом районе находится единственная замена Q278K, также меняющая заряд, но в другом направлении.

Часть замен расположена в субстрат-связывающей щели Хн марала, это Q189K, K221L, Q242R, а также шесть замен в районе 289–295. Такие замены могут влиять на связывание фермента с к-КЗ и в конечном итоге – на наблюдаемую каталитическую активность. Химозин верблюда также имеет несколько замен в субстрат-связывающей щели по сравнению с Хн коровы [38].

**Параметры кинетики Михаэлиса–Ментен.** Гидролиз химозином синтетического флуорогенного субстрата, имитирующего Хн-чувствительный участок к-КЗ коровы, приводит к нелинейному росту флуоресценции, интенсивность которой зависит от концентрации субстрата и отражает изменение скорости ферментативной реакции. Из данных, представленных в табл. 3, видно, что параметры кинетики Михаэлиса–Ментен для рХн марала и коммерческого жидкого препарата рХн верблюда близки, но заметно отличаются от значений кинетических констант, полученных для рХн коровы.

Рекомбинантный Хн марала продемонстрировал самые низкие значения  $K_m$ , что указывает на наибольшую аффинность к использованному



**Рис. 3.** Выравнивание химозинов коровы, марала и верблюда. Положительно заряженные а.о. выделены синим, отрицательно заряженные – красным. Одинаковые а.о. показаны точками. (С цветными вариантами рис. 3–5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

хромогенному субстрату. По скорости насыщения субстратом рХн марала превосходит коровий рХн в 3,4 раза. Аффинность к субстрату рХн верблюда превышает этот показатель для рХн коровы в 3,1 раза. Аналогичные результаты были получены при сравнении  $K_m$  рХн коровы и одногорбого верблюда, с использованием хромогенного андекапептида, имитирующего Хн-чувствительный участок коровьего к-К3 [16]. В диапазоне рН 5,50–6,65 константы Михаэлиса коммерческого рХн верблюда, рассчитанные с

использованием такого же флуорогенного субстрата, что и в данном исследовании, также были меньше  $K_m$  коммерческого рХн коровы в 2,1–3,1 раза [39].

Анализ Хн-чувствительных участков (96–119) к-К3 одногорбого верблюда и коровы показывает, что они различаются на 9 а.о., включая замену М106I в гидролизуемой пептидной связи (105–106). Идентичность участков 96–119 к-К3 коровы и верблюда составляет 62,5%. Напротив, первичная структура Хн-чувствительных участ-

**Таблица 3.** Параметры кинетики Михаэлиса–Ментен рекомбинантных химозинов

| Параметр  | рХн Cer     | рХн Cam     | рХн Bos     |
|---|-------------|-------------|-------------|
| $K_m$ (мкМ)   | 1,18 ± 0,10 | 1,28 ± 0,14 | 3,97 ± 0,34 |
| $k_{cat}$ (с <sup>-1</sup> )                        | 2,68 ± 0,08 | 3,66 ± 0,09 | 16,9 ± 0,21 |
| $k_{cat}/K_m$ (мкМ <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup> ) | 2,27 ± 0,10 | 2,45 ± 0,16 | 4,26 ± 0,52 |

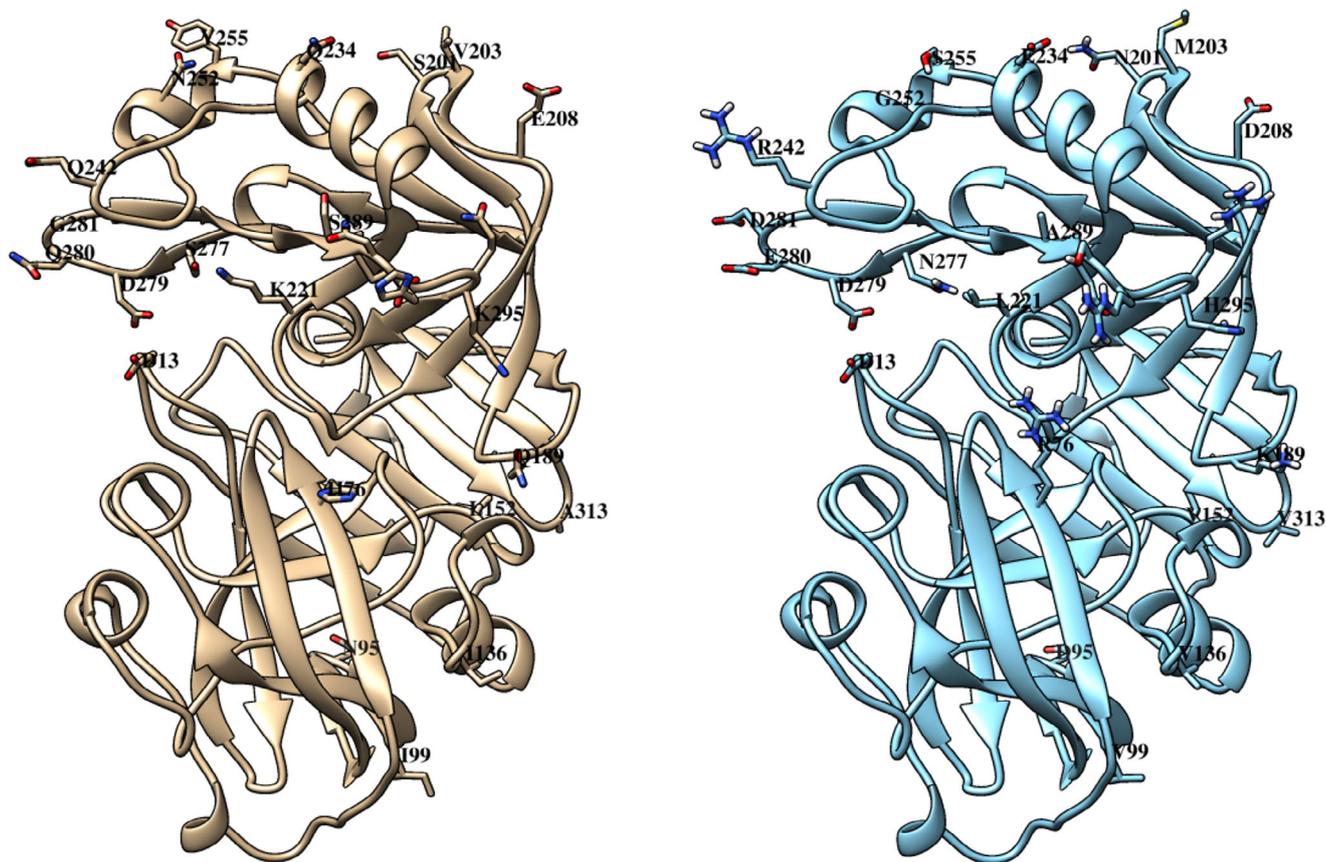


Рис. 4. Пространственные структуры химозинов коровы и марала. Слева – химозин коровы, справа – марала. Подписаны каталитические остатки D13 и D279, а также выделены позиции с заменами и границы района 289–295, в котором сконцентрировано пять замен. N-концевой домен находится снизу, C-концевой – сверху

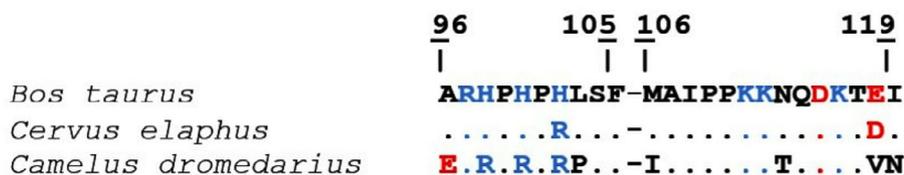


Рис. 5. Выравнивание Хн-чувствительных участков к-КЗ коровы, марала и верблюда. Положительно заряженные а. о. выделены синим, отрицательно заряженные – красным. Одинаковые а.о. показаны точками. Последовательности 105–106 обозначены пробелами

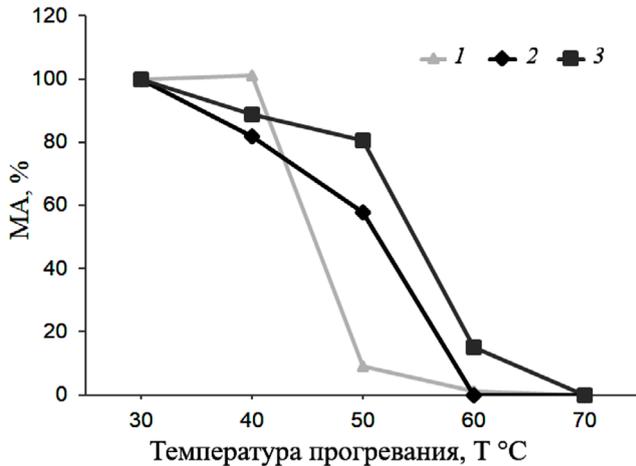
ков к-КЗ марала и коровы различается всего на 2 аминокислоты, а идентичность последовательностей 96–119 этих белков составляет 91,7%. Можно предполагать, что повышенная аффинность рХн Сам и рХн Сег к субстрату, имитирующему к-КЗ коровы, обусловлена различиями в структуре Хн-связывающих участков к-казеинов и субстрат-связывающей щели Хн коровы, верблюда и марала (рис. 5).

Возможно, те же причины, которые усиливают сродство рХн Сег и рХн Сам к использованному флуорогенному субстрату, замедляют осво-

бождение этих ферментов от продуктов реакции, что приводит к наблюдаемому нами уменьшению каталитической константы скорости ( $k_{cat}$  ( $c^{-1}$ )) и каталитической эффективности ( $k_{cat}/K_m$  ( $мкМ^{-1} \cdot c^{-1}$ )).

**Термостабильность.** Результаты исследования ТС рХн коровы, одногорбого верблюда и марала представлены на рис. 6.

При 40 °С МА коммерческих препаратов рХн коровы и одногорбого верблюда составила соответственно 101 и 82%. При 50 °С рХн Vos почти полностью инактивировался (остаточная МА –



**Рис. 6.** Зависимость остаточной молокосвертывающей активности от температуры прогревания фермента (термостабильность). Условные обозначения: 1 – коммерческий рХн коровы, 2 – коммерческий рХн одногорбого верблюда, 3 – рХн марала

9%), тогда как рХн Сам сохранил при этой температуре 58% МА. Полная термоинактивация верблюжьего рХн наблюдалась при 60 °C. Согласно выбранному критерию (см. Материалы и методы), диапазон ТС рХн коровы и верблюда составил 30–40 °C, но при температурах прогревания выше 40 °C верблюжий фермент инактивировался медленнее. Полученные нами результаты согласуются с данными Carreler et al. [16], которые также отмечали более высокую ТС рХн верблюда по сравнению с рХн коровы. Рекombинантный Хн марала оказался термостабилен в более широком диапазоне температур (30–50 °C). После прогревания при 40 и 50 °C фермент сохранял 89 и 81% МА соответственно. При 60 °C рХн марала проявлял всего 15% от исходной коагуляционной способности, а при 70 °C фермент полностью инактивировался. Таким образом, порог термоинактивации рХн марала оказался на 10 °C выше, чем у контрольных препаратов рХн, и составил 50 °C.

Возможно, более высокая ТС рХн марала обусловлена особенностями его аминокислот-

ного состава. Известно, что у белков термофильных микроорганизмов увеличено число заряженных остатков по сравнению с ортологами из мезофильных микроорганизмов [40]. В частности, у фенилаланин-тРНК-синтетазы из термофильного микроорганизма *Thermus thermophilus* имеется повышенное содержание остатков аргинина и аспарагиновой кислоты по сравнению с ортологом из *Escherichia coli* [41]. Химозины марала и верблюда имеют больше заряженных остатков, чем Хн коровы, и это может быть фактором, влияющим на их повышенную ТС.

В результате данного исследования идентифицирован ген Хн алтайского марала [*Cervis elaphus sibiricus* (Severtzov, 1873)] и получен его рекombинантный аналог в прокариотической системе экспрессии. Изучены и проанализированы некоторые структурные особенности и биохимические свойства нового генно-инженерного молокосвертывающего фермента. В планах дальнейших работ нашего научного коллектива – сравнительный анализ свойств рХн, полученного в про- и эукариотической системе экспрессии.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (номер темы FZMW-2020-0002, «Разработка продуцентов рекombинантных ферментов для сыроделия»).

**Благодарности.** Секвенирование ДНК было выполнено в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все применяемые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 7, 2020.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Harboe, M., Broe, M. L., and Qvist, K. B. (2010) The production, action and application of rennet and coagulants, in *Technology of Cheesemaking*, 2, 98-129.
- Белов А. Н., Коваль А. Д., Авданина Е. А., Ельчанинов В. В. (2009) Влияние молокосвертывающего препарата на органолептические показатели сыра, *Сыроделие Маслоделие*, 1, 22-24.
- Jacob, M., Jaros, D., and Rohm, H. (2011) Recent advances in milk clotting enzymes, *Int. J. Dairy Technol.*, 64, 14-33.
- Feijoo-Siota, L., Blasco, L., Luis Rodriguez-Rama, J., Barros-Velázquez, J., de Miguel, T., Sánchez-Pérez, A., and G Villa, T. (2014) Recent patents on microbial proteases for the dairy industry, *Recent Adv. DNA Gene Seq.*, 8, 44-55.
- Kimberlin, R. H. (1996). Bovine spongiform encephalopathy and public health: some problems and solutions in assessing the risk, in *3rd International Symposium on Transmissible Subacute Spongiform Encephalopathies: Prion Diseases, Paris* (Court, L., and Dodet, B., eds.) Amsterdam, Elsevier, pp. 487-502.
- Lebedev, L. R., Kosogova, T. A., Teplyakova, T. V., Kriger, A. V., Elchaninov, V. V., Belov, A. N., and Koval, A. D. (2016). Study of technological properties of milk-clotting

- enzyme from *Irpex lacteus* (*Irpex lacteus* (fr.) fr.), *Foods Raw Mater.*, **4**, 58-65.
7. Ельчанинов В. В. (2006) Молокосвертывающий фермент из сычугов северного оленя, *Сыроделие и маслоделие*, **4**, 42-44.
  8. Ельчанинов В. В. (2006) *Исследование молокосвертывающего фермента из сычугов северных оленей*, Дисс. канд. техн. наук, Кемеров. Технол. Ин-т Пищевой Пром., Кемерово, стр. 121-147.
  9. Uchiyama, H., Uozumi, T., Veppu, T., and Arima, K. (1980) Purification of prorennin mRNA and its translation *in vitro*, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1373-1381.
  10. Flamm, E. L. (1991) How FDA approved chymosin: a case history, *Biotechnology*, **9**, 349.
  11. Pungercar, J., Strukelj, B., Gubensek, F., Turk, V., and Kregar, I. (1990) Complete primary structure of lamb preprochymosin deduced from cDNA, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 4602.
  12. Rogelj, I., Perko, B., Francky, A., Penca, V., and Pungercar, J. (2001). Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production, *J. Dairy Sci.*, **84**, 1020-1026.
  13. Vega-Hernández, M. C., Gómez-Coello, A., Villar, J., and Claverie-Martín, F. (2004) Molecular cloning and expression in yeast of caprine prochymosin, *J. Biotechnol.*, **114**, 69-79.
  14. Eskandari, M. H., Hosseini, A., and Aminlari, M. (2008) Nucleotide sequence of cDNA encoding for preprochymosin in native goat (*Capra hircus*) from Iran, *Iranian J. Veterinary Res.*, **9**, 262-265.
  15. Kappeler, S., Farah, Z., van den Brink, J. M., Rahbek-Nielsen, H., and Budtz, P. (2016) U.S. Patent No. 9,307,775, Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
  16. Kappeler, S. R., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhani, Z., Hansen, E. B., and Johansen, E. (2006) Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **342**, 647-654.
  17. Ersöz, F., and Inan, M. (2019) Large-scale production of yak (*Bos grunniens*) chymosin A in *Pichia pastoris*, *Protein Expr. Purif.*, **154**, 126-133.
  18. Luo, F., Jiang, W. H., Yang, Y. X., Li, J., and Jiang, M. F. (2016) Cloning and expression of yak active chymosin in *Pichia pastoris*, *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, **29**, 1363.
  19. Vallejo, J. A., Ageitos, J. M., Poza, M., and Villa, T. G. (2008). Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris*, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 10606-10610.
  20. Бельская С. В., Рудометов А. П., Щербаков Д. Н., Балабова Д. В., Кригер А. В., Белов А. Н., Коваль А. Д., Ельчанинов В. В. (2018) Некоторые биохимические свойства рекомбинантного химозина альпака (*Vicugna pacos* L.), *Прикл. Биохим. Микробиол.*, **54**, 585-593.
  21. Vallejo, J. A., Ageitos, J. M., Poza, M., and Villa, T. G. (2012) A comparative analysis of recombinant chymosins, *J. Dairy Sci.*, **95**, 609-613.
  22. Bansal, N., Drake, M. A., Piraino, P., Broe, M. L., Harboe, M., Fox, P. F., and McSweeney, P. L. H. (2009) Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese, *Int. Dairy J.*, **19**, 510-517.
  23. Wei, C., Tang, B., Zhang, Y., and Yang, K. (1999) Oxidative refolding of recombinant prochymosin, *Biochem. J.*, **340**, 345.
  24. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680.
  25. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
  26. Рудометов А. П., Бельская С. В., Щербаков Д. Н., Балабова Д. В., Кригер А. В., Ельчанинов В. В. (2017) Исследование ферментативной стабильности жидких препаратов рекомбинантного химозина коровы (*Bos taurus taurus* L.), *Сыроделие и маслоделие*, **6**, 40-43.
  27. Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, in *Nucleic Acids Symposium Series*, Information Retrieval Ltd., Vol. 41, pp. 95-98.
  28. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., and Lepore, R. (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Res.*, **46**, W296-W303.
  29. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis, *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605-1612.
  30. Johnson, K. A., and Goody, R. S. (2011) The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper, *Biochemistry*, **50**, 8264-8269.
  31. Naidu, A., Fitak, R. R., Munguia-Vega, A., and Culver, M. (2011) Novel primers for complete mitochondrial cytochrome *b* gene sequencing in mammals, *Mol. Ecol. Res.*, **12**, 191-196.
  32. Павлинов И. Я. (2006) *Систематика современных млекопитающих*, Московский гос. Университет, Москва.
  33. Щербаков Д. Н., Рудометов А. П., Ельчанинов В. В., Бельская С. В., Кригер А. В., Ильичев А. А. (2006) *Рекомбинантная плазмида pET21a-ProChym, обеспечивающая синтез химерного белка прохимозина В Bos Taurus, и штамм Escherichia coli BL21(DE3)pLysE pET21a-ProChym – продуцент химерного белка прохимозина В Bos Taurus.*, Патент РФ на изобретение № 2670071, СПК C12N 9/6483 (2006.01); C12N 15/64 (2006.01); C12N 15/70 (2006.01); C12Y 304/23004 (2006.01).
  34. Pedersen, V. B., Christensen, K. A., and Foltmann, B. (1979) Investigations on the activation of bovine prochymosin, *Eur. J. Biochem.*, **94**, 573-580.
  35. Wang, N., Wang, K. Y., Li, G., Guo, W., and Liu, D. (2015) Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris*, *Protein Expr. Purif.*, **111**, 75-81.
  36. Jiang, X. P., Yin, M. L., Chen, P., and Yang, Q. (2012) Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 2087-2093.
  37. Nosedá, D. G., Recúpero, M. N., Blasco, M., Ortiz, G. E., and Galvagno, M. A. (2013) Cloning, expression and optimized production in a bioreactor of bovine chymosin B in *Pichia* (*Komagataella*) *pastoris* under AOX1 promoter, *Protein Expr. Purif.*, **9**, 235-244.
  38. Jensen, J. L., Mølgaard, A., Navarro Poulsen, J. C., Harboe, M. K., Simonsen, J. B., Lorentzen, A. M., and Larsen, S. (2013) Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **69**, 901-913.
  39. Jensen, J. L., Jacobsen, J., Moss, M. L., Rasmussen, F., Qvist, K. B., Larsen, S., and van den Brink, J. M. (2015) The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay, *J. Dairy Sci.*, **98**, 2853-2860.
  40. Zhou, X. X., Wang, Y. B., Pan, Y. J., and Li, W. F. (2008). Differences in amino acids composition and coupling patterns between mesophilic and thermophilic proteins, *Amino Acids*, **34**, 25-33.
  41. Бобкова Е. В., Гедрович А. В., Анкилова В. Н., Лаврик О. И., Баратова Л. А., Шишков А. В. (1990) Сравнительное исследование фенилаланил-тРНК-синтетаз из *Escherichia coli* и *Thermus thermophilus* методом триэтовой топографии, *Биохимия*, **55**, 1570-1577.

**IDENTIFICATION OF THE CHYMOSIN GENE OF ALTAI MARAL  
[*Cervus Elaphus Sibiricus* (Severtzov, 1873)], DEVELOPMENT  
OF ITS RECOMBINANT ANALOG IN THE PROKARYOTIC  
EXPRESSION SYSTEM AND ANALYSIS OF SOME BIOCHEMICAL  
PROPERTIES OF THE CREATED ENZYME**

**S. V. Belenkaya<sup>1,2\*\*</sup>, A. A. Bondar<sup>3</sup>, T. A. Kurgina<sup>2,3</sup>, V. V. Elchaninov<sup>4</sup>, A. Yu. Bakulina<sup>1,2</sup>,  
E. A. Rukhlova<sup>2</sup>, O. I. Lavrik<sup>3</sup>, A. A. Ilyichev<sup>1</sup>, and D. N. Shcherbakov<sup>1,5</sup>**

<sup>1</sup> State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", 630559 Koltsovo,  
Novosibirsk Region, Russia; E-mail: belenkaya.sveta@gmail.com

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,  
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> Federal Altai Scientific Center of Agrobiotechnologies,  
Siberian Research Institute of cheese making, 656910 Barnaul, Russia

<sup>5</sup> Altai State University, 656049 Barnaul, Russia

Received May 5, 2020

Revised May 5, 2020

Accepted May 19, 2020

For the first time, the chymosin gene (*CYM*) of a maral was characterized. Its exon/intron organization was established using comparative analysis of the nucleotide sequence. The *CYM* mRNA sequence encoding a maral pre-prochymosin was reconstructed. Nucleotide sequence of the *CYM* maral mRNA allowed developing an expression vector to ensure production of a recombinant enzyme. Recombinant maral prochymosin was obtained in the expression system of *Escherichia coli* [strain BL21 (DE3)]. Total milk-coagulation activity (MCA) of the recombinant maral chymosin was 2330 AU/ml. The recombinant maral prochymosin relative activity was 52955 AU/mg. The recombinant maral chymosin showed 100-81% MCA in the temperature range 30-50°C, thermal stability (TS) threshold was 50°C, and the enzyme was completely inactivated at 70°C. Preparations of the recombinant chymosin of a single-humped camel and recombinant bovine chymosin were used as reference samples. Michaelis–Menten constant ( $K_m$ ), turnover number ( $k_{cat}$ ), and catalytic efficiency ( $k_{cat}/K_m$ ) of the recombinant maral chymosin, were  $1.18 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ,  $2.68 \pm 0.08 \text{ s}^{-1}$  and  $2.27 \pm 0.10 \mu\text{m M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ , respectively.

**Keywords:** recombinant chymosin, milk-clotting activity, thermal stability, Michaelis–Menten kinetics parameters

УДК 577.214

## РОЛЬ КОНТАКТОВ CRE-РАЙОНА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *Escherichia coli* С НЕМАТРИЧНОЙ ЦЕПЬЮ ДНК В ПРОЦЕССЕ УХОДА С ПРОМОТОРА\*

© 2020 И.В. Петушков\*\*, А.В. Кульбачинский

Институт молекулярной генетики Российской академии наук,  
123182 Москва, Россия; электронная почта: telomer1@rambler.ru

Поступила в редакцию 07.05.2020

После доработки 09.06.2020

Принята к публикации 10.06.2020

РНК-полимераза (РНКП) узнает последовательность промоторной ДНК благодаря множеству взаимодействий, которые обеспечивают специфичность инициации транскрипции. У бактерий, кроме главного фактора инициации –  $\sigma$ -субъединицы, – в узнавании промоторов может принимать участие кор-фермент РНКП. В частности, остаток гуанина в +2 положении (+2G) нематричной цепи ДНК размещается в CRE-кармане (core recognition element), сформированном  $\beta$ -субъединицей РНКП. Целью нашего исследования являлось изучение роли данных контактов в процессе ухода РНКП с промотора. В работе исследованы точечные мутации в  $\beta$ -субъединице РНКП *Escherichia coli*, которые нарушают описанные взаимодействия. Мы установили, что наличие в составе промотора остатка +2G приводит к замедлению скорости ухода с промотора и увеличению доли неактивных комплексов. Аминокислотные замены в CRE-кармане снижают стабильность промоторных комплексов и изменяют картину коротких РНК-продуктов, синтезируемых в процессе инициации, но не оказывают значительного влияния на скорость перехода к элонгации независимо от наличия остатка +2G. Таким образом, контакты CRE-кармана с +2G не вносят существенного вклада в кинетику ухода РНКП с промотора, а наблюдаемые изменения в эффективности abortивного синтеза не связаны напрямую со скоростью перехода к элонгации транскрипции.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** РНК-полимераза, CRE-карман, промотор, уход с промотора.

**DOI:** 10.31857/S0320972520070076

### ВВЕДЕНИЕ

В ходе узнавания промотора РНК-полимераза (РНКП) осуществляет локальное плавление ДНК-дуплекса размером ~13 нуклеотидов в области точки старта транскрипции, в результате чего формируется открытый промоторный комплекс (R<sub>Po</sub>) [1]. Узнавание –35 и –10 элементов промотора и дискриминатора (участок между –10 элементом и стартом транскрипции) происходит при участии  $\sigma$ -субъединицы.  $\beta$ -Субъединица, входящая в состав кор-фермента РНКП, способна формировать контакты с нуклеотидами нематричной цепи ДНК в распла-

вленном участке от –4 до +2 положения, который получил название CRE (элемент, распознаваемый кор-ферментом РНКП, от англ. core recognition element). Наиболее интересными являются взаимодействия остатка гуанина в +2 положении (+2G). Этот остаток выпетливается и размещается в специальном кармане, образованном консервативными аминокислотными остатками  $\beta$ -субъединицы, который называется CRE-карманом (рис. 1, а) [2–4]. Несмотря на то что взаимодействия CRE с кор-ферментом были выявлены в промоторном комплексе, анализ последовательностей многочисленных промоторов не выявил никаких консенсусных элементов в этом районе, что позволяет предположить, что эти взаимодействия не являются обязательными при узнавании промотора и могут иметь значение на более поздних этапах транскрипции [5]. Например, у *Escherichia coli* были выявлены 39 промоторов, у которых взаимодействия CRE-кармана с промотором участвуют в определении точки старта транскрипции [6].

Во время синтеза первых 4–6 нуклеотидов РНК-транскрипта 5'-конец растущей РНК сталкивается с районом 3.2  $\sigma$ -субъединицы, который проникает внутрь РНКП и способствует

Принятые сокращения: РНКП – РНК-полимераза; CRE – элемент, распознаваемый кор-ферментом РНКП (core recognition element); EC – элонгационный комплекс; ITS – начально транскрибируемая последовательность (initially transcribed sequence); R<sub>Po</sub> – открытый промоторный комплекс; R<sub>Pint</sub> – инициаторный комплекс; WT – дикий тип.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-117, 29.06.2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.



зультате формируется напряженный комплекс с неканоническим размером транскрипционного пузыря [14–16]. Накопленное напряжение может привести к частичному или полному смещению комплекса назад (в направлении к точке старта), что приводит к высвобождению abortивного продукта. Когда размер РНК-транскрипта достигает длины 9–15 нуклеотидов, накопленной энергии становится достаточно для разрыва контактов с промотором, что способствует переходу от инициаторного комплекса (RPint) к элонгационному (EC) [10, 16–20]. Значительный вклад в процесс ухода с промотора вносит прямое взаимодействие РНК-транскрипта с районом 3.2  $\sigma$ -субъединицы [9, 21–24].

О кинетике процесса ухода с промотора и о факторах, влияющих на этот процесс, известно немного. Показано, что более сильные контакты с ключевыми элементами промотора приводят к замедлению скорости ухода с промотора [21, 25]. Влияние последовательности в области старта синтеза ITS (начально транскрибируемая последовательность от английского *initially transcribed sequence*) понятно в меньшей степени. Замены в ITS приводят к изменению уровня транскрипции до 10 раз *in vivo* и до 25 раз *in vitro* [26, 27]. От последовательности в области ITS зависит относительное количество как abortивных, так и полноразмерных продуктов, а также размер самих abortивных продуктов [27–30]. Предложено несколько вариантов того, как ITS может влиять на скорость ухода с промотора: за счет изменений в стабильности переднего ДНК–ДНК-дуплекса, стабильности РНК–ДНК-гибрида, доли непродуктивных комплексов во время abortивного синтеза [10, 31]. Подобные непродуктивные комплексы в состоянии паузы и в частично смещенном состоянии удалось выявить методами работы с единичными молекулами [10, 32]. Можно предположить, что наличие специфических контактов нуклеотидов CRE с кор-ферментом РНКП может влиять на кинетику этого процесса. При анализе множества вариантов ITS на разных промоторах было обнаружено, что в случае замены +2G в промоторе *lacUV5* происходит увеличение скорости перехода к элонгации, хотя наличие дополнительных контактов должно было бы приводить к замедлению ухода с промотора. Данный эффект был специфичен для *lacUV5*, но не для двух других исследованных промоторов [31]. Таким образом, влияние остатка +2G на кинетику ухода с промотора остается непонятным. Также ранее не изучалась роль взаимодействий +1 нуклеотида в нематричной цепи с остатком W183 в этом процессе. В связи с этой задачей

данной работы являлось исследование роли контактов остатков в +1 и +2 положении в нематричной цепи с кор-ферментом в процессе ухода с промотора. Для этого мы применили метод молекулярных маяков [33, 34] в сочетании со стандартными тестами по транскрипции *in vitro*.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Клонирование и выделение белков.** Кор-фермент РНКП экспрессировали с использованием плазмиды pIA679, кодирующей все субъединицы РНКП под контролем промотора РНКП бактериофага T7 (с 6 остатками гистидина на N-конце  $\beta$ -субъединицы) [35]. Замены W183A, D446A, E546A в  $\beta$ -субъединице проводили методом сайт-направленного мутагенеза в гене *rpoB* [12]. Кор-фермент РНКП выделяли из штамма *E. coli* BL21(DE3). Экспрессию, разрушение клеток, осаждение полимином Р и сульфатом аммония («Sigma-Aldrich», США), а также хроматографическую очистку фермента на гепариновой, Ni-аффинной и анионообменной колонках проводили по опубликованной методике [35]. Экспрессию и хроматографическую очистку  $\sigma^{70}$ -субъединицы проводили, как описано ранее [7].  $\sigma^{70}$ -Субъединицу, содержащую уникальный остаток цистеина в 211 положении, экспрессировали и очищали по аналогичной методике и вводили флуоресцентную метку тетраметилродамин-5-малемид [34].

**Транскрипция *in vitro*.** Матрицу для транскрипции, содержащую промотор T7A1cons (от –85 до +53 позиции относительно точки старта) или его вариант с заменой +2G, получали методом ПЦР с использованием полимеразы Pfu («Thermo Fisher Scientific», США) и очищали, используя набор GeneJET PCR purification kit («Thermo Fisher Scientific», США), как описано ранее [12, 36]. Кор-фермент и  $\sigma^{70}$ -субъединицу смешивали в транскрипционном буфере TB40 (40 mM Tris-HCl («Sigma-Aldrich», США), pH 7,9; 40 mM NaCl («Roth», Германия); 10 mM MgCl<sub>2</sub> («Sigma-Aldrich», США) до концентрации 50 нМ и 250 нМ соответственно; добавляли матрицу T7A1cons до концентрации 25 нМ и инкубировали 10 мин при 37 °С. Далее к транскрипционным комплексам добавляли нуклеотидные субстраты. Для детекции abortивных и полноразмерных продуктов добавляли смесь затравки ApU до 100 мкМ, АТР и СТР до 25 мкМ, ГТР до 7 мкМ, а также 2,5 мкКи [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ГТР (ИБХ РАН). Для получения 5'-меченых abortивных РНК-транскриптов добавляли смесь ГТР, СТР, УТР («GE Healthcare», США) до конечной кон-

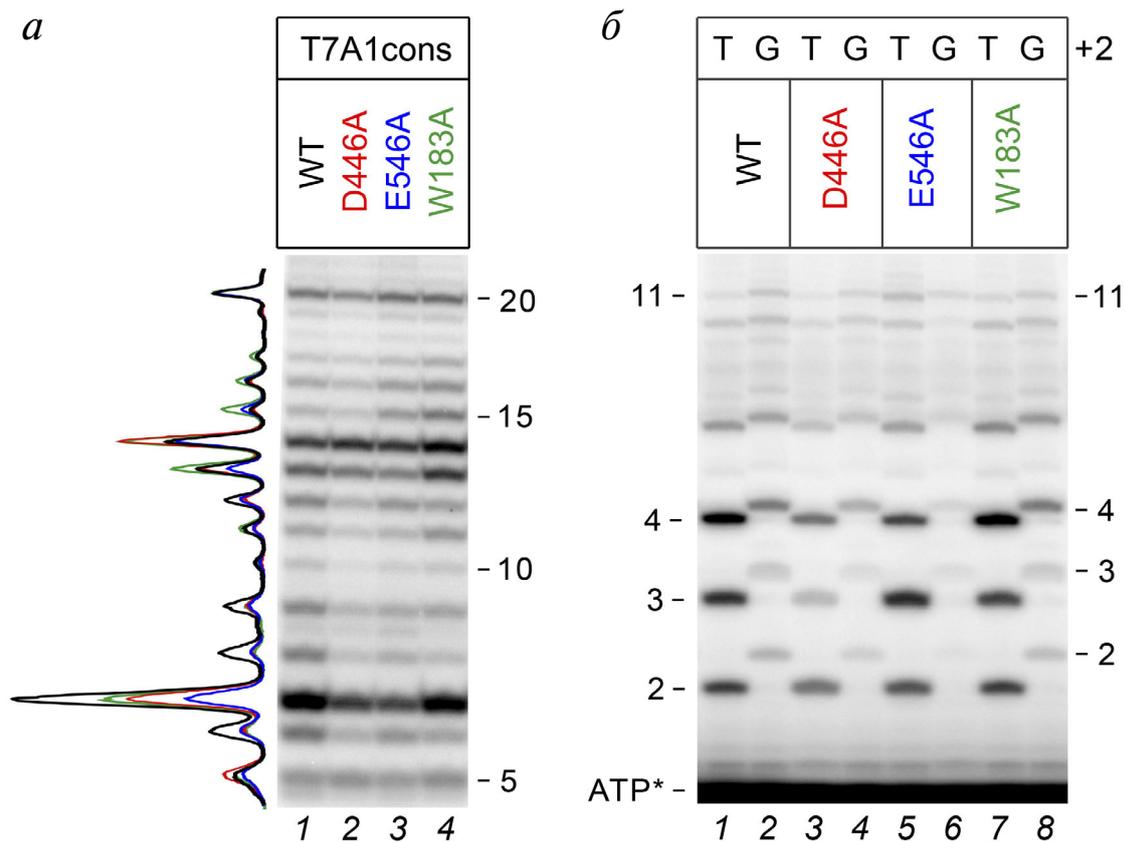
центрации 25 мкМ и 2,5 мкКи  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$  (ИБХ РАН). Транскрипцию останавливали через 10 мин добавлением равного объема стоп-раствора (8 М мочевины, 20 мМ ЭДТА («Sigma-Aldrich» США)). РНК-продукты анализировали в 23%-ном или 30%-ном денатурирующем ПААГ [8], детекцию проводили при помощи фосфоимиджера Typhoon 9500 («GE Healthcare», США).

**Измерение стабильности промоторного комплекса и скорости ухода с промотора методом молекулярных маяков.** Все эксперименты проводили в буфере ТВ40 в присутствии 0,01% (v/v) Tween 20 в кювете объемом 800 мкл при 37 °С. Возбуждение сигнала флуоресценции проводили при длине волны 550 нм (ширина щели монохроматора 10 нм), детекцию – при 580 нм (ширина щели монохроматора 10 нм), используя флуориметр QuantaMaster QM40 («Photon Technology International», США). В реакционную смесь добавляли меченую  $\sigma^{70}$ -субъединицу до концентрации 1 нМ. Далее вносили кор-фермент до конечной концентрации 4 нМ и про-

торную ДНК до 5 нМ и инкубировали смесь 5 мин. Для измерения стабильности промоторного комплекса добавляли гепарин до концентрации 100 мкг/мл, перемешивали смесь микропипеткой ~10–15 с и включали детектор [37]. При измерении скорости ухода после сборки РР<sub>о</sub> в реакционную смесь добавляли 1000-кратный избыток немеченой  $\sigma^{70}$ -субъединицы и добавляли смесь всех NTP до конечной концентрации 100 мкМ. Данные по флуоресценции нормализовали по величине амплитуды сигнала и аппроксимировали уравнением кинетики первого порядка [25, 37].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Влияние точечных мутаций в CRE-районе на транскрипцию с промотора T7A1cons.** В работе было исследовано три мутантных варианта РНКП с заменами D446A, E546A и W183A в  $\beta$ -субъединице, которые, как было показано ра-



**Рис. 2.** Влияние замен в CRE-районе РНКП *E. coli* на синтез РНК в процессе инициации транскрипции. *a* – Электрофореграмма РНК-продуктов транскрипции с промотора T7A1cons, разделенных в 23%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Слева изображен профиль интенсивности сигнала, нормированный по интенсивности полноразмерного продукта размером в 20 нуклеотидов для каждой дорожки. *б* – Электрофореграмма РНК-продуктов, полученных при инициации транскрипции с промоторов T7A1cons и T7A1cons+2G в присутствии  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ , разделенных в 30%-ном ПААГ в денатурирующих условиях

нее, нарушают взаимодействия РНКП с остатками в +2 и +1 положениях промотора [2, 12]. Для изучения влияния CRE-района на стадию инициации мы остановили свой выбор на промоторе T7A1cons, который имеет консенсусный –10 элемент (последовательность ТАТААТ) и –35 элемент, близкий консенсусному (консенсус TTGACA) (рис. 1, б). Этот промотор высокоактивен в реакциях синтеза полноразмерных и abortивных РНК-продуктов *in vitro*, образует стабильные промоторные комплексы и является хорошей моделью для изучения механизмов ухода с промотора [3, 7, 8, 25, 38, 39]. Мы протестировали полученные мутантные полимеразы на данном промоторе, а также его варианте, содержащем остаток гуанина в +2 положении (замена +2Т на +2G, рис. 1, б).

В первом из проведенных тестов в реакцию добавляли нуклеотидные субстраты, достаточные для синтеза РНК длиной 20 нуклеотидов, при этом синтез более длинных продуктов был невозможен из-за отсутствия в смеси уридинового нуклеотида, который должен включаться в 21 положение. Было обнаружено, что в этих условиях все РНКП обладают близкой транскрипционной активностью и способны к переходу к элонгации и синтезу 20-нуклеотидной РНК (рис. 2, а). Все полимеразы также синтезируют большое количество abortивных продуктов длиной до 15 нуклеотидов, но у мутантных РНКП, особенно у фермента с заменой D446, наблюдается снижение относительного количества abortивных продуктов размером 6–14 нуклеотидов.

Для того чтобы более точно оценить влияние мутаций в РНКП и замены +2G в последовательности промотора на эффективность синтеза коротких abortивных продуктов, мы провели реакцию синтеза РНК с использованием [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТР, что позволило ввести радиоактивную метку строго в 5'-конец синтезируемой РНК. Было показано, что замена +2G приводит к заметному снижению количества синтезируемых коротких РНК длиной 2–4 нуклеотида, но слабее влияет на синтез более длинных продуктов (рис. 2, б). Подобное явление наблюдается как в случае РНКП дикого типа (WT, дорожки 1 и 2), так и в случае мутантных РНКП. В то же время в случае мутантных РНКП с заменами D446A и E546A происходит дополнительное снижение количества 2–4 нуклеотидных РНК для обоих вариантов промотора (дорожки 1, 3 и 5 для исходного промотора и 2, 4 и 6 для промотора с заменой +2G).

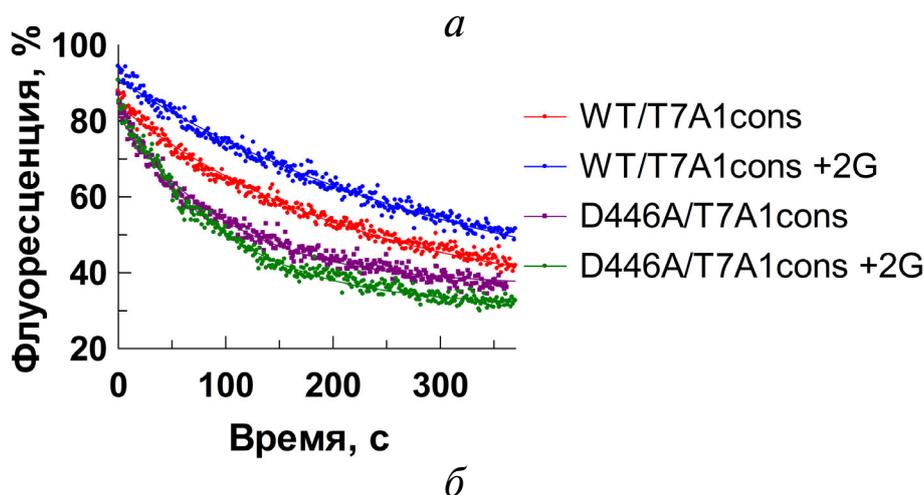
Соотношение эффективности abortивного и продуктивного синтеза РНК является важной характеристикой эффективности перехода от

инициации к элонгации транскрипции. Таким образом, наблюдаемые эффекты позволяют предположить, что замена +2G в промоторе, а также мутации в CRE-районе РНКП могут влиять на скорость ухода с промотора, изменяя контакты РНКП с промоторной ДНК.

**Измерение стабильности промоторного комплекса методом молекулярных маяков.** Использованный нами метод молекулярных маяков основан на изменениях флуоресценции меченой  $\sigma$ -субъединицы при связывании РНКП с промоторной ДНК. Флуорофор ковалентно присоединен к остатку цистеина в положении 211  $\sigma^{70}$ -субъединицы, расположенному рядом с районом 2, взаимодействующим с –10 элементом промотора. При образовании промоторного комплекса происходят конформационные перестройки, в результате которых ароматические остатки района перестают гасить свечение флуорофора и происходит усиление флуоресценции. Это позволяет в режиме реального времени наблюдать за формированием и разрушением промоторного комплекса [33, 34, 40, 41].

Чтобы понять роль остатка +2G в стабилизации промоторного комплекса, мы измерили кинетику диссоциации промоторного комплекса в присутствии конкурента ДНК (гепарина) с использованием промоторов T7A1cons и T7A1cons+2G. В процессе диссоциации комплекса происходит снижение флуоресценции за счет разрыва контактов  $\sigma$ -субъединицы с –10 элементом промотора (рис. 3, а). В соответствии с нашими ожиданиями, замена +2G приводит к достоверному увеличению стабильности промоторного комплекса (время полужизни  $t_{1/2}$  возрастает от 158 до 209 с для РНКП WT; рис. 3, а и б).

Также мы протестировали РНКП с заменами аминокислотных остатков, контактирующих с +2G, которые способны нарушать эти взаимодействия [2, 6, 11, 12]. Было показано, что точечная замена D446A приводит к снижению стабильности промоторного комплекса по сравнению с РНКП WT ( $t_{1/2} = 68$  и 158 с соответственно; рис. 3, б). Кроме того, эта замена делает РНКП неспособной распознавать замену +2G в промоторе ( $t_{1/2}$  не возрастает). Замена E546A приводит к аналогичному, но более слабому эффекту. Замена W183A приводит к значительной дестабилизации промоторного комплекса (рис. 3, б). Таким образом, в соответствии с опубликованными структурными и биохимическими данными контакты остатка +2G в промоторе T7A1cons с CRE-карманом увеличивают стабильность промоторного комплекса, и имеющаяся экспериментальная модель хорошо подходит для изучения роли данных взаимодействий в процессе ухода с промотора.



*б*

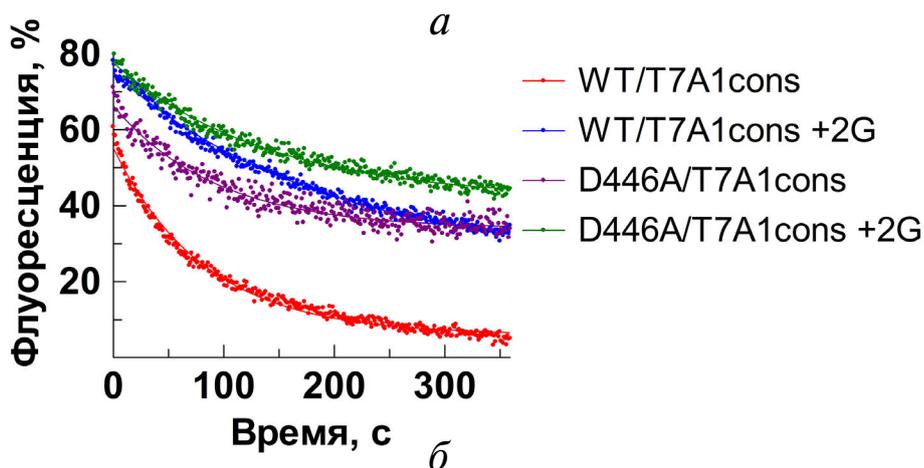
| РНКП  | Стабильность промоторного комплекса<br>$t_{1/2}$ , с |              | Отношение +2G/WT |
|-------|--|--------------|------------------|
|       | T7A1cons WT  | T7A1cons+2G  |                  |
| WT    | 157,9 ± 9,2  | 209,0 ± 19,1 | 1,32             |
| D446A | 67,8 ± 5,1   | 60,3 ± 8,1   | 0,89             |
| E546A | 121,0 ± 10,4   | 131,5 ± 14,0 | 0,92             |
| W183A | 49,1 ± 11,5  | -            | -                |

**Рис. 3.** Влияние остатка +2G на стабильность промоторного комплекса. Измерения проводили методом молекулярных маяков. *а* – Кинетики диссоциации промоторного комплекса в присутствии гепарина для промоторов T7A1cons и T7A1cons+2G для РНКП WT и D446A. *б* – Значения времен полужизни промоторных комплексов ( $t_{1/2}$ ) для РНКП WT и РНКП, содержащих мутации в CRE-районе, на исследуемых промоторах. Измерения с РНКП W183A на промоторе T7A1cons+2G не проводили

**Измерение скорости и эффективности ухода РНКП с промотора методом молекулярных маяков.** С использованием описанной выше модельной системы мы измерили скорость и эффективность ухода РНКП с промоторов T7A1cons и T7A1cons+2G в процессе инициации транскрипции. При проведении экспериментов к сформированным промоторным комплексам добавляли нуклеотидные субстраты, а также избыток немеченой  $\sigma$ -субъединицы (чтобы избежать повторного формирования комплексов меченой РНКП с промотором). Это позволяло наблюдать за разрывом контактов РНКП с промотором при переходе к элонгации транскрипции в реальном времени. Процесс ухода с промотора протекает относительно быстро и описывается уравнением кинетики первого порядка (рис. 4, *а*). В качестве величины, описывающей скорость данного процесса, удобно использовать время, за которое половина активных комплексов переходят к элонгации ( $t_{1/2}$ ). При этом не вся РНКП, которая образовала открытый промоторный комплекс, разрывает

контакты с промотором и уходит в элонгацию. Эта фракция транскрипционного комплекса существует длительное время и выглядит как плато на кривой флуоресценции. Так как разрыв контактов  $\sigma$ -субъединицы с  $-10$  элементом промотора, который фиксируется по снижению флуоресценции, происходит лишь при переходе к элонгации транскрипции, данная фракция может соответствовать как каталитически неактивным комплексам, так и инициаторным комплексам, осуществляющим abortивный синтез РНК, но неспособным покинуть промотор. Для РНКП WT  $t_{1/2}$  составляет  $\sim 60$  с, а доля неактивного промоторного комплекса  $\sim 8\%$  (рис. 4, *а* и *б*). Замена +2G в промоторе приводит к уменьшению скорости ухода с промотора более, чем в 2 раза ( $t_{1/2}$  возрастает до 136 с), а доля неактивных комплексов возрастает в 3 раза (до 24%).

Чтобы понять, связаны ли наблюдаемые эффекты с контактами +2G с CRE-карманом, мы протестировали влияние замен D446A и E546A на процесс перехода к элонгации. Мутация



| РНКП  | Время ухода с промотора $t_{1/2}$ , с |             | Отношение +2G/WT |
|-------|---------------------------------------|-------------|------------------|
|       | T7A1cons WT                           | T7A1cons+2G |                  |
| WT    | 59,9 ± 5,4                            | 136,2 ± 7,2 | 2,3              |
| D446A | 58,5 ± 7,9                            | 101,5 ± 7,3 | 1,7              |
| E546A | 47,5 ± 3,9                            | 120,6 ± 4,5 | 2,5              |
| W183A | 82,5 ± 1,5                            | -           | -                |

| РНКП  | Доля неактивного RPint, % |             | Отношение +2G/WT |
|-------|---------------------------|-------------|------------------|
|       | T7A1cons WT               | T7A1cons+2G |                  |
| WT    | 7,8 ± 4                   | 24,3 ± 1,3  | 3,1              |
| D446A | 37,4 ± 4,9                | 40,4 ± 1,8  | 1,1              |
| E546A | 11 ± 1                    | 21,4 ± 5    | 1,9              |
| W183A | 8,9 ± 1,8                 | -           | -                |

**Рис. 4.** Влияние остатка +2G на процесс ухода РНКП с промотора. *а* – Кинетики ухода с промоторов T7A1cons и T7A1cons+2G, измеренные для РНКП WT и D446A. *б* – Значения времен ухода с промоторов ( $t_{1/2}$ ) для РНКП WT и РНКП, содержащих мутации в CRE-районе. *в* – Значения доли неактивного инициаторного комплекса (RPint)

D446A не влияет на скорость ухода с промотора T7A1cons, но приводит к значительному возрастанию доли неактивных комплексов (~30%). На промоторе T7A1cons+2G в случае РНКП D446A время ухода с промотора увеличивается до 101,5 с, а доля неактивных комплексов доходит до 40%. Замена E546A незначительно увеличивает скорость ухода с промотора T7A1cons, но не влияет на долю неактивных комплексов. В случае замены W183A мы наблюдаем небольшое замедление скорости ухода с промотора.

Таким образом, полученные методом молекулярных маяков результаты указывают на то, что замена +2G сильно снижает скорость перехода к элонгации и увеличивает долю неактивных комплексов. Мутация D446A не влияет на

скорость, но также приводит к формированию большого количества неактивных комплексов.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы впервые исследовали влияние контактов РНКП с CRE-участком промотора на стабильность промоторного комплекса и процесс перехода к элонгации, используя метод молекулярных маяков на двунитевом промоторе. Этот метод позволяет детектировать формирование и разрыв контактов  $\sigma$ -субъединицы с -10 элементом промотора в ходе инициации транскрипции. Мы показали, что присутствие остатка +2G в промоторе повышает ста-

бильность промоторного комплекса, что согласуется с опубликованными данными [2, 12]. При этом точечные мутации D446A и E546A, которые нарушают взаимодействия остатка +2G с CRE-карманом, делают промоторные комплексы нечувствительными к замене +2G в промоторе. Замена W183A приводит к значительному снижению времени жизни комплексов (примерно в 3 раза), что подтверждает имеющиеся данные о роли взаимодействий W183 с нематричной цепью промотора в стабилизации промоторного комплекса [12, 13]. В целом, проведенные эксперименты подтверждают наличие функциональных взаимодействий РНКП с CRE-участком промотора в использованной модельной системе.

Это позволило нам изучить роль CRE-кармана РНКП и взаимодействующего с ним участка ДНК в процессе ухода с промотора. Было показано, что полученные нами точечные мутации в РНКП либо не влияют на скорость ухода с промотора, либо оказывают относительно небольшой эффект (некоторое снижение скорости наблюдается только в случае замены W183A). При этом введение остатка +2G в промотор приводит к значительному замедлению скорости ухода с промотора и увеличению доли неактивных комплексов. Данный эффект мог бы объясняться взаимодействием +2G с CRE-карманом. Однако замена D446A способна лишь частично супрессировать эффект снижения скорости ухода с промотора T7A1cons+2G (ускорение на ~25% относительно РНКП WT), а замена E546A на этот процесс практически не влияет. Таким образом, контакты CRE-кармана с +2G почти не влияют на скорость ухода с промотора. Согласно структурным данным, полученным для RPint *E. coli* и *T. thermophilus* с короткими РНК-продуктами размером 4 и 6 нуклеотидов, в этих комплексах контакты +2G с CRE-карманом не видны [3, 4]. Это указывает на то, что описанные контакты разрываются раньше, чем контакты нематричной цепи ДНК с  $\sigma$ -субъединицей. Вероятно, этот факт может объяснять такой небольшой эффект замены D446A на скорость ухода с промотора.

Анализ abortивных продуктов РНК в опытах по транскрипции *in vitro* показывает, что эффективность abortивного синтеза слабо коррелирует со скоростью ухода РНКП с промотора. Так, количество коротких abortивных транскриптов, синтезируемых на промоторе T7A1cons+2G, значительно меньше, чем в случае исходного промотора. Вероятно, это объясняется тем, что наличие пары rG/dC в РНК-ДНК-гибриде (по сравнению с rU/dA в исходном промоторе) способствует более ста-

бильному удержанию коротких РНК в составе инициаторного комплекса [42]. В то же время скорость перехода к элонгации в случае этого промотора оказывается значительно ниже. Кроме того, на промоторе T7A1cons+2G происходит значительное увеличение доли неактивных комплексов в сравнении с исходным промотором. Это может объясняться замедленной транслокацией РНКП в таких промоторных комплексах, а также формированием неактивных интермедиатов транскрипции без диссоциации коротких РНК-продуктов. Действительно, исследования на единичных молекулах показали, что во время abortивного синтеза возможно формирование пауз транскрипции, а также кратковременный или длительный переход комплекса в смещенное неактивное состояние без диссоциации транскрипта [10, 32]. Наличие таких комплексов оказывает значительное влияние на скорость ухода с промотора [32]. Возможно, замена +2G приводит к увеличению доли таких комплексов, что можно было бы выявить в дальнейших исследованиях на уровне единичных молекул.

Замена D446A слабо влияет на скорость перехода к элонгации, хотя и снижает эффективность abortивного синтеза. Кроме того, замена D446A не компенсирует снижение скорости перехода к элонгации и долю неактивных комплексов на промоторе T7A1cons+2G. Это позволяет полагать, что наблюдаемые в случае этого промотора эффекты не связаны с контактами +2G с CRE-карманом. Более того, замена D446A значительно увеличивает долю неактивных комплексов в случае промотора T7A1cons, не содержащего остатка +2G. Можно предположить, что как специфические (при наличии +2G), так и неспецифические (при его отсутствии) контакты остатка D446 с нематричной цепью ДНК могут подавлять формирование неактивных комплексов в процессе инициации. При мутации данного остатка значительная часть комплексов остается в неактивном состоянии, но при этом активные комплексы уходят с промотора со скоростью, сопоставимой с РНКП дикого типа.

Можно было бы предположить, что нарушение контактов холофермента РНКП с промоторной ДНК должно приводить к ускорению скорости перехода к элонгации (облегчая разрыв контактов с промотором), однако это не так. Замена W183A замедляет уход с промотора, хотя и снижает стабильность промоторного комплекса. Возможно, остаток W183, контактируя с нематричной цепью ДНК, способствует транслокации РНКП во время начальных стадий синтеза РНК. В случае РНКП с заменой

D446A также происходит снижение стабильности промоторного комплекса, но нет влияния на скорость ухода с промотора. Таким образом, мы не наблюдаем однозначных соответствий между скоростью ухода с промотора и стабильностью промоторного комплекса.

Обобщая имеющиеся данные, можно сделать вывод, что наличие остатка +2G в начально транскрибируемой области промотора может влиять не только на стабильность промоторных комплексов, но и на процесс перехода к элонгации, изменяя эффективность abortивного синтеза и скорость ухода РНКП с промотора. При этом интенсивность синтеза коротких РНК в процессе инициации не отражает скорость перехода от инициации к элонгации транскрипции. Мутации в CRE-районе РНКП способны увеличивать долю неактивных инициаторных комплексов (в случае замены D446A) или замедлять процесс перехода к элонгации (W183A),

причем эти эффекты не связаны с узнаванием гуанина в +2 положении промотора, а могут объясняться взаимодействиями этого района со следующими нуклеотидами нематричной цепи ДНК. Выявлению подробных механизмов данных процессов могут помочь дальнейшие исследования инициации транскрипции, прежде всего, на уровне единичных молекул.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-14-01393).

**Благодарности.** Авторы благодарят И. Арцимович за предоставленные плазмиды.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feklistov, A., Sharon, B. D., Darst, S. A., and Gross, C. A. (2014) Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective, *Annu. Rev. Microbiol.*, **68**, 357-376, doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155737.
2. Zhang, Y., Feng, Y., Chatterjee, S., Tuske, S., Ho, M. X., Arnold, E., and Ebright, R. H. (2012) Structural basis of transcription initiation, *Science*, **338**, 1076-1080, doi: 10.1126/science.1227786.
3. Basu, R. S., Warner, B. A., Molodtsov, V., Pupov, D., Esyunina, D., Fernandez-Tornero, C., Kulbachinskiy, A., and Murakami, K. S. (2014) Structural basis of transcription initiation by bacterial RNA polymerase holoenzyme, *J. Biol. Chem.*, **289**, 24549-24559, doi: 10.1074/jbc.M114.584037.
4. Zuo, Y., and Steitz, T. A. (2015) Crystal structures of the *E. coli* transcription initiation complexes with a complete bubble, *Mol. Cell*, **58**, 534-540, doi: 10.1016/j.molcel.2015.03.010.
5. Mitchell, J. E., Zheng, D., Busby, S. J., and Minchin, S. D. (2003) Identification and analysis of "extended -10" promoters in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4689-4695, doi: 10.1093/nar/gkg694.
6. Vvedenskaya, I. O., Vahedian-Movahed, H., Zhang, Y., Taylor, D. M., Ebright, R. H., and Nickels, B. E. (2016) Interactions between RNA polymerase and the core recognition element are a determinant of transcription start site selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E2899-E2905, doi: 10.1073/pnas.1603271113.
7. Kulbachinskiy, A., and Mustaev, A. (2006) Region 3.2 of the sigma subunit contributes to the binding of the 3'-initiating nucleotide in the RNA polymerase active center and facilitates promoter clearance during initiation, *J. Biol. Chem.*, **281**, 18273-18276, doi: 10.1074/jbc.C600060200.
8. Pupov, D., Kuzin, I., Bass, I., and Kulbachinskiy, A. (2014) Distinct functions of the RNA polymerase sigma subunit region 3.2 in RNA priming and promoter escape, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 4494-4504, doi: 10.1093/nar/gkt1384.
9. Duchi, D., Bauer, D. L., Fernandez, L., Evans, G., Robb, N., Hwang, L. C., Gryte, K., Tomescu, A., Zawadzki, P., Morichaud, Z., Brodolin, K., and Kapanidis, A. N. (2016) RNA polymerase pausing during Initial transcription, *Mol. Cell*, **63**, 939-950, doi: 10.1016/j.molcel.2016.08.011.
10. Dulin, D., Bauer, D. L. V., Malinen, A. M., Bakermans, J. J. W., Kaller, M., Morichaud, Z., Petushkov, I., Depken, M., Brodolin, K., Kulbachinskiy, A., and Kapanidis, A. N. (2018) Pausing controls branching between productive and non-productive pathways during initial transcription in bacteria, *Nat. Commun.*, **9**, 1478, doi: 10.1038/s41467-018-03902-9.
11. Vvedenskaya, I. O., Vahedian-Movahed, H., Bird, J. G., Knoblauch, J. G., Goldman, S. R., Zhang, Y., Ebright, R. H., and Nickels, B. E. (2014) Transcription. Interactions between RNA polymerase and the "core recognition element" counteract pausing, *Science*, **344**, 1285-1289, doi: 10.1126/science.1253458.
12. Petushkov, I., Pupov, D., Bass, I., and Kulbachinskiy, A. (2015) Mutations in the CRE pocket of bacterial RNA polymerase affect multiple steps of transcription, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 5798-5809, doi: 10.1093/nar/gkv504.
13. Wiesler, S. C., Weinzierl, R. O., and Buck, M. (2013) An aromatic residue switch in enhancer-dependent bacterial RNA polymerase controls transcription intermediate complex activity, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 5874-5886, doi: 10.1093/nar/gkt271.
14. Mekler, V., Kortkhonjia, E., Mukhopadhyay, J., Knight, J., Revyakin, A., Kapanidis, A. N., Niu, W., Ebright, Y. W., Levy, R., and Ebright, R. H. (2002) Structural organization of bacterial RNA polymerase holoenzyme and the RNA polymerase-promoter open complex, *Cell*, **108**, 599-614.
15. Straney, D. C., and Crothers, D. M. (1987) A stressed intermediate in the formation of stably initiated RNA chains at the *Escherichia coli lac* UV5 promoter, *J. Mol. Biol.*, **193**, 267-278, doi: 10.1016/0022-2836(87)90218-x.

16. Kapanidis, A. N., Margeat, E., Ho, S. O., Kortkhonjia, E., Weiss, S., and Ebricht, R. H. (2006) Initial transcription by RNA polymerase proceeds through a DNA-scrunching mechanism, *Science*, **314**, 1144-1147, doi: 10.1126/science.1131399.
17. Revyakin, A., Liu, C., Ebricht, R. H., and Strick, T. R. (2006) Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching, *Science*, **314**, 1139-1143, doi: 10.1126/science.1131398.
18. Henderson, K. L., Felth, L. C., Molzahn, C. M., Shkel, I., Wang, S., Chhabra, M., Ruff, E. F., Bieter, L., Kraft, J. E., and Record, M. T., Jr. (2017) Mechanism of transcription initiation and promoter escape by *E. coli* RNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E3032-E3040, doi: 10.1073/pnas.1618675114.
19. Winkelman, J. T., and Gourse, R. L. (2017) Open complex DNA scrunching: a key to transcription start site selection and promoter escape, *BioEssays*, **39**, doi: 10.1002/bies.201600193.
20. Carpousis, A. J., and Gralla, J. D. (1985) Interaction of RNA polymerase with *lacUV5* promoter DNA during mRNA initiation and elongation. Footprinting, methylation, and rifampicin-sensitivity changes accompanying transcription initiation, *J. Mol. Biol.*, **183**, 165-177, doi: 10.1016/0022-2836(85)90210-4.
21. Ko, J., and Heyduk, T. (2014) Kinetics of promoter escape by bacterial RNA polymerase: effects of promoter contacts and transcription bubble collapse, *Biochem. J.*, **463**, 135-144, doi: 10.1042/BJ20140179.
22. Samanta, S., and Martin, C. T. (2013) Insights into the mechanism of initial transcription in *Escherichia coli* RNA polymerase, *J. Biol. Chem.*, **288**, 31993-32003, doi: 10.1074/jbc.M113.497669.
23. Murakami, K. S., Masuda, S., and Darst, S. A. (2002) Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution, *Science*, **296**, 1280-1284, doi: 10.1126/science.1069594.
24. Li, L., Molodtsov, V., Lin, W., Ebricht, R. H., and Zhang, Y. (2020) RNA extension drives a stepwise displacement of an initiation-factor structural module in initial transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 5801-5809, doi: 10.1073/pnas.1920747117.
25. Petushkov, I., Esyunina, D., Mekler, V., Severinov, K., Pupov, D., and Kulbachinskiy, A. (2017) Interplay between sigma region 3.2 and secondary channel factors during promoter escape by bacterial RNA polymerase, *Biochem. J.*, **474**, 4053-4064, doi: 10.1042/BCJ20170436.
26. Kammerer, W., Deuschle, U., Gentz, R., and Bujard, H. (1986) Functional dissection of *Escherichia coli* promoters: information in the transcribed region is involved in late steps of the overall process, *EMBO J.*, **5**, 2995-3000.
27. Hsu, L. M., Cobb, I. M., Ozmore, J. R., Khoo, M., Nahm, G., Xia, L., Bao, Y., and Ahn, C. (2006) Initial transcribed sequence mutations specifically affect promoter escape properties, *Biochemistry*, **45**, 8841-8854, doi: 10.1021/bi060247u.
28. Hsu, L. M. (2002) Promoter clearance and escape in prokaryotes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1577**, 191-207, doi: 10.1016/s0167-4781(02)00452-9.
29. Hsu, L. M. (2009) Monitoring abortive initiation, *Methods*, **47**, 25-36, doi: 10.1016/j.ymeth.2008.10.010.
30. Vo, N. V., Hsu, L. M., Kane, C. M., and Chamberlin, M. J. (2003) *In vitro* studies of transcript initiation by *Escherichia coli* RNA polymerase. 3. Influences of individual DNA elements within the promoter recognition region on abortive initiation and promoter escape, *Biochemistry*, **42**, 3798-3811, doi: 10.1021/bi026962v.
31. Heyduk, E., and Heyduk, T. (2018) DNA template sequence control of bacterial RNA polymerase escape from the promoter, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 4469-4486, doi: 10.1093/nar/gky172.
32. Lerner, E., Chung, S., Allen, B. L., Wang, S., Lee, J., Lu, S. W., Grimaud, L. W., Ingargiola, A., Michalet, X., Alhadid, Y., Borukhov, S., Strick, T. R., Taatjes, D. J., and Weiss, S. (2016) Backtracked and paused transcription initiation intermediate of *Escherichia coli* RNA polymerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E6562-E6571, doi: 10.1073/pnas.1605038113.
33. Mekler, V., Pavlova, O., and Severinov, K. (2011) The interaction of *E. coli* RNA polymerase  $\sigma^{70}$  subunit with promoter elements in the context of free  $\sigma^{70}$ , RNA polymerase holoenzyme and the  $\beta'$ - $\sigma^{70}$  complex., *J. Biol. Chem.*, **286**, 270-279, doi: 10.1074/jbc.M110.174102.
34. Mekler, V., and Severinov, K. (2015) Use of RNA polymerase molecular beacon assay to measure RNA polymerase interactions with model promoter fragments, *Methods Mol. Biol.*, **1276**, 199-210, doi: 10.1007/978-1-4939-2392-2\_11.
35. Svetlov, V., and Artsimovitch, I. (2015) Purification of bacterial RNA polymerase: tools and protocols, *Methods Mol. Biol.*, **1276**, 13-29, doi: 10.1007/978-1-4939-2392-2\_2.
36. Petushkov, I., Esyunina, D., and Kulbachinskiy, A. (2017)  $\sigma^{38}$ -dependent promoter-proximal pausing by bacterial RNA polymerase, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 3006-3016, doi: 10.1093/nar/gkw1213.
37. Pupov, D., Petushkov, I., Esyunina, D., Murakami, K. S., and Kulbachinskiy, A. (2018) Region 3.2 of the  $\sigma$  factor controls the stability of rRNA promoter complexes and potentiates their repression by DksA, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 11477-11487, doi: 10.1093/nar/gky919.
38. Pupov, D., Esyunina, D., Feklistov, A., and Kulbachinskiy, A. (2013) Single-strand promoter traps for bacterial RNA polymerase, *Biochem. J.*, **452**, 241-248, doi: 10.1042/BJ20130069.
39. Pupov, D., Miropolskaya, N., Sevostyanova, A., Bass, I., Artsimovitch, I., and Kulbachinskiy, A. (2010) Multiple roles of the RNA polymerase  $\beta'$  SW2 region in transcription initiation, promoter escape, and RNA elongation, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 5784-5796, doi: 10.1093/nar/gkq355.
40. Mekler, V., Minakhin, L., Kuznedelov, K., Mukhamedyarov, D., and Severinov, K. (2012) RNA polymerase-promoter interactions determining different stability of the *Escherichia coli* and *Thermus aquaticus* transcription initiation complexes, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 11352-11362, doi: 10.1093/nar/gks973.
41. Mekler, V., Minakhin, L., and Severinov, K. (2011) A critical role of downstream RNA polymerase-promoter interactions in the formation of initiation complex, *J. Biol. Chem.*, **286**, 22600-22608, doi: 10.1074/jbc.M111.247080.
42. Sugimoto, N., Nakano, S., Katoh, M., Matsumura, A., Nakamuta, H., Ohmichi, T., Yoneyama, M., and Sasaki, M. (1995) Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes, *Biochemistry*, **34**, 11211-11216, doi: 10.1021/bi00035a029.

**ROLE OF THE INTERACTIONS OF THE CRE REGION  
OF *Escherichia coli* RNA POLYMERASE  
WITH NONTEMPLATE DNA DURING PROMOTER ESCAPE\***

**I. V. Petushkov\*\* and A. V. Kulbachinskiy**

*Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, 123182 Moscow, Russia; E-mail: telomer1@rambler.ru*

Received May 7, 2020

Revised June 9, 2020

Accepted June 10, 2020

RNA polymerase (RNAP) recognizes promoter DNA through many interactions that determine specificity of transcription initiation. In addition to the dedicated transcription initiation  $\sigma$  factor in bacteria, the core enzyme of RNAP can also participate in promoter recognition. In particular, guanine residue at the +2 position (+2G) of the nontemplate DNA strand is bound in the CRE pocket formed by the RNAP  $\beta$  subunit. Here, we analyzed the role of these contacts in the process of promoter escape by RNAP by studying point mutations in the  $\beta$  subunit of *Escherichia coli* RNAP that disrupted these interactions. We found that the presence of +2G in the promoter slowed down the rate of promoter escape and increased proportion of inactive complexes. Amino acid substitutions in the CRE pocket decreased the promoter complex stability and changed the pattern of short RNA products synthesized during initiation, but did not significantly affect the rate of transition to elongation, regardless of the presence of +2G. Thus, the contacts of the CRE pocket with +2G do not make a significant contribution to the kinetics of promoter escape by RNAP, while the observed changes in the efficiency of abortive synthesis are not directly related to the rate of promoter escape.

*Keywords:* RNA polymerase, CRE pocket, promoter escape

УДК 577.1

## РЕГУЛЯЦИЯ БЕЛКОМ p53 МЕТАБОЛИЗМА МЛЕКОПИТАЮЩИХ, ЗАВИСИМОГО ОТ ТИАМИНА (ВИТАМИНА B1)\*

© 2020 В.И. Буник<sup>1,2,3\*\*</sup>, В.А. Алешин<sup>1,2</sup>, С. Жоу<sup>4</sup>, Ш. Кришнан<sup>4</sup>, А. Карлссон<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия; электронная почта: bunik@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия

<sup>3</sup> Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119992 Москва, Россия

<sup>4</sup> Отделение Клинической Микробиологии, Отдел Лабораторной Медицины, Каролинский Институт, Больница Каролинского Университета, 14186 Стокгольм, Швеция

Поступила в редакцию 25.05.2020

После доработки 09.06.2020

Принята к публикации 09.06.2020

Транскрипционный фактор p53 — один из главных регуляторов энергетического обмена. В свою очередь, энергетический обмен сильно зависит от тиамина (витамина B1) и/или его природных производных, причем известно, что основное производное, тиаминдифосфат (ТДФ), влияет на связывание p53 с ДНК. Чтобы получить системный взгляд на регуляцию зависимого от тиамина метаболизма белком p53, мы оценили предполагаемые сайты связывания p53 с ДНК вблизи участков инициации транскрипции генов, кодирующих транспортеры и ферменты, связанные с тиамином и/или его производными. Предсказания подтверждены экспериментальным исследованием изменений метаболизма в ответ на активатор p53 — цисплатин. Экспрессия p53 и его известной мишени, p21, была определена в клетках аденокарциномы легкого человека линии A549, обладающих функционирующим p53. Анализ проводили в контрольных клетках и клетках после обработки цисплатином. Также измеряли активности или экспрессию ряда ферментов энергетического метаболизма, зависимого от тиамина. Наряду с повышенной экспрессией p53 и p21 цисплатин влиял на активность метаболических ферментов, для генов которых были предсказаны участки связывания p53. Активность изофермента глутаматдегидрогеназы 2 сильно снижалась, тогда как активность NADP-зависимых изоцитратдегидрогеназ и малик-ферментов, а также 2-оксоглутаратдегидрогеназы с эндогенным уровнем ТДФ повышались. В то же время NAD-зависимая изоцитратдегидрогеназа, митохондриальная аспартатаминотрансфераза и два изофермента малатдегидрогеназы, у которых не было предсказано связывание p53 вблизи участков инициации транскрипции, также увеличивали свою активность после инкубации с цисплатином. Зависимая от p53 регуляция анализируемых метаболических ферментов лучше коррелировала с индукцией мишени p53 — p21, нежели с индукцией самого p53.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** клетки A549, цисплатин, глутатион, p53, p21, сукцинилфосфонат, тиамин-зависимый метаболизм.

DOI: 10.31857/S0320972520070088

### ВВЕДЕНИЕ

Связывание p53 с ДНК может напрямую регулировать транскрипцию нескольких сотен

Принятые сокращения: ГДГ — глутаматдегидрогеназа; GOT2 — митохондриальная аспартатаминотрансфераза; GSH — глутатион; GSSG — глутатиондисульфид; ИЦДГ — изоцитратдегидрогеназа; МДГ — малатдегидрогеназа; ОГДК — комплекс 2-оксоглутаратдегидрогеназы; СФ — сукцинил фосфонат; ТДФ — тиаминдифосфат.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-130, 24.06.2020.

\*\* Адресат для корреспонденции.

белков, причем этот список расширяется до тысяч белков, регулируемых косвенно [1]. В основном опосредованная p53 активация транскрипции изучалась в отношении мишеней p53, имеющих общее регуляторное значение для судьбы клеток, таких как дестабилизирующий p53 NDM2, контролирующий клеточный цикл p21, регуляторы гибели/выживания клеток PUMA и TIGAR и т.д. Поскольку судьба клетки тесно связана с энергетическим статусом, неудивительно, что p53 также известен как главный регулятор энергетического обмена клетки. Несколько исследований рассматривали прямую активацию или репрессию соответствующих транспортеров и ферментов при индукции p53

[2–5]. При этом список белков-мишеней p53 включает переносчик тиамин (витамина B1) [2], дифосфатное производное которого, тиаминдифосфат (ТДФ), является не только коферментом энергетического метаболизма, но также регулятором связывания p53 с ДНК [6].

Хотя большинство исследований регуляции транскрипции с помощью p53 сфокусировано на онкогенной роли инактивации p53 в раковых клетках, некоторые опухолевые клетки используют систему регуляции, определяемую функционирующим у них p53. К таким клеткам относятся клетки немелкоклеточной аденокарциномы легкого линии A549 [7, 8]. Сигнальный путь p53 связан с изменениями регулируемого тиамином метаболизма опухолевых клеток [9, 10] и их реакцией на цисплатин [8] – наиболее применяемый для лечения рака легких препарат, к которому, однако, у раковых клеток развивается резистентность. Поэтому особый интерес представляет изучение в таких клетках зависящей от p53 и тиамин метаболической регуляции.

База данных DECODE, которая объединяет текстовый анализ данных ChIP-seq от компании SABiosciences и геномные данные из UCSC Genome Browser, обеспечивает предсказания сайтов связывания более чем для 200 транскрипционных факторов. Из них мы сосредоточились на предсказании сайтов связывания p53 в отношении генов, вовлеченных в регулируемый тиамином метаболизм. Целью данного исследования было оценить влияние p53 на зависящую от тиамин метаболическую регуляцию. Предсказание сайтов связывания p53 вблизи генов, кодирующих белки зависящего от тиамин метаболизма, сопоставлялись с результатами биохимического анализа таких белков после активации p53.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Биоинформатическая оценка потенциальных сайтов связывания p53 в геномах.** Поиск сайтов связывания p53 в непосредственной близости от участков инициации транскрипции проводили аналогично другим исследованиям [11, 12], используя базу данных DECODE (от английского «DECipherment Of DNA Elements»), разработанную принадлежащей QIAGEN компанией SABiosciences, США. Совмещая результаты текстового анализа данных ChIP-seq и геномные данные UCSC Genome Browser, DECODE показывает расположение предсказанных участков связывания вблизи области инициации транскрипции гена для более чем 200 транскрипционных факторов. Для генов человека

мы сравнивали информацию коммерческой базы данных DECODE с данными открытой базы GeneCards (<https://www.genecards.org/>). GeneCards включает наиболее вероятные из указываемых компанией QIAGEN, владеющей базой DECODE, сайты связывания транскрипционных факторов.

**Клеточная культура и реагенты.** Клеточную линию аденокарциномы немелкоклеточного рака легкого A549 (ATCC® CCL-185™, «ATCC», США) культивировали в среде DMEM («Thermo Fischer Scientific», США), которая содержала 1 г/литр глюкозы, 1 мМ пируват, 4 мМ GlutaMAX™, 10% FBS («Gibco», США), 100 Ед./мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина («Thermo Fisher Scientific», США), при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

Клетки A549 высевали в 6-луночные планшеты по 2 × 10<sup>5</sup> клеток на каждую лунку. Через 24 ч среду заменяли свежей с добавлением 5 мкМ цисплатина или 4,5 мМ сукцинилфосфоната (СФ). СФ был синтезирован в соответствии с ранее описанной методикой [13]. Его идентичность и чистоту подтверждали ЯМР-спектроскопией. Клетки культивировали в течение 24 ч (приблизительно до 70% плотности покрытия), подвергали лизису и собирали лизаты, как описано ранее [14]. При этом были использованы коктейли ингибиторов протеаз и фосфатаз cOmplete™ («Roche», Швейцария) и PhosSTOP™ («Roche», Швейцария).

**Анализ ферментативных активностей.** Ферментативные активности анализировали в день приготовления лизатов клеток, как описано ранее [14]. Анализ холофермента комплекса 2-оксоглутаратдегидрогеназы (ОГДК) при эндогенном уровне его кофермента ТДФ проводили, исключив ТДФ из среды измерения активности. Активность изофермента глутаматдегидрогеназы (ГДГ) человека, ГДГ2, анализировали при добавлении 1 мкМ GTP (для ингибирования ГДГ1) и 100 мкМ ADP (для активации GTP-резистентной ГДГ2), учитывая различия регуляторных свойств двух изоферментов [15]. Анализ NAD-зависимой изоцитратдегидрогеназы (ИЦДГ) проводили, как предложено в исследовании Cox и Davies [16], с использованием буфера HEPES. NADP-зависимой ИЦДГ анализировали, как описано в работе Artiukhov et al. [17]. Используемые для измерений реактивы (NAD, NADP, ADP, GTP, NADH, 2-оксоглутарат, DL-изоцитрат, малат, оксалоацетат, CoA и ТДФ) были произведены «Sigma-Aldrich», США.

Ферментативные активности нормализовали на общее содержание белка в лизате, которое определяли с использованием набора для ана-

лиза белка («Bio-Rad», США) в соответствии с инструкциями производителя.

**Анализ p53, p21 и GOT2.** Уровни белков p53 и митохондриальной аспартатаминотрансферазы GOT2 определяли методом иммунолоттинга с использованием первичных антител против p53 («Santa Cruz Bio-technology», США) и против GOT2 («Sigma-Aldrich», США). Для нормализации использовали уровни  $\beta$ -актина (антитела «Sigma-Aldrich», США) и VDAC/порина (антитела «Cell Signaling Technology», США) в тех же пробах.

Уровень мРНК p21 (5'-CAGACCAGCAT-GACAGATTC-3', 5'-TTAGGGCTTCCTCTTG-GAGA-3') анализировали с помощью ПЦР в реальном времени («Кара Biosystems», США). Для приготовления РНК использовали мини-набор RNeasy («QIAGEN», Нидерланды). Для нормализации определяемых уровней транскрипции p21 использовали мРНК  $\beta$ -актина и белка S18 в исследуемых пробах.

**Анализ глутатиона и его дисульфида.** Глутатион (GSH) определяли с использованием 5,5'-ди-тиобис-(2-нитробензойной кислоты) (ДТНБ), как описано в работе Boyko et al. [18]. Дисульфид глутатиона (GSSG) количественно определяли по флуоресценции его продукта с о-фталевым альдегидом по методике Hissin и Hilf [19], оптимизированной Senft et al. [20].

**Статистический анализ.** Значения представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Независимые эксперименты относятся к различным посевам клеток. Две экспериментальные группы (контроль и опыт) сравнивали с использованием двустороннего t-критерия Стьюдента с поправкой Холма–Сидака для множественного тестирования. Все данные прошли проверку нормальности с помощью обобщенного теста Д'Агостино. Статистический анализ проводили с использованием программы GraphPad Prism, версии 7.0 («GraphPad Software Inc.», США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ферменты и транспортеры, связанные с тиамин и его природными производными, перечислены в таблице. В первую очередь таблица включает известные белки, каталитическая активность которых нуждается в основном внутриклеточном производном тиамин — коферменте ТДФ. Кроме того, в таблицу включены ферменты, которые регулируются тиамин и его природными производными аллостерически или конкурентно по отношению к субстратам [21, 22]. Наконец, таблица также включает фер-

менты, наиболее тесно связанные с функцией белков, зависящих от тиамин, а также известные в настоящее время ферменты метаболизма тиамин и транспортеры.

Используя данные DECODE, мы сопоставили наличие участков связывания p53 вблизи точек инициации транскрипции в трех хорошо охарактеризованных геномах млекопитающих: человека, мыши и крысы. Консервативность регуляции того или иного гена млекопитающих p53 определяли по числу предсказаний участков связывания p53 в этих геномах. Сходимость предсказаний в разных геномах считали маркером повышенной вероятности регуляции гена белком p53. Таким образом, общее количество потенциальных сайтов связывания p53 вблизи начальных точек транскрипции в трех геномах млекопитающих (таблица) рассматривалось, как кумулятивный маркер надежности предсказания. Для гетерогенных белковых комплексов, включая регуляторные ферменты, такие как киназы и фосфатазы, сайты связывания p53 суммировались по всем генам, кодирующим компоненты системы. Например, для полиферментного комплекса ОГДК было предсказано, что транскрипция как первого, так и второго компонента комплекса может зависеть от p53 (таблица). Это увеличивает вероятность регуляции белком p53 основной формы этого полиферментного комплекса, включающей продукт гена *OGDH* по сравнению с теми формами, которые содержат изоферменты *OGDH*, кодируемые недавно охарактеризованными генами *OGDHL* и *DHTKD1* [17]. Однако активность комплекса, включающих продукты генов *OGDHL* и *DHTKD1*, может также зависеть от p53 посредством его влияния на транскрипцию второго компонента комплекса, кодируемого геном *DLST*. Предсказанные сайты связывания p53 участками генов, кодирующих ТДФ-зависимые полиферментные комплексы дегидрогеназ 2-оксокислот (таблица), хорошо соотносятся с существующими данными об индуцированном p53 повышении их транскрипции в химических моделях дефицита тиамин [23].

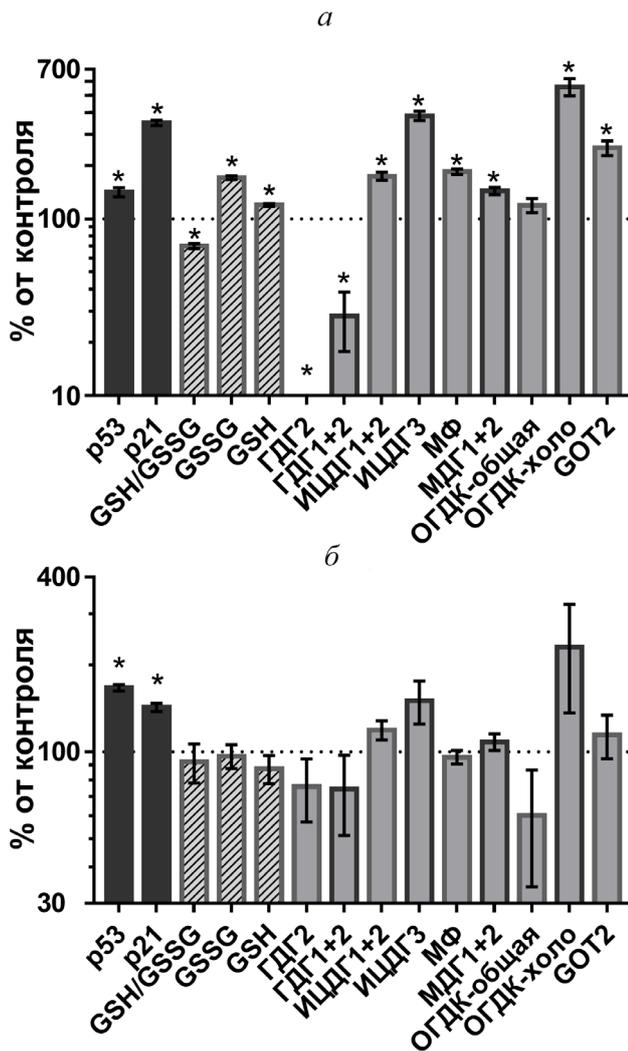
По сравнению с информацией, полученной нами из DECODE, лучшие находки, указанные в базе GeneCards, обладают меньшей чувствительностью. В частности, они не включают известные прямые мишени p53: SLC19A2 [2], PDK2 и PDK4 [4, 5, 24], у которых, по данным DECODE, предсказано от 2 до 6 сайтов p53 (таблица).

Для проверки биоинформатических данных о регуляции зависящих от тиамин метаболических генов p53 мы использовали цисплатин — хорошо известный активатор p53 в клетках A549 [8].

Предполагаемые участки связывания p53 с ДНК в непосредственной близости от участков инициации транскрипции генов, кодирующих белки зависимого от тиамина метаболизма в геномах человека, мыши и крысы

| Группы белков                           | Гены  | Участки связывания p53  |   |  |   |  |  |
|---|---|---|---|--|---|--|--|
|   |   | Человек   | Мышь  | Крыса  | в трех геномах  | в расчете на гетероконплекс  |  |
| ТДФ-зависимые ферменты                  | ОГДК  | <i>OGDH*</i><br><i>OGDHL</i><br><i>DHTKD1</i><br><i>DLST</i><br><i>DLD</i>  | 1<br>0<br>0<br>1<br>0   | 2<br>0<br>0<br>1<br>0  | 0<br>0<br>0<br>1<br>0   | 3<br>0<br>0<br><b>3</b><br>0   | 6 сайтов в 2 каталитических компонентах                  |
|   | Комплекс пируватдегидрогеназы   | <i>PDHA1</i><br><i>PDHA2</i><br><i>PDHB</i><br><i>DLAT</i><br><i>PDHX</i><br><i>PDK1*</i><br><i>PDK2</i><br><i>PDK3</i><br><i>PDK4</i><br><i>PDP1</i><br><i>PDP2</i><br><i>PDPR</i> | 0<br>0<br>0<br>0<br>0<br>3<br>1<br>0<br>2<br>0<br>1<br>0  | 0<br>0<br>0<br>0<br>1<br>1<br>0<br>0<br>2<br>0<br>Нет рез.<br>Нет рез. | 0<br>0<br>0<br>0<br>0<br>1<br>1<br>0<br>2<br>0<br>1<br>Нет рез. | 0<br>0<br>0<br>0<br>1<br><b>5</b><br>2<br>0<br><b>6</b><br>0<br>2<br>0 | 16 сайтов в основном в системе фосфорилирования          |
|   | ДГРОК   | <i>BCKDHA</i><br><i>BCKDHB</i><br><i>DBT</i><br><i>BCKDK</i><br><i>PPM1K</i>  | 1<br>0<br>0<br>3<br>0   | 1<br>0<br>0<br>3<br>0  | 1<br>0<br>0<br>1<br>Нет рез.                                    | <b>3</b><br>0<br>0<br><b>7</b><br>0                                    | 10 сайтов в 2 компонентах: каталитическом и регуляторном |
|   | Другие  | <i>TKT*</i><br><i>TKTL1</i><br><i>TKTL2</i><br><i>HACL1</i><br><i>ILVBL</i>   | 4<br>0<br>0<br>0<br>0   | 1<br>0<br>0<br>0<br>0  | 1<br>Нет рез.<br>Нет рез.<br>Нет рез.<br>Нет рез.               | <b>6</b><br>0<br>0<br>0<br>0   |  |
|   | Другие ферменты, вовлеченные в зависимость от тиамина регуляцию метаболизма | Регулируемые тиамином и/или его производными  | <i>GLUD1</i><br><i>GLUD2*</i><br><i>MDH1</i><br><i>MDH2</i><br><i>PDXK</i><br><i>GOT1</i><br><i>GOT2</i><br><i>GPT*</i><br><i>GPT2</i><br><i>GLUL</i> | 0<br>1<br>0<br>0<br>1<br>0<br>0<br>12<br>0<br>0                        | 0<br>Нет гена<br>0<br>0<br>0<br>0<br>0<br>5<br>0<br>0           | 0<br>Нет гена<br>0<br>0<br>1<br>0<br>0<br>5<br>Нет рез.<br>0           | 0<br>1<br>0<br>0<br>2<br>0<br>0<br><b>22</b><br>0<br>0   |
| Сопряженные с ТДФ-зависимыми ферментами |   | <i>IDH1 (NADP)</i><br><i>IDH2 (NADP)</i>  | 1<br>0  | 1<br>0   | 1<br>0  | <b>3</b><br>0  |  |
|   |   | <i>IDH3A (NAD)</i><br><i>IDH3B (NAD)</i><br><i>IDH3G (NAD)</i>  | 0<br>1<br>2   | 1<br>0<br>2  | 0<br>1<br>2   | 1<br>2<br>6  | 9 сайтов в 3 каталитических компонентах                  |
|   |   | <i>ME1* (NADP)</i><br><i>ME2 (NAD и NADP)</i><br><i>ME3 (NADP)</i>  | 1<br>0<br>0   | Нет рез.<br>0<br>0   | 0<br>Нет рез.<br>Нет рез.                                       | 1<br>0<br>0  |  |
| Белки метаболизма и транспорта тиамина  |   | <i>TPK1*</i><br><i>THTPA</i><br><i>SLC19A1</i><br><i>SLC19A2</i><br><i>SLC19A3</i><br><i>SLC44A4</i><br><i>SLC25A19</i>   | 1<br>2<br>0<br>2<br>0<br>3<br>0   | 1<br>2<br>0<br>0<br>0<br>4<br>0  | Нет рез.<br>3<br>0<br>0<br>Нет рез.<br>4<br>0                   | 2<br><b>7</b><br>0<br>2<br>0<br><b>11</b><br>0                         |  |

Примечание. Звездочки обозначают сайты p53 по базе GeneCards (<https://www.genecards.org/>). Сходимые предсказания генов с регулируемой p53 транскрипцией выделены жирным шрифтом. Описанные в литературе непосредственные мишени регуляции p53 отмечены серым. ДГРОК – комплекс дегидрогеназы разветвленных 2-оксокислот; рез. – результат.

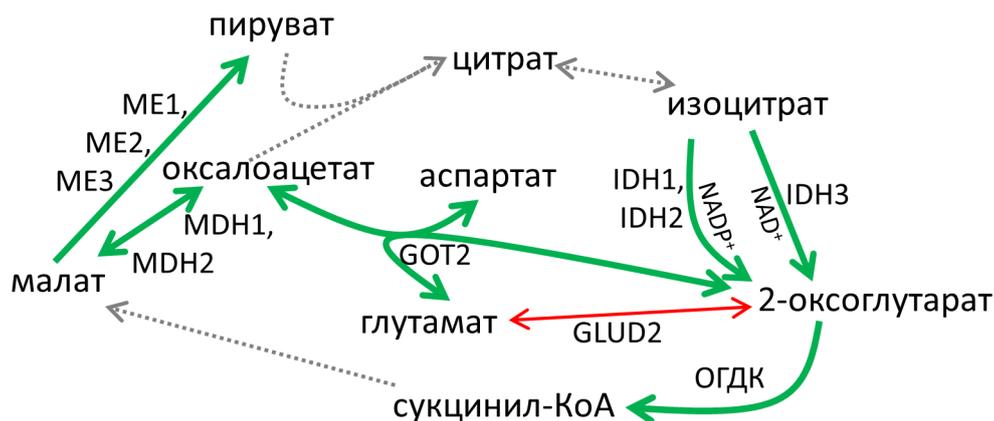


**Рис. 1.** Изменения уровней p53, p21, клеточного глутатиона и активности/экспрессии ферментов, связанных с зависимым от тиамин метаболизмом, после 24-часовой инкубации с 5 мкМ цисплатином (а) или 4,5 мМ СФ, специфическим ингибитором ОГДК (б); \*  $p < 0,05$ . Сокращения: ГДГ – глутаматдегидрогеназа, ИЦДГ – исоцитратдегидрогеназа, МФ – малик-фермент (все три изофермента), МДГ – малатдегидрогеназа, ОГДК – 2-оксоглутаратдегидрогеназный комплекс, GOT2 – митохондриальная аспаратаминотрансфераза, GSH – глутатион, GSSG – глутатион дисульфид. Числа обозначают изоферменты в соответствии с таблицей

Действительно, 24 часа инкубации клеток A549 с 5 мкМ цисплатином ( $IC_{50}$  для клеток A549 к цисплатину составляет 18 мкМ [25]) повышала экспрессию p53, что приводило к индукции белка p21 (ингибитора циклин-зависимой киназы 1A) – известной мишени p53 (рис. 1, а). В этих условиях окислительно-восстановительный потенциал клеточного глутатиона (GSH/GSSG) снижался, что согласуется с молекулярным механизмом действия цисплатина, который вызывает окислительный стресс и продукцию актив-

ных форм кислорода (АФК) [26]. Тем не менее можно было наблюдать увеличение уровней не только окисленной, но и восстановленной форм глутатиона, хотя содержание последней росло заметно слабее (рис. 1, а). Таким образом, индукция цисплатином p53 вызывала рост биосинтеза глутатиона – известного пути, контролируемого взаимодействием сигнального пути АФК-p53-p21 и пути, регулируемого транскрипционным регулятором Nrf [27]. Биохимический анализ набора ферментов, выбранных из перечисленных в таблице белков, зависимых от тиамин, указывает на метаболические ферменты – мишени такой регуляции.

Как показано на рис. 1, а и 2, цисплатин вызывал значительные изменения в ферментах узла глутамата/2-оксоглутарата и сопряженного с ним метаболизма малата. Цисплатин увеличивал поток субстрата через ОГДК, повышая его насыщение эндогенным коферментом ТДФ, т.е. уровень холо-ОГДК, с  $23 \pm 9\%$  до  $100\%$  ( $p < 0,05$ ). Ввиду отсутствия увеличения общей активности ОГДК более высокое насыщение фермента эндогенным ТДФ хорошо согласуется с известным, зависимым от p53 увеличением транспорта тиамин [2]. Другие известные мишени транскрипционной регуляции p53 среди метаболических ферментов, такие как NADP-зависимые ИЦДГ и малик-ферменты [28, 29], также были активированы вместе с ростом p53 и p21 (рис. 1, а). В то же время специфический для человека изофермент глутаматдегидрогеназы ГДГ2 (ген *GLUD2*), у которого по биоинформатическому предсказанию имеется сайт связывания p53 (таблица), был сильно подавлен при обработке клеток цисплатином (рис. 1, а). Влияние на общую активность ГДГ было менее выраженным в соответствии с прогнозируемым отсутствием регуляции транскрипции ГДГ1 p53 (таблица). Наряду с 6-кратным увеличением активности холофермента ОГДК ( $p < 0,02$ ) изофермент NAD-зависимая ИЦДГ, предшествующий ОГДК в цикле Кребса и обеспечивающий ОГДК его субстратом 2-оксоглутаратом, продемонстрировал 4-кратное увеличение при индукции p53 цисплатином ( $p < 0,01$ ). Увеличивались и некоторые другие ферменты: МДГ (в 1,4 раза,  $p < 0,02$ ) и GOT2 (в 2,5 раза,  $p < 0,01$ ), которые, согласно предсказанию, не имеют сайтов связывания p53 (таблица). Известно, что изофермент МДГ1 является ко-активатором транскрипционной активности p53 [30, 31]. Однако механизмы наблюдаемой активации этих ферментов требуют дальнейших исследований. Они могут быть непрямыми мишенями p53; либо регулирующие эти гены сайты связывания p53 могут быть расположены на большом расстоянии от



**Рис. 2.** Схематическое изображение перестройки метаболизма в ответ на активацию p53 цисплатином в клетках A549. Увеличение показано толстыми зелеными стрелками, уменьшение – тонкой красной стрелкой, неизмененные участки метаболизма – серыми пунктирными стрелками. Сокращенные названия ферментов на рисунке указаны в соответствии с идентификаторами в таблице. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

точек инициации транскрипции за счет трехмерной структуры организации хроматина, не учитываемой DECODE (таблица). В целом, наблюдаемые изменения в параметрах метаболизма под действием цисплатина на клетки A549 (рис. 1, а) указывают на то, что транскрипционная активность p53 повышает продукцию и окисление 2-оксоглутарата в цикле Кребса, снижая опосредованное ГДГ2 окисление глутамата. Такие изменения хорошо согласуются с увеличением потока глутамата на биосинтез глутатиона при окислительном стрессе, вызванном цисплатином.

Известно, что в зависимости от сигнала повышенная экспрессия p53 может приводить к различным результатам, и такая комплексная регуляция зависит от посттрансляционных модификаций p53 и его партнеров по связыванию с ДНК [1]. Действительно, по сравнению с действием цисплатина (рис. 1, а) инкубация клеток A549 с 4,5 мМ сукцинилфосфонатом – специфическим ингибитором ОГДК [13] – привела к сходному с индуцируемым цисплатином уровню активации p53, который, однако, способствовал значительно менее выраженной индукции p21 при действии СФ (рис. 1, б). При действии СФ отсутствовали и статистически значимые изменения гомеостаза глутатиона и исследованных ферментов (рис. 1, б). Тем не менее общая картина изменений была сходной при обработке клеток цисплатином (рис. 1, а) и СФ (рис. 1, б). Особенно заметными были увеличение активности холофермента ОГДК и NAD-зависимой ИЦДГ. Так, насыщение ОГДК эндогенным ТДФ увеличивалось после обработки СФ с  $23 \pm 9\%$  до  $78 \pm 16$  ( $p = 0,06$ ). Одновременно наблюдали 1,5-кратное увеличение

NAD-зависимой ИЦДГ (рис. 1, б), хотя данное изменение и не достигло статистической значимости. Таким образом, подобно цисплатину, СФ повышал уровень p53 с последующим воздействием на уровень холофермента ОГДК, для которого была характерна самая большая амплитуда изменения по сравнению с изменениями других исследованных ферментативных активностей. Полученные данные свидетельствуют о том, что контролируемое p53 увеличение внутриклеточного тиамина за счет усиления регуляции транспортера SLC19A2 [2] является первоочередной защитой при нарушении метаболизма митохондрий путем вызываемого СФ ингибирования ОГДК. Действительно, как было показано ранее, при обработке СФ клеток и при введении его животным происходит увеличение притока тиамина в клетки или ткани [32]. Следует отметить, что цисплатин также известен в качестве ингибитора ОГДК [33].

В целом, охарактеризованные нами изменения метаболических ферментов после активации p53 в клетках A549 с помощью цисплатина (рис. 1 и 2) показывают хорошее соответствие предсказанным с помощью DECODE участкам связывания p53 вблизи генов, кодирующих данные ферменты и тиаминовые транспортеры (таблица). Таким образом, анализ геномов средствами биоинформатики является ценным инструментом для планирования и интерпретации сложных биологических экспериментов. Наши данные об участии p53 в регуляции зависимо от тиамина метаболизма в клетках A549, подвергшихся воздействию цисплатина, дают представление о метаболических особенностях этих раковых клеток и молекулярных механизмах действия цисплатина, который является наи-

более широко применяемым лекарством при раке легкого.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке шведского Ракового фонда (грант № CAN 2016/1342-1345 Анне Карлссон) и Российского научного фонда (грант № 18-14-00116 Виктории И. Буник).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все международные, национальные и институциональные принципы проведения экспериментов были соблюдены. В частности, эксперименты с культурой клеток, представленные в этом исследовании, были проведены в Каролинском институте и одобрены местной комиссией по этике.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Beckerman, R., and Prives, C. (2010) Transcriptional regulation by p53, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a000935, doi: 10.1101/cshperspect.a000935.
- Lo, P. K., Chen, J. Y., Tang, P. P., Lin, J., Lin, C. H., Su, L. T., Wu, C. H., Chen, T. L., Yang, Y., and Wang, F. F. (2001) Identification of a mouse thiamine transporter gene as a direct transcriptional target for p53, *J. Biol. Chem.*, **276**, 37186-37193, doi: 10.1074/jbc.M104701200.
- Itahana, Y., and Itahana, K. (2018) Emerging roles of p53 family members in glucose metabolism, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 776, doi: 10.3390/ijms19030776.
- Janky, R., Verfaillie, A., Imrichova, H., Van de Sande, B., Standaert, L., Christiaens, V., Hulselmans, G., Hertens, K., Naval Sanchez, M., Potier, D., Svetlichnyy, D., Kalender Atak, Z., Fiers, M., Marine, J. C., and Aerts, S. (2014) iRegulon: from a gene list to a gene regulatory network using large motif and track collections, *PLoS Comput. Biol.*, **10**, e1003731, doi: 10.1371/journal.pcbi.1003731.
- Wang, B., Niu, D., Lam, T. H., Xiao, Z., and Ren, E. C. (2014) Mapping the p53 transcriptome universe using p53 natural polymorphs, *Cell Death Differ.*, **21**, 521-532, doi: 10.1038/cdd.2013.132.
- McLure, K. G., Takagi, M., and Kastan, M. B. (2004) NAD<sup>+</sup> modulates p53 DNA binding specificity and function, *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 9958-9967, doi: 10.1128/MCB.24.22.9958-9967.2004.
- Breen, L., Heenan, M., Amberger-Murphy, V., and Clynes, M. (2007) Investigation of the role of p53 in chemotherapy resistance of lung cancer cell lines, *Anticancer Res.*, **27**, 1361-1364.
- Guntur, V. P., Waldrep, J. C., Guo, J. J., Selting, K., and Dhand, R. (2010) Increasing p53 protein sensitizes non-small cell lung cancer to paclitaxel and cisplatin *in vitro*, *Anticancer Res.*, **30**, 3557-3564.
- Jonus, H. C., Hanberry, B. S., Khatu, S., Kim, J., Luesch, H., Dang, L. H., Bartlett, M. G., and Zastre, J. A. (2018) The adaptive regulation of thiamine pyrophosphokinase-1 facilitates malignant growth during supplemental thiamine conditions, *Oncotarget*, **9**, 35422-35438, doi: 10.18632/oncotarget.26259.
- Duan, L., Perez, R. E., Chen, L., Blatter, L. A., and Maki, C. G. (2018) p53 promotes AKT and SP1-dependent metabolism through the pentose phosphate pathway that inhibits apoptosis in response to Nutlin-3a, *J. Mol. Cell Biol.*, **10**, 331-340, doi: 10.1093/jmcb/mjx051.
- Ye, L., Gu, L., Caprioli, J., and Piri, N. (2018) RNA-binding protein Rbpms is represented in human retinas by isoforms A and C and its transcriptional regulation involves Sp1-binding site, *Mol. Genet. Genomics*, **293**, 819-830, doi: 10.1007/s00438-018-1423-8.
- Sidibe, A., Ropraz, P., Jemelín, S., Emre, Y., Poittevin, M., Pocard, M., Bradfield, P. F., and Imhof, B. A. (2018) Angiogenic factor-driven inflammation promotes extravasation of human proangiogenic monocytes to tumours, *Nat. Commun.*, **9**, 355, doi: 10.1038/s41467-017-02610-0.
- Bunik, V. I., Denton, T. T., Xu, H., Thompson, C. M., Cooper, A. J., and Gibson, G. E. (2005) Phosphonate analogues of  $\alpha$ -ketoglutarate inhibit the activity of the  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex isolated from brain and in cultured cells, *Biochemistry*, **44**, 10552-10561, doi: 10.1021/bi0503100.
- Aleshin, V. A., Artiukhov, A. V., Oppermann, H., Kazantsev, A. V., Lukashev, N. V., and Bunik, V. I. (2015) Mitochondrial impairment may increase cellular NAD(P)H: resazurin oxidoreductase activity, perturbing the NAD(P)H-based viability assays, *Cells*, **4**, 427-451, doi: 10.3390/cells4030427.
- Plaitakis, A., Latsoudis, H., and Spanaki, C. (2011) The human GLUD2 glutamate dehydrogenase and its regulation in health and disease, *Neurochem. Int.*, **59**, 495-509, doi: 10.1016/j.neuint.2011.03.015.
- Cox, G. F., and Davies, D. D. (1967) Nicotinamide-adenine dinucleotide-specific isocitrate dehydrogenase from pea mitochondria. Purification and properties, *Biochem. J.*, **105**, 729-734, doi: 10.1042/bj1050729.
- Artiukhov, A. V., Grabarska, A., Gumbarewicz, E., Aleshin, V. A., Kahne, T., Obata, T., Kazantsev, A. V., Lukashev, N. V., Stepulak, A., Fernie, A. R., and Bunik, V. I. (2020) Synthetic analogues of 2-oxo acids discriminate metabolic contribution of the 2-oxoglutarate and 2-oxoadipate dehydrogenases in mammalian cells and tissues, *Sci. Rep.*, **10**, 1886, doi: 10.1038/s41598-020-58701-4.
- Boyko, A., Ksenofontov, A., Ryabov, S., Baratova, L., Graf, A., and Bunik, V. (2017) Delayed influence of spinal cord injury on the amino acids of NO<sup>•</sup> metabolism in rat cerebral cortex is attenuated by thiamine, *Front. Med.*, **4**, 249, doi: 10.3389/fmed.2017.00249.
- Hissin, P. J., and Hilf, R. (1976) A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues, *Anal. Biochem.*, **74**, 214-226, doi: 10.1016/0003-2697(76)90326-2.
- Senft, A. P., Dalton, T. P., and Shertzer, H. G. (2000) Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe o-phthalaldehyde, *Anal. Biochem.*, **280**, 80-86, doi: 10.1006/abio.2000.4498.
- Mkrtychyan, G., Aleshin, V., Parkhomenko, Y., Kaehne, T., Di Salvo, M. L., Parroni, A., Contestabile, R., Vovk, A., Bettendorff, L., and Bunik, V. (2015) Molecular mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin in brain: biochemical, structural and pathway analysis, *Sci. Rep.*, **5**, 12583, doi: 10.1038/srep12583.
- Aleshin, V. A., Mkrtychyan, G. V., and Bunik, V. I. (2019) Mechanisms of the non-coenzyme action of thiamin: protein targets and medical significance, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, doi: 10.1134/S0320972519080013.
- Chorny, S., Parkhomenko, Y., and Chorna, N. (2017) Thiamine antagonists trigger p53-dependent apoptosis in

- differentiated SH-SY5Y cells, *Sci. Rep.*, **7**, 10632, doi: 10.1038/s41598-017-10878-x.
24. Contractor, T., and Harris, C. R. (2012) p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2, *Cancer Res.*, **72**, 560-567, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1215.
  25. Zhou, X., Paredes, J. A., Krishnan, S., Curbo, S., and Karlsson, A. (2015) The mitochondrial carrier SLC25A10 regulates cancer cell growth, *Oncotarget*, **6**, 9271-9283, doi: 10.18632/oncotarget.3375.
  26. Chen, B., Shen, Z., Wu, D., Xie, X., Xu, X., Lv, L., Dai, H., Chen, J., and Gan, X. (2019) Glutathione peroxidase 1 promotes NSCLC resistance to cisplatin via ROS-induced activation of PI3K/AKT pathway, *BioMed Res. Int.*, **2019**, 7640547, doi: 10.1155/2019/7640547.
  27. Jang, D. E., Song, J., Park, J. W., Yoon, S. H., and Bae, Y. S. (2020) Protein kinase CK2 activates Nrf2 via autophagic degradation of Keap1 and activation of AMPK in human cancer cells, *BMB Rep.*, **53**, 272-277.
  28. Kil, I. S., Huh, T. L., Lee, Y. S., Lee, Y. M., and Park, J. W. (2006) Regulation of replicative senescence by NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase, *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 110-119, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.021.
  29. Jiang, P., Du, W., Mancuso, A., Wellen, K. E., and Yang, X. (2013) Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence, *Nature*, **493**, 689-693, doi: 10.1038/nature11776.
  30. Lee, S. M., Dho, S. H., Ju, S. K., Maeng, J. S., Kim, J. Y., and Kwon, K. S. (2012) Cytosolic malate dehydrogenase regulates senescence in human fibroblasts, *Biogerontology*, **13**, 525-536, doi: 10.1007/s10522-012-9397-0.
  31. Lee, S. M., Kim, J. H., Cho, E. J., and Youn, H. D. (2009) A nucleocytoplasmic malate dehydrogenase regulates p53 transcriptional activity in response to metabolic stress, *Cell Death Differ.*, **16**, 738-748, doi: 10.1038/cdd.2009.5.
  32. Mkrtchyan, G., Graf, A., Bettendorff, L., and Bunik, V. (2016) Cellular thiamine status is coupled to function of mitochondrial 2-oxoglutarate dehydrogenase, *Neurochem. Int.*, **101**, 66-75, doi: 10.1016/j.neuint.2016.10.009.
  33. Zhang, L., Cooper, A. J., Krasnikov, B. F., Xu, H., Bubber, P., Pinto, J. T., Gibson, G. E., and Hanigan, M. H. (2006) Cisplatin-induced toxicity is associated with platinum deposition in mouse kidney mitochondria *in vivo* and with selective inactivation of the  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex in LLC-PK1 cells, *Biochemistry*, **45**, 8959-8971, doi: 10.1021/bi060027g.

## REGULATION OF MAMMALIAN THIAMINE (VITAMIN B1)-DEPENDENT METABOLISM BY p53\*

V. I. Bunik<sup>1,2,3\*\*</sup>, V. A. Aleshin<sup>1,2</sup>, X. Zhou<sup>4</sup>, Sh. Krishnan<sup>4</sup>, and A. Karlsson<sup>4</sup>

<sup>1</sup> *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: bunik@belozersky.msu.ru*

<sup>2</sup> *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 119992 Moscow, Russia*

<sup>4</sup> *Division of Clinical Microbiology, Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institute, Karolinska University Hospital, 14186 Stockholm, Sweden*

Received May 25, 2020

Revised June 09, 2020

Accepted June 09, 2020

Transcriptional factor p53 is a master regulator of energy metabolism. Energy metabolism strongly depends on thiamine (vitamin B1) and/or its natural derivatives. Thiamine diphosphate (ThDP), which is a major thiamine derivative, affects p53 binding to DNA. In order to elucidate the mechanism of regulation of thiamine-dependent metabolism by p53, we assessed putative p53-binding sites near transcription starting points in genes coding for transporters and enzymes, whose function is associated with thiamine and/or its derivatives. The predictions were validated by studying cell metabolic response to the p53 inducer cisplatin. Expression of p53 and its known target, p21, has been evaluated in cisplatin-treated and control human lung adenocarcinoma A549 cells that possess functional p53 pathway. We also investigated the activity of enzymes involved in the thiamine-dependent energy metabolism. Along with upregulating the expression of p53 and p21, cisplatin affected the activities of metabolic enzymes, whose genes were predicted as carrying the p53-binding sites. The activity of glutamate dehydrogenase GDH2 isoenzyme strongly decreased, while the activities of NADP<sup>+</sup>-dependent isocitrate dehydrogenase (IDH) and malic enzymes, as well as the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex at its endogenous ThDP level, were elevated. Simultaneously, the activities of NAD<sup>+</sup>-dependent IDH, mitochondrial aspartate aminotransferase, and two malate dehydrogenase isoenzymes, whose genes were not predicted to have the p53-binding sequences near the transcription starting points, were upregulated by cisplatin. The p53-dependent regulation of the assayed metabolic enzymes correlated with induction of p21 by p53 rather than induction of p53 itself.

**Keywords:** A549 cells, cisplatin, glutathione, p53, p21, succinyl phosphonate, thiamine-dependent metabolism

УДК 577.24

## ПЛЕНКИ ИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО СПИДРОИНА ОТМЕНЯЮТ НЕКОТОРЫЕ ПРИЗНАКИ СТАРЕНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ NIH 3T3, ИНДУЦИРОВАННЫЕ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ГЛЮКОЗЫ

© 2020 А.М. Мойсенович<sup>1#</sup>, М.М. Мойсенович<sup>1\*#</sup>, А.К. Судьина<sup>1</sup>, В.В. Татарский<sup>2,3,4</sup>, А.И. Хамидуллина<sup>3</sup>, М.А. Ястребова<sup>3</sup>, Л.И. Давыдова<sup>5,6</sup>, В.Г. Богущ<sup>5,6</sup>, В.Г. Дебабов<sup>5,6</sup>, А.Ю. Архипова<sup>1,7</sup>, К.В. Шайтан<sup>1,8</sup>, А.А. Штиль<sup>2,3</sup>, И.А. Дёмина<sup>1,9</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия; электронная почта: [tmoisenovich@mail.ru](mailto:tmoisenovich@mail.ru)

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, 115478 Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия

<sup>4</sup> Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», 119049 Москва, Россия

<sup>5</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 117545, Москва, Россия

<sup>6</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, Россия

<sup>7</sup> Московский областной научно-исследовательский клинический институт (МОНИКИ), 129110 Москва, Россия

<sup>8</sup> Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991 Москва, Россия

<sup>9</sup> Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, 117198 Москва, Россия

Поступила в редакцию 28.03.2020

После доработки 15.05.2020

Принята к публикации 22.05.2020

Целью исследования было изучение влияния производных структурных белков шелка на показатели клеточного старения при культивировании мышечных фибробластов NIH 3T3 в средах с повышенным содержанием глюкозы. В качестве субстратов для культивирования клеток использовали пленки, сформированные из фиброина шелка *Bombyx mori* или из рекомбинантного аналога спидроина 1 *Nephila clavipes* – rS1/9, а также покровные стекла. Показано, что воздействие 50 мМ глюкозы вызывало замедление роста фибробластов на покровных стеклах. Также, культивирование фибробластов на стеклах при повышенной концентрации глюкозы приводило к увеличению площади клеток и их ядер, к усилению программируемой клеточной гибели и уменьшению синтеза коллагена. Пленки защищали фибробласты от клеточной гибели, вызываемой глюкозой. Наиболее выраженное влияние на количество клеток, включение BrdU и снижение программируемой клеточной гибели было показано для спидроина. Общее количество растворимого коллагена, продуцируемого фибробластами при повышении концентрации глюкозы, уменьшалось на стекле и субстрате из фиброина и не изменялось для спидроина. Проведение молекулярного анализа показало, что при концентрации глюкозы 50 мМ усиливается фосфорилирование субъединицы р65 гетеродимера NF-κB при культивировании на стекле, в то время как на фиброине влияние концентрации глюкозы на данный показатель не детектировалось, а на спидроине фосфорилирование снижалось. В ходе исследования была продемонстрирована антивозрастная активность спидроина, что указывает на его перспективность при разработке скаффолдов, предназначенных для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** клеточное старение, рекомбинантный спидроин, регенерация, искусственная кожа.

DOI: 10.31857/S032097252007009X

### ВВЕДЕНИЕ

Важнейшими функциями кожи являются защита от внешних воздействий, в том числе, от

патогенов и ультрафиолетового излучения, выработка витамина D, терморегуляция, газообмен, обеспечение тактильной чувствительности. Эти функции необходимы для поддержания го-

Принятые сокращения: ВКМ – внеклеточный матрикс; BrdU – 5-бром-2'-дезоксигидроуридин; AGE – конечные продукты гликирования; NF-κB – транскрипционный ядерный фактор; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; FBS – эмбриональная бычья сыворотка; МТГ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ол)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид.

\* Адресат для корреспонденции.

# Авторы внесли равный вклад в работу.

меостаза и функционирования организма, поэтому разработка подходов для полного физиологического восстановления повреждений кожи — одна из важнейших задач современной регенеративной медицины. Старение сопровождается нарушениями гомеостаза, которые, накапливаясь, вызывают формирование морщин, развитие сухости, усиление пигментации и потерю эластичности [1]. Нарушения микроциркуляции приводят к замедлению заживления ран, развитию диабетических язв и хронических воспалений [2, 3], чему способствуют и изменения внеклеточного матрикса (ВКМ) [4]. Наиболее важные компоненты ВКМ кожи — комплексы гликозаминогликанов и фибриллярных белков, таких как коллаген типа 1 и 3, фибронектин и эластин [5]. Молодая дерма состоит из длинных, плотно упакованных коллагеновых фибрилл, содержащих положительно заряженные остатки лизина, гидроксизина, аргинина и в меньшей степени гистидина. В стареющей коже коллагеновые фибриллы фрагментированы и дезорганизованы. Количество фрагментированного коллагена у доноров кожи 80-ти лет в 4,3 раза больше по сравнению с донорами 21–30 лет [6]. Возрастной фрагментации коллагена может способствовать повышенная активность металлопротеиназ. Кроме того, повреждение белков и липидов может вызывать окислительный стресс, что приводит к ускорению старения кожи [7].

При этом заметной перестройке подвергаются межмолекулярные коллагеновые сшивки. Сшивок между лизинами в цепях  $\alpha 1$  и гидроксизинами в цепях  $\alpha 2$ , опосредованных лизилоксидазой, становится меньше по сравнению с числом сшивок, образующихся при неферментативном гликозилировании (реакция Майяра) [8]. Данный процесс является посттрансляционной модификацией первичных аминогрупп глюкозой. В результате реакции образуется фруктолизин, который формируется при гликозилировании аминогрупп лизина [9]. Впоследствии глюкоза или другие сахара внедряются между молекулами коллагена вместо прямой связи между соседними боковыми цепями аминокислот [8]. Конечные продукты гликирования (AGE) изменяют структуру коллагеновых фибрилл, уменьшая положительный заряд белка [10, 11]. Межмолекулярные сшивки коллаген–сахар–коллаген увеличивают жесткость ткани, делая ее менее эластичной, и уменьшают способность коллагена связывать гиалуроновую кислоту и другие гликозаминогликаны [8, 11].

Гипергликемия — важный фактор старения кожи [12–24]. Токсическое влияние повышенного содержания глюкозы включают в себя следующие эффекты: усиление окислительного

стресса, активацию полиольного пути и биосинтеза гексозамина, повреждение ДНК и изменение экспрессии генов, что приводит к старению, воспалению и/или клеточной смерти [14–17]. Сосудистые осложнения при диабете, вызываемые гипергликемией, приводят к образованию плохо заживающих трофических язв на коже [18, 19].

Культирование клеток в присутствии высокой концентрации глюкозы используется в моделях старения. В этих моделях исследуются такие параметры, как площадь клеток и ядер, повышенная скорость запрограммированной гибели клеток, ослабление пролиферации, изменение синтеза коллагена и активность ядерного фактора каппа В (NF- $\kappa$ B) [20–22].

Транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B является основным регулятором множества клеточных реакций на стресс. В покоящихся клетках пять субъединиц NF- $\kappa$ B находятся в цитоплазме в комплексе с ингибирующим белком I $\kappa$ B. В ответ на стимул киназные каскады приводят к протеолизу I $\kappa$ B, фосфорилированию субъединицы p65 (Rel A) и трансактивации NF- $\kappa$ B-зависимых генов [23]. Многочисленные модели показали активацию NF- $\kappa$ B в результате повреждения ДНК, окислительного стресса и повышенной концентрации глюкозы [24–27]. Учитывая, что каждый из этих факторов участвует в старении клеток кожи, фосфорилирование p65 может быть важным молекулярным процессом, который регулирует фенотип, соответствующий старению. Кроме того, известно, что ингибирование NF- $\kappa$ B задерживало проявления признаков старения в мышечной модели прогерии [28].

Возрастные изменения кожи могут быть замедлены с помощью использования искусственных компонентов ВКМ, биоискусственных аналогов кожи и биоразлагаемых скаффолдов. Биоинженерные заменители кожи созданы с целью поддержания достаточного уровня пролиферации фибробластов, необходимого для выработки ВКМ, восстановления и обновления соединительной ткани и ее эластичности. Сформированные аналоги ВКМ являются предпочтительными моделями из-за их биосовместимости и умеренной иммуномодулирующей активности. Важно отметить, что при биодegradации этих материалов образуются нетоксичные продукты: короткие пептиды и аминокислоты. Структурные белки шелка и их рекомбинантные аналоги успешно используются в тканевой инженерии при создании скаффолдов — аналогов ВКМ и биоискусственной кожи. Фиброин, структурный белок нити шелкопряда, является примером такого материала [29]. Белок rS1/9, реком-

бинантный аналог спидроина 1 каркасной нити паутины *Nephila clavipes*, имеет рI 10,49 и положительно заряжен при физиологических значениях pH [30–32]. Ген, кодирующий rS1/9, был синтезирован и клонирован в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* [30–32]. Ранее мы продемонстрировали более высокую активность спидроиновых скаффолдов rS1/9 по сравнению с фиброиновыми при регенерации кости и заживлении ран кожи в моделях *in vivo*. Скаффолд из спидроина стимулировал пролиферацию клеток кожи, а также образование сосудов и нервов внутри 3D-конструкций [33–36].

В данной работе мы исследовали влияние пленок, сформированных из rS1/9, на параметры старения мышечных фибробластов линии NIH 3T3, культивируемых при физиологической (5,5 мМ) и высокой (50 мМ) концентрациях глюкозы. Для сравнения были использованы пленки, сформированные из фиброина, и покровные стекла. Пленки из спидроина оказались более эффективны, чем пленки из фиброина в предотвращении некоторых признаков старения клеток.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** В исследованиях использовали следующие реактивы: 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанола (ГФИП, 99%) («ПиМ-Инвест», Россия); этанол 95% («Медхимпром», Россия); диметилсульфоксид (ДМСО, 99,9%), глюкоза, смесь ингибиторов протеаз, фенолметилсульфонилфторид, реагент Брэдфорда («Sigma-Aldrich», США); этанол, ацетон, соляная кислота, Tween-20, Triton X-100, Tris-HCl, NP-40, додецилсульфат натрия, NaCl и EDTA («Chemmed», Испания); 5-бром-2'-дезоксигуанидин (BrdU), антитело против BrdU, козий антикрысиный IgG H + L («Abcam», Великобритания); набор для флуоресцентной микроскопии аннексина V – FITC («BD Pharmingen™», США); набор для анализа Sicol («Bioscolor», Великобритания); Alexa Fluor™ 488 фаллоидин и Hoechst 33342 («ThermoFisher Scientific», США); нитроцеллюлозная мембрана («GE Healthcare», США). Первичные антитела против фосфорилированного (Ser536, клон 93H1) и общего p65 (клон D14E12), вторичные IgG кролика, связанные с пероксидазой хрена (7074) и реагент Enhanced Chemiluminescence («Cell Signaling Technology, Inc.» США). В работе использовали круглые покровные стекла типа D 263® M производства «Marienfeld», Германия.

**Выделение и очистка белков шелка.** Лиофилизированный фиброин получали из шелковых

хирургических нитей (ООО «Оптикум», Россия) по протоколу, описанному нами ранее [37]. Хирургические нити кипятили 30 мин в 20 мМ водном растворе Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> и затем 3 × 30 мин в дистиллированной воде. Высушивали 4 ч при 60 °С и растворяли в 9,3 М водном растворе LiBr в течение 4 ч на водяной бане при 60 °С, затем диализовали против дистиллированной воды в течение 2 дней, проводя 10 смен воды. Полученный водный раствор фиброина замораживали на 2 дня при –70 °С и лиофилизировали, используя прибор Alpha 1-2 LDplus («Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH», Германия).

Для получения rS1/9 использовали штамм дрожжей *S. cerevisiae*. Клетки дрожжей были трансформированы плазмидой с искусственным геном *rS1/9*, состоящим из девяти химически синтезированных «мономеров» *If1* [32]. Белок rS1/9 выделяли из биомассы дрожжевых клеток, как описано ранее [31]. Клетки были разрушены в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА («Amresco», США) и 5% (v/v) глицерина («Merck», Германия), с помощью стеклянных шариков. Полученную суспензию центрифугировали («Eppendorf», Германия) (30 000 g, 1 ч,) и экстрагировали целевой белок из осадка 10%-ным раствором LiCl («Panreac», США) в 90%-ной муравьиной кислоте в течение 18 ч при интенсивном перемешивании. Затем образец центрифугировали при 30 000 g в течение 1 ч, супернатант диализовали против 10 мМ ацетата натрия (pH 4,0) и снова центрифугировали. Окончательную очистку проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке HiPrep 16/10 SP FF («GE Healthcare», США) при изменении pH (pH 4,0 → pH 7,0 → pH 4,0). Белок элюировали градиентом концентрации NaCl и диализовали против деионизированной воды, затем замораживали при –70 °С и лиофилизировали. Высокая чистота образцов была подтверждена с помощью RAAG-SDS электрофореза [31] и спектрофотометрии («Pharmacia LKB Biochrom», Великобритания). Полученные лиофилизированные фиброин и спидроин хранили в плотно завинченных флаконах при 4 °С.

**Формирование и характеристика пленок.** Для получения 2%-го (w/v) раствора фиброина или rS1/9 в ГФИП навеску 200 мг материала растворяли в 1 мл при 70 °С, пропускали через целлюлозный фильтр для удаления нерастворимых частиц и центрифугировали при 13 680 g в течение 6 мин [38]. Образцы пленок были получены с помощью нанесения раствора белка на круглые покровные стекла диаметром 23 мм с последующим высушиванием. Образцы промывали этанолом и водой для формирования эластич-

ных пленок (несколько мкм толщиной), прочно прикрепленных к поверхности стекла. Морфология поверхности пленок была охарактеризована с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Пленки для СЭМ были подготовлены в соответствии со стандартным протоколом. Фиксировали 2,5%-ным (v/v) глутаральдегидом в 0,1 М какодилатном буфере, pH 7,2, при 4 °C в течение ночи и трижды промывали в том же буфере с последующей дегидратацией в растворах этанола восходящей концентрации и ацетона. Высушивание в критических точках проводили на приборе HCP-2 («Hitachi, Ltd.», Япония). Образцы металлизировали слоем платины толщиной 20 нм («Ion Coater IB3; Eiko Engineering Co.», Япония). Полученные образцы анализировали с помощью микроскопа Camscan S2 («Cambridge Instruments», Великобритания) с разрешением 10 нм и рабочим напряжением 20 кВ. Изображения были получены с использованием программного обеспечения MicroCapture («SMA», Россия).

**Клеточные культуры.** Клетки линии мышечных фибробластов NIH 3T3 («American Type Culture Collection», Manassas, США) культивировали в модифицированной Дульбессо среде Игла («PanEco», Россия) с добавлением 10% (v/v) эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) («HyClone», США), 2 мМ L-глутамин («PanEco», Россия) и 100 мкг/мл гентамицина («Gibco», США) при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> во влажной атмосфере. Клетки 15–20 пассажей использовали в качестве модели стареющих фибробластов. Клетки были разделены на шесть групп: 5,5 мМ глюкоза/стекло; 50 мМ глюкоза/стекло; 5,5 мМ глюкоза/фиброин; 50 мМ глюкоза/фиброин; 5,5 мМ глюкоза/гS1/9; 50 мМ глюкоза/гS1/9.

**Измерение количества клеток и их площади.** Для определения количества клеток и площади, покрытой клетками, растущими на твердых субстратах, был обновлен протокол, описанный ранее [39]. На соответствующие стекла, находящиеся в чашках Петри диаметром 35 мм, наносили 40 000 клеток в 2 мл среды. Клетки фиксировали в 4%-ном (v/v) параформальдегиде в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,4 (PBS) в течение 30 мин после 3-х дней культивирования. Затем проводили пермеабиллизацию в 0,1%-ном (v/v) растворе Triton X-100, содержащем 0,1% (v/v) FBS, в PBS в течение 30 мин при 4 °C с дальнейшей отмывкой образцов дважды с помощью PBS, содержащего 0,1% (v/v) FBS. Для идентификации актиновых микрофиламентов и ядер клетки инкубировали с Alexa Fluor™ 488 фаллоидином и Hoechst 33342 соответственно, затем трижды отмывали PBS. Изо-

бражения были получены на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 («Nikon Corporation», Япония), объективами CFI Plan Apo VC 20×, 0,75 и Apo TIRF 60× Oil DIC. Среднюю площадь отдельных клеток определяли путем измерения площади кластеров и отдельных клеток, деленной на количество ядер.

**Оценка клеточной пролиферации путем включения BrdU.** Анализ включения BrdU проводили в соответствии с протоколом производителя. Для этого фибробласты линии NIH 3T3 ( $4 \times 10^4$ ) высевали на соответствующие стекла в чашках Петри диаметром 35 мм в 2 мл среды. Через 44 ч в среду добавляли BrdU (конечная концентрация 10 мкМ) на 4 ч, после чего клетки фиксировали с помощью параформальдегида при комнатной температуре в течение 10 мин с последующей пермеабиллизацией в растворе 0,1%-го (v/v) Triton X-100 и обработкой 1,5 М HCl. Образцы инкубировали в течение ночи с антителами против BrdU (1/250). Несвязанные антитела отмывали 5× с помощью раствора 0,1%-го (v/v) Tween-20, содержащего 1% (v/v) FBS в PBS. Далее образцы обрабатывали конъюгированными с Су3 вторичными поликлональными антителами (козий анти-крысиный IgG H + L, 1/750) в течение 1 ч при комнатной температуре. Ядра были окрашены Hoechst 33342. Изображения были получены на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 («Nikon Corporation», Япония) и объективом Plan Fluor 40×, 1,3.

**Анализ апоптоза.** Необработанные стекла или пленки, прикрепленные к 23 мм покровным стеклам, помещали на дно чашки Петри, диаметром 35 мм, после чего добавляли  $10^5$  клеток в 2 мл среды. Апоптоз оценивали через 48 ч после посева с помощью конфокальной микроскопии с использованием набора для флуоресцентной микроскопии аннексин V – FITC. Клетки визуализировали на микроскопе Eclipse Ti-E, оборудованном конфокальным модулем A1 («Nikon Corporation», Япония) и объективом Plan Fluor 40×, 1,3.

**Измерение коллагена.** Для оценки количества растворимого коллагена фибробласты линии NIH 3T3 высевали на чашку Петри диаметром 35 мм в количестве  $4 \times 10^4$  в 2 мл культуральной среды. Набор для анализа Sircol [40] использовали для определения количества общего растворимого коллагена через 48 ч после посева.

**Анализ выживаемости клеток.** Клетки высевали на пленки из фиброина или гS1/9, как описано выше. Через 2 дня добавляли 200 мкл раствора МТТ (3-(4,5-диметилтиозол-2-ол)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид, 5 мг/мл в PBS) («Sigma-Aldrich», США) и инкубировали при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 4 ч во влажной атмосфере.

ре. Кристаллы формазана растворяли в ДМСО и колориметрические измерения («Тесан», Швейцария) проводили при 550 нм.

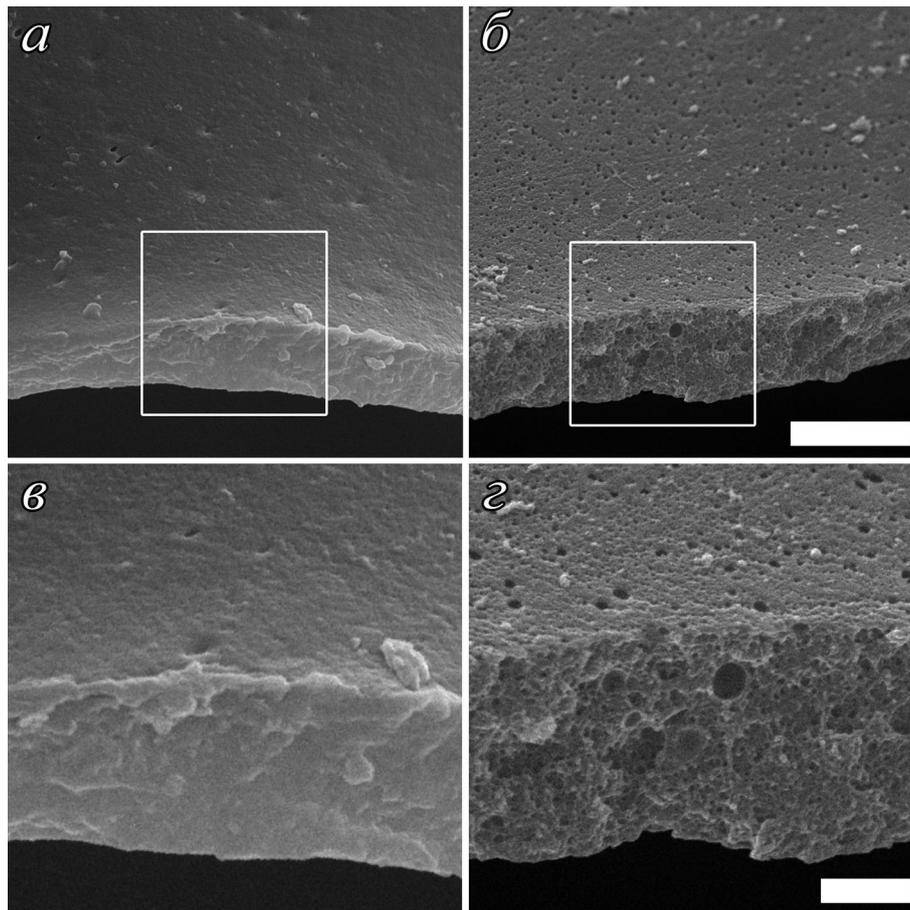
**Иммуноблоттинг.** Клетки линии NIH 3T3 обрабатывали в соответствии с вышеуказанными протоколами, после чего промывали ледяным PBS и лизировали в течение 30 мин на льду в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl, pH 7,4, 1% (v/v) NP-40, 0,1% (m/v) SDS, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, смесь ингибиторов протеаз и 2 мМ фенилметилсульфонилфторида. Концентрацию белка определяли с помощью реагента Брэдфорда [41]. Белки разделяли электрофорезом в RAAG (40 мкг общего белка на лунку) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0,2 мкм. Неспецифические взаимодействия белок–антитело блокировали раствором 5%-го обезжиренного молока в PBS. Мембраны инкубировали в течение 2 ч с первичными антителами против фосфорилированного (Ser536, клон 93Н1) или общего р65 (клон D14E12) и визуализировали с использованием вторичного связанного с пероксидазой хрена анти-кроличь-

его IgG (клон 7074) и реагента с улучшенной хемиллюминесценцией в системе Image Quant LAS 4000 («GE Healthcare», США). Денситометрия иммуноблотов и количественный анализ интенсивностей полос проводили с использованием ImageJ. Интенсивности полос фосфо-р65 были нормализованы на уровень общего р65. Образец «Стекло 5,5 мМ» был взят за 1.

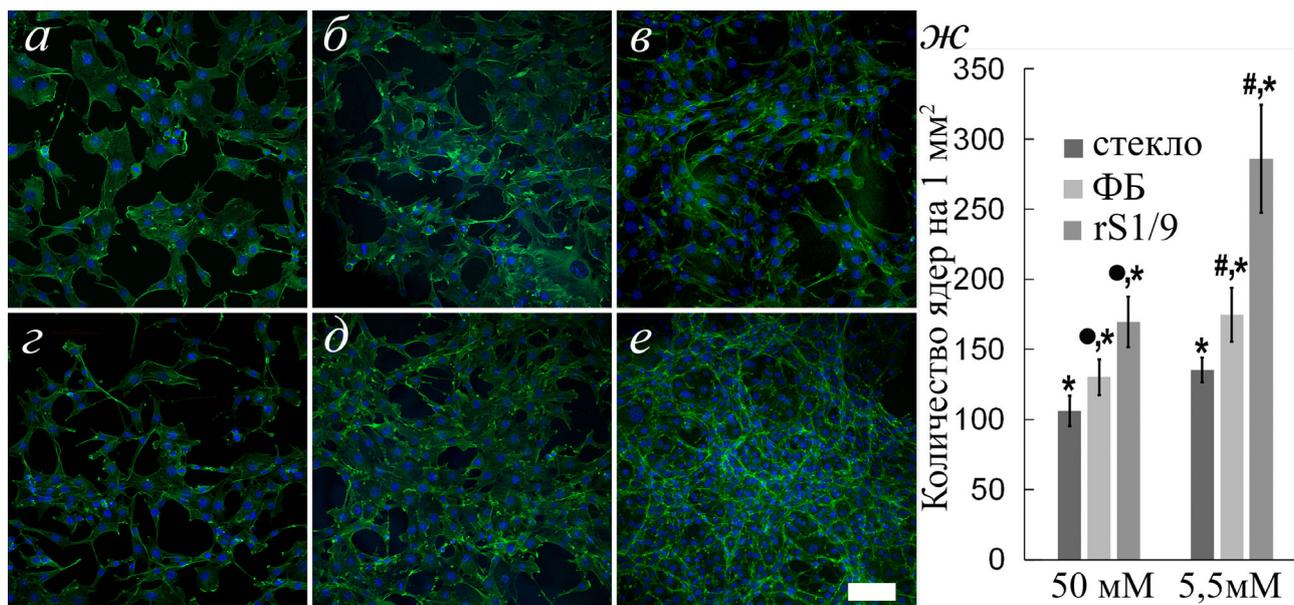
**Статистический анализ.** Данные представлены как среднее из трех повторов  $\pm$  стандартное отклонение. Сравнения проводились с использованием одностороннего теста ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюки (GraphPad Prism 8.2.0; GraphPad Software, Inc.).  $p < 0,05$  между группами считали статистически значимым различием.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Пленки, сформированные из структурных белков шелка.** Пленки были сформированы из фиброина тутового шелкопряда *Bombyx mori* или



**Рис. 1.** СЭМ пленок, образованных фиброином или спидроином rS1/9. *а, в* – Фиброиновая пленка; *б, г* – пленка rS1/9. Белые прямоугольники обозначают расположение увеличенных изображений (*в, г*). Масштаб: *а, б* – 10 мкм; *в, г* – 3 мкм



**Рис. 2.** Плотность клеток на разных подложках в зависимости от концентрации глюкозы. *а–е* – 50 мМ; *з–е* – 5,5 мМ. *а, з* – Стекло; *б, д* – фиброин; *в, е* – rS1/9. Ядра визуализировали с помощью Hoechst 33342 (синий), актиновые филаменты – с Alexa Fluor™ 488 фаллоидином (зелёный). Масштаб – 100 мкм. *ж* – Плотность клеток на разных субстратах в зависимости от концентрации глюкозы. Представлены средние значения ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Парное сравнение показало существенные различия между клетками в среде с низкой и высокой концентрациями глюкозы на различных субстратах шелка (фиброине (ФБ) или спидроине (rS1/9)) и стекле (\* – разница, выявленная при культивировании клеток на одних и тех же субстратах с низким или высоким содержанием глюкозы; • – разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков шелка и стекле в присутствии 50 мМ глюкозы; # – разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков и стекле в присутствии 5,5 мМ глюкозы);  $p < 0,05$ . (С цветными вариантами рис. 2–4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

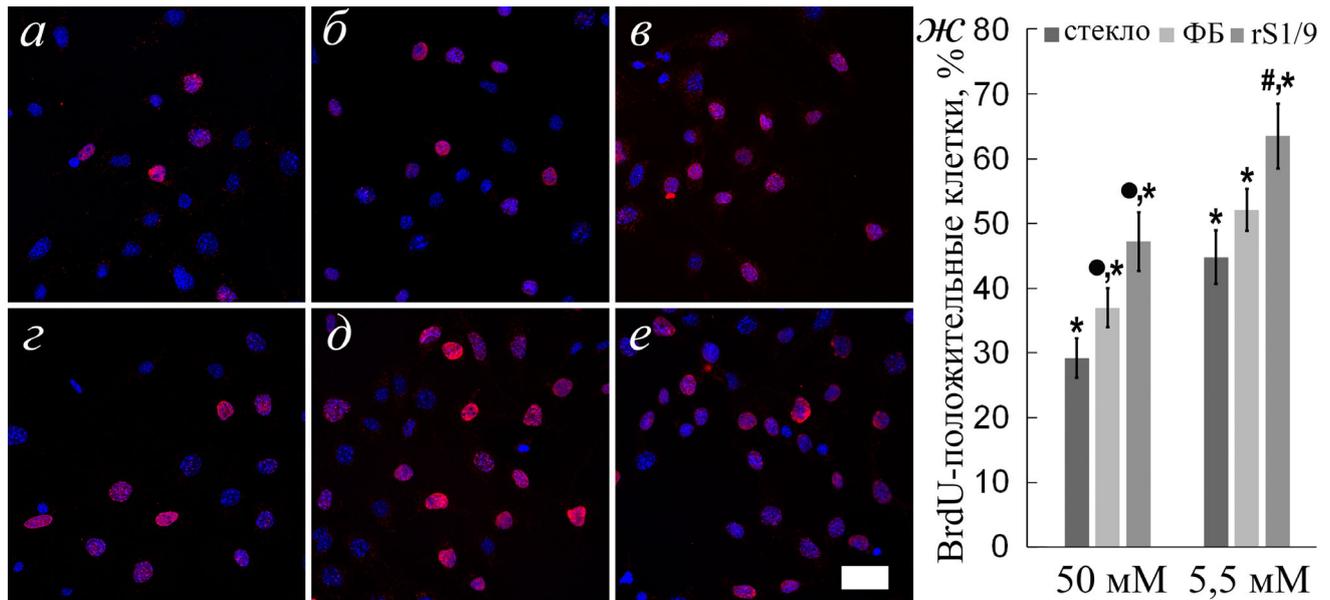
белка rS1/9 – рекомбинантного аналога спидроина 1 *Nephila clavipes* (рис. 1).

Значения толщины пленки составляли 8–10 мкм для фиброина и 10–12 мкм для спидроина (подробности приготовления см. в разделе «Материалы и методы»). Небольшая разница в толщине пленок может быть обусловлена наличием нанопор в структуре спидроиновых пленок. Эти нанопоры сформировались спонтанно, без каких-либо дополнительных реагентов. Отдельные нанопоры открываются на поверхности. Диаметр нанопор составлял 5–25 нм. В пленках из фиброина поверхностных пор обнаружено не было.

**Плотность и пролиферация клеток линии НИН ЗТЗ на пленках из фиброина и спидроина при различных концентрациях глюкозы.** Для моделирования условий старения фибробластов мы оценили влияние высокой концентрации глюкозы на выживаемость клеток, их пролиферацию, а также клеточную и ядерную площади. Клетки наносили на покровные стекла или на биоразлагаемые пленки, сформированные из фиброина или rS1/9, затем подвергали воздействию 50 мМ глюкозы. Для сравнения использовали 5,5 мМ

глюкозу. В 5,5 мМ глюкозе после 72 ч культивирования на стеклах средняя плотность клеток составила  $136 \pm 9$  ядер/мм<sup>2</sup>, тогда как на фиброине эта величина составила  $175 \pm 19$  ядер/мм<sup>2</sup>, а для спидроина этот показатель был еще выше –  $287 \pm 39$  ядер/мм<sup>2</sup> (рис. 2.). При концентрации глюкозы 50 мМ максимальная плотность ( $170 \pm 27$  ядер/мм<sup>2</sup>) была выявлена на пленках из спидроина, а минимальная – на стеклах ( $107 \pm 11$  ядер/мм<sup>2</sup>); плотность клеток на пленках из фиброина составила  $131 \pm 13$  ядер/мм<sup>2</sup>.

Снижение плотности клеток в среде с концентрацией глюкозы 50 мМ было связано с замедленной скоростью клеточной пролиферации. Процент BrdU-положительных клеток был самым низким у фибробластов, культивируемых на стеклах, по сравнению с таким же показателем для клеток, культивируемых на пленках. Пленки из спидроина обуславливали максимальное включение BrdU в ДНК клеток, культивируемых при 50 мМ глюкозы (рис. 3). Кроме того, при концентрации глюкозы 5,5 мМ скорость пролиферации на стекле была низкой, тогда как спидроин обеспечивал условия для самой быстрой пролиферации.



**Рис. 3.** Включение BrdU фибробластами линии NIH 3T3 на разных подложках в присутствии 50 мМ (*a–в*) или 5 мМ (*г–е*) глюкозы. *a, г* – Стекло, *б, д* – фиброин, *в, е* – rS1/9. Красный цвет: окрашивание BrdU; синий цвет: Hoechst 33342 (ядро). Масштаб – 100 мкм. *ж* – Процентное содержание BrdU-положительных клеток на разных подложках в зависимости от концентрации глюкозы. Представлены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Парное сравнение показало существенные различия между клетками в среде с низкой и высокой концентрациями глюкозы на различных субстратах шелка (фиброине (ФБ) или спидроине (rS1/9)) и стекле. \* Разница, выявленная при культивировании клеток на одних и тех же субстратах с низким или высоким содержанием глюкозы; • – разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков шелка и стекле в присутствии 50 мМ глюкозы; # – разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков и стекле в присутствии 5,5 мМ глюкозы;  $p < 0,05$

**Влияние высокого содержания глюкозы на площадь клеток и их ядер.** Площадь клеток и их ядер увеличивалась при культивировании фибробластов линии NIH 3T3 на стекле с 50 мМ глюкозой. Пленки из фиброина частично ослабляли эти эффекты, тогда как на пленках из спидроина влияния высокой концентрации глюкозы обнаружено не было (рис. 4).

**Выживаемость клеток: роль материала пленки и содержания глюкозы.** Воздействие 50 мМ глюкозы на фибробласты линии NIH 3T3 при культивировании на стекле в течение 48 ч существенно увеличивало количество апоптотических клеток, при концентрации глюкозы 5,5 мМ процент ранних апоптотических клеток (аннексин V положительный/пропидий йодид отрицательный) составлял  $1,84 \pm 0,73\%$ , тогда как в 50 мМ глюкозе соответствующие значения составили  $8,31 \pm 2,71\%$  (рис. 5, *a*); количество поздних апоптотических/некротических клеток также увеличивалось в 50 мМ глюкозе (рис. 5, *б*). Количество клеток с маркерами гибели уменьшалось, если фибробласты культивировали на пленках из белков шелка, причем лучший защитный эффект выявляли на спидроине (рис. 5).

Было измерено количество коллагена, продуцируемого фибробластами линии NIH 3T3

после их культивирования в течение 48 ч на разных субстратах в концентрациях глюкозы 5,5 мМ или 50 мМ с применением колориметрического теста, и нормализовано к сигналу МТТ (рис. 6). Первый параметр отражает концентрацию растворимого коллагена, а второй соответствует синтетической активности отдельных клеток.

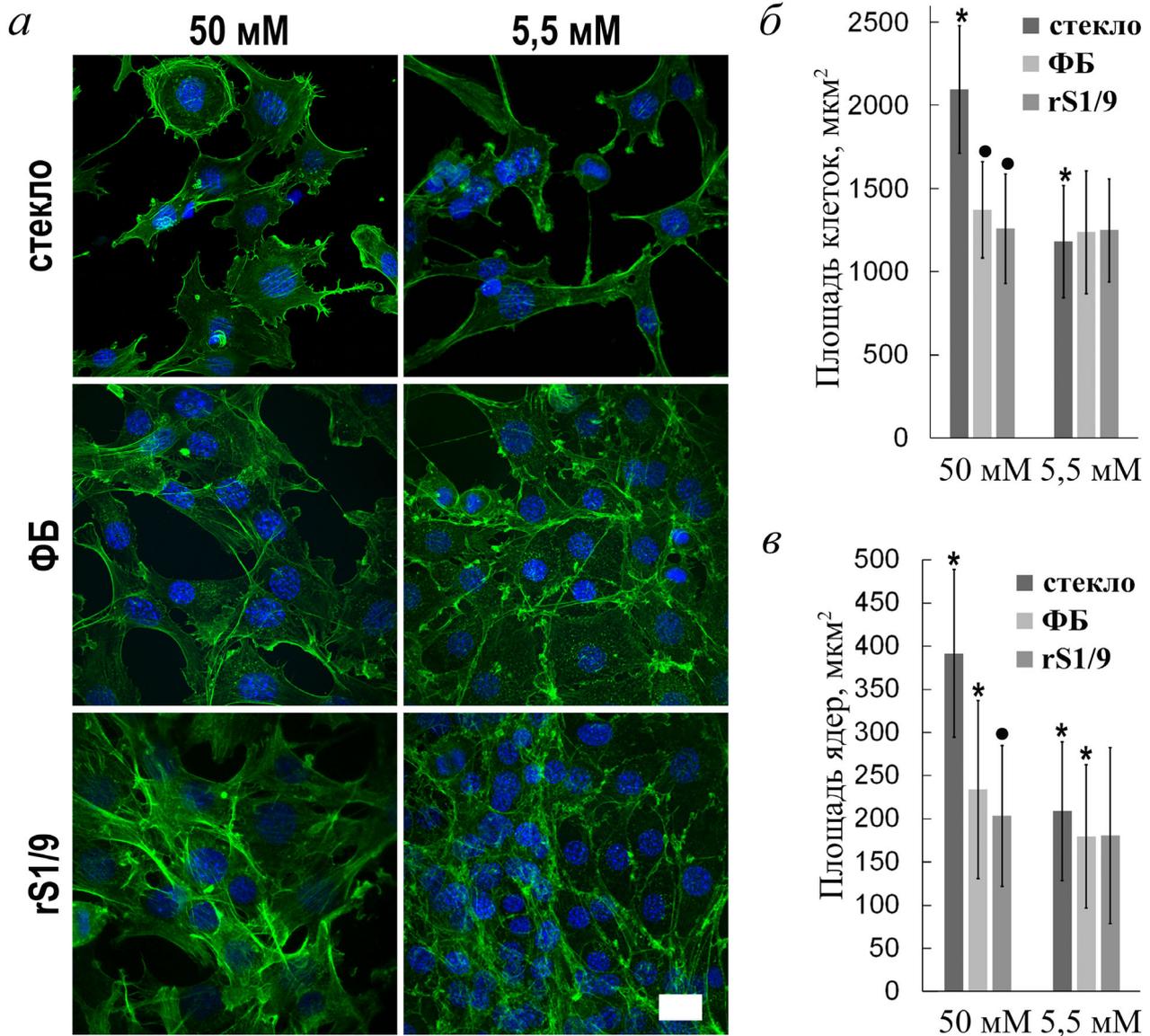
**Дифференциальное влияние концентрации глюкозы на активацию NF-κB в фибробластах линии NIH 3T3, выращенных на пленках из шелка.** Известно, что транскрипционный фактор NF-κB опосредует различные клеточные ответы на внутриклеточные и внеклеточные сигналы [42]. В частности, NF-κB задействован в регуляции адгезии и метаболизма глюкозы. Субъединица p65 гетеродимера NF-κB фосфорилируется по Ser536 с последующей транслокацией в цитоплазму и трансактивацией генов. Добавление 50 мМ глюкозы к фибробластам линии NIH 3T3 привело к заметным различиям в фосфорилировании субъединицы p65, биомаркера активации NF-κB. По аналогии с предыдущими сообщениями [20] количество фосфо-p65 было увеличено в клетках, культивированных на стекле в 50 мМ глюкозе. Кроме того, пленки из разных видов шелка по-разному регулировали фосфорилирование p65:

на пленках из спидроина при концентрации глюкозы как 5,5 мМ, так и 50 мМ были выявлены противоположные эффекты, а фиброин не изменял фосфорилирование р65 в ответ как на низкую, так и на высокую концентрацию глюкозы.

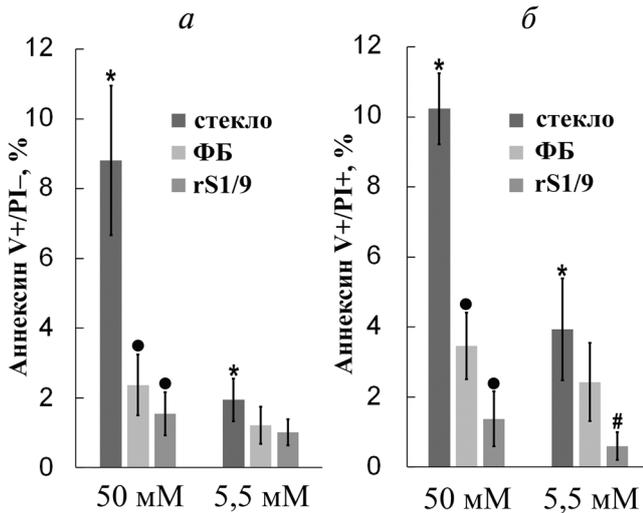
### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**Модель клеточного старения.** При проведении исследований была использована модель

клеточного старения фибробластов при их культивировании в среде с повышенным содержанием глюкозы. Диабет и сопутствующая ему гипергликемия сопровождаются проявлениями клеточного старения. Для установления диагноза сахарный диабет ВОЗ рекомендует ориентироваться на уровень глюкозы в плазме крови натощак  $\geq 7,0$  мМ (126 мг/дл) или при проведении теста с нагрузкой  $\geq 11,1$  мМ (200 мг/дл) в плазме через 2 ч после приема глюкозы [43].



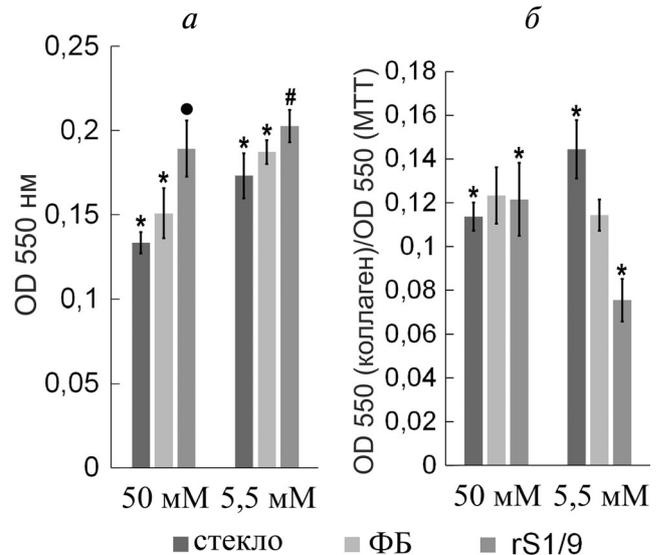
**Рис. 4.** Площадь клеток и их ядер на разных пленках при 50 мМ против 5,5 мМ глюкозы. *а* – Ядра визуализировали с помощью Hoechst 33342 (синий), актиновые микрофиламенты – с Alexa Fluor™ 488 фаллоидином (зеленый). Масштаб – 10 мкм. Средние значения площади клеток (*б*) и ядер (*в*) соответственно. Представлены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Парное сравнение показало существенные различия, (\*) выявленные при культивировании клеток на одних и тех же субстратах (фиброине (ФБ), спидроине (rS1/9) и стекле) с низким или высоким содержанием глюкозы, и (•) разницу, выявленную при культивировании клеток на субстратах из белков шелка и стекле в присутствии 50 мМ глюкозы;  $p < 0,05$



**Рис. 5.** Окрашивание аннексин V/PI фибробластов линии NIH 3T3, выращенных на разных подложках, в зависимости от концентрации глюкозы. *a* – Окрашивание аннексин V+/PI–; *б* – окрашивание аннексин V+/PI+. PI – пропидий йодид. Представлены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Парное сравнение показало существенные различия между клетками в среде с низкой и высокой концентрациями глюкозы на различных субстратах шелка и стекле. \* Разница, выявленная при культивировании клеток на одних и тех же субстратах с низким или высоким содержанием глюкозы; • разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков шелка (фиб्रोине (ФБ) или спидроине (rS1/9)) и стекле в присутствии 50 мМ глюкозы; # разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков и стекле в присутствии 5,5 мМ глюкозы;  $p < 0,05$

Повышение концентрации глюкозы в среде культивирования до 20–50 мМ и выше – основа модели клеточного старения во многих исследованиях, в том числе при индукции старения мышечных фибробластов 3T3 [20], мезенхимальных стволовых клеток крысы [44], фибробластов человека [45], эндотелиальных клеток [46]. При этом гипергликемия является важнейшим фактором старения фибробластов. Такое старение в значительной степени обусловлено образованием конечных продуктов гликирования (AGEs). AGEs – ковалентно связанные соединения, являющиеся продуктами неферментативной реакции между глюкозой и белками или липидами. Повреждающее действие этих реакций проявляется в их способности модифицировать белки, участвующие в образовании фокальных контактов и белки-регуляторы транскрипции генов [47].

Взаимодействие AGEs с рецептором RAGE приводит к активации внутриклеточных сигнальных каскадов и активации транскрипции генов, продукты которых, среди прочих регуля-



**Рис. 6.** Измерение растворимого коллагена. *a* – Колориметрические анализы концентрации коллагена в среде; *б* – значения в *a* нормированы на сигнал МТТ. Представлены средние значения  $\pm$  стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Парное сравнение показало существенные различия между клетками в среде с низкой и высокой концентрациями глюкозы на различных субстратах шелка [фиб्रोине (ФБ) или спидроине (rS1/9)] и стекле (\* разница, выявленная при культивировании клеток на одних и тех же субстратах с низким или высоким содержанием глюкозы; • разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков шелка и стекле в присутствии 50 мМ глюкозы; # разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков и стекле в присутствии 5,5 мМ глюкозы);  $p < 0,05$

торных эффектов, участвуют в формировании фенотипа старения. Кроме того, взаимодействие AGE-RAGE стимулирует генерацию активных форм кислорода (АФК) по пути НАДФН-оксидазы [48]. Блокирование RAGE путей приводит к отмене признаков старения, индуцированных повышенной концентрацией глюкозы в культивируемых фибробластах человека [45].

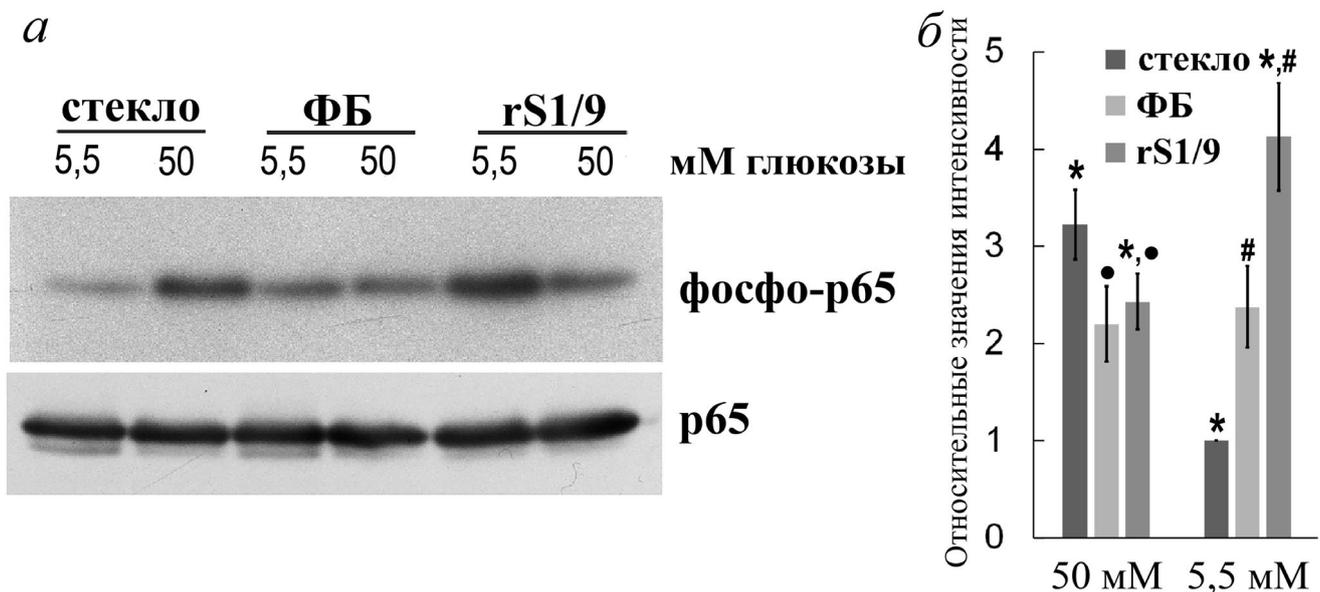
**Роль структурных характеристик спидроиновых пленок в пролиферации и старении фибробластов.** Молекула rS1/9 (94 кДа) содержит 9 мономерных повторов, каждый из которых состоит из 4 первичных аминокислотных повторов, идентичных природному спидроину 1. Первичные повторы обогащены триплетами GGL, GGY и GGQ, а также каждый несет по одному поли-аланиновому участку (5–8 а.о.). Эти блоки образуют  $\beta$ -листы в виде кристаллитов, и именно эти структуры придают уникальную прочность материалам, полученным из спидроина. С другой стороны, растяжения участков между Ala

блоками позволяют материалу быть эластичным. Рассчитанное значение  $pI$  для rS1/9 составляет 10,49. Двадцать девять остатков Arg и отсутствие отрицательно заряженных боковых цепей делают белок rS1/9 поликатионом при физиологических значениях pH [49]. Из-за низкого значения  $pI$  (4,9) фиброин, напротив, заряжен отрицательно в том же диапазоне pH. Во время контакта с питательными средами или биологическими жидкостями поверхности фиброина и других биоматериалов могут быть изменены за счет адсорбции растворимых макромолекул. Такие модификации изменяют свойства поверхности и кардинально влияют на цитосовместимость этих структур [50].

Главной особенностью rS1/9 является его способность самопроизвольно образовывать поры в формируемых из него изделиях. Мы продемонстрировали преимущества пористой структуры скаффолда в модели регенерации кости [33, 34]. В этих материалах сеть макроскопических пор переплетается с более мелкими, микрометровыми. Однако поры нанометрового размера в конструкциях на основе rS1/9 ранее не обнаруживали. Пленки, сформированные из rS1/9 и использованные в настоящем исследовании, имели нанометровые поры (рис. 1). Можно ожидать, что в искусственном ВКМ они

могут быть полезны для газообмена и движения метаболитов [51–53]. Механические характеристики и рельеф поверхности нанопористых материалов могут способствовать необходимой биосовместимости в культуре клеток и в организме. Действительно, хорошая цитосовместимость пленок, сформированных из шелка (рис. 2), подтверждает эту гипотезу. Более того, rS1/9 обеспечивал наилучшие условия для пролиферации клеток, что было определено по включению BrdU (рис. 3).

Среди множества изменений, типичных для стареющих клеток, увеличенный размер является отличительной чертой, связанной с дезорганизацией коллагеновых фибрилл, как следствием активации металлопротеиназ [54]. В культурах стареющие клетки часто бывают крупнее, как показано в моделях старения, вызванного высоким содержанием глюкозы [55], ультрафиолетовым излучением [56], перекисью водорода [57], а также в модели изолированных дермальных фибробластов человека, взятых у доноров молодого и пожилого возраста [58]. Ядра стареющих клеток теряют округлую форму, а их размер увеличивается [59–61]. На стекле при высокой концентрации глюкозы площадь, занимаемая клетками и ядрами (рис. 4), была больше, по сравнению с таковой при низкой концентрации



**Рис. 7.** Влияние концентрации глюкозы на фосфорилирование субъединицы p65 NF-κB в фибробластах NIN 3T3 на различных носителях. *а* – Иммуноблоттинг (данные одного репрезентативного эксперимента из трех с аналогичными результатами); *б* – денситометрия (средние значения ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов). Попарное сравнение показало существенные различия между клетками в среде с низкой и высокой концентрациями глюкозы на различных субстратах шелка [фиб्रोине (ФБ) или спидроине (rS1/9)] и стекле (\* разница, выявленная при культивировании клеток на одних и тех же субстратах с низким или высоким содержанием глюкозы; • разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков шелка и стекле в присутствии 50 мМ глюкозы; # разница, выявленная при культивировании клеток на субстратах из белков и стекле в присутствии 5,5 мМ глюкозы);  $p < 0,05$

глюкозы. При культивировании на производных шелка при 5,5 и 50 мМ глюкозы значения размеров площади клеток были одинаковы. При 50 мМ глюкозы площадь клеток, культивируемых на стекле, выше, чем на пленках из производных шелка. (рис. 4, б). На пленке из фиброина влияние высокого уровня глюкозы на площадь ядер было менее выраженным, чем на стекле; никаких изменений не было обнаружено на спидроине (рис. 4, в). Кроме того, культивирование на пленках из фиброина или спидроина защищало клетки от запрограммированной гибели (рис. 5). Плотность клеток и интенсивность контактных взаимодействий, которые обеспечивают передачу сигналов для реализации запрограммированных механизмов гибели клеток, были выше при культивировании фибробластов на пленках по сравнению с культивированием на необработанных стеклах, однако уровень раннего и позднего апоптоза на пленках был значительно ниже, чем на стекле, как при низких, так и при высоких концентрациях глюкозы. Пленки из rS1/9 были наиболее эффективными и в поддержании выживания фибробластов линии NIH 3T3 (рис. 5). Таким образом, специфическая молекулярная архитектура rS1/9 и особенности трехмерных пленок не только способствуют пролиферации клеток, но и предотвращают появление фенотипа старения (определяемого увеличенным размером клеток и ядер, а также повышенной скоростью апоптоза) в ответ на повышение уровня глюкозы.

**Влияние пленок из rS1/9 на выработку коллагена.** При культивировании фибробластов на rS1/9 в присутствии 50 мМ глюкозы уровень растворимого коллагена на rS1/9 оставался высоким (рис. 6, а). Напротив, на фиброине и на стекле значения поглощения, которые отражают общее количество растворимого коллагена, снижались в присутствии высокой концентрации глюкозы. Эти результаты свидетельствуют о том, что пленка, полученная из спидроина, может поддерживать заживление ран и регенерацию тканей при стрессе, вызванном глюкозой. В таких процессах своевременный синтез ВКМ имеет решающее значение для миграции и дифференцировки клеток. Другое важное наблюдение заключается в том, что спидроин предотвращал гиперсинтез растворимого коллагена при 5,5 мМ глюкозы. При этой концентрации плотность клеток на спидроине была примерно в два раза больше, чем на стекле (рис. 2), тогда как концентрации коллагена отличались незначительно (рис. 6, а). Когда плотность клеток была высокой при физиологическом содержании глюкозы, синтетическая активность фибробластов была наименее выраженной (рис. 6, б). Этот

факт может быть полезен для контроля гиперпластических процессов.

При концентрации глюкозы 50 мМ и низкой плотности клеток количество растворимого коллагена, нормализованного по сигналу МТТ (как определено по значениям поглощения), было аналогично соответствующим значениям для фибробластов, культивируемых при концентрации глюкозы 5,5 мМ (рис. 6 а). Эти результаты полностью подтверждают наши ранние данные об антифиброзных свойствах фиброина и спидроина: у эмбриональных фибробластов мыши (MEF) растворимый фиброин или rS1/9 значительно подавляли экспрессию генов *Ctgf* и *Fgf2* [33]. Известно, что белки, кодируемые этими генами, способствуют фиброзу во время заживления раны на коже [62]. Кроме того, пониженная экспрессия *Ctgf* и *Fgf2* была продемонстрирована в MEF, культивируемых на микрогелях, содержащих rS1/9, и на микрочастицах, изготовленных из фиброина и желатина. Подкожная имплантация этих микрогелей ускоряла процесс заживления. Важно отметить, что микрогели предотвращали образование рубцов и способствовали регенерации полнослойной раны кожи [36, 63].

**NF-κB как молекулярный сенсор высокого содержания глюкозы: роль фиброина и спидроина.** Ряд исследований показал активацию NF-κB в моделях старения [28, 42, 64,]. P65 накапливается в ядрах стареющих клеток во время старения, вызванного онкогенной экспрессией, повреждением ДНК [59] или повышенными концентрациями глюкозы [42]. Активация NF-κB во время старения необходима для формирования связанного со старением секреторного фенотипа (SASP), а также управляет возрастными симптомами у мышей в модели прогерии [28]. Фосфорилирование субъединицы p65 транскрипционного фактора NF-κB при 50 мМ глюкозы на стекле соответствует предполагаемой роли этого механизма в ответ на увеличение концентрации глюкозы. В противоположность этому, 50 мМ глюкозы не оказали влияния на количество фосфо-p65 при культивировании на фиброине. Спидроиновая пленка имела противоположный эффект, а именно, при 50 мМ количество фосфо-p65 было меньше, чем при 5,5 мМ (рис. 7). Никаких изменений в количестве общего p65 обнаружено не было, что указывает на то, что разные концентрации глюкозы и разные клеточные подложки влияют на специфическую активацию этого сигнального пути. Интересно, что аттенуированное фосфорилирование p65 на спидроине сопровождалось выраженным влиянием этой пленки на снижение значений параметров старения, таких как пло-

щадь клеток и их ядер, скорость пролиферации и жизнеспособность. Кроме того, меньшее количество фосфо-p65 коррелировало с ограниченной продукцией растворимого коллагена на спидроине. Остается выяснить, связаны ли эти явления и фосфорилирование p65. Независимо от механизма, ослабленная активация p65 на пленках rS1/9 при концентрации глюкозы 50 мМ может быть полезной для предотвращения воспалительных реакций в коже, что дополнительно подтверждает терапевтическую применимость этого биоматериала.

Биосовместимые пленки, сформированные из структурных белков фиброина шелка и спидроина, поддерживали пролиферацию и выживание мышечных фибробластов и по некоторым маркерам ослабляли изменения, ассоциированные с клеточным старением, вызванным повышенным содержанием глюкозы. Уникальные молекулярные свойства рекомбинантного спидроина, в частности его способность самопроизвольно образовывать нанопоры во время фор-

мирования пленок, делают этот полимер перспективным для дальнейшего развития тканевых заменителей кожи и инструментов для замедления старения.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований [проекты №№ 17-00-00359 (17-00-00356, 17-00-00357 и 17-00-00358) и 18-34-00875].

**Благодарности.** Работа выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского Университета и на оборудовании ЦКП Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- West, M. D., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. (1989) Replicative senescence of human skin fibroblasts correlates with a loss of regulation and overexpression of collagenase activity, *Exp. Cell Res.*, **184**, 138-147.
- Stadelmann, W. K., Digenis, A. G., and Tobin, G. R. (1998) Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds, *Am. J. Surg.*, **176**, 26S-38S.
- Mekkes, J. R., Loots, M. A. M., Van Der Wal, A. C., and Bos, J. D. (2003) Causes, investigation and treatment of leg ulceration, *Br. J. Dermatol.*, **148**, 388-401.
- Bellin, C., De Wiza, D. H., Wiernsperger, N. F., and Rösen, P. (2006) Generation of reactive oxygen species by endothelial and smooth muscle cells: influence of hyperglycemia and metformin, *Horm. Metab. Res.*, **38**, 732-739.
- Beauchef, G., Bigot, N., Kypriotou, M., Renard, E., Porée, B., Widom, R., Domp martin-Blanchere, A., Oddos, T., Maquart, F. X., Demoor, M., Boumediene, K., and Galera, P. (2012) The p65 subunit of NF- $\kappa$ B inhibits COL1A1 gene transcription in human dermal and scleroderma fibroblasts through its recruitment on promoter by protein interaction with transcriptional activators (c-Krox, Sp1, and Sp3), *J. Biol. Chem.*, **287**, 3462-3478.
- Fisher, G. J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., and Voorhees, J. J. (2002) Mechanisms of photoaging and chronological skin aging, *Arch. Dermatol.*, **138**, 1462-1470.
- Fisher, G. J., Quan, T., Purohit, T., Shao, Y., Moon, K. C., He, T., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J. J. (2009) Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevation of matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin, *Am. J. Pathol.*, **174**, 101-114.
- Cole, M. A., Quan, T., Voorhees, J. J., and Fisher, G. J. (2018) Extracellular matrix regulation of fibroblast function: redefining our perspective on skin aging, *J. Cell Commun. Signal.*, **12**, 35-43.
- Dyer, D. G., Dunn, J. A., Thorpe, S. R., Bailie, K. E., Lyons, T. J., McCance, D. R., and Baynes, J. W. (1993) Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging, *J. Clin. Invest.*, **91**, 2463-2469.
- Hadley, J. C., Meek, K. M., and Malik, N. S. (1998) Glycation changes the charge distribution of type I collagen fibrils, *Glycoconj. J.*, **15**, 835-840.
- Phillip, J. M., Aifuwa, I., Walston, J., and Wirtz, D. (2015) The mechanobiology of aging, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **17**, 113-141.
- Shanbhag, S., Nayak, A., Narayan, R., and Nayak, U. Y. (2019) Anti-aging and sunscreens: paradigm shift in cosmetics, *Adv. Pharm. Bull.*, **9**, 348-359.
- Matsuyama, M., WuWong, D. J., Horvath, S., and Matsuyama, S. (2019) Epigenetic clock analysis of human fibroblasts *in vitro*: effects of hypoxia, donor age, and expression of hTERT and SV40 large T, *Aging (Albany NY)*, **11**, 3012-3022.
- Yan, L.-J. (2014) Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress, *J. Diabetes Res.*, **2014**, 1-11.
- Campos, C. (2012) Chronic hyperglycemia and glucose toxicity: pathology and clinical sequelae, *Postgrad. Med.*, **124**, 90-97.

16. Safi, S. Z., Qvist, R., Kumar, S., Batumalaie, K., and Ismail, I. S. B. (2014) Molecular mechanisms of diabetic retinopathy, general preventive strategies, and novel therapeutic targets, *Biomed Res. Int.*, **2014**, 801269.
17. Sun, Q., Li, J., and Gao, F. (2014) New insights into insulin: the anti-inflammatory effect and its clinical relevance, *World J. Diabetes*, **5**, 89-96.
18. Geraldès, P., and King, G. L. (2010) Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications, *Circ. Res.*, **106**, 1319-1331.
19. Groop, P.-H., Forsblom, C., and Thomas, M. C. (2005) Mechanisms of disease: pathway-selective insulin resistance and microvascular complications of diabetes, *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.*, **1**, 100-110.
20. Soydas, T., Yaprak Sarac, E., Cinar, S., Dogan, S., Solakoglu, S., Tuncdemir, M., and Kanigur Sultuybek, G. (2018) The protective effects of metformin in an *in vitro* model of aging 3T3 fibroblast under the high glucose conditions, *J. Physiol. Biochem.*, **74**, 273-281.
21. Li, B., Bian, X., Hu, W., Wang, X., Li, Q., Wang, F., Sun, M., Ma, K., Zhang, C., Chang, J., and Fu, X. (2020) Regenerative and protective effects of calcium silicate on senescent fibroblasts induced by high glucose, *Wound Repair Regen.*, **28**, 315-325.
22. Maeda, M., Hayashi, T., Mizuno, N., Hattori, Y., and Kuzuya, M. (2015) Intermittent high glucose implements stress-induced senescence in human vascular endothelial cells: role of superoxide production by NADPH oxidase, *PLoS One*, **10**, e0123169.
23. Christian, F., Smith, E., and Carmody, R. (2016) The regulation of NF- $\kappa$ B subunits by phosphorylation, *Cells*, **5**, 12.
24. Wei, W., and Ji, S. (2018) Cellular senescence: molecular mechanisms and pathogenicity, *J. Cell. Physiol.*, **233**, 9121-9135.
25. Zhang, L., Yousefzadeh, M. J., Suh, Y., Niedernhofer, L. J., and Robbins, P. D. (2019) Signal transduction, ageing and disease, *Subcell Biochem.*, **91**, 227-247.
26. Zhang, W.-S., Pan, A., Zhang, X., Ying, A., Ma, G., Liu, B.-L., Qi, L.-W., Liu, Q., and Li, P. (2019) Inactivation of NF- $\kappa$ B2 (p52) restrains hepatic glucagon response via preserving PDE4B induction, *Nat. Commun.*, **10**, 4303.
27. Soria-Valles, C., López-Soto, A., Osorio, F. G., and López-Otín, C. (2017) Immune and inflammatory responses to DNA damage in cancer and aging, *Mech. Ageing Dev.*, **165**, 10-16.
28. Tilstra, J. S., Robinson, A. R., Wang, J., Gregg, S. Q., Clauson, C. L., Reay, D. P., Nasto, L. A., St Croix, C. M., Usas, A., Vo, N., Huard, J., Clemens, P. R., Stolz, D. B., Guttridge, D. C., Watkins, S. C., Garinis, G. A., Wang, Y., Niedernhofer, L. J., and Robbins, P. D. (2012) NF- $\kappa$ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice, *J. Clin. Invest.*, **122**, 2601-2612.
29. Sheikh, F. A., Ju, H. W., Lee, J. M., Moon, B. M., Park, H. J., Lee, O. J., Kim, J. H., Kim, D. K., and Park, C. H. (2015) 3D electrospun silk fibroin nanofibers for fabrication of artificial skin, *Nanomedicine*, **11**, 681-691.
30. Teplenin, A., Krashennikova, A., Agladze, N., Sidoruk, K., Agapova, O., Agapov, I., Bogush, V., and Agladze, K. (2015) Functional analysis of the engineered cardiac tissue grown on recombinant spidroin fiber meshes, *PLoS One*, **10**, e0121155.
31. Сидорук К. В., Давыдова Л. И., Козлов Д. Г., Губайдуллин И. И., Глазунов А. В., Богуш В. Г., Дебабов В. Г. (2014) Оптимизация ферментации штамма *Saccharomyces cerevisiae* – продуцента рекомбинантного спидроина 1f9, *Биотехнология*, **30**, 27-35.
32. Богуш В. Г., Сидорук К. В., Молчан О. К., Птицын Л. Р., Альтман И. Б., Козлов Д. Г., Ефремов Б. Д., Беневоленский С. В., Агапов И. И., Машко С. В., Дебабов В. Г. (2001) Молекулярное клонирование и экспрессия в дрожжах синтетических генов белков-аналогов белка каркасной нити спидроина 1, *Биотехнология*, **2**, 11-22.
33. Moisenovich, M. M., Pustovalova, O. L., Arhipova, A. Yu., Vasiljeva, T. V., Sokolova, O. S., Bogush, V. G., Debafov, V. G., Sevastianov, V. I., Kirpichnikov, M. P., and Agapov, I. I. (2010) *In vitro* and *in vivo* biocompatibility studies of a recombinant analogue of spidroin 1 scaffolds, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **96**, 125-131.
34. Moisenovich, M. M., Pustovalova, O., Shackelford, J., Vasiljeva, T. V., Druzhinina, T. V., Kamenchuk, Y. A., Guzeev, V. V., Sokolova, O. S., Bogush, V. G., Debafov, V. G., Kirpichnikov, M. P., and Agapov, I. I. (2012) Tissue regeneration *in vivo* within recombinant spidroin 1 scaffolds, *Biomaterials*, **33**, 3887-3898.
35. Мойсенович М. М., Малюченко Н. В., Архипова А. Ю., Котлярова М. С., Давыдова Л. И., Гончаренко А. В., Агапова О. И., Друцкая М. С., Богуш В. Г., Агапов И. И., Дебабов В. Г., Кирпичников М. П. (2015) Новые 3D-микроносители из рекомбинантного спидроина для использования в регенеративной медицине, *Доклады Академии наук*, **463**, 479-482.
36. Nosenko, M. A., Moysenovich, A. M., Zvartsev, R. V., Arkhipova, A. Y., Zhdanova, A. S., Agapov, I. I., Vasilieva, T. V., Bogush, V. G., Debafov, V. G., Nedospasov, S. A., Moisenovich, M. M., and Drutskaya, M. S. (2018) Novel biodegradable polymeric microparticles facilitate scarless wound healing by promoting re-epithelialization and inhibiting fibrosis, *Front. Immunol.*, **9**, 1-11.
37. Bessonov, I., Moysenovich, A., Arkhipova, A., Ezernitskaya, M., Efremov, Y., Solodilov, V., Timashev, P., Shaytan, K., Shtil, A., and Moisenovich, M. (2020) The mechanical properties, secondary structure, and osteogenic activity of photopolymerized fibroin, *Polymers*, **12**, 646.
38. Bessonov, I. V., Rochev, Y. A., Arkhipova, A. Y., Kopitsyna, M. N., Bagrov, D. V., Karpushkin, E. A., Bibikova, T. N., Moysenovich, A. M., Soldatenko, A. S., Nikishin, I. I., Kotliarova, M. S., Bogush, V. G., Shaitan, K. V., and Moisenovich, M. M. (2019) Fabrication of hydrogel scaffolds via photocrosslinking of methacrylated silk fibroin, *Biomed. Mater.*, **14**, 034102.
39. Baker, B. M., Trappmann, B., Wang, W. Y., Sakar, M. S., Kim, I. L., Shenoy, V. B., Burdick, J. A., and Chen, C. S. (2015) Cell-mediated fibre recruitment drives extracellular matrix mechanosensing in engineered fibrillar microenvironments, *Nat. Mater.*, **14**, 1262-1268.

40. Lodder, E. M., Scicluna, B. P., Beekman, L., Arends, D., Moerland, P. D., Tanck, M. W. T., Adriaens, M. E., and Bezzina, C. R. (2014) Integrative genomic approach identifies multiple genes involved in cardiac collagen deposition, *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **7**, 790-798.
41. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
42. Zhang, Q., Lenardo, M. J., and Baltimore, D. (2017) 30 Years of NF- $\kappa$ B: a blossoming of relevance to human pathobiology, *Cell*, **168**, 37-57.
43. World Health Organization and International Diabetes Federation (2006) Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia: report of a WHO/IDF consultation, *World Health Organization*.
44. Zhang, D., Lu, H., Chen, Z., Wang, Y., Lin, J., Xu, S., Zhang, C., Wang, B., Yuan, Z., Feng, X., Jiang, X., and Pan, J. (2017) High glucose induces the aging of mesenchymal stem cells via Akt/mTOR signaling, *Mol. Med. Rep.*, **16**, 1685-1690.
45. Bian, X., Li, B., Yang, J., Ma, K., Sun, M., Zhang, C., and Fu, X. (2020). Regenerative and protective effects of dMSC-sEVs on high-glucose-induced senescent fibroblasts by suppressing RAGE pathway and activating Smad pathway, *Stem Cell Res. Ther.*, **11**, 166.
46. Khemais-Benkhiat, S., Belcastro, E., Idris-Khodja, N., Park, S. H., Amoura, L., Abbas, M., Auger, C., Kessler, L., Mayoux, E., Toti, F., and Schini-Kerth, V. B. (2020) Angiotensin II-induced redox-sensitive SGLT1 and 2 expression promotes high glucose-induced endothelial cell senescence, *J. Cell. Mol. Med.*, **24** 2109-2122.
47. Stirban, A., Gawlowski, T., and Roden, M. (2013) Vascular effects of advanced glycation endproducts: clinical effects and molecular mechanisms, *Mol. Metab.*, **3**, 94-108.
48. Chen, J. H., Lin, X., Bu, C., and Zhang, X. (2018). Role of advanced glycation end products in mobility and considerations in possible dietary and nutritional intervention strategies, *Nutr. Metab.*, **15**, 72.
49. Bogush, V. G., Sokolova, O. S., Davydova, L. I., Klinov, D. V., Sidoruk, K. V., Esipova, N. G., Neretina, T. V., Orchanskyi, I. A., Makeev, V. Y., Tumanyan, V. G., Shaitan, K. V., Debabov, V. G., and Kirpichnikov, M. P. (2009) A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins, *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **4**, 17-27.
50. Schmidt, D. R., Waldeck, H., and Kao, W. J. (2009) Protein adsorption to biomaterials, in: *Biological Interactions on Materials Surfaces* (Puleo, D., and Bizios, R., eds.) Springer, New York, NY.
51. Gao, C., Peng, S., Feng, P., and Shuai, C. (2017) Bone biomaterials and interactions with stem cells, *Bone Res.*, **5**, 17059.
52. Haugh, M. G., Murphy, C. M., and O'Brien, F. J. (2010) Novel freeze-drying methods to produce a range of collagen-glycosaminoglycan scaffolds with tailored mean pore sizes, *Tissue Eng. Part C Methods*, **16**, 887-894.
53. Sai, K. P., and Babu, M. (2000) Collagen based dressings – a review, *Burns*, **26**, 54-62.
54. Tu, Y., and Quan, T. (2016) Oxidative stress and human skin connective tissue aging, *Cosmetics*, **3**, 1-12.
55. Hang, W., He, B., Chen, J., Xia, L., Wen, B., Liang, T., Wang, X., Zhang, Q., Wu, Y., Chen, Q., and Chen, J. (2018) Berberine ameliorates high glucose-induced cardiomyocyte injury via AMPK signaling activation to stimulate mitochondrial biogenesis and restore autophagic flux, *Front. Pharmacol.*, **9**, 1121.
56. Chen, W., Kang, J., Xia, J., Li, Y., Yang, B., Chen, B., Sun, W., Song, X., Xiang, W., Wang, X., Wang, F., Wan, Y., and Bi, Z. (2008) p53-related apoptosis resistance and tumor suppression activity in UVB-induced premature senescent human skin fibroblasts, *Int. J. Mol. Med.*, **21**, 645-653.
57. Chen, Q. M., Tu, V. C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O., and Dilley, T. (2000) Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide, *J. Cell Sci.*, **113**, 4087-4097.
58. Bentov, I., Damodarasamy, M., Plymate, S., and Reed, M. J. (2014) Decreased proliferative capacity of aged dermal fibroblasts in a three dimensional matrix is associated with reduced IGF1R expression and activation, *Biogerontology*, **15**, 329-337.
59. Beausejour, C. M. (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways, *EMBO J.*, **22**, 4212-4222.
60. Mehta, I. S., Figgitt, M., Clements, C. S., Kill, I. R., and Bridger, J. M. (2007) Alterations to nuclear architecture and genome behavior in senescent cells, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1100**, 250-263.
61. Zhang, R., Chen, W., and Adams, P. D. (2007) Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci, *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 2343-2358.
62. Chujo, S., Shirasaki, F., Kondo-Miyazaki, M., Ikawa, Y., and Takehara, K. (2009) Role of connective tissue growth factor and its interaction with basic fibroblast growth factor and macrophage chemoattractant protein-1 in skin fibrosis, *J. Cell. Physiol.*, **220**, 189-195.
63. Arkhipova, A. Y., Nosenko, M. A., Malyuchenko, N. V., Zvartsev, R. V., Moisenovich, A. M., Zhdanova, A. S., Vasil'eva, T. V., Gorshkova, E. A., Agapov, I. I., Drutskaya, M. S., Nedospasov, S. A., and Moisenovich, M. M. (2016) Effects of fibroin microcarriers on inflammation and regeneration of deep skin wounds in mice, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1251-1260.
64. Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J. E., Premsrirut, P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C. S., Kogan, S. C., and Lowe, S. W. (2011) Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- $\kappa$ B promotes senescence and enhances chemosensitivity, *Genes Dev.*, **25**, 2125-2136.

## RECOMBINANT SPIDROIN FILMS ATTENUATE INDIVIDUAL MARKERS OF GLUCOSE INDUCED AGING IN NIH 3T3 FIBROBLASTS

A. M. Moysenovich<sup>1#</sup>, M. M. Moisenovich<sup>1\*#</sup>, A. K. Sudina<sup>1</sup>, V. V. Tatarskiy<sup>2,3,4</sup>,  
A. I. Khamidullina<sup>3</sup>, M. A. Yastrebova<sup>3</sup>, L. I. Davydova<sup>5,6</sup>, V. G. Bogush<sup>5,6</sup>, V. G. Debabov<sup>5,6</sup>,  
A. Yu. Arkhipova<sup>1,7</sup>, K. V. Shaitan<sup>1,8</sup>, A. A. Shtil<sup>2,3</sup>, and I. A. Demina<sup>1,9</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia; E-mail: mmoisenovich@mail.ru

<sup>2</sup> Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 115478 Moscow, Russia

<sup>3</sup> Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

<sup>4</sup> National University of Science and Technology "MISIS", 119049 Moscow, Russia

<sup>5</sup> NRC "Kurchatov Institute" – GOSNIIGENETIKA, 117545 Moscow, Russia

<sup>6</sup> NRC "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia

<sup>7</sup> Moscow Regional Research and Clinical Institute (MONIKI), 129110 Moscow, Russia

<sup>8</sup> Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

<sup>9</sup> Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology,  
Oncology and Immunology, 117198 Moscow, Russia

Received March 28, 2020

Revised May 15, 2020

Accepted May 22, 2020

The effect of bioresorbable materials on aging in cultured mouse NIH 3T3 fibroblasts treated with elevated glucose concentration was investigated. The cells were grown on films produced from the silkworm fibroin and rS1/9, a recombinant analog of *Nephila clavipes* spidroin 1. Exposure to 50 mM glucose of the cells grown on uncoated glass support resulted in the cell growth retardation. The average areas of the cells and nuclei and the percentage of apoptotic cells increased, whereas the amount of soluble collagen decreased. In contrast, on the fibroin and spidroin films, the cell density and the percentage of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-positive cells were higher vs. the cells grown on the glass support. The films protected NIH 3T3 fibroblasts from the glucose-induced death. The most prominent effects on the cell density, BrdU incorporation, and apoptosis prevention were observed in the cells cultured on spidroin films. Unlike the cells grown on glass support (decrease in the soluble collagen production) or fibroin (no effect), production of soluble collagen by the cells grown on spidroin films increased after cell exposure to 50 mM glucose. Molecular analysis demonstrated that 50 mM glucose upregulated phosphorylation of the NFκB heterodimer p65 subunit in the cells grown on the glass support. The treatment of cells grown on fibroin films with 5.5 mM or 50 mM glucose had no effect on p65 phosphorylation. The same treatment decreased p65 phosphorylation in the cells on the spidroin films. These results demonstrate the anti-aging efficacy of biomaterials derived from the silk proteins and suggest that spidroin is more advantageous for tissue engineering and therapy than fibroin.

**Keywords:** cell aging, recombinant spidroin, regeneration, artificial skin

УДК 577.23

## ЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ КАБЕЛИ КЛЕТОК. I. ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ ВДОЛЬ СОПРЯГАЮЩИХ МЕМБРАН

### Обзор

© 2020 В.В. Птушенко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: ptush@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup> Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.05.2020

После доработки 14.06.2020

Принята к публикации 15.06.2020

Полвека назад была предложена концепция «электрических кабелей» клетки, участвующих в её биоэнергетических процессах [Skulachev, V. P. (1971) *Curr. Top. Bioenerg.*, Elsevier, p. 127–190]. В качестве претендентов на эту роль рассматривались мембранные структуры клетки. Последующие исследования показали, что исполнять роль электрических кабелей могут сопрягающие мембраны, то есть те же структуры, которые служат для генерации мембранного потенциала (внутренние мембраны митохондрий, плазмалемма бактерий). Почти во всех крупных систематических группах были обнаружены организмы, реализующие энергопередающую функцию сопрягающих мембран. Были найдены «кабельные» структуры макроскопических размеров (порядка миллиметров или даже сантиметров). Среди наиболее ярких примеров – гигантские митохондрии некоторых одноклеточных организмов (водорослей, грибов и простейших) и клеток ряда тканей животных; нитчатые митохондрии; митохондриальный ретикулум мышечной ткани животных; трихомы цианобактерий. Значение «электрических кабелей» для клетки или многоклеточного образования определяется возможностью быстрого обмена с их помощью энергией между энергопроизводящими и энергопотребляющими участниками метаболизма, в то время как диффузионный путь передачи растворимых макроэргов (АТФ и др.) потребовал бы несопоставимо большего времени. Однако в последние 10–15 лет был обнаружен новый тип «электрических кабелей» живой клетки, предположительно белковой природы, и решающих иные задачи в биоэнергетической системе клетки. Строение и функции кабелей этого типа будут рассмотрены во второй части обзора (Электрические кабели клеток. II. Бактериальные электронные проводники).

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** трансмембранный электрохимический потенциал, митохондрии, хлоропласты, цианобактерии, стромулы, нанопровода.

DOI: 10.31857/S0320972520070106

### ВВЕДЕНИЕ

Началом электробиологии считается открытие Луиджи Гальвани «животного электричества» в 1786 году [1]. За ним последовала долгая история сомнений, опровержений, признания и дальнейшего развития. Триумфом электробиологии можно считать построение к 1952 г. математической модели Ходжкина–Хаксли, описавшей генерацию и распространение потенциалов действия в нервных клетках, электрических проводах многоклеточного эукариотического организма [2]. Используя аналогию с техникой, эти провода, по которым передаётся управляющий (эфферентный) или сенсорный (афферент-

ный) сигнал, можно было бы назвать сигнальными проводами (кабелями).

В то же время вопрос о возможности «силовых кабелей» в живых организмах был бессмыслен до появления представления о существовании в них электрической формы энергии. Основу для её поисков дала предложенная П. Митчеллом в 1961 г. хемиосмотическая гипотеза (позже ставшая теорией) окислительного фосфорилирования [3]. В соответствии с этой гипотезой, биологическое окисление (дыхание) и фосфорилирование сопряжены через образование трансмембранного электрохимического протонного потенциала ( $\Delta\mu_{H^+}$ ). Следовательно, как химическая, так и электрическая компоненты протондвижущей силы являются формами запасённой энергии для клетки [4]. Доказательство существования митохондриального трансмембранного потенциала было получено в

Принятые сокращения: GFP – зелёный флуоресцентный белок (green fluorescent protein);  $\Delta\mu_{H^+}$  – трансмембранный протонный электрохимический потенциал; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

1969 г. с применением синтетических проникающих ионов [5], позже названных Д. Грином «ионами Скулачева» [6].

Открытие «митохондриального электричества» привело одного из его авторов, В.П. Скулачева, к предположению, что мембраны могут служить не только для генерации электрохимического потенциала, но и для его передачи между пространственно отдалёнными генератором и потребителем [7]. Тем самым в биологии появилось представление о «живых» электрических проводах, осуществляющих передачу энергии, т.е. о «силовых кабелях» живого организма. Эта концепция транспорта электрической энергии клетки вдоль мембран, отмечая в будущем году свой полувековой юбилей, получила в последующие годы своё подтверждение и, более того, обнаружила свою универсальность — «электрические кабели» оказались характерными для представителей всех основных групп живого мира: для растений, животных, простейших и бактерий [8].

В последние годы концепция электрических кабелей клетки неожиданно получила новое развитие: в 2005 г. были обнаружены «нанопровода» у некоторых металл- и сульфатредуцирующих бактерий, передающие электрический ток на расстояния порядка единиц-десятков микрометров [9]. А спустя ещё пять лет, в 2010 г. была открыта новая группа бактерий, получивших название «кабельных» [10]. Многоклеточные кабельные бактерии способны передавать электрический ток на макроскопические расстояния (порядка сантиметров). Однако функции электрического тока в этих бактериальных проводах оказались отличными от известных ранее «сигнальной» и «энергетической». Электрический ток в данном случае связывал не регулятор и эффектор, не генератор и потребитель мощности, а элементы самого генератора — компоненты дыхательной цепи, разнесённые друг от друга на расстояния, на порядки превышающие обычные расстояния между ними в митохондриальной или бактериальной плазматической мембране. Но ещё более удивительной оказалась природа этого «внутригенераторного» электрического тока: его распространение происходит не по мембране, а по белковым фибриллам [11, 12].

Несмотря на то, что полного понимания строения нанопроводов и механизма их проводимости ещё нет, «тройной юбилей» концепции «биологических кабелей» даёт основание сделать обзор основных вех в исследованиях в этой области. В настоящей статье мы подробно рассмотрим зарождение, обоснование и примеры реализации концепции энергетических электрических кабелей клетки с участием сопрягаю-

щих мембран. В следующей статье (Электрические кабели клеток. II. Бактериальные электронные проводники), продолжающей данный обзор, будет рассказано об имеющихся к настоящему времени данных о функциях и организации электропроводящего аппарата «электрогенных» бактерий, «кабельных» бактерий и функционально близких к ним организмов.

## МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ КАБЕЛИ

В 1969 г. группа В.П. Скулачева и Е.А. Либермана экспериментально показала наличие электрохимического протонного трансмембранного потенциала ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) в митохондриях (более 200 мВ, электрическая компонента не менее 180 мВ) [5]. Это открытие не только давало ключевое доказательство хемиосмотической гипотезы Митчелла, в соответствии с которой протонный потенциал служил промежуточным продуктом при окислительном фосфорилировании [4], но и меняло представление о взаимосвязи генераторов энергии клетки между собой и с её потребителями. Так, возможность распространения по мембране энергии, полученной в ходе биологического окисления, в форме электрохимического потенциала должна была «связать в единую систему тысячи энергопроизводящих отдельных ферментных комплексов, которые расположены в пространственно удалённых друг от друга областях мембраны» [7]. В.П. Скулачев также предположил, что передача энергии трансмембранного потенциала не ограничивается только одной митохондрией, но может обеспечивать её связь с другими митохондриями или другими компонентами цитоплазмы за счёт внутриклеточной мембранной «силовой сети» [7]. Основания для таких предположений давали появившиеся тогда же данные о наличии в некоторых клетках (например, в мышечных клетках животных) мембранных структур (трубок и цистерн саркоплазматического ретикулама), пронизывавших всё пространство клетки между пространственно удалёнными митохондриями или между ними и плазматической мембраной [13–15]. Более того, тогда же начали появляться данные, что в мышечных тканях животных и сами митохондрии могут достигать значительных размеров [16, 17]. Это указывало на митохондрии, как возможные клеточные структуры для переноса (а не только генерации) электрохимического потенциала.

Однако это всё были лишь косвенные указания на возможность существования «трансклеточных» энергопередающих мембран. Чтобы подтвердить наличие непрерывной сети мито-

хондриальных мембран в клетке, Л.Е. Бакеева, Ю.С. Ченцов и В.П. Скулачев предприняли систематическое исследование серийных срезов сначала мышцы диафрагмы крысы [18, 19], а затем и сердечной мышцы представителей всех классов позвоночных животных (рыбы, лягушки, ящерицы, голубя, крысы и быка) [20]. В результате удалось установить наличие митохондриальной сети, названной авторами митохондриальным ретикулумом (*Reticulum mitochondriale*), и реконструировать её трёхмерную структуру (рис. 1). Принципиальные характеристики митохондриального ретикулума, как структурные, так и функциональные, установленные в этих ранних работах, были полностью подтверждены в недавних работах группы R.S. Valaban [21] с использованием сканирующей электронной микроскопии методом фокусированных ионных пучков. Митохондриальный ретикулум мышцы диафрагмы представлял собою сеть из тонких ветвящихся трубчатых митохондриальных тяжей [18], в то время как кардиомиоциты содержали множество толстых митохондрий эллиптической формы, связанных друг с другом контактами [20]. В областях контактов (0,1–1 мкм) внешние мембраны соседних митохондрий были максимально сближены (не исключено, что происходило их слияние, аналогичное слиянию плазматических мембран в области плотных клеточных контактов), и вся область контакта (включая внутреннюю и внешнюю мембраны и межмембранное пространство) обладала повышенной электронной плотностью. Более того, наблюдались также электронно-плотные контакты митохондриальных мембран с плазматической мембраной в области межклеточных щелевых контактов, образующие, таким образом, шестимембранные структуры (две плазматические мембраны, две внешние и две внутренние мембраны митохондрий) [20]. Эти структурные данные с очевидностью указывали на существование единой «электрической сети» не только в пределах одной клетки, но и в системе связанных клеток.

Предположение о том, что описанные в этих работах мембранные контакты действительно обладают электрической проводимостью и связывают отдельные митохондрии в единую электрическую сеть, было затем подтверждено экспериментально. С помощью проникающего катионного флуоресцентного красителя этилродамина, который накапливается в митохондриях при образовании в них трансмембранного потенциала, было произведено прижизненное окрашивание митохондрий кардиомиоцитов крысы. Краситель, таким образом, визуализировал образование или исчезновение мембран-

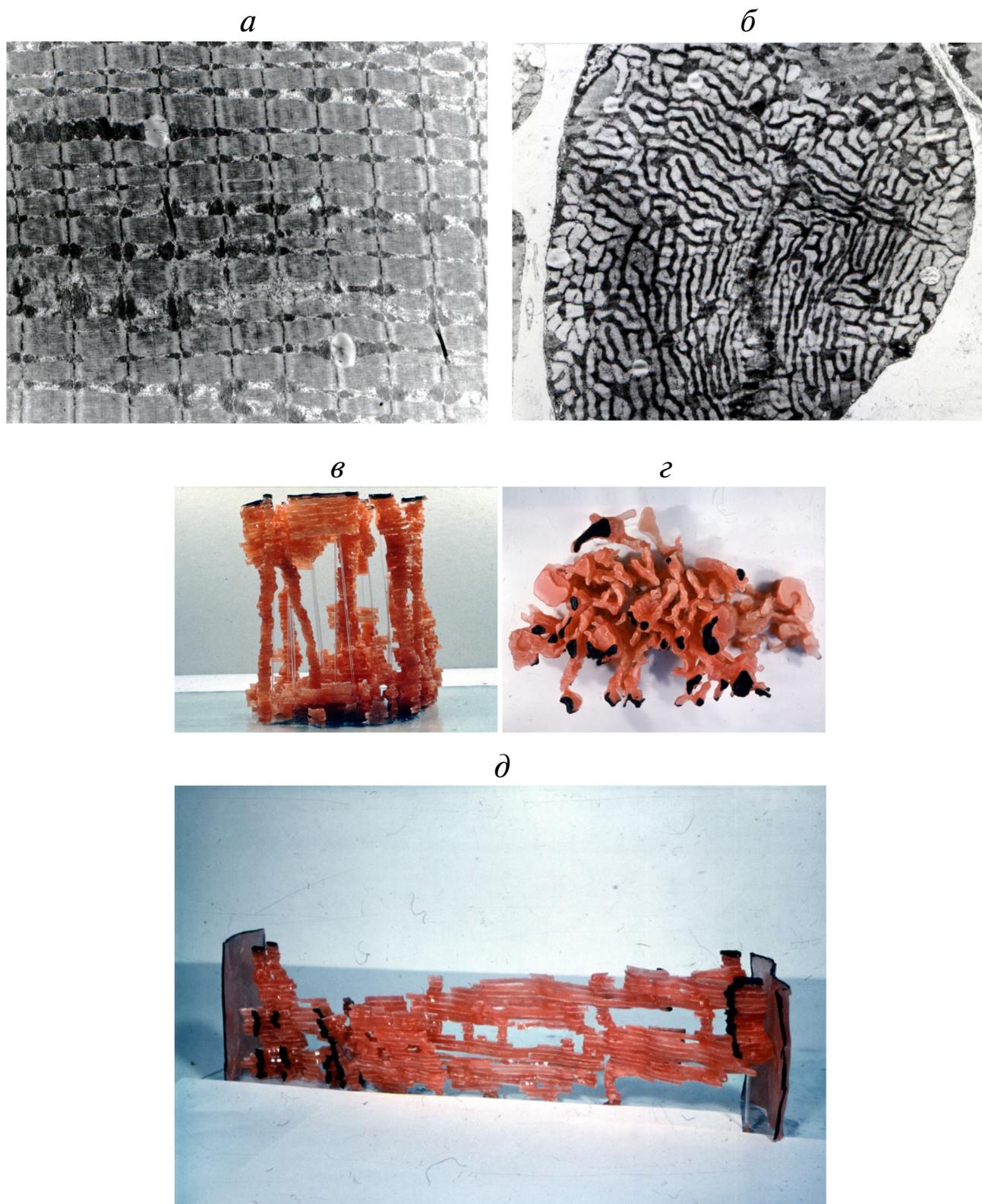
ного потенциала в митохондриях, делая доступным наблюдение этих процессов в световой микроскоп. Было показано, что повреждение одной митохондрии тонким лучом лазера ( $\varnothing \leq 0,5$  мкм) или при уколе кончиком капилляра ( $\sim 0,2$  мкм), приводило к исчезновению мембранного потенциала сразу во многих (хотя не во всех) митохондриях, образующих кластер размером до 50 мкм. Такой кластер электрически связанных митохондрий был назван авторами «гроздь митохондрий» (*Streptio mitochondriale*) [23]. Аналогичным образом была показана «электрическая связность» нитевидных митохондрий фибробластов человека, имеющих длину до 40 мкм и электрически независимых от всех или части остальных митохондриальных филаментов клетки [23, 24] (рис. 2).

Потребность в протяжённых митохондриальных сетях для мышечных клеток, очевидно, связана с необходимостью быстрой доставки энергии к миофибриллам при интенсивной работе мышцы, когда скорость диффузии кислорода на те же расстояния с периферии клетки может ограничивать скорость окислительного фосфорилирования в её центре. Однако, миоциты – не единственные клетки животных, в которых были обнаружены подобные пространственно-протяжённые митохондриальные структуры, они встречаются и в клетках печени, и поджелудочной железы, и др. [22].

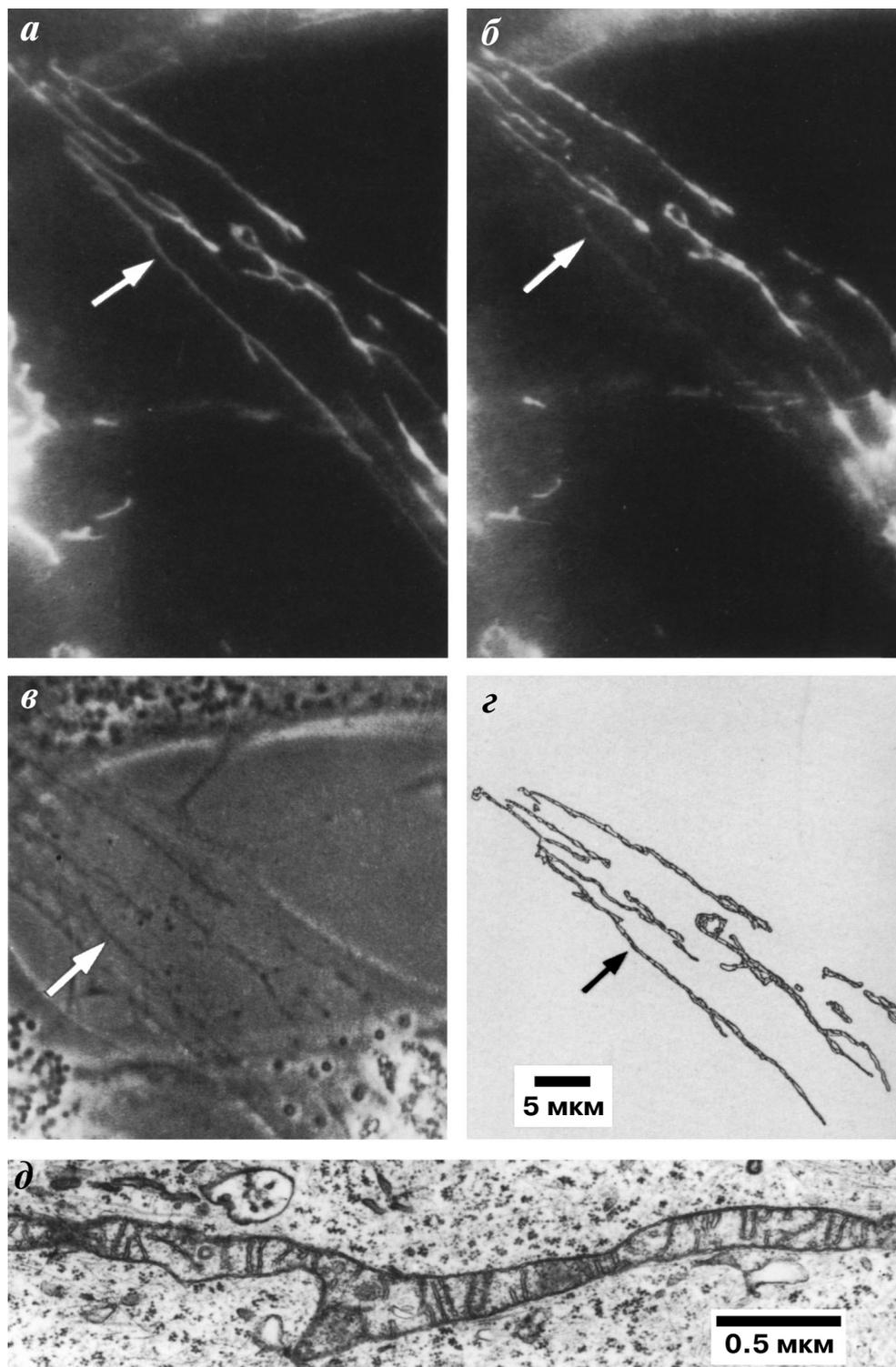
Митохондриальные сети или гигантские митохондрии были обнаружены также и у одноклеточных организмов, по крайней мере, на некоторых стадиях их развития – например, у одноклеточной водоросли *Euglena gracilis* [25], у утратившей фотосинтетический аппарат одноклеточной зелёной водоросли *Polytomella agilis* [26] или в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [27]. Гигантские митохондрии в этих случаях представляют собой ветвящиеся трубчатые структуры (по сути, ту же митохондриальную сеть), ветви которых имеют длину до десятков микрометров. В этих случаях, однако, их энергопередающая функция не очевидна, поскольку образование таких гигантских разветвлённых митохондриальных структур в этих организмах, как правило, сопряжено с падением дыхательной активности и уменьшением количества крист внутренней мембраны [25, 26].

## БАКТЕРИАЛЬНЫЕ МЕМБРАННЫЕ КАБЕЛИ

Генерация  $\Delta\mu_{H^+}$  на внутренней митохондриальной мембране обусловлена работой дыхательной цепи. Другим генератором  $\Delta\mu_{H^+}$ , характерным для ныне живущих фототрофных орга-



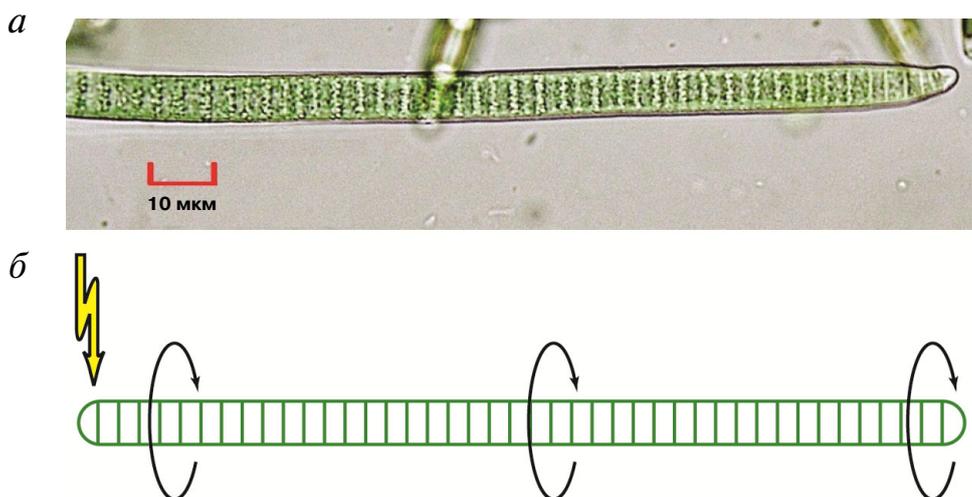
**Рис. 1.** Митохондриальный ретикулум в мышцах диафрагмы двухмесячной крысы. *а* – Продольный срез, *б* – поперечный срез через изотропную область. *в–д* – Трёхмерная реконструкция митохондрий мышц диафрагмы на основе серийных электронно-микроскопических срезов (*в* – саркомер, вид сбоку; *г* – саркомер, вид сверху; *д* – область миофибриллы вблизи Z-диска, вид сбоку). Источник: [22]. Дизайн изображений: Лаборатория Феликса Каспаринского ([www.kasparinsky.pro](http://www.kasparinsky.pro)). С цветными вариантами рис. 1, 3 и 5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm>.)



**Рис. 2.** «Укол» длинного (40 мкм) митохондриального филамента фибробласта человека узким ( $\varnothing \leq 0,5$  мкм) лазерным лучом приводит к мгновенному исчезновению мембранного потенциала по всей длине филамента. В среду добавлен флуоресцентный краситель этилродамин, накапливающийся в митохондриях, обладающих трансмембранным электрохимическим потенциалом. Фотографии до (а) и после (б–д) «укола» митохондрии лазером (место «укола» указано стрелкой); а и б – флуоресцентная микроскопия; в – фазово-контрастная микроскопия; з – вид сверху на трёхмерную модель митохондриальной сети, полученную с использованием метода серийных электронно-микроскопических срезов; д – электронная микроскопия, показан участок «укола» лазером. Фотографии (в–д) показывают, что митохондрия в целом не повреждена. Источник: [22]. Дизайн изображений: Лаборатория Феликса Каспаринского ([www.kasparinsky.pro](http://www.kasparinsky.pro))

низмов, является фотосинтетическая цепь переноса электронов. С точки зрения возможностей транспорта энергии мембранного потенциала, запасённого в ходе фотосинтеза, наиболее интересны цианобактерии, поскольку у этих организмов распространены многоклеточные нитчатые формы. Так, к нитчатым цианобактериям относятся виды родов *Anabaena*, *Lyngbya*, *Nostoc* и *Oscillatoria* [28]. Фотосинтетический аппарат в клетках цианобактерий содержится в мембранах, образующих отдельную систему — тилакоиды. Вопрос об электрической связи тилакоидов с плазматической мембраной не совсем ясен. Ранние работы и часть работ последнего времени указывают на наличие контактов между тилакоидами и внутренней плазматической мембраной, так что внутритилакоидный объём оказывается связан с периплазматическим пространством [29, 30]. В этом случае электрохимический потенциал, образованный фотосинтетическим аппаратом на тилакоидной мембране, может распространяться и на внутреннюю плазматическую мембрану. В то же время в некоторых работах показано, что тилакоиды представляют собой изолированную систему, причём как в одноклеточных [31, 32], так и в многоклеточных видах [32]. В этом случае прямой электрической связи между двумя мембранными системами нет, и она обеспечивается лишь за счёт восстановительных эквивалентов, генерируемых фотосинтетической электронтранспортной цепью тилакоидов и служащих субстратом для дыхательной цепи плазматической мембраны.

Между плазматическими мембранами клеток, образующих нить, имеются контакты — микроплазмодесмы. Сейчас известно, что они представляют собой относительно широкие каналы ( $\varnothing$  до 20 нм), проницаемые не только для ионов, но и для низкомолекулярных веществ [33]. Доказательство, что они, действительно, связывают клетки бактериальной нити (трихома) в единую электрическую систему, было получено в 1982 г. и стало важным свидетельством универсальности механизма передачи энергии по мембранным структурам живых клеток [34]. Эксперименты на трихомах нитчатой цианобактерии *Phormidium uncinatum* из семейства Oscillatoriaceae показали, что энергия, полученная освещёнными клетками в результате фотосинтеза, может эффективно передаваться вдоль трихома на макроскопические расстояния — как минимум, до 2 мм (длина трихома). Так, освещение лишь небольшой части (не более 5%) клеток, расположенных на одном конце трихома, приводило к возникновению энергозависимой подвижности клеток на другом конце трихома. Этот перенос энергии ингибировался протонофорами и ионофорами, устраняющими трансмембранный потенциал, и был независим от АТФ; об этом говорило как сохранение эффекта в присутствии ингибитора АТФ-синтазы, так и малое время (секунды) распространения энергии, невозможное при диффузионном распространении АТФ или других молекулярных форм запасённой энергии (рис. 3). Электрический механизм переноса энергии был также подтверж-



**Рис. 3.** Освещение незначительного участка (<5% длины) трихома нитчатой цианобактерии *P. uncinatum* приводит к быстрой (в секундной шкале) передаче энергии вдоль трихома и обеспечению энергозависимой подвижности клеток, удалённых от освещённой области. *а* — Часть трихома *P. uncinatum*, оптическая микрофотография (источник: фотоатлас цианобактерий, [https://atlasofcyanobacteria.com/#Phormidium\\_uncinatum](https://atlasofcyanobacteria.com/#Phormidium_uncinatum)). *б* — Схема эксперимента по наблюдению подвижности клеток трихома при освещении его части. Круговые стрелки показывают светозависимую работу двигательного аппарата клеток трихома, которая в жидкой среде выявляется по вращению колец слизи, выделяемой клетками

дён прямыми экспериментами с использованием внеклеточных электродов.

Однако для эффективной передачи энергии мембранного потенциала на макроскопические расстояния становятся существенными электрические потери за счёт ограниченной проводимости цитоплазмы и токов утечки через мембрану. Количественный анализ показал, что при типичных электрических и геометрических характеристиках цианобактериальной клетки характерное расстояние распространения потенциала (при котором происходят потери половины передаваемой энергии) составляют  $\sim 7$  мм, хотя эта величина может варьировать вместе с изменениями электрического сопротивления мембраны и цитоплазмы [34]. Что же касается интенсивности такого обмена энергией (или силы тока) между клетками в составе трихома, то она может быть оценена как 50 пА ( $3 \times 10^8$  элементарных зарядов в секунду [35]), что соответствует скорости производимой АТФ порядка  $0,6 \times 10^8 \text{ с}^{-1}$  и сопоставимо со скоростью энергетического обмена одной цианобактериальной клетки [36].

## ХЛОРОПЛАСТЫ

**Распространение трансмембранного потенциала в тилакоидах.** Хлоропласты – достаточно крупные органеллы, обладающие собственной внутренней мембранной системой – тилакоидами, в мембранах которых происходит генерация и латеральное распространение  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ . У большинства растений хлоропласты имеют размеры порядка нескольких микрометров, а у ряда растений, адаптированных к условиям глубокого затенения, были обнаружены хлоропласты размером до 20–30 мкм [37, 38]. При этом предполагается, что тилакоиды внутри хлоропласта образуют непрерывную сеть [39, 40]. Тилакоиды стромы «обматывают» грану подобно шарфу. Запутываясь по спирали, они соприкасаются со всеми тилакоидами стромы, образуя с ними шелеподобные контакты размером от  $15 \times 30$  до  $15 \times 435$  нм. По-видимому, длина «контактных зон» может регулироваться хлоропластом; тем самым растения могут регулировать поток не только крупных молекул через систему своих тилакоидов, но и ионов, которые определяют мембранный потенциал [40].

При этом распределение белковых комплексов – генераторов и потребителей  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  вдоль поверхности тилакоидных мембран хлоропластов неоднородно [41]. Поэтому вопрос об эффективности распространения потенциала вдоль тилакоидной мембраны, пусть и не на

макроскопические расстояния, но всё же достаточно большие по клеточным меркам, возникает и в этом случае. В хлоропластах основной составляющей трансмембранного электрохимического протонного потенциала является не электрическая, а химическая составляющая –  $\Delta\text{pH}$ . Характерные значения  $\Delta\text{pH}$  оценивались по-разному в разное время и варьируют от  $\sim 3,5$  до 2,0 единиц рН в зависимости от метаболического состояния хлоропласта [42, 43], что соответствует  $\sim 120$ – $210$  мВ. Впервые вопрос о том, что в состоянии интенсивного фотофосфорилирования тилакоидный  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  может «не успевать» распространиться по всему тилакоиду и достичь равновесного значения во всех участках мембраны, был поставлен, насколько нам известно, в начале 1980-х гг. в работах De Kouchkovsky et al. [44, 45]. По их оценкам, различия в величине трансмембранной разности потенциалов между «потенциал-генерирующей» и «потенциал-потребляющей» областями тилакоида могут достигать от 0,2 [44] до 0,5 единиц рН [45], что соответствует 12–30 мВ. Недавние расчёты [46], проведённые с учётом стеккинга тилакоидов (т.е. образования «стопок» тилакоидов – гран), при котором мембраны соседних тилакоидов оказываются сближенными и образуют весьма узкую щель для водной фазы, показали, какие факторы определяют возникновение продольного градиента  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ . Во-первых, это диссипация  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  ( $\Delta\text{pH}$ ) на краях тилакоида комплексами АТФ-синтазы, которая создаёт неоднородное распределение рН внутри тилакоида. Этот эффект может давать, как предполагается, до 1 единицы рН (60 мВ) [46]. Заметим, кстати, что аналогичный эффект был предсказан и для митохондриальных крист, в которых рассеяние  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  при синтезе АТФ также ожидается преимущественно на краях кристы и может давать до 0,7 единиц рН (42 мВ) разницы между рН в центре кристы и вблизи её краёв [47]. Во-вторых, из-за того, что тилакоиды в грани очень плотно упакованы, диффузия протонов через узкую щель между мембранами соседних тилакоидов затруднена, и откачивание протонов из этой щели фотосинтетическим аппаратом может создавать там очень высокие локальные значения рН (до 10,2–10,8) [46]. В итоге  $\Delta\text{pH}$  в центре грани может достигать 4,5 единиц, в то время как на участках мембраны, экспонированных в строму, снижаться до 1,0–2,3 единиц, в зависимости от интенсивности фосфорилирования. Это означает возможность образования значительных латеральных градиентов  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  – от 2,2 до 3,5 единиц рН (130–210 мВ) [46]. Кроме метаболического состояния хлоропласта (состояние активного фосфорилирования или

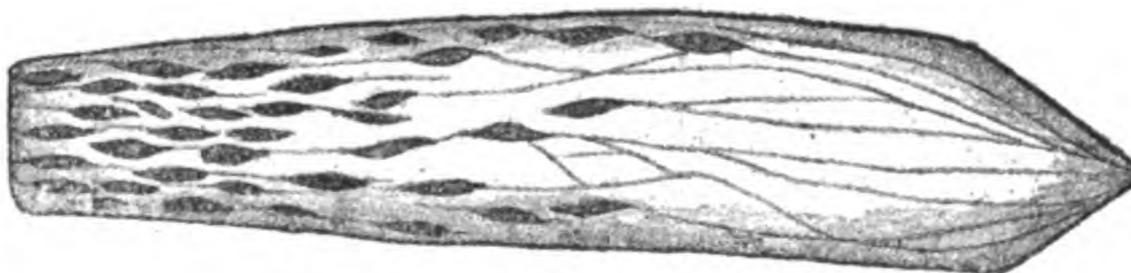
состояние фотосинтетического контроля, в котором снижен отток протонов из внутритилакоидного люмена через АТФ-синтазу из-за отсутствия субстратов фосфорилирования), эта величина зависит также от того, насколько в люмене и/или в межтилакоидном пространстве затруднена диффузия протонов. При этом, как показывают расчёты, снижение скорости распространения потенциала и вызываемое им снижение трансмембранного потенциала в области локализации АТФ-синтаз негативно сказываются на скорости синтеза АТФ. Несмотря на то, что такой расчёт может лишь приблизительно учитывать геометрию взаимного расположения тилакоидов (преувеличенное соотношение толщины внутри- и межтилакоидных просветов — 10 вместо наблюдавшихся в эксперименте значений 1,3–2,9 [48, 49]; плоские цилиндрические тилакоиды стромы вместо спиральных; и т.п.), тем не менее, он даёт представление о возможных потерях в величине распространяющегося по мембране протонного потенциала и определяющих их факторах.

Таким образом, даже при таких относительно малых пространственных масштабах распространения мембранного потенциала, который имеет место в хлоропластах, могут возникать ситуации, когда его скорость лимитирует биоэнергетические процессы. При этом надо иметь в виду, что  $\Delta\mu_{H^+}$  в тилакоидах, наряду с непосредственной энергетической функцией, несёт также и регуляторную функцию, определяя пространственное перераспределение фотосинтетических антенных комплексов в тилакоиде, снижая квантовую эффективность фотосинтетических реакционных центров, и др. [50–52].

**Регуляция фотосинтетической активности хлоропластов за счёт распространения электрохимического потенциала по плазматическим мембранам клеток.** Говоря о регуляторной функции  $\Delta\mu_{H^+}$  на тилакоидной мембране, необходимо также упомянуть, что  $\Delta\mu_{H^+}$  (и электрохимические потенциалы других ионов) на плазматической мембране эукариотической клетки также может выполнять регуляторную функцию по отношению к фотосинтетическим процессам в хлоропласте и, в частности, к генерации самой тилакоидной  $\Delta\mu_{H^+}$ . Наиболее изучены эти регуляторные процессы на гигантских клетках (до нескольких сантиметров длиной) харовых водорослей. Плазмалемма этих клеток осуществляет интеграцию внутриклеточных метаболических процессов за счёт изменений в распределении  $\Delta\mu_{H^+}$  и проницаемости мембраны к другим ионам (в первую очередь, к кальцию) вдоль своей поверхности [53]. При этом мембранно-зависимая дистанционная регуляция использует два

разных механизма: протекание круговых электрических токов между функционально различными зонами клетки и проведение по клетке потенциала действия. Круговые токи обусловлены работой АТФ-зависимых протонных насосов, генерирующих  $\Delta\mu_{H^+}$  и неравномерно распределённых по поверхности клетки (в соответствии с распределением функционально различных зон). Потенциал действия подавляет как работу протонных насосов, так и пассивное поглощение протонов на «другом полюсе» круговых токов, а также повышает концентрацию кальция в цитоплазме. Эти изменения, в свою очередь, вызывают повышение стационарной  $\Delta\mu_{H^+}$  на тилакоидной мембране и рост теплового рассеяния поглощаемой хлоропластами световой энергии [54]. Регуляция теплового рассеяния поглощённой световой энергии потенциалом действия, распространяющимся по плазматическим мембранам клеток, обнаружена также у высших растений [55]. Потенциал действия распространяется по проводящим тканям, что позволяет ему осуществлять связь даже между разными листьями одного растения. Показано, что в регуляции также задействован кальций, однако в целом механизм регуляции в данном случае не изучен в достаточной степени.

**Гипотезы о единой мембранной сети хлоропластов.** В отличие от митохондрий, способных к образованию электрически связанных систем, пронизывающих всю клетку, для хлоропластов такие образования не характерны, несмотря на то, что гипотезы о существовании в растительных клетках связанных между собой хлоропластов или даже единой хлоропластной сети, пронизывающей симпласт, высказывались неоднократно. История возникновения представлений о том, что хлоропласты в клетке образуют сеть, отчасти похожа на историю открытия митохондриальной сети. Впервые цепочки хлоропластов, соединённые тонкими нитями (Plasmatränge) длиной до 30 мкм, были обнаружены и исследованы ещё в конце 19-го — начале 20-го веков [56, цит. по 57; 58] (рис. 4); причём были изучены особенности их расположения в клетке, зависимость образования от фазы развития клетки, и др. Относительно происхождения этих цепочек был сделан вывод, что они являются результатом незавершённого деления хлоропластов [56, цит. по 59]. В 1960-х гг., т.е. в тот же период, когда были повторно открыты нитчатые митохондрии и возникало представление о единой митохондриальной сети, используя оптическую фазово-контрастную микроскопию, обнаружили, что хлорофилл-содержащие структуры хлоропластов окружены очень подвижным бесцветным чехлом, который спо-



**Рис. 4.** Старая клетка мха *Funaria hygrometrica*, с веретенообразными хлоропластами, соединёнными тонкими нитями (Plasmastränge). Увеличение приблизительно 500×. Рисунок из книги [58]

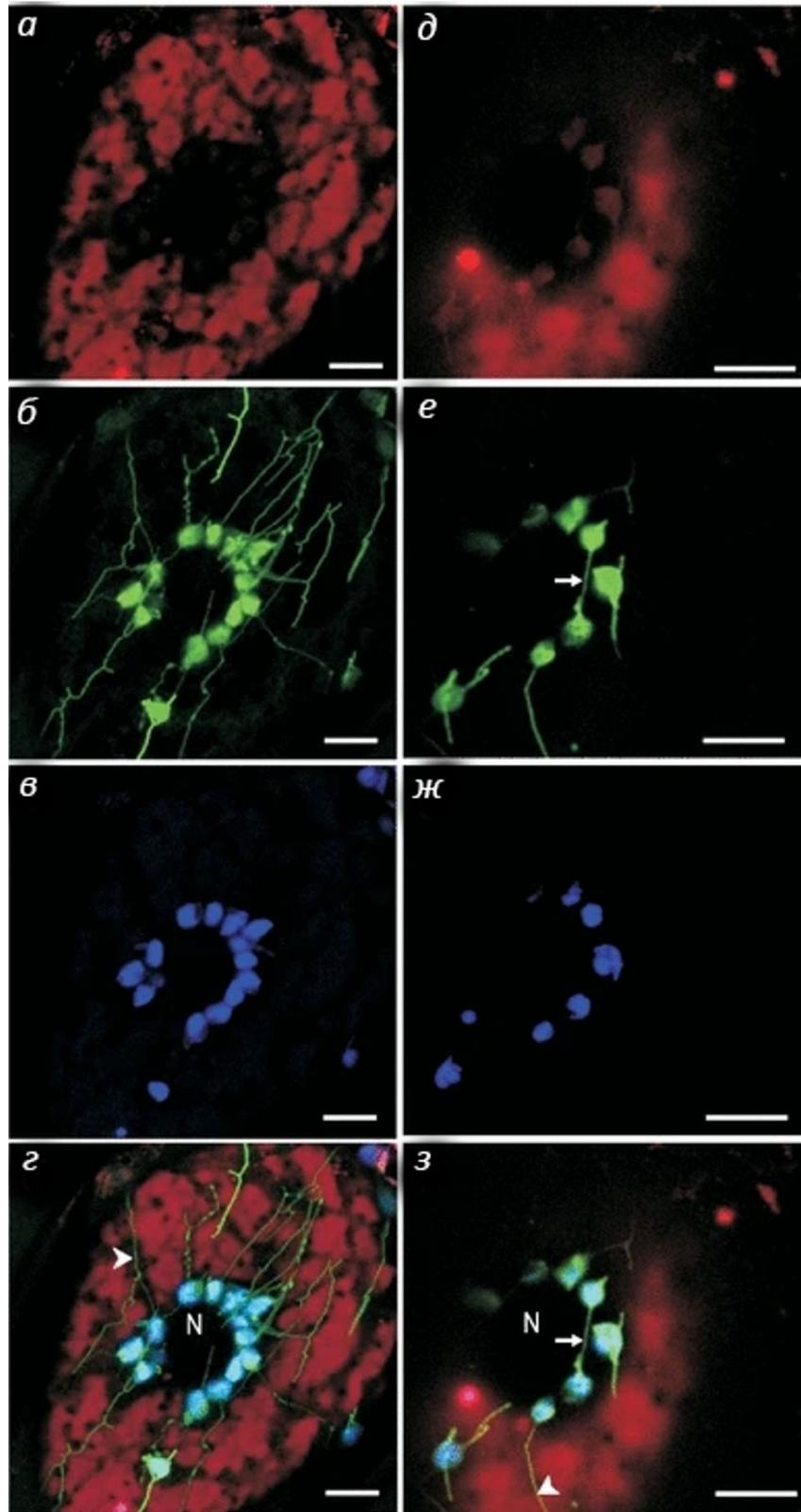
собен образовывать длинные «протуберанцы» (выросты, выдающиеся в цитоплазму). Протуберанцы затем могли фрагментироваться на сегменты, неотличимые в световой микроскоп от митохондрий [60]. Однако, в отличие от аналогичных открытий в области строения митохондриальной системы клетки, обнаружение этих структур не привело к революционным интерпретациям их роли в образовании «хлоропластного ретикулула» вплоть до 1990-х гг. [57].

В 1994 г. были переоткрыты трубчатые выросты хлоропластов, соединяющие их в хлоропластную «сеть», впервые описанные в конце 19-го века [56; цит. по 57; 58]. В гигантских клетках одноклеточной водоросли *Acetabularia cliftonii* методами электронной микроскопии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии с использованием прижизненной окраски 3,3'-дигексилоксакарбоцианином обнаружили, наряду с трубчатыми митохондриями, также трубчатые мембранные образования  $\varnothing \sim 0,5$  мкм, соединяющие между собой хлоропласты и достигающие в длину до сотен микрометров [61]. Причём большая часть хлоропластов клетки образовывала сеть; хлоропластов, не связанных с другими, было меньшинство. В данном случае предположения о возможной функции межхлоропластных трубок были основаны на наблюдаемом Menzel [61] характере движения хлоропластов и касались лишь их участия в движении: хлоропласты плыли друг за другом, словно лодки, связанные бечёвкой. Это наблюдение предполагало также, что, наряду с мембраной, в формировании этой структуры участвуют, внутри или снаружи от мембраны, и элементы цитоскелета.

Вскоре после этого появились гипотезы о том, что с помощью мембранных трубок хлоропласты способны образовывать единое пространство стромы, и по межпластидным трубкам могут обмениваться содержимым [62], причём не только низкомолекулярным, но и белками вплоть до 550 кДа [63]. Такой вывод был сделан

на основе экспериментов с трансгенными растениями табака и петунии, в которые был введён зелёный флуоресцентный белок (GFP) с хлоропластным сигнальным пептидом [62] или GFP-меченые хлоропластные белки (в том числе Rubisco) [63]. Авторы наблюдали перемещение белка по мембранным трубкам между хлорофилл-содержащими органеллами, которые они интерпретировали как отдельные хлоропласты. При этом сама трубчатая мембранная структура, по мнению авторов, напоминала бактериальные пили. (О бактериальных пили-подобных структурах, обнаруженных у металловосстанавливающих протеобактерий *Shewanella oneidensis* и имеющих мембранное строение, будет рассказано во втором обзоре данной серии: «Электрические кабели клеток. II. Бактериальные электронные проводники».) Эти данные о перемещении между хлоропластами белков, локализованных в строме, были интерпретированы как свидетельствующие о заполнении трубок содержимым стромы, за что они и получили название: стромулы (stromules: stroma filled tubules) [64].

Вслед за этим также были высказаны предположения о том, что стромулы ограничены не внешней и внутренней тилакоидными мембранами, а мембраной эндоплазматического ретикулула (ЭПР), предположительно окружающей хлоропласты [57]. Это предположение основано на гипотезе о том, что хлоропласт, имеющий симбиотическое происхождение, наряду с собственной двойной мембраной (наследницей двойной плазматической мембраны эндосимбиотической цианобактерии), должен иметь фагоцитарную мембрану клетки-хозяина, и у современных растений эта мембрана могла бы быть представлена мембраной ЭПР [57, 65]. При этом, поскольку давно известно, что плазмодесмы связывают между собой в единую систему не только цитоплазму соседних клеток, но и их ретикулярные системы за счёт десмотрубочек — мембранного канала, образованного ЭПР и



**Рис. 5.** *a* и *д* – Визуализация вакуолярной системы (автофлуоресценция антоцианов, красный псевдоцвет), (*б* и *е*) – стромул (флуоресценция карбоксифлуоресцеина, зеленый псевдоцвет) и (*в* и *ж*) – хлорофилла (автофлуоресценция, синий псевдоцвет) в клетках феллодермы клубней красного картофеля (св. Rosalinde). *z* и *z* – Объединение изображений (*a–в*) и (*е–ж*) соответственно. N – ядро, наконечники стрелок – стромулы, стрелки – межхлоропластные анастомозы. Масштабный отрезок 10 мкм. Рисунок из статьи [69]

пронизывающего канал плазмодесмы [66] — стромулы, в связи с этими представлениями, могли бы связывать хлоропласты разных клеток в единый «хлоропластный симпласт».

Наконец, наиболее радикальная гипотеза о передаче сигнала между тилакоидными мембранами в разных листьях по единой мембранной сети растения была высказана в связи с изучением регуляции фотосинтетического аппарата растений в условиях светового стресса. В работе Szechynska-Hebda et al. [55] было показано наличие быстрой дальнедействующей системы регуляции механизмов защиты от избыточного освещения в листьях *Arabidopsis*. Освещение одного листа интенсивным светом и активация в нём фотозащитных механизмов позволяла активировать их и в остальных листьях, даже если они не подвергались освещению. При этом регуляция имела фотоэлектрофизиологическую природу, т.е. была связана с распространением по растению электрического (электрохимического) сигнала. Между листьями сигнал распространялся в виде электрохимического мембранного потенциала по плазматическим мембранам клеток обкладки проводящего пучка со скоростью 0,2–0,3 см/с, причём временные и пространственные характеристики распространения определялись трансмембранной разностью рН в тилакоидах клеток освещённого листа. Авторы предположили, что эффективная регуляция за счёт распространения электрического сигнала по растению была возможна только при наличии единой внутри- и межклеточной мембранной системы, включая стромулы и их контакты с плазматической мембраной [55].

Однако все эти гипотезы, рассматривающие возможность существования в растении, в листе или хотя бы в отдельной клетке сети хлоропластов, недостаточно обоснованы. Так, даже представление об обмене содержимым стромы между соединёнными стромулой хлоропластами, имеющее, казалось бы, наиболее весомое экспериментальное обоснование, подвергается очень серьёзной критике [59]. Так, при интерпретации экспериментов по перемещению GFP-меченых белков через стромулы два совершенно разных цитологических явления: (i) формирующиеся хлоропласты или хлоропласты на поздних стадиях деления, образующие кажущиеся цепочки и открытые в конце 19-го века [56, цит. по 57; 58], с одной стороны, и (ii) выросты («протуберанцы») хлоропластной мембраны, открытые в 1960-х, с другой [60], — были, по-видимому, ошибочно, объединены в одно. При этом выросты хлоропластной мембраны (а только их и правомерно называть стромулами [59]) подвиж-

ны и достаточно распространены, но они не соединяют между собой разные хлоропласты. В то же время в формирующихся или делящихся хлоропластах, действительно, происходит перенос GFP-меченого белка по анастомозам между хлоропластами, но их, строго говоря, нельзя считать разными органеллами, и само образование таких цепочек хлоропластов — относительно редкое явление для зрелых хлоропластов в не подверженных старению или заболеванию тканях растения (рис. 5). Что же касается электрофизиологической регуляции фотосинтетических процессов на уровне всего растения, то тут гораздо более обоснованным выглядит сценарий, при котором изменения тилакоидного  $\Delta\mu_{H^+}$  через какие-либо химические сигналы (например, через активные формы кислорода) стимулируют возникновение регуляторного сигнала на плазматической мембране, распространяющегося далее в виде электрохимического трансмембранного потенциала действия по плазматическим мембранам клеток проводящих тканей [67, 68].

Наконец, необходимо отметить, что, независимо от наличия каких-либо контактов хлоропластных мембран между собой или с другими мембранными структурами клетки, главные энергетические мембраны хлоропластов (тилакоиды) остаются изолированными структурами в отличие от митохондрий, где кристы, гомологичные тилакоидным мембранам, сохраняют связь с внутренней мембраной органеллы и несут общий потенциал. Внутренняя мембрана хлоропласта, тем не менее, несёт трансмембранный потенциал, используемый для энергетически независимого транспорта, например для потенциала-зависимого унипорта ионов [70, 71]. Были предположения, что возможен перенос протонного градиента от мембран периферических тилакоидов на внутреннюю хлоропластную мембрану за счёт отдельных каналов, соединяющих люмен тилакоида с межмембранным пространством хлоропласта [72], и такие каналы как будто наблюдались [73, цит. по 74]. Несмотря на то что, как правило, связь между внутренними мембранными структурами и мембраной оболочки хлоропласта наблюдается лишь в процессе формирования пластиды, но не в зрелых органеллах [75], тем не менее изредка контакты между мембраной тилакоида стромы и внутренней хлоропластной мембраной наблюдаются и в зрелых хлоропластах [76]. В хлоропластах, действительно, происходит светозависимый перенос протонов через внутреннюю хлоропластную мембрану из стромы в цитозоль [77], что приводит к образованию электрохимического потенциала ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) на внутренней хлоропластной мембране. Однако его

первичным генератором является АТФ-зависимый протонный насос [78]. Таким образом, генерация  $\Delta\mu_{H^+}$  на внутренней хлоропластной мембране, хотя и, действительно, является следствием фотосинтетической генерации  $\Delta\mu_{H^+}$  на тилакоидной мембране, но опосредована образованием АТФ в световых реакциях фотосинтеза.

Приведённые здесь примеры, разумеется, не исчерпывают все случаи переноса энергии вдоль мембран в живых организмах в форме трансмембранного протонного потенциала ( $\Delta\mu_{H^+}$ ). Однако они демонстрируют универсальность данного механизма, как в отношении систематической и экологической распространённости, так и в отношении «обслуживаемых» биоэнергетических процессов первичной генерации  $\Delta\mu_{H^+}$  (фотофосфорилирование и окислительное фосфорилирование). Эта универсальность не удивительна в свете представления о том, что удачные решения, найденные в ходе эволюции, могут широко распространяться по всему живому миру практически вплоть до унификации.

Однако для решения специфической задачи мембранной биоэнергетики — соединения двух полуреакций окислительно-восстановительной реакции в ходе окислительного фосфорилиро-

вания — потребовался совершенно иной механизм электрической проводимости: электронная проводимость белковых структур. В настоящее время разнообразие форм жизни, в которых обнаружен этот механизм, ограничено относительно узкой экологической и биохимической группой микроорганизмов, но не исключено, что дальнейшие исследования существенно расширят наши представления о его распространённости. Подробному описанию этого механизма и истории его открытия посвящена вторая статья из данной серии (Электрические кабели клеток. II. Бактериальные электронные проводники).

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 19-14-50558.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Galvani, L. (1792) De viribus electricitatis in motu musculari comentarius cum joannis aldini dissertatione et notis; accesserunt epistolae ad animalis electricitatis theoriam pertinentes, *Apud Societatem Typographicam*.
- Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve, *J. Physiol.*, **117**, 500-544.
- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature*, **191**, 144-148.
- Mitchell, P. (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation, *Biol. Rev.*, **41**, 445-501.
- Liberman, E. A., Topaly, V. P., Tsofina, L. M., Jasaitis, A. A., and Skulachev, V. P. (1969) Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria, *Nature*, **222**, 1076-1078.
- Green, D. E. (1974) The electromechanical model for energy coupling in mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **346**, 27-78.
- Skulachev, V. P. (1971) Energy transformations in the respiratory chain, *Curr. Top. Bioenerg.*, Elsevier, pp. 127-190.
- Skulachev, V. P. (1980) Integrating functions of biomembranes. Problems of lateral transport of energy, metabolites and electrons, *Biochim. Biophys. Acta*, **604**, 297-320.
- Reguera, G., McCarthy, K. D., Mehta, T., Nicoll, J. S., Tuominen, M. T., and Lovley, D. R. (2005) Extracellular electron transfer via microbial nanowires, *Nature*, **435**, 1098-1101.
- Nielsen, L. P., Risgaard-Petersen, N., Fossing, H., Christensen, P. B., and Sayama, M. (2010) Electric currents couple spatially separated biogeochemical processes in marine sediment, *Nature*, **463**, 1071-1074.
- Filman, D. J., Marino, S. F., Ward, J. E., Yang, L., Mester, Z., Bullitt, E., Lovley, D. R., and Strauss, M. (2019) Cryo-EM reveals the structural basis of long-range electron transport in a cytochrome-based bacterial nanowire, *Commun. Biol.*, **2**, 1-6.
- Wang, F., Gu, Y., O'Brien, J. P., Sophia, M. Y., Yalcin, S. E., Srikanth, V., Shen, C., Vu, D., Ing, N. L., Hochbaum, A. I., Egelman, E. H., and Malvankar, N. S. (2019) Structure of microbial nanowires reveals stacked hemes that transport electrons over micrometers, *Cell*, **177**, 361-369.
- Гилёв В., Мельникова Е. (1969) Митохондрия и процесс возбуждения-сокращения в мышечном волокне, *Цитология*, **11**, 117-120.
- Margreth, A., Muscatello, U., and Andersson-Cedergren, E. (1963) A morphological and biochemical study on the regulation of carbohydrate metabolism in the muscle cell, *Exp. Cell Res.*, **32**, 484-509.
- Walker, S. M., and Schrodt, G. R. (1966) Evidence for connections between mitochondria and the sarcoplasmic

- reticulum and evidence for glycogen granules within the sarcoplasmic reticulum, *Am. J. Phys. Med.*, **45**, 25-44.
16. Bubenzer, H. J. (1966) The thin and the thick muscular fibers of the rat diaphragm, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **69**, 520.
  17. Gauthier, G. F. (1969) On the relationship of ultrastructural and cytochemical features to color in mammalian skeletal muscle, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **95**, 462-482.
  18. Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., and Skulachev, V. P. (1978) Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle, *Biochim. Biophys. Acta*, **501**, 349-369.
  19. Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., and Skulachev, V. P. (1981) Ontogenesis of mitochondrial reticulum in rat diaphragm muscle., *Eur. J. Cell Biol.*, **25**, 175-181.
  20. Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., and Skulachev, V. P. (1983) Intermitochondrial contacts in myocardiocytes, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **15**, 413-420.
  21. Glancy, B., Hartnell, L. M., Malide, D., Yu, Z. X., Combs, C. A., Connelly, P. S., Subramaniam, S., and Balaban, R. S. (2015) Mitochondrial reticulum for cellular energy distribution in muscle, *Nature*, **523**, 617-620.
  22. Скулачев В. П., Богачев А. В., Каспаринский Ф. О. (2011) *Мембранная биоэнергетика*, Издательство МГУ, Москва.
  23. Amchenkova, A. A., Bakeeva, L. E., Chentsov, Y. S., Skulachev, V. P., and Zorov, D. B. (1988) Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes, *J. Cell Biol.*, **107**, 481-495.
  24. Драчёв В., Зоров Д. (1986) Митохондрия как электрический кабель. Экспериментальная проверка гипотезы, *Доклады Академии Наук СССР*, **287**, 1237-1238.
  25. Osafune, T. (1973) Three-dimensional structures of giant mitochondria, dictyosomes and "concentric lamellar bodies" formed during the cell cycle of *Euglena gracilis* (Z) in synchronous culture, *Microscopy*, **22**, 51-61.
  26. Burton, M. D., and Moore, J. (1974) The mitochondrion of the flagellate, *Polytomella agilis*, *J. Ultrastruct. Res.*, **48**, 414-419.
  27. Hoffmann, H.-P., and Avers, C. J. (1973) Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell, *Science*, **181**, 749-751.
  28. Komárek, J., and Johansen, J. R. (2015) Filamentous cyanobacteria, *Freshwater Algae of North America*, Elsevier, pp. 135-235.
  29. Schnepf, E. (1964) Zur feinstruktur von geosiphon pyri-forme, *Arch. Mikrobiol.*, **49**, 112-131.
  30. Van De Meene, A. M. L., Hohmann-Marriott, M. F., Vermaas, W. F. J., and Roberson, R. W. (2006) The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Arch. Microbiol.*, **184**, 259-270.
  31. Schneider, D., Fuhrmann, E., Scholz, I., Hess, W. R., and Graumann, P. L. (2007) Fluorescence staining of live cyanobacterial cells suggest non-stringent chromosome segregation and absence of a connection between cytoplasmic and thylakoid membranes, *BMC Cell Biol.*, **8**, 1-10.
  32. Nevo, R., Charuvi, D., Shimoni, E., Schwarz, R., Kaplan, A., Ohad, I., and Reich, Z. (2007) Thylakoid membrane perforations and connectivity enable intracellular traffic in cyanobacteria, *EMBO J.*, **26**, 1467-1473.
  33. Flores, E., Nieves-Mori6n, M., and Mullineaux, C. W. (2019) Cyanobacterial septal junctions: properties and regulation, *Life*, **9**, 1.
  34. Chailakhyan, L. M., Glagolev, A. N., Glagoleva, T. N., Murvanidze, G. V., Potapova, T. V., and Skulachev, V. P. (1982) Intercellular power transmission along trichomes of cyanobacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **679**, 60-67.
  35. Попапова Т., Кокшарова О. (2020) Нитчатые цианобактерии как прототип многоклеточных организмов, *Физиология растений*, **67**, 20-34.
  36. Chapman, A. G., and Atkinson, D. E. (1977) Adenine nucleotide concentrations and turnover rates. Their correlation with biological activity in bacteria and yeast, *Adv. Microb. Physiol.*, **15**, 253-306.
  37. Nasrulhaq-Boyce, A., and Duckett, J. G. (1991) Dimorphic epidermal cell chloroplasts in the mesophyll-less leaves of an extreme-shade tropical fern, *Teratophyllum rotundifoliatum* (R. Bonap.) Holtt.: a light and electron microscope study, *New Phytol.*, **119**, 433-444.
  38. Sheue, C.-R., Sarafis, V., Kiew, R., Liu, H.-Y., Salino, A., Kuo-Huang, L.-L., Yang, Y.-P., Tsai, C.-C., Lin, C.-H., Yong, J. W. H., and Ku, M. S. B. (2007) Bizonoplast, a unique chloroplast in the epidermal cells of microphylls in the shade plant *Selaginella erythropus* (*Selaginellaceae*), *Am. J. Botany*, **94**, 1922-1929.
  39. Paolillo, D. J. (1970) The three-dimensional arrangement of intergranal lamellae in chloroplasts, *J. Cell Science*, **6**, 243-253.
  40. Austin, J. R., and Staehelin, L. A. (2011) Three-dimensional architecture of grana and stroma thylakoids of higher plants as determined by electron tomography, *Plant Physiol.*, **155**, 1601-1611.
  41. Anderson, J. M. (2012) Lateral heterogeneity of plant thylakoid protein complexes: early reminiscences, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **367**, 3384-3388.
  42. Rottenberg, H., and Grunwald, T. (1972) Determination of  $\Delta pH$  in chloroplasts: 3. Ammonium uptake as a measure of  $\Delta pH$  in chloroplasts and sub-chloroplast particles, *Eur. J. Biochem.*, **25**, 71-74.
  43. Tikhonov, A. N., Agafonov, R. V., Grigor'ev, I. A., Kirilyuk, I. A., Ptushenko, V. V., and Trubitsin, B. V. (2008) Spin-probes designed for measuring the intrathylakoid pH in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 285-294.
  44. De Kouchkovsky, Y., and Haraux, F. (1981)  $^2H_2O$  effect on the electron and proton flow in isolated chloroplasts: an indication for lateral heterogeneity of membrane pH, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 205-212.
  45. De Kouchkovsky, Y., Haraux, F., and Sigalat, C. (1982) Effect of hydrogen-deuterium exchange on energy-coupled processes in thylakoids: a new illustration of the hypothesis of local proton gradients with the energy-transducing biomembranes, *FEBS Lett.*, **139**, 245-249.
  46. Vershubskii, A. V., Trubitsin, B. V., Priklonskii, V. I., and Tikhonov, A. N. (2017) Lateral heterogeneity of the proton potential along the thylakoid membranes of chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **1859**, 388-401.

47. Rieger, B., Junge, W., and Busch, K. B. (2014) Lateral pH gradient between OXPHOS complex IV and F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP-synthase in folded mitochondrial membranes, *Nat. Commun.*, **5**, 1-7.
48. Kirchhoff, H., Hall, C., Wood, M., Herbstová, M., Tsabari, O., Nevo, R., Charuvi, D., Shimoni, E., and Reich, Z. (2011) Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20248-20253.
49. Daum, B., Nicastro, D., Austin, J., McIntosh, J. R., and Kühlbrandt, W. (2010) Arrangement of photosystem II and ATP synthase in chloroplast membranes of spinach and pea, *Plant Cell*, **22**, 1299-1312.
50. Takizawa, K., Cruz, J. A., Kanazawa, A., and Kramer, D. M. (2007) The thylakoid proton motive force *in vivo*. Quantitative, non-invasive probes, energetics, and regulatory consequences of light-induced pmf, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 1233-1244.
51. Jahns, P., Latowski, D., and Strzalka, K. (2009) Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 3-14.
52. Ptushenko, V. V., Ptushenko, E. A., Samoilo, O. P., and Tikhonov, A. N. (2013) Chlorophyll fluorescence in the leaves of *Tradescantia* species of different ecological groups: induction events at different intensities of actinic light, *Biosystems*, **114**, 85-97.
53. Bulychev, A. A., and Komarova, A. V. (2014) Long-distance signal transmission and regulation of photosynthesis in characean cells, *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 273-281.
54. Krupenina, N. A., and Bulychev, A. A. (2007) Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 781-788.
55. Szechynska-Hebda, M., Kruk, J., Górecka, M., Karpińska, B., and Karpiński, S. (2010) Evidence for light wavelength-specific photoelectrophysiological signaling and memory of excess light episodes in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, **22**, 2201-2218.
56. Haberlandt, G. (1888) *Die Chlorophyllkörper der Selaginellen*, Neubauer.
57. Великанов Г. (2009) Стромулы: их природа, структура и функции в растительной клетке, *Биол. Мембр.: Журн. Мембр. Клет. Биол.*, **26**, 468-478.
58. Senn, G. (1908) *Die Gestalts- und Lageveränderung der Pflanzen-Chromatophoren: Mit einer Beilage: Die Lichtbrechung der Lebenden Pflanzenzelle*, Engelmann, W., p. 397.
59. Schattat, M. H., Barton, K. A., and Mathur, J. (2015) The myth of interconnected plastids and related phenomena, *Protoplasma*, **252**, 359-371.
60. Wildman, S. G., Hongladarom, T., and Honda, S. I. (1962) Chloroplasts and mitochondria in living plant cells: cinephotomicrographic studies, *Science*, **138**, 434-436.
61. Menzel, D. (1994) An interconnected plastidom in *Acetabularia*: implications for the mechanism of chloroplast motility, *Protoplasma*, **179**, 166-171.
62. Köhler, R. H., Cao, J., Zipfel, W. R., Webb, W. W., and Hanson, M. R. (1997) Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids, *Science*, **276**, 2039-2042.
63. Kwok, E. Y., and Hanson, M. R. (2004) GFP-labelled Rubisco and aspartate aminotransferase are present in plastid stromules and traffic between plastids, *J. Exp. Bot.*, **55**, 595-604.
64. Köhler, R. H., and Hanson, M. R. (2000) Plastid tubules of higher plants are tissue-specific and developmentally regulated, *J. Cell Sci.*, **113**, 81-89.
65. Великанов Г., Леванов В., Белова Л., Пономарева А., Ильина Т. (2012) Регулируемое русло для диффузии между вакуолями соседних клеток: вакуолярный симпласт, *Усп. Совр. Биол.*, **132**, 36-50.
66. Robards, A. W. (1976) Plasmodesmata in higher plants, in *Intercellular Communication in Plants: Studies on Plasmodesmata* (Gunning, B. E. S., and Robards, A. W., eds.) Springer, pp. 15-57.
67. Carmody, M., and Pogson, B. (2013) Systemic photooxidative stress signalling, in *Long-distance Systemic Signaling and Communication in Plants* (Baluska, F., ed.) Springer, pp. 251-274.
68. Hedrich, R., Salvador-Recatalà, V., and Dreyer, I. (2016) Electrical wiring and long-distance plant communication, *Trends Plant Sci.*, **21**, 376-387.
69. Borucki, W., Bederska, M., and Sujkowska-Rybkowska, M. (2015) Visualisation of plastid outgrowths in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers by carboxyfluorescein diacetate staining, *Plant Cell Rep.*, **34**, 853-860.
70. Roh, M. H., Shingles, R., Cleveland, M. J., and McCarty, R. E. (1998) Direct measurement of calcium transport across chloroplast inner-envelope vesicles, *Plant Physiol.*, **118**, 1447-1454.
71. Shingles, R., North, M., and McCarty, R. E. (2002) Ferrous ion transport across chloroplast inner envelope membranes, *Plant Physiol.*, **128**, 1022-1030.
72. Heber, U., and Heldt, H. W. (1981) The chloroplast envelope: structure, function, and role in leaf metabolism, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **32**, 139-168.
73. Carde, J. P., Joyard, J., and Douce, R. (1982) Electron microscopic studies of envelope membranes from spinach plastids, *Biol. Cell*, **44**, 315-324.
74. Douce, R., and Joyard, J. (1990) Biochemistry and function of the plastid envelope, *Annu. Rev. Cell Biol.*, **6**, 173-216.
75. Vothknecht, U. C., and Westhoff, P. (2001) Biogenesis and origin of thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1541**, 91-101.
76. Shimoni, E., Rav-Hon, O., Ohad, I., Brumfeld, V., and Reich, Z. (2005) Three-dimensional organization of higher-plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography, *Plant Cell*, **17**, 2580-2586.
77. Heldt, H. W., Werdan, K., Milovancev, M., and Geller, G. (1973) Alkalization of the chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space, *Biochim. Biophys. Acta*, **314**, 224-241.
78. Berkowitz, G. A., and Peters, J. S. (1993) Chloroplast inner-envelope ATPase acts as a primary H<sup>+</sup> pump, *Plant Physiol.*, **102**, 261-267.

**ELECTRIC CABLES OF LIVING CELLS. I. ENERGY TRANSFER  
ALONG COUPLING MEMBRANES****Review****V. V. Ptushenko<sup>1,2</sup>**<sup>1</sup> *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,  
119992 Moscow, Russia; E-mail: ptush@belozersky.msu.ru*<sup>2</sup> *Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

Received May 17, 2020

Revised June 14, 2020

Accepted June 15, 2020

The concept of “electric cables” involved in bioenergetic processes in a living cell was proposed half a century ago [Skulachev, V. P. (1971) *Curr. Top. Bioenerg.*, Elsevier, pp. 127-190]. Membrane structures of a cell were considered as probable pathways for transferring transmembrane electrochemical potential. Further studies have shown that coupling membranes (inner mitochondrial membrane or bacterial cell membrane), i.e., those involved in the generation of membrane potential, can also serve for its transfer. A wide range of organisms from almost all major taxa have been discovered to employ the energy-transmitting function of coupling membranes. Macroscopic (millimeter or even centimeter in length) cable-like structures have been found, the most striking examples of which are giant mitochondria of some unicellular organisms (algae, fungi, protozoa) and animal tissues, filamentous mitochondria, mitochondrial reticulum in animal muscle tissue, and trichomes of cyanobacteria. The importance of such “electric cables” in cells or multicellular structures is determined by their ability to provide rapid energy exchange between metabolic counterparts, energy producers and energy consumers, as the diffusive transport of soluble macroergic molecules (ATP, etc.) requires much longer time. However, in the last 10-15 years, a new type of bacterial “electric cables” of presumably proteinaceous nature has been discovered, which serve a quite different purpose in cell bioenergetics. The molecular structure and functions of these cables will be discussed in the second part of the review (“Electric cables of living cells. II. Bacterial electron conductors”).

*Keywords:* transmembrane electrochemical potential, mitochondria, chloroplasts, cyanobacteria, stromules, nanowires

УДК 577.217;616.98

## АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА Nrf2 КАК ПОДХОД К ПРЕДОТВРАЩЕНИЮ ЦИТОКИНОВОГО ШТОРМА ПРИ COVID-19

© 2020 Р.А. Зиновкин<sup>1,2,3\*</sup>, О.А. Гребенчиков<sup>4</sup>

<sup>1</sup> НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: roman.zinovkin@gmail.com

<sup>2</sup> НИИ Митохондриологии МГУ, 119992 Москва, Россия

<sup>3</sup> Институт молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, 119991 Москва, Россия

<sup>4</sup> НИИ общей реаниматологии имени В.А. Неговского ФНКЦ РР, 107031 Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.05.2020

После доработки 04.06.2020

Принята к публикации 04.06.2020

Nrf2 является ключевым фактором транскрипции, ответственным за антиоксидантную защиту во многих тканях и клетках, включая альвеолярный эпителий, эндотелий и макрофаги. Кроме того, Nrf2 функционирует как транскрипционный репрессор, подавляющий экспрессию цитокинов воспаления в макрофагах. Пациенты с COVID-19 в критическом состоянии зачастую имеют чрезвычайно высокие параметры окислительного стресса и системного воспаления, которое служит одной из основных причин летальности. В данной статье представлено обоснование использования индукторов транскрипционного фактора Nrf2 для предотвращения развития избыточного воспалительного ответа при COVID-19.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** Nrf2, SARS-CoV-2, COVID-19, цитокиновый шторм, окислительный стресс.

**DOI:** 10.31857/S0320972520070118

### ВВЕДЕНИЕ

Патогенез COVID-19 является предметом чрезвычайно активного изучения, при этом до сих пор не разработана эффективная терапия против этого заболевания, вызываемого коронавирусом SARS-CoV-2. Первоначально SARS-CoV-2 инфицирует клетки эпителия верхних дыхательных путей. Если инфекция ограничена лишь этими клетками, то болезнь обычно протекает в достаточно мягкой форме. При проникновении вируса в альвеолы легких происходит заражение пневмоцитов второго типа, в этом случае может развиваться тяжелая пневмония. При инфекции происходит ингибирование интерфероновой реакции клеток, при этом экспрессируется большое количество хемокинов, которые привлекают из сосудистого русла в альвеолы иммунные клетки: моноциты, В- и Т-лимфоциты [1]. Чрезмерная экстравазация этих клеток в альвеолы считается основной причиной патогенетических изменений в легких, приводящих к развитию дыхательной недостаточности и ост-

рого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) [2].

В тяжелых случаях вирус может проникать в кровотоки и заражать эндотелиальные клетки, а также другие клетки-мишени, которые находятся в тканях почек, пищевода, мочевого пузыря, подвздошной кишки, сердца и ЦНС. Высвобождающиеся при гибели зараженных клеток эндогенные «образы опасности» (damage-associated molecular patterns, DAMPs) вносят дополнительный вклад в активацию иммунных клеток и развитие цитокинового шторма. Таким образом, при тяжелых формах COVID-19 наблюдается полиорганная недостаточность, сопряженная с гиперактивацией иммунной системы. Пациенты с COVID-19 в критическом состоянии имеют чрезвычайно высокие параметры системного воспаления, включая С-реактивный белок и цитокины IL-6, TNF $\alpha$ , IL-8 и др. [3–5].

Цитокиновый шторм неизбежно сопровождается повышенной генерацией активных форм кислорода (АФК) иммунными клетками и развитием окислительного стресса [6]. Цитокины воспаления и АФК действуют совместно, активируя клетки легочного эпителия и эндотелия. Это приводит к разрыву межклеточных контактов, заполнению интерстициального пространства альвеол жидкостью и нарушению газообме-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром.

\* Адресат для корреспонденции.

на в легких. Кроме того, цитокиновый шторм и окислительный стресс приводят к АФК-зависимому апоптозу эндотелиальных клеток [7], что способствует высвобождению факторов свертывания крови и образованию тромбов [8].

Для терапии цитокинового шторма при COVID-19 в настоящее время используют кортикостероиды, а также ингибиторы воспалительных каскадов на основе моноклональных антител: тоцилизумаб (анти IL-6), секукинумаб (анти IL-17A), канакинумаб (анти IL-1 $\beta$ ), руксолитиниба фосфат (ингибитор JAK-киназ), и др. [4]. Опыт использования кортикостероидов при COVID-19 показал заметные ограничения их применимости, связанные, прежде всего, с общим подавлением специфического иммунитета и повышением вероятности развития вторичной бактериальной пневмонии [9, 10]. Применение препаратов на основе моноклональных антител имеет ряд ограничений, обусловленных их узконаправленным действием лишь на один из множества цитокинов воспаления. Таким образом, представляется крайне важной разработка новых подходов к предотвращению развития цитокинового шторма при COVID-19.

## ДИСКУССИЯ

Транскрипционный фактор Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) обеспечивает функционирование клеток в условиях электрофильного и окислительного стресса. В отсутствие стресса Nrf2 находится в цитоплазме в комплексе со своим ингибитором – белком Keap1, который стимулирует убиквитинилирование Nrf2 и его последующую деградацию. При появлении избыточного количества АФК или электрофилов происходит разрушение комплекса Keap1–Nrf2, в результате чего Nrf2 мигрирует в ядро. В ядре Nrf2 взаимодействует с последовательностями ARE в промоторах генов, стимулируя их транскрипцию [11]. Nrf2 управляет экспрессией генов, участвующих в антиоксидантном ответе, редокс-гомеостазе, биогенезе митохондрий и других процессах, активация этих генов защищает клетки от развития воспаления [12]. При активации Nrf2 повышается экспрессия гемоксигеназы (HO-1), ответственной за деградацию провоспалительных свободных гемов и образование противовоспалительных соединений, таких как СО и билирубин; НАД(Ф)Н:хинон оксидоредуктазы (NQO1), обладающей антиоксидантными активностями; а также ключевыми ферментами биосинтеза глутатиона – основного клеточного антиоксиданта. Отсутствие Nrf2 у нокаутных мышей вызыва-

ет неконтролируемый воспалительный ответ: активацию клеток врожденного иммунитета, высокую продукцию цитокинов, хемокинов и АФК – все эти факторы способствуют повреждению клеток и тканей [13].

Активация Nrf2 приводит к снижению воспалительного ответа не только за счет увеличения антиоксидантного ответа, но и за счет активности Nrf2 как транскрипционного репрессора, снижающего количество мРНК и белков (цитокинов воспаления IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF) в макрофагах человека [14]. Действие индукторов Nrf2 на снижение цитокинов воспаления в крови описано для множества животных моделей [12, 15–17]. Защитная роль активации Nrf2 при различных воспалительных воздействиях продемонстрирована в многочисленных экспериментах на клетках эпителия дыхательных путей и сосудистого эндотелия [18–22]. В настоящий момент проводятся десятки клинических исследований эффективности индукторов Nrf2 ответа на людях с целью профилактики и лечения воспалительных и респираторных заболеваний.

Ниже суммированы основные факты и наблюдения, обосновывающие целесообразность активации Nrf2 при COVID-19:

1. Избыточный воспалительный ответ при COVID-19 связан с высокой летальностью пациентов [3]. Активация Nrf2 снижает воспалительный ответ, предотвращая экспрессию цитокинов воспаления [14] и макрофагов [23, 24]. Использование индукторов Nrf2 позволяет снизить избыточные воспалительные реакции у пациентов, страдающих острыми и хроническими заболеваниями [25].

2. ОРДС является основным фактором смертности у больных COVID-19 [26]. Активация Nrf2 защищает эпителий дыхательных путей от разрывки межклеточных плотных контактов при воспалительном воздействии и от развития ОРДС [27].

3. В патогенезе COVID-19 нарушение целостности сосудов считается ключевым событием, приводящим к дисфункции эндотелия и тромбообразованию [28]. Активация Nrf2 защищает эндотелий сосудов от повреждения, вызванного окислительным стрессом или цитокинами воспаления [29].

4. Повышенный окислительный стресс характерен для тяжелых случаев течения COVID-19 [30], при этом наблюдаются отдельные случаи успешного лечения COVID-19 с помощью глутатиона [31]. Под контролем транскрипционного фактора Nrf2 находятся ключевые ферменты биосинтеза глутатиона [32]. Снижение активности Nrf2 приводит к развитию окислительного стресса, а стимуляция – к увеличению

содержания глутатиона в организме и восстановлению редокс-баланса [33].

5. Возраст является важнейшим фактором риска при инфекции COVID-19 [34]. С возрастом происходит угасание активности Nrf2 [33].

6. Активность Nrf2 снижена у пациентов с гипергликемией [35], которая тоже является фактором риска при COVID-19 [34].

7. У пациентов мужского пола COVID-19 протекает тяжелее и смертность у них выше, чем у женщин [34]. Половые различия в активности Nrf2 у людей неизвестны, но у самок мышей активность Nrf2 выше, чем у самцов [36].

До сих пор не было предпринято попыток исследовать соединения-индукторы Nrf2 в качестве средств, уменьшающих окислительный стресс и развитие воспаления при инфекциях, вызываемых SARS-CoV-2. Данная задача может быть решена тестированием тех соединений-активаторов Nrf2, которые уже являются лекарственными средствами, или находятся в различных стадиях клинических испытаний на людях. Для активации Nrf2 может применяться широкий спектр соединений, в том числе следующие индукторы:

1. Сульфорафан – растительное соединение, содержащееся в крестоцветных, таких как брокколи и брюссельская капуста. Действие сульфорафана на снижение уровня цитокинов воспаления в крови показано на множестве животных моделей [37]. В настоящее время проводится около 70 клинических испытаний с сульфорафаном для терапии широкого круга заболеваний, в том числе хронической обструктивной болезни легких, астмы, артрита, онкологических заболеваний. Сульфорафан перорально хорошо переносится в суточных дозах до 200 мкмоль, достигая эффективных действующих концентраций в плазме крови [38].

2. Диметилфумарат – диметиловый эфир фумаровой кислоты. В США он был одобрен FDA для лечения рецидивирующего рассеянного склероза (торговое название Tecfidera), а в Германии – для лечения псориаза (торговое название Фумадерм). Интересно, что диметилфумарат способен снижать воспалительные реакции как Nrf2-зависимым [39], так и Nrf2-независимым образом [40, 41].

3. Тиосульфат натрия – лекарственное средство, применяемое внутривенно и перорально. Безопасная субстанция, которая используется для терапии интоксикаций различного генеза. Тиосульфат натрия является донором сероводорода (H<sub>2</sub>S), который является индуктором Nrf2. Сероводород поддерживает редокс-баланс клеток, обладает противовоспалительным действием [42]. Соединения-доноры H<sub>2</sub>S обладают противовоспалительной активностью и антивирусным действием против широкого спектра пато-

генных вирусов [43]. Недавно опубликована обзорная работа, обосновывающая применение ингаляционной формы тиосульфата натрия для пациентов с COVID-19 [44].

4. Эпигаллокатехин 3-галлат – полифенол, содержащийся в зеленом чае. Это нетоксичное соединение обладает противовоспалительной активностью *in vitro* и *in vivo* [45]. Помимо этого, эпигаллокатехин 3-галлат является ингибитором фурина – протеазы, осуществляющей процессинг S-белка SARS-CoV-2 и способствующей проникновению вируса в клетку [46–48].

5. Ресвератрол – полифенол растительного происхождения. Активирует Nrf2, снижая экспрессию его негативного регулятора KEAP1, также активирует деацетилазу SIRT1 [49]. Пероральное употребление ресвератрола приводит к снижению цитокинов воспаления (IL-1β и TNF) и активации экспрессии генов-мишеней Nrf2 (NQO1 и глутатион S-трансферазы) [50]. Ресвератрол повышает синтез эндогенного глутатиона и защищает альвеолярные клетки эпителия от окислительного стресса [51].

В основном данные препараты применяют при лечении хронических воспалительных реакций, а не острых состояний. Неизвестно, насколько эффективно будет применение этих индукторов Nrf2 при цитокиновом шторме и ОРДС. Возможно, индукторы Nrf2 могут применяться для предотвращения развития цитокинового шторма, или в процессе его манифестации, в комбинации с уже используемыми противовоспалительными препаратами.

Для большинства предложенных препаратов уже известна их токсичность и биодоступность, что позволяет быстро приступить к соответствующим клиническим испытаниям. Для снижения окислительного стресса и воспаления при COVID-19 представляется логичным применение индукторов Nrf2 совместно с предшественниками биосинтеза глутатиона, например N-ацетилцистеином. Подобную терапию можно использовать с целью уменьшения повреждения клеток и тканей, предупреждения развития дыхательной недостаточности и ОРДС.

**Благодарности.** Авторы благодарят А. С. Приходько (НИИ физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского МГУ) за полезное обсуждение работы.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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., and tenOever, B. R. (2020) Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19, *Cell*, **181**, 1036-1045, doi: 10.1016/j.cell.2020.04.026.
- Ackermann, M., Verleden, S. E., Kuehnel, M., Haverich, A., Welte, T., Laenger, F., Vanstapel, A., Werlein, C., Stark, H., Tzankov, A., Li, W. W., Li, V. W., Mentzer, S. J., and Jonigk, D. (2020) Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19, *N. Engl. J. Med.*, doi: 10.1056/NEJMoa2015432.
- Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., Manson, J. J., and HLH Across Speciality Collaboration (2020) COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression, *Lancet*, **395**, 1033-1034, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0.
- Zhang, W., Zhao, Y., Zhang, F., Wang, Q., Li, T., Liu, Z., Wang, J., Qin, Y., Zhang, X., Yan, X., Zeng, X., and Zhang, S. (2020) The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): the perspectives of clinical immunologists from China, *Clin. Immunol.*, **214**, 108393, doi: 10.1016/j.clim.2020.108393.
- Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., and Ning, Q. (2020) Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019, *J. Clin. Invest.*, **130**, 2620-2629, doi: 10.1172/JCI137244.
- Schieber, M., and Chandel, N. S. (2014) ROS function in redox signaling and oxidative stress, *Curr. Biol.*, **24**, R453-R462, doi: 10.1016/j.cub.2014.03.034.
- Winn, R. K., and Harlan, J. M. (2005) The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases, *J. Thromb. Haemost.*, **3**, 1815-1824, doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01378.x.
- Klok, F. A., Kruip, M. J. H. A., van der Meer, N. J. M., Arbous, M. S., Gommers, D. A. M. P. J., Kant, K. M., Kaptein, F. H. J., van Paassen, J., Stals, M. A. M., Huisman, M. V., and Endeman, H. (2020) Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19, *Thromb. Res.*, **191**, 145-147, doi: 10.1016/j.thromres.2020.04.013.
- Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, H., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., and Zhang, L. (2020) Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study, *Lancet*, **395**, 507-513, doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
- Zha, L., Li, S., Pan, L., Tefsen, B., Li, Y., French, N., Liyun Chen, L., Gang Yang, G., and Villanueva, E. V. (2020) Corticosteroid treatment of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19), *Med. J. Aust.*, **212**, 416-420, doi: 10.5694/mja2.50577.
- Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism, *Trends. Mol. Med.*, **10**, 549-557, doi: 10.1016/j.molmed.2004.09.003.
- Ahmed, S. M. U., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J., and Tang, X. (2017) Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1863**, 585-597, doi: 10.1016/j.bbadis.2016.11.005.
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N., and Biswal, S. (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 89-116, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046.
- Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., Sekine, H., Tanaka, N., Moriguchi, T., Motohashi, H., Nakayama, K., and Yamamoto, M. (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription, *Nat. Commun.*, **7**, 11624, doi: 10.1038/ncomms11624.
- Thimmulappa, R. K., Scollick, C., Traore, K., Yates, M., Trush, M. A., Liby, K. T., Sporn, M. B., Yamamoto, M., Kensler, T. W., and Biswal, S. (2006) Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 883-889, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.10.102.
- Lin, W., Wu, R. T., Wu, T., Khor, T.-O., Wang, H., and Kong, A.-N. (2008) Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent pathway, *Biochem. Pharmacol.*, **76**, 967-973, doi: 10.1016/j.bcp.2008.07.036.
- Motterlini, R., Nikam, A., Manin, S., Ollivier, A., Wilson, J. L., Djouadi, S., Muchova, L., Martens, T., Rivard, M., and Foresti, R. (2019) HYCO-3, a dual CO-releaser/Nrf2 activator, reduces tissue inflammation in mice challenged with lipopolysaccharide, *Redox Biol.*, **20**, 334-348, doi: 10.1016/j.redox.2018.10.020.
- Kosmider, B., Messier, E. M., Janssen, W. J., Nahreini, P., Wang, J., Hartshorn, K. L., and Mason, R. J. (2012) Nrf2 protects human alveolar epithelial cells against injury induced by influenza A virus, *Respir. Res.*, **13**, 43, doi: 10.1186/1465-9921-13-43.
- Chan, K., and Kan, Y. W. (1999) Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12731-12736, doi: 10.1073/pnas.96.22.12731.
- Boutten, A., Goven, D., Artaud-Macari, E., Boczkowski, J., and Bonay, M. (2011) NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease, *Trends Mol. Med.*, **17**, 363-371, doi: 10.1016/j.molmed.2011.02.006.
- Zakkar, M., Van der Heiden, K., Luong, L. A., Chaudhury, H., Cuhlmann, S., Hamdulay, S. S., Krams, R., Edirisinghe, I., Rahman, I., Carlsen, H., Haskard, D. O., Mason, J. C., and Evans, P. C. (2009) Activation of Nrf2 in endothelial cells protects arteries from exhibiting a proinflammatory state, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **29**, 1851-1857, doi: 10.1161/ATVBAHA.109.193375.
- Chen, X.-L., Dodd, G., Thomas, S., Zhang, X., Wasserman, M. A., Rovin, B. H., and Kunsch, C. (2006) Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **290**, H1862-H1870, doi: 10.1152/ajpheart.00651.2005.
- Jhang, J.-J., and Yen, G.-C. (2017) The role of Nrf2 in NLRP3 inflammasome activation, *Cell. Mol. Immunol.*, **14**, 1011-1012, doi: 10.1038/cmi.2017.114.
- Zhao, C., Gillette, D. D., Li, X., Zhang, Z., and Wen, H. (2014) Nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) is required for NLRP3 and AIM2 inflammasome activation, *J. Biol. Chem.*, **289**, 17020-17029, doi: 10.1074/jbc.M114.563114.
- Robledinos-Antón, N., Fernández-Ginés, R., Manda, G., and Cuadrado, A. (2019) Activators and inhibitors of NRF2: a review of their potential for clinical development, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 9372182, doi: 10.1155/2019/9372182.
- Wu, C., Chen, X., Cai, Y., Xia, J., Zhou, X., Xu, S., Huang, H., Zhang, L., Zhou, X., Du, C., Zhang, Y., Song, J.,

- Wang, S., Chao, Y., Yang, Z., Xu, J., Zhou, X., Chen, D., Xiong, W., Xu, L., Zhou, F., Jiang, J., Bai, C., Zheng, J., and Song, Y. (2020) Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China, *JAMA Intern. Med.*, doi: 10.1001/jamainternmed.2020.0994.
27. Mehla, K., Balwani, S., Agrawal, A., and Ghosh, B. (2013) Ethyl gallate attenuates acute lung injury through Nrf2 signaling, *Biochimie*, **95**, 2404-2414, doi: 10.1016/j.biochi.2013.08.030.
  28. Sardu, C., Gambardella, J., Morelli, M. B., Wang, X., Marfella, R., and Santulli, G. (2020) Is COVID-19 an endothelial disease? Clinical and basic evidence, *J. Clin. Med.*, **9**, E1417, doi: 10.3390/jcm9051417.
  29. Chapple, S. J., Siow, R. C. M., and Mann, G. E. (2012) Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **44**, 1315-1320, doi: 10.1016/j.biocel.2012.04.021.
  30. Buinitskaya, Y., Gurinovich, R., Wlodaver, C. G., and Kastsuchenka, S. (2020) Highlights of COVID-19 pathogenesis. Insights into oxidative damage, doi: 10.6084/m9.figshare.12121575.v9.
  31. Horowitz, R. I., Freeman, P. R., and Bruzzese, J. (2020) Efficacy of glutathione therapy in relieving dyspnea associated with COVID-19 pneumonia: a report of 2 cases, *Respir. Med. Case Rep.*, 101063, doi: 10.1016/j.rmcr.2020.101063.
  32. Li, N., Alam, J., Venkatesan, M. I., Eiguren-Fernandez, A., Schmitz, D., Di Stefano, E., Slaughter, N., Killeen, E., Wang, X., Huang, A., Wang, M., Miguel, A. H., Cho, A., Sioutas, C., and Nel, A. E. (2004) Nrf2 is a key transcription factor that regulates antioxidant defense in macrophages and epithelial cells: protecting against the proinflammatory and oxidizing effects of diesel exhaust chemicals, *J. Immunol.*, **173**, 3467-3481, doi: 10.4049/jimmunol.173.5.3467.
  33. Zhang, H., Davies, K. J. A., and Forman, H. J. (2015) Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging, *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 314-336, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036.
  34. Richardson, S., Hirsch, J. S., Narasimhan, M., Crawford, J. M., McGinn, T., Davidson, K. W., and the Northwell COVID-19 Research Consortium (2020) Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes among 5700 patients hospitalized with COVID-19 in the New York City Area, *JAMA*, **323**, 2052-2059, doi: 10.1001/jama.2020.6775.
  35. Urano, A., Furusawa, Y., Yagishita, Y., Fukutomi, T., Muramatsu, H., Negishi, T., Sugawara, A., Kensler, T. W., and Yamamoto, M. (2013) The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus, *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 2996-3010, doi: 10.1128/MCB.00225-13.
  36. Rooney, J., Oshida, K., Vasani, N., Vallanat, B., Ryan, N., Chorley, B. N., Wang, X., Bell, D. A., Wu, K. C., Aleksunes, L. M., Klaassen, C. D., Kensler, T. W., and Corton, J. C. (2018) Activation of Nrf2 in the liver is associated with stress resistance mediated by suppression of the growth hormone-regulated STAT5b transcription factor, *PLoS One*, **13**, e0200004, doi: 10.1371/journal.pone.0200004.
  37. Innamorato, N. G., Rojo, A. I., García-Yagüe, A. J., Yamamoto, M., de Ceballos, M. L., and Cuadrado, A. (2008) The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation, *J. Immunol.*, **181**, 680-689, doi: 10.4049/jimmunol.181.1.680.
  38. Tahata, S., Singh, S. V., Lin, Y., Hahm, E.-R., Beumer, J. H., Christner, S. M., Rao, U. N., Sander, C., Tarhini, A. A., Tawbi, H., Ferris, L. K., Wilson, M., Rose, A., Dietz, C. M., Hughes, E. K., Fahey, J. W., Leachman, S. A., Cassidy, P. B., Butterfield, L. H., Zarour, H. M., and Kirkwood, J. M. (2018) Evaluation of biodistribution of sulforaphane after administration of oral broccoli sprout extract in melanoma patients with multiple atypical nevi, *Cancer Prev. Res.*, **11**, 429-438, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-17-0268.
  39. Lin, S. X., Lisi, L., Dello Russo, C., Polak, P. E., Sharp, A., Weinberg, G., Kalinin, S., and Feinstein, D. L. (2011) The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase-1, *ASN Neuro*, **3**, doi: 10.1042/AN20100033.
  40. Schulze-Topphoff, U., Varrin-Doyer, M., Pekarek, K., Spencer, C. M., Shetty, A., Sagan, S. A., Cree, B. A. C., Sobel, R. A., Wipke, B. T., Steinman, L., Scannevin, R. H., and Zamvi, S. S. (2016) Dimethyl fumarate treatment induces adaptive and innate immune modulation independent of Nrf2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 4777-4782, doi: 10.1073/pnas.1603907113.
  41. Kornberg, M. D., Bhargava, P., Kim, P. M., Putluri, V., Snowman, A. M., Putluri, N., Snowman, A. M., Putluri, N., Calabresi, P., and Snyder, S. H. (2018) Dimethyl fumarate targets GAPDH and aerobic glycolysis to modulate immunity, *Science*, **360**, 449-453, doi: 10.1126/science.aan4665.
  42. Corsello, T., Komaravelli, N., and Casola, A. (2018) Role of hydrogen sulfide in NRF2- and sirtuin-dependent maintenance of cellular redox balance, *Antioxidants (Basel)*, **7**, doi: 10.3390/antiox7100129.
  43. Bazhanov, N., Escaffre, O., Freiberg, A. N., Garofalo, R. P., and Casola, A. (2017) Broad-range antiviral activity of hydrogen sulfide against highly pathogenic RNA viruses, *Sci. Rep.*, **7**, 41029, doi: 10.1038/srep41029.
  44. Evgen'ev, M. B., and Frenkel, A. (2020) Possible application of H<sub>2</sub>S-producing compounds in therapy of coronavirus (COVID-19) infection and pneumonia, *Cell Stress Chaperones*, doi: 10.1007/s12192-020-01120-1.
  45. Ohishi, T., Goto, S., Monira, P., Isemura, M., and Nakamura, Y. (2016) Anti-inflammatory action of green tea, *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.*, **15**, 74-90, doi: 10.2174/1871523015666160915154443.
  46. Zhu, J., Van de Ven, W. J. M., Verbiest, T., Koeckelberghs, G., Chen, C., Cui, Y., and Vermorken, A. J. M. (2013) Polyphenols can inhibit furin *in vitro* as a result of the reactivity of their auto-oxidation products to proteins, *Curr. Med. Chem.*, **20**, 840-850, doi: 10.2174/0929867311320060009.
  47. Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., and Li, F. (2020) Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 11727-11734, doi: 10.1073/pnas.2003138117.
  48. Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G., and Decroly, E. (2020) The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade, *Antiviral Res.*, **176**, 104742, doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104742.
  49. Ungvari, Z., Bagi, Z., Feher, A., Recchia, F. A., Sonntag, W. E., Pearson, K., de Cabo, R., and Csizsar, A. (2010) Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **299**, H18-H24, doi: 10.1152/ajpheart.00260.2010.
  50. Ghanim, H., Sia, C. L., Korzeniewski, K., Lohano, T., Abuaysheh, S., Marumganti, A., Chaudhuri, A., and Dandona, P. (2011) A resveratrol and polyphenol preparation suppresses oxidative and inflammatory stress response to a high-fat, high-carbohydrate meal, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **96**, 1409-1414, doi: 10.1210/jc.2010-1812.
  51. Kode, A., Rajendrasozhan, S., Caito, S., Yang, S.-R., Megson, I. L., and Rahman, I. (2008) Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **294**, L478-L488, doi: 10.1152/ajplung.00361.2007.

**TRANSCRIPTION FACTOR Nrf2 AS A THERAPEUTIC TARGET FOR THE PREVENTION OF CYTOKINE STORM IN COVID-19****R. A. Zinovkin<sup>1,2,3\*</sup> and O. A. Grebenchikov<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: roman.zinovkin@gmail.com*

<sup>2</sup> *Institute of Mitoengineering, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia*

<sup>4</sup> *Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology, 107031 Moscow, Russia*

Received May 30, 2020

Revised June 4, 2020

Accepted June 4, 2020

Nrf2 is a key transcription factor responsible for antioxidant defense in many tissues and cells, including alveolar epithelium, endothelium, and macrophages. Furthermore, Nrf2 functions as a transcriptional repressor that inhibits expression of the inflammatory cytokines in macrophages. Critically ill patients with COVID-19 infection often present signs of high oxidative stress and systemic inflammation – the leading causes of mortality. This article suggests rationale for the use of Nrf2 inducers to prevent development of an excessive inflammatory response in COVID-19 patients.

*Keywords:* Nrf2, SARS-CoV-2, COVID-19, cytokine storm, oxidative stress

## **АНОНС**

В журнале «Биохимия» готовятся следующие специальные выпуски:

**Том 85, № 10, 2020 г.** «Программируемая гибель клеток в биологии и медицине» (под ред. проф. Б.Д. Животовского).

**Том 85, № 11, 2020 г.** Часть I. «Пути поиска новых антибиотиков» (под ред. акад. А.Г. Габрибова). Часть II. «Исследования структуры и функций рибосом» (под ред. проф. П.В. Сергиева и акад. О.А. Донцовой). Посвящается юбилею акад. А.А. Богданова.

**Том 85, № 12, 2020 г.** «Феноптоз» (под ред. главного редактора, акад. В.П. Скулачёва). Посвящается юбилею акад. В.П. Скулачёва.