СОДЕРЖАНИЕ

Том 55, номер 3, 2021

ОБЗОРЫ

Функции E3 убиквитин-лигазы Hyd в тканях дрозофилы

Ю. А. Галимова, Н. В. Дорогова, С. А. Фёдорова 355

Что могут рассказать белки WOX? Обзор мишеней, регуляторов, партнеров

В. Е. Творогова, Е. Ю. Красноперова, А. А. Кудряшов, Э. А. Поценковская, И. Е. Додуева, Л. А. Лутова 362

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

Паттерны экспрессии p53 и Ki-67 при HBV-ассоциированной гепатоцеллюлярной карциноме: количественная ПЦР в реальном времени и иммуногистохимическое исследование

Z. Heidari, B. Moudi, H. Mahmoudzadeh-Sagheb 392

Пептидный препарат АКТГ(4-7)PGP (семакс) подавляет транскрипцию генов провоспалительных медиаторов, индуцированную обратимой ишемией мозга крыс

Л. В. Дергунова, В. Г. Дмитриева, И. Б. Филиппенков, В. В. Ставчанский, А. Е. Денисова, В. В. Южаков, Л. Е. Севанькаева, Л. В. Валиева, О. Ю. Сударкина, Л. В. Губский, Н. Ф. Мясоедов, С. А. Лимборская 402

Спектр герминальных и соматических мутаций в архивных образцах рака молочной железы с различным рецепторным статусом

И. С. Абрамов, Ю. С. Корнева, О. А. Шистерова, А. Ю. Иконникова, М. А. Емельянова, Т. С. Лисица, Г. С. Краснов, Т. В. Наседкина 412

Изменение транскрипции генов *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc* и *FoxG1* в развивающемся мозге мышей с нокаутом гена *Zbtb33*

Н. Б. Илларионова, М. А. Борисова, Е. Ю. Баженова, Д. С. Забелина, Д. В. Фурсенко, А. В. Куликов 422

Генетическая вариабельность 5'-нетранслируемой области генома вируса клещевого энцефалита из разных регионов Северной Евразии

Е. П. Пономарева, В. А. Терновой, Т. П. Микрюкова, Е. В. Протопопова, Н. Л. Тупота, В. Б. Локтев 431

Роль естественного отбора в формировании генетической компоненты преэклампсии

В. Н. Сереброва, Е. А. Трифонова, В. А. Степанов 441

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Гипоксия ускоряет экспрессию β-актина через активацию транскрипции *actb* ядерным фактором дыхания-1

X. T. Wang, K. Cheng, L. Zhu 460

Яд змеи *Macrovipera lebetina obtusa* как противоопухолевый модулятор в мышиной модели саркомы S-180

N. Ghazaryan, N. Movsisyan, J. C. Macedo, S. Vaz, N. Ayvazyan, L. Pardo, E. Logarinho 468

Профилактическая вакцинация мезенхимальными стволовыми клетками защищает мышей от летальной инфекции, вызванной вирусом простого герпеса 1 типа

Р. Р. Климова, Н. А. Демидова, О. В. Масалова, А. А. Кущ 478

N-домен антирестрикционных белков ArdA ингибирует репрессорную активность гистоноподобного белка H-NS

О. Е. Мелькина, Г. Б. Завильгельский 491

Деубиквитинирующий (DUB) модуль SAGA участвует в Pol III-зависимой транскрипции

Ю. В. Николенко, Ю. А. Вдовина, Е. И. Фефелова, А. А. Глухова, Е. Н. Набирочкина, Д. В. Копытова 500

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

Перекрестные связи между сигнальными путями глутаматных и лептиновых рецепторов

А. Л. Проскура, М. Ю. Исламова, С. О. Вечкапова 510

МЕТОДЫ

Дисульфидные связи в белках, детектируемые присоединением высокомолекулярных производных малеимида

Q.-W. Ding, M. Lin 519

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 3, с. 355–361

ОБЗОРЫ

УДК 577.29:57.052

ФУНКЦИИ Е3 УБИКВИТИН-ЛИГАЗЫ Hyd В ТКАНЯХ ДРОЗОФИЛЫ

© 2021 г. Ю. А. Галимова[a], *, Н. В. Дорогова[b], С. А. Фёдорова[b]

[a] Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

[b] Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: pertseva@ngs.ru

Поступила в редакцию 31.07.2020 г.
После доработки 30.09.2020 г.
Принята к публикации 04.10.2020 г.

Убиквитин-протеасомная система (UPS) – важный регулятор основных клеточных процессов. Компоненты UPS вовлечены в регуляцию клеточного цикла, трансдукцию сигнала, ответ клетки на повреждения ДНК, метаболизм и контроль транскрипции. Ключевую роль в функционировании UPS играют Е3 убиквитин-лигазы – ферменты, которые ковалентно присоединяют убиквитин к белкам-мишеням. Одна из наиболее интересных Е3 лигаз – супрессор опухолевого роста Hyd (hyperplastic discs) дрозофилы, необходима для регуляции пролиферации, роста и дифференцировки клеток. Изучение мутаций *hyd* в различных тканях дрозофилы показало, что в зависимости от клеточного контекста Hyd может выполнять не только протеолитические функции, связанные с деградацией белков, но и, взаимодействуя с другими белками и/или нуклеиновыми кислотами, выступать в качестве важного регулятора клеточных процессов.

Ключевые слова: убиквитинирование, убиквитин-лигаза Е3, опухолевый супрессор, непротеолитические функции

DOI: 10.31857/S002689842103006X

УБИКВИТИНИРОВАНИЕ И РОЛЬ Е3 УБИКВИТИН-ЛИГАЗ

Убиквитин (Ub) – небольшой высококонсервативный белок, состоящий из 76 аминокислотных остатков, присутствует во всех клетках, а убиквитинирование – одна из самых частых посттрансляционных модификаций белков, играет ключевую роль в разнообразных клеточных процессах. Существуют разные типы убиквитиновых модификаций: моноубиквитинирование – присоединение одной молекулы убиквитина к белку путем ковалентного связывания с остатком лизина (Lys) в молекуле субстрата; мультиубиквитинирование (или множественное моноубиквитинирование) – одновременное присоединение убиквитина к нескольким остаткам Lys белка-субстрата; полиубиквитинирование – формирование поли-Ub-цепи, состоящей из нескольких молекул убиквитина, связанных между собой посредством специфических остатков лизина и глицина. В убиквитин-протеасомной системе (UPS – Ubiquitin-Proteasome System) убиквитин модифицирует белковые субстраты, формируя поли-Ub-цепи, которые служат сигналом для протеасомной деградации белка [1]. Однако оказалось, что убиквитин не только регулирует деградацию белков посредством UPS, но и выполняет множество непротеолитических регуляторных функций. Убиквитинирование изменяет поверхность белка-субстрата, что влияет на его активность, стабильность, способность взаимодействовать с другими белками, а также на его внутриклеточную локализацию [2, 3]. Моноубиквитинирование или мультиубиквитинирование необходимы для попадания определенных белков в везикулы на разных стадиях секреторно-эндоцитозного пути. В этом случае убиквитин выступает в роли регулируемого сортировочного сигнала [4]. А в случае полиубиквитинирования различная топология поли-Ub-цепей приводит к связыванию со специфическими белками-адапторами, что, в свою очередь, имеет различные последствия. Возможны по меньшей мере восемь различных типов связей между мономерами убиквитина. Семь из них образуются за счет внутренних остатков лизина в структуре убиквитина, а восьмой осуществляется через N-концевой остаток метионина [5]. К примеру, связывание через Lys48 используется главным образом для направления белка на деградацию, а связывание через Lys63 играет важную роль в репарации ДНК, воспалительной реакции, эндоцитозе и синтезе белка на рибосомах [6].

Связывание убиквитина с белками-субстратами осуществляется путем трех последовательных

ферментативных реакций. Сначала убиквитин-активирующий фермент E1 ATP-зависимо активирует убиквитин с формированием высокоэнергетической тиоэфирной связи между карбоксильной группой C-концевого остатка глицина в убиквитине и остатком цистеина в молекуле E1. Затем активированный убиквитин переносится на специфический остаток цистеина убиквитинсвязывающего фермента E2 с формированием сходной тиоэфирной связи. На третьем этапе убиквитин-лигаза E3 взаимодействует одновременно с E2, благодаря E2-связывающему домену, и с белком-субстратом, благодаря субстратсвязывающему домену. Убиквитин-лигаза E3 осуществляет перенос активированного убиквитина с E2 на субстрат с формированием изопептидной связи между ε-аминогруппой субстрата и C-концевой карбоксильной группой убиквитина [7]. Именно на этом этапе происходит распознавание специфичного субстрата, сайта и типа убиквитиновой модификации, поэтому убиквитин-лигазы E3 играют ключевую роль в каскаде реакций убиквитинирования.

Чтобы использовать весь функциональный потенциал убиквитинирования, в эукариотических клетках существуют сотни убиквитин-лигаз, которые содержат несколько основных типов каталитических доменов и разнообразные субстратсвязывающие домены и регуляторные элементы. Это свойство позволяет убиквитин-лигазам функционировать в разных клеточных контекстах, отвечать на различные клеточные сигналы и стимулировать процессинг разнообразных белковых субстратов. В геноме человека найдено около 1000 E3 убиквитин-лигаз, которые в зависимости от структуры E2-связывающего домена делят на три основных класса: RING (Really Interesting New Gene)/U-box, HECT (Homologous to E6AP C-Terminus) и RBR (RING between RING) [8]. Каждый из этих классов имеет свой особый белоксвязывающий домен (RING-finger или HECT) для связывания с E2 и различные домены для взаимодействия с субстратами.

RING-домен устроен по типу цинковых пальцев, он осуществляет перенос убиквитина от E2 на субстрат за один шаг [9]. Это самое большое семейство E3 убиквитин-лигаз. У человека насчитывается около 600 представителей данного семейства [9]. Среди них есть белки, осуществляющие свои функции как самостоятельно (например, IAP – inhibitor of apoptosis, предотвращающий апоптоз; Mdm2, катализирующий убиквитинирование p53), так и в составе мультибелковых комплексов (таких как SCF – Skp-Cullin-F-box и APC/C – anaphase-promoting complex/cyclosome), мишенями которых служат циклины и секурины – ингибиторы анафазы [10–13].

Второй класс E3 лигаз – HECT-лигазы – характеризуется наличием C-концевого домена из ~350 аминокислот, содержащего активный сайт – консервативный остаток цистеина, с помощью которого образуется временная тиоэфирная связь с убиквитином, а затем его перенос на остаток лизина в молекуле целевого белка [14]. В геноме человека обнаружено около 50 генов белков этого семейства. К этому классу относятся белки E6-AP, Huwe1 и Nedd4.

E3 лигазы третьего класса – RBR – совмещают в себе черты двух первых классов, так как имеют два RING-домена, один из которых функционирует как каркас, а другой содержит каталитический остаток цистеина, образующий промежуточную связь с убиквитином [15]. У человека известно 14 E3 лигаз класса RBR, из которых наиболее изучен Parkin [15].

Hyd – УНИКАЛЬНЫЙ ЧЛЕН СЕМЕЙСТВА E3 ЛИГАЗ

Правильное функционирование UPS необходимо для нормального протекания таких жизненно важных процессов, как клеточный цикл и апоптоз. Поэтому в последние годы возрос интерес к изучению компонентов UPS, в частности E3 убиквитин-лигаз, обеспечивающих специфичность убиквитинирования, в качестве потенциальных мишеней для терапии многих болезней, включая рак. Один из наиболее интересных представителей семейства E3 убиквитин-лигаз – HECT-убиквитин-лигаза HYD (hyperplastic discs). Первоначально *hyd* обнаружили у *Drosophila melanogaster* как температурочувствительную мутацию, которая вызывала разрастание крыловых и гальтерных имагинальных дисков в мутантных личинках, выращенных при рестриктивной температуре, при этом способность дисков к дифференцировке сохранялась [16, 17]. Было показано, что *hyd* играет ключевую роль в контроле пролиферации соматических клеток в процессе развития дрозофилы, и на этом основании его отнесли к супрессорам опухолевого роста [17].

Убиквитин-лигаза Hyd дрозофилы, кодируемая геном *hyperplastic discs*, относится к HECT-семейству E3 убиквитин-лигаз. Белок Hyd состоит из 2885 аминокислотных остатков и содержит N-концевой UBA-домен (ubiquitin-associated), необходимый для связывания с убиквитином [18]; два сигнала ядерной локализации NLS; UBR (ubiquitin recognin box) домен по типу цинковых пальцев, отвечающий за распознавание первого типа N-дегронов [19]; C-концевой HECT-домен, обеспечивающий каталитическую активность; и белоксвязывающий домен PABC (poly(A)-binding protein C-terminal) (рис. 1*a*).

В структуре HECT-домена выделяются две различные части, связанные между собой гибким линкером. N-концевая часть взаимодействует с

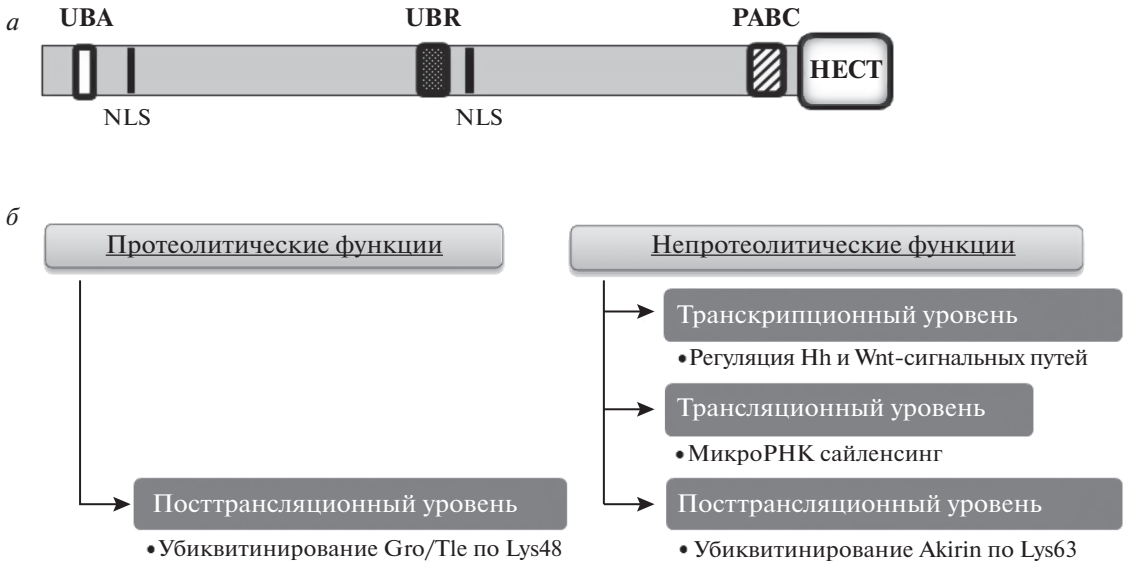


Рис. 1. Структура (*а*) и функции (*б*) белка Hyd. UBA – ubiquitin-associated domain; NLS – nuclear localization signal; UBR – ubiquitin recognin box; HECT – homologous to the E6-AP carboxyl terminus; PABC – poly(A)-binding protein C-terminal.

убиквитинсвязывающим ферментом E2, а C-концевая часть содержит каталитический остаток цистеина, который принимает убиквитин от E2. При этом C-концевая часть Hyd имеет уникальные особенности, отличающие ее от HECT-доменов других E3 лигаз, такие как вставка из четырех аминокислот во второй спирали, которая приводит к удлинению спирали и совершенно новой ориентации предшествующей петли. Эта выступающая петля имеет значение при взаимодействии с E2-связывающим ферментом, она влияет на специфичность связывания [20].

Еще одна уникальная черта белка Hyd – наличие белоксвязывающего домена PABC, найденного также в белке PABP (poly(A)-binding protein), функция которого связана с трансляцией мРНК. PABC представляет собой небольшой протеолитически стабильный, высококонсервативный участок, который служит для связывания с различными белками, осуществляющими регуляцию трансляции (медиаторами терминации и усиления трансляции, стабилизации и полиаденилирования мРНК) [21]. Домен PABC белка Hyd может связываться с некоторыми партнерами соответствующего PABC-домена белка PABP [21, 22].

Hyd В ТКАНЯХ ДРОЗОФИЛЫ

Еще в ранних исследованиях было показано, что опухолевые супрессоры могут функционировать во многих тканях, но только в некоторых из них мутации этих генов вызывают гиперплазию [23]. Изучение мутаций *hyd* в соматических тканях дрозофилы выявило интересную особенность этого онкосупрессора. Оказалось, что при сильных мутациях мухи умирают на личиночной стадии или на ранней стадии куколки, а имагинальные диски меньше по размеру или отсутствуют совсем. При слабых мутациях, наоборот, чаще встречаются разросшиеся диски, а особи доживают до поздних стадий куколки или до взрослого состояния [17]. В связи с этим предполагается [17], что роль Hyd в контроле клеточной пролиферации не ограничивается лишь ее терминацией, этот фермент участвует также в ее инициации и поддержании.

Эксперименты по мозаичному анализу на глазных имагинальных дисках дрозофилы показали, что в глазах взрослых особей, содержащих клоны клеток, гомозиготных по мутации *hyd*, разрастается нормальная ткань дикого типа, окружающая мутантные клоны [24]. При этом сами мутантные клоны во взрослом состоянии не сохраняются. Механизм разрастания, при котором сверхпролиферации подвергаются не сами мутантные клетки, а их окружение, получил название клеточно-неавтономного. Глаза, которые полностью состояли из мутантной ткани, были меньше по размеру. Этот фенотип объясняется тем, что в клонах, мутантных по *hyd*, происходит эктопическая экспрессия генов *hedgehog* и *dpp,* что, в свою очередь, приводит к преждевременной дифференцировке фоторецепторов и распространению волны дифференцировки в окружающие здоровые ткани. Таким образом, когда глаз полностью мутантный, прогрессия морфогенетической борозды ускоряется, и клетки диска раньше прекращают деление.

Также известно, что утрата функции гена *hyd* приводит к стерильности самцов и самок дрозо-

филы [17]. На модели сперматогенеза показано, что мутации *hyd* вызывают многочисленные нарушения клеточного деления и дифференцировки сперматоцитов, к которым приводит несогласованность в развитии событий хромосомного, центросомного, микротрубочкового и цитоплазматического циклов. Однако при этом не происходит гиперплазии ни зародышевой, ни соматической тканей семенников, и особенность гена как онкосупрессора не проявляется [25].

Разное проявление мутаций *hyd* в разных тканях обусловлено многофункциональностью этого белка: в зависимости от клеточного контекста он может осуществлять не только свои протеолитические функции, связанные с деградацией белков, но и, взаимодействуя с другими белками и/или нуклеиновыми кислотами, выступать в качестве важного регулятора клеточных процессов (рис. 1*б*).

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ Hyd

Хотя выявлено более 56 белок-белковых взаимодействий, в которых участвует белок Hyd дрозофилы, доказанным субстратом для убиквитинирования с последующей протеасомной деградацией является только белок Groucho/TLE [26]. У ортолога Hyd, белка UBR5 (Ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 5) человека, который локализуется преимущественно в ядре, известно множество субстратов, включая белки ответа на повреждения ДНК (TopBP1, ATMIN и CHK2) [27–29], регуляторы транскрипции (hPXR, RNF168, CDK9) [27] и трансляции (PAIP2 (PABP2)) [27], протоонкогены β-катенин, E6 папилломавируса человека и c-Myc [27, 28, 30], регуляторы клеточной гибели MOAP1 и XIAP [31, 32], белки с мотивом PAM2 – BUB1, BUB1β, и ATXN2L [26], фактор ангиогенеза AGR2 [33] и глюконеогенеза PEPCK1 [28]. Таким образом, UBR5 млекопитающих вовлечен в регуляцию многих клеточных процессов: транскрипцию, трансляцию, пролиферацию, трансформацию клеток, ответ на повреждения ДНК (рис. 1*б*).

НЕПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ Hyd

В экспериментах на крыловых имагинальных дисках дрозофилы показано, что в Hh-сигнальном пути Hyd регулирует экспрессию генов-мишеней Hh – *dpp, ptc, en, col,* связываясь непосредственно с промоторами этих генов в различных соотношениях, что делает возможным их дифференцированное регулирование [34]. На определенном промоторе Hyd выступает в роли фактора, присутствие которого влияет на транскрипционную активность Ci (*Cubitus interuptus*) – главного транскрипционного медиатора Hh-сигнального пути. При этом Hyd физически взаимодействует с Ci. Интересно, что для осуществления этой регуляции необходима E3 лигазная активность Hyd, но в протеасомной деградации этих субстратов Hyd не участвует [34].

Hyd необходим также для запуска экспрессии генов-мишеней в сигнальном пути Wnt, контролирующем ключевые события в процессе эмбрионального развития и морфогенеза. В отсутствие сигнала Wg репрессор Groucho/TLE связан с энхансерной последовательностью генов-мишеней, и это предотвращает их экспрессию. В ответ на сигнал происходит стабилизация белка-эффектора β-катенина, который связывается с Groucho/TLE и Hyd, что приводит к убиквитинированию TLE, его дестабилизации и, как следствие, к конформационному изменению всего комплекса белков, связанных с энхансером. Хроматин переходит в деконденсированное состояние, что приводит к активации транскрипции. Экспериментально полученные данные позволили сделать вывод [26], что инактивация Groucho/TLE путем убиквитинирования и последующей протеасомной деградации не является основным механизмом регуляции его репрессорных функций. Предполагается, что присоединение поли-(Ub)-цепей ослабляет связь Groucho/TLE с нуклеосомами, а следовательно, и его способность удерживать хроматин в компактном состоянии [26].

Другой пример непротеолитической функции Hyd – участие в развитии иммунного ответа у дрозофилы. Посредством каталитического HECT-домена Hyd физически взаимодействует с белком Akirin и формирует на нем Lys63-поли-(Ub)-цепи, которые служат для дальнейшего связывания кофактора Akirin с транскрипционным фактором Relish и последующей активации экспрессии Akirin-зависимых генов [35]. Белок UBR5 человека (ортолог Hyd дрозофилы) необходим также для активации транскрипции AKIRIN2-зависимых генов.

Во всех приведенных примерах рассмотрены эволюционно консервативные сигнальные пути. И у млекопитающих, и у дрозофилы Hyd выполняет в них аналогичные функции. Еще один пример консервативного механизма регуляции экспрессии генов с участием UBR5 – генный сайленсинг, опосредованный микроРНК. В этом процессе убиквитин-лигазная активность UBR5 вообще оказалась необязательной. Для нормального функционирования UBR5 в сайленсинге с участием микроРНК необходим домен PABC, посредством которого UBR5 взаимодействует с белками семейства GW182 в комплексе с Argonaute и микроРНК, осуществляющими регуляцию трансляции [36] (рис. 1*б*).

РОЛЬ Hyd В РАЗВИТИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Hyd, как и все Е3 убиквитин-лигазы, – высококонсервативный белок, имеющий близкого ортолога у млекопитающих – UBR5, также известного, как EDD (E3 identified by Differential Display). Изначально *UBR5* был идентифицирован в клетках рака молочной железы при скрининге генов, регулируемых прогестином [37]. В дальнейшем оказалось, что амплификация *UBR5* характерна для многих видов рака [38]. Так, при раке молочной железы и раке яичников амплификация локуса *UBR5* приводит к сверхэкспрессии мРНК гена *UBR5*. Недавние исследования показали, что 18% случаев мантийноклеточной лимфомы связаны с несинонимичными заменами в гене *UBR5*. Большинство из этих мутаций затрагивает консервативный остаток цистеина в HECT-домене белка, что нарушает его лигазную активность [39]. По данным COSMIC (catalogue of somatic mutations in cancer) при раке часто возникают точечные мутации по всей рамке считывания *UBR5,* а в районе домена HECT/PABC наблюдается тенденция к мутациям со сдвигом рамки считывания, что также, скорее всего, приводит к потере Е3 убиквитин-лигазной активности [40]. Это указывает на онкосупрессорную функцию UBR5-опосредованного убиквитинирования [27].

Все большее количество исследований говорит о том, что UBR5 связан с различными аспектами биологии рака, но механизм, посредством которого этот белок вносит вклад в инициацию и прогрессию опухолей, остается невыясненным. Не совсем понятно, к какой группе генов следует отнести *UBR5* – к онкогенам или онкосупрессорам. В одних случаях прослеживается четкая связь между амплификацией *UBR5*, его сверхэкспрессией и химиорезистентностью опухоли и, как следствие, с неблагоприятным исходом болезни [32]. Например, повышенный уровень экспрессии UBR5 при серозном раке яичника коррелирует со сниженной чувствительностью к цисплатину, что в совокупности приводит к почти двукратному увеличению риска рецидива и смерти пациентов [41]. В других случаях развитие опухолей обусловлено мутациями потери функции UBR5 [39]. В связи с этим большое значение для изучения роли UBR5 в развитии рака приобретают животные модели, позволяющие модулировать экспрессию UBR5 в различных условиях и в различных клеточных контекстах. Выяснение роли UBR5 и набора субстратов в каждом конкретном случае необходимы для использования UBR5 в качестве мишени при таргетной противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных научных исследований по темам 0310-2019-0005 (Ю.А. Галимова) и 0324-2019-0042-С-01 (Н.В. Дорогова и С.А. Фёдорова).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Finley D. (2009) Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu. Rev. Biochem*. **78**, 477–513.
2. Schnell J.D., Hicke L. (2003) Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin binding proteins. *J. Biol. Chem*. **278**, 35857–35860.
3. Mukhopadhyay D., Riezman H. (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*. **315**, 201–205.
4. Hicke L. (2001) A new ticket for entry into budding vesicles – ubiquitin. *Cell*. **106**, 527–530.
5. Kirisako T., Kamei K., Murata S., Kato M., Fukumoto H., Kanie M., Sano S., Tokunaga F., Tanaka K., Iwai K. (2006) A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J*. **25**(20), 4877–4887.
6. Pickart C.M., Fushman D. (2004) Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr. Opin. Chem. Biol*. **8**, 610–616.
7. Bernassola F., Karin M., Aaron Ciechanover A., Melino G. (2008) The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development. *Cancer Cell*. **14**, 10–21.
8. Sun Y. (2006) E3 ubiquitin ligases as cancer targets and biomarkers. *Neoplasia*. **8**, 645–654.
9. Deshaies R.J., Joazeiro C.A.P. (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem*. **78**, 399–434.
10. Yang Y., Fang S., Jensen J.P., Weissman A.M., Ashwell J.D. (2000) Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*. **288**, 874–877.
11. Fang S., Jensen J.P., Ludwig R.L., Vousden K.H., Weissman A.M. (2000) Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem*. **275**, 8945–8951.
12. Deshaies R.J. (1999) SCF and cullin/RING H2-based ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. **15**, 435–467.
13. Chang L., Barford D. (2014) Insights into the anaphase-promoting complex: a molecular machine that regulates mitosis. *Curr. Opin. Struct. Biol*. **29**, 1–9.
14. Scheffner M., Nuber U., Huibregtse J.M. (1995) Protein ubiquitination involving an E1–E2–E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*. **373**, 81–83.
15. Wenzel D.M., Lissounov A., Brzovic P.S., Klevit R.E. (2011) UBCH7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature*. **474**, 105–108.
16. Martin P., Martin A., Shearn A. (1977) Studies of l(3)c43hs1 a polyphasic, temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster* with a variety of imaginal disc defects. *Dev. Biol*. **55**, 213–232.

17. Mansfield E., Hersperger E., Biggs J., Shearn A. (1994) Genetic and molecular analysis of *hyperplastic discs*, a gene whose product is required for regulation of cell proliferation in *Drosophila melanogaster* imaginal discs and germ cells. *Dev. Biol*. **165**, 507–526.
18. Kozlov G., Nguyen L., Lin T., De Crescenzo G., Park M., Gehring K. (2007) Structural basis of ubiquitin recognition by the ubiquitin-associated (UBA) domain of the ubiquitin ligase EDD. *J. Biol. Chem*. **282**, 35787–35795.
19. Tasaki T., Mulder L.C., Iwamatsu A., Lee M.J., Davydov I.V., Varshavsky A., Muesing M., Kwon Y.T. (2005) A family of mammalian E3 ubiquitin ligases that contain the UBR box motif and recognize N-degrons. *Mol. Cell. Biol*. **25**, 7120–7136.
20. Matta-Camacho E., Kozlov G., Menade M., Gehring K. (2012) Structure of the HECT C-lobe of the UBR5 E3 ubiquitin ligase. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun*. **68**, 1158–1163.
21. Deo R.C., Sonenberg N., Burley S.K. (2001) X-ray structure of the human hyperplastic discs protein: an ortholog of the C-terminal domain of poly(A)-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 4414–4419.
22. Lim N.S., Kozlov G., Chang T.C., Groover O., Siddiqui N., Volpon L., De Crescenzo G., Shyu A.B., Gehring K. (2006) Comparative peptide binding studies of the PABC domains from the ubiquitin-protein isopeptide ligase HYD and poly(A)-binding protein. Implications for HYD function. *J. Biol. Chem*. **281**, 14376–14382.
23. Gateff E. (1994) Tumor suppressor and overgrowth suppressor genes of *Drosophila melanogaster:* developmental aspects. *Int. J. Dev. Biol*. **38**(4), 565–590.
24. Lee J.D., Amanai K., Shearn A., Treisman J.E. (2002) The ubiquitin ligase hyperplastic discs negatively regulates hedgehog and decapentaplegic expression by independent mechanisms. *Development*. **129**, 5697–5706.
25. Pertceva J.A., Dorogova N.V., Bolobolova E.U., Nerusheva O.O., Fedorova S.A., Omelyanchuk L.V. (2010) The role of *Drosophila hyperplastic discs* gene in spermatogenesis. *Cell Biol. Int*. **34**, 991–996.
26. Flack J. E., Mieszczanek J., Novcic N., Bienz M. (2017) Wnt-dependent inactivation of the Groucho/TLE corepressor by the HECT E3 ubiquitin ligase Hyd/UBR5. *Mol. Cell*. **67**, 181–193.
27. Shearer R.F., Iconomou M., Watts C.K., Saunders D.N. (2015) Functional roles of the E3 ubiquitin ligase UBR5 in cancer. *Mol. Cancer Res*. **13**, 1523–1532.
28. Scheffner M., Kumar S. (2014) Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: biological and pathophysiological aspects. *Biochim. Biophys. Acta*. **1843**(1), 61–74.
29. Muñoz-Escobar J., Matta-Camacho E., Kozlov G., Gehring K. (2015) The MLLE domain of the ubiquitin ligase UBR5 binds to its catalytic domain to regulate substrate binding. *J. Biol. Chem*. **290**(37), 22841–22850.
30. Qiao X., Liu Y., Prada M.L., Mohan A.K., Gupta A., Jaiswal A., Sharma M., Merisaari J., Haikala H.M., Talvinen K., Yetukuri L., Pylvänäinen J.W., Klefström J., Kronqvist P., Meinander A., Aittokallio T., Hietakangas V., Eilers M., Westermarck J. (2020) UBR5 is co-amplified with MYC in breast tumors and encodes an ubiquitin ligase that limits MYC-dependent apoptosis. *Cancer Res*. **80**(7), 1414–1427.
31. Gupta I., Singh K., Varshney N.K., Khan S. (2018) Delineating crosstalk mechanisms of the ubiquitin proteasome system that regulate apoptosis. *Front. Cell. Dev. Biol*. **6**, 11.
32. Matsuura K., Huang N.J., Cocce K., Zhang L., Kornbluth S. (2017) Downregulation of the proapoptotic protein MOAP-1 by the UBR5 ubiquitin ligase and its role in ovarian cancer resistance to cisplatin. *Oncogene*. **36**(12), 1698–1706.
33. Wang D., Xu Q., Yuan Q., Jia M., Niu H., Liu X., Zhang J, Young C.Y., Yuan H. (2019) Proteasome inhibition boosts autophagic degradation of ubiquitinated-AGR2 and enhances the antitumor efficiency of bevacizumab. *Oncogene*. **38**, 3458–3474.
34. Wang G., Tang X., Chen Y., Cao J., Huang Q., Ling X., Ren W., Liu S., Wu Y., Ray L., Lin X. (2014) Hyperplastic discs differentially regulates the transcriptional outputs of Hedgehog signaling. *Mech. Dev*. **133**, 117–125.
35. Cammarata-Mouchtouris A., Nguyen X.H., Acker A., Bonnay F., Goto A., Orian A., Fauvarque M.O., Boutros M., Reichhart J.M., Matt N. (2020) Hyd ubiquitinates the NF-κB co-factor Akirin to operate an effective immune response in *Drosophila*. *PLoS Pathog*. **16**(4), e1008458.
36. Su H., Meng S., Lu Y., Trombly M.I., Chen J., Lin C., Turk A., Wang X. (2011) Mammalian hyperplastic discs homolog EDD regulates miRNA-mediated gene silencing. *Mol. Cell*. **43**(1), 97–109.
37. Callaghan M.J., Russell A.J., Woollatt E., Sutherland G.R., Sutherland R.L., Watts C.K. (1998) Identification of a human HECT family protein with homology to the Drosophila tumor suppressor gene *hyperplastic discs*. *Oncogene*. **17**, 3479–3491.
38. Clancy J.L., Henderson M.J., Russell A.J., Anderson D.W., Bova R.J., Campbell I.G., Choong D.Y., Macdonald G.A., Mann G.J., Nolan T., Brady G., Olopade O.I., Woollatt E., Davies M.J., Segara D., Hacker N.F., Henshall S.M., Sutherland R.L., Watts C.K. (2003) EDD, the human orthologue of the *hyperplastic discs* tumour suppressor gene, is amplified and overexpressed in cancer. *Oncogene*. **22**, 5070–5081.
39. Meissner B., Kridel R., Lim R.S., Rogic S., Tse K., Scott D.W., Moore R., Mungall A.J., Marra M.A., Connors J.M., Steidl C., Gascoyne R.D. (2013) The E3 ubiquitin ligase UBR5 is recurrently mutated in mantle cell lymphoma. *Blood*. **121**, 3161–3164.
40. Forbes S.A., Bhamra G., Bamford S., Dawson E., Kok C., Clements J., Menzies A., Teague J.W., Futreal P.A., Stratton M.R (2008) The catalogue of somatic mutations in cancer (COSMIC). *Curr. Protoc. Hum. Genet.* Ch. **10**, Unit 10-11.
41. O'Brien P.M., Davies M.J., Scurry J.P., Smith A.N., Barton C.A., Henderson M.J., Saunders D.N., Gloss B.S., Patterson K.I., Clancy J.L., Heinzelmann-Schwarz V.A., Scolyer R.A., Zeng Y., Williams E.D., Scurr L., DeFazio A., Quinn D.I., Watts C.K.W., Hacker N.F., Henshall S.M., Sutherland R.L. (2008) The E3 ubiquitin ligase EDD is an adverse prognostic factor for serous epithelial ovarian cancer and modulates cisplatin resistance *in vitro*. *Br. J. Cancer*. **98**(6), 1085–1093.

ROLES OF THE E3 UBIQUITIN LIGASE Hyd IN *Drosophila*

I. A. Galimova[1, *], N. V. Dorogova[2], and S. A. Fedorova[2]

[1]*Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Science, Novosibirsk, 630090 Russia*
[2]*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Science, Novosibirsk, 630090 Russia*
**e-mail: pertseva@ngs.ru*

The ubiquitin-proteasome system (UPS) is an important regulator of cell signaling and proteostasis, essential to a variety of cellular processes. Components of UPS are implicated in regulation of cell cycle progression, signal transduction, DNA damage response, metabolism and transcriptional control. E3 ubiquitin ligases covalently attach ubiquitin to target proteins; they play a key role in the functioning of UPS. *Drosophila* tumor suppressor Hyd (hyperplastic disc) is a E3 ligase, involved in cell proliferation, growth and differentiation. Analysis of *Drosophila hyd* mutants showed that the effects of Hyd are dependent on tissue context. Besides its role in proteolysis, Hyd-mediated ubiquitination has non-proteolytical consequences. It is capable of binding both to other proteins and to nucleic acids. It participates in regulation of crucial cell processes, including tumorigenesis.

Keywords: ubiquitination, E3 ubiquitin ligase, tumor suppressor, non-proteolytical functions

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 3, с. 362–391

ОБЗОРЫ

УДК 577.218

ЧТО МОГУТ РАССКАЗАТЬ БЕЛКИ WOX? ОБЗОР МИШЕНЕЙ, РЕГУЛЯТОРОВ, ПАРТНЕРОВ[1]

© 2021 г. В. Е. Творогова[a], *, Е. Ю. Красноперова[a], А. А. Кудряшов[a], Э. А. Поценковская[a], И. Е. Додуева[a], Л. А. Лутова[a]

[a]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*e-mail: krubaza@mail.ru

Поступила в редакцию 18.08.2020 г.
После доработки 13.10.2020 г.
Принята к публикации 14.10.2020 г.

WOX (WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX) – это семейство гомеодоменсодержащих транскрипционных факторов растений. Белки WOX поддерживают активность меристем различного типа, а также регулируют формирование органов растений, влияя на пролиферацию и дифференцировку клеток в различных тканях. Изучение семейства WOX может оказаться полезным для разработки методик трансформации и редактирования генома растений. В настоящем обзоре рассмотрены функции и механизмы работы транскрипционных факторов WOX, их мишени, партнеры и регуляторы. Семейство WOX можно разделить на три филогенетически обособленные клады: так называемую древнюю, промежуточную и кладу WUS. Каждой из ветвей семейства посвящен отдельный раздел обзора. Наиболее подробно рассмотрены гены *WOX Arabidopsis thaliana*, описаны также их ортологи у других видов растений. Приведены сводные таблицы с известными мишенями, регуляторами и партнерами членов семейства WOX.

Ключевые слова: транскрипционные факторы, WUS, WOX, развитие растений

DOI: 10.31857/S0026898421030174

ВВЕДЕНИЕ

WOX (WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX) – это семейство гомеодоменсодержащих транскрипционных факторов (ТФ), участвующих в регуляции роста и развития растений. В геноме *Arabidopsis thaliana* обнаружено 15 членов семейства *WOX*, включая ген *WUSCHEL* (*WUS*), а также гены *WOX1–14* [1]. Семейство *WOX* можно разделить на три большие клады: так называемую древнюю, или T1, в которую попадают гены *WOX10*, *13* и *14 A. thaliana*, промежуточную (T2), включающую *WOX8*, *9*, *11* и *12*, и современную кладу (T3, или кладу WUS), куда входят *WUS* и *WOX1–7* [2, 3]. Согласно данным филогенетического анализа, ветвь *WUS* впервые появилась у общего предка Polypodiidae и Spermatophyta [4]. В то же время члены промежуточной клады можно встретить у растений, начиная с Lycopodiophyta [5], хотя, согласно одному из последних исследований, они встречаются только у семенных растений [3]. Гены *WOX* древней ветви обнаруживаются в геномах растений, начиная с Chlorophyta [6]. В настоящем обзоре рассмотрены функции членов данного семейства и регуляторные модули, в составе которых они работают.

СОВРЕМЕННАЯ ВЕТВЬ (T3/ВЕТВЬ WUS)

В состав ТФ WOX современной клады входит не только гомеодомен, но и так называемый WUS-мотив, обычно необходимый для функциональной активности ТФ, а некоторые факторы (WUS, WOX5 и WOX7) содержат и домен EAR (ERF-associated amphiphilic repression), обладающий репрессорной активностью [3]. В основном гены *WOX* современной клады участвуют в регуляции функционирования различных типов меристем.

WUS

Функции WUS в меристемах побега. Ген *WUS A. thaliana* известен в первую очередь как фактор, поддерживающий функционирование меристем побега за счет стимуляции пролиферации и по-

[1] Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898421030174 для авторизованных пользователей. Сокращения: ТФ – транскрипционный фактор; СЭ – соматический эмбриогенез; ПАМ – побеговая апикальная меристема; КАМ – корневая апикальная меристема; ОЦ – организующий центр; ПЦ – покоящийся центр; CIM – среда для индукции развития каллуса (Callus-Inducing Medium); SIM – среда для индукции развития побега (Shoot-Inducing Medium).

давления дифференцировки их стволовых клеток. WUS функционирует в апикальной меристеме побега (ПАМ), меристеме соцветия, пазушных меристемах и меристеме цветка. ПАМ растений с потерей функции гена *WUS* (*wus-1*) способна дать начало лишь небольшому числу листьев, после чего прекращает функционировать. На ее поверхности образуются новые меристемы, но любая из них через небольшой промежуток времени прекращает свою работу, и ситуация повторяется. Сходными дефектами обладают меристемы соцветий, а меристемы цветка также дифференцируются раньше, чем в норме, и вместо шести тычинок и двух плодолистиков формируют всего лишь одну тычинку в центре [7]. Потеря функции *WUS* также приводит к снижению частоты образования пазушных меристем. Напротив, стимуляция активности WUS приводит, в частности, к увеличению размеров ПАМ [8] и количества пазушных меристем [9].

WUS способен не только поддерживать функционирование меристем побега, но и обеспечивать их идентичность. Так, эктопическая экспрессия *WUS* в отдельных клетках корней *A. thaliana* приводит к развитию структур, подобных ПАМ, образующих листоподобные органы. При добавлении ауксина в среду на кончиках таких корней развиваются соматические эмбрионы, а на фоне сверхэкспрессии гена *LEAFY*, регулятора цветения, – неупорядоченно расположенные органы цветка [10]. В системе регенерации побегов из эксплантов гипокотилей *A. thaliana* потеря функции *WUS* делает невозможной регенерацию побегов *in vitro*, а его избыточная экспрессия может приводить к регенерации побегов на безгормональной среде [11].

WUS начинает экспрессироваться уже в эмбрионе на стадии 16 клеток во внутренних клетках апикального домена. В постэмбриональном развитии этот ген экспрессируется в ПАМ и меристеме соцветия в клетках организующего центра (ОЦ), а также в центральной части меристемы цветка. В ходе развития цветка уровень экспрессии *WUS* постепенно уменьшается, и его РНК не детектируется, когда стволовые клетки меристемы окончательно расходуются на образование плодолистиков [12]. Также экспрессия *WUS* наблюдается при заложении пазушной меристемы; в ходе дальнейшего развития домен экспрессии ограничивается ее ОЦ [13]. Таким образом, ген *WUS* в меристемах побега обычно оказывает влияние не на те клетки, в которых экспрессируется (клетки ОЦ), а на стволовые клетки, расположенные выше [12]. Белок WUS способен мигрировать из ОЦ в соседние клетки, и его присутствие в слоях L1 и L2 важно для выполнения его функций в ПАМ [14, 15]. WUS способен формировать гомодимеры, а его подвижность, вероятно, ограничивается в том числе за счет гомодимеризации [15].

Ортологи *WUS* обнаружены у множества видов растений, в том числе у голосеменных [16]. Обычно паттерны экспрессии и функции *WUS A. thaliana* и его ортологов сходны, однако встречаются и различия. Так, ортологи *WUS* у *Medicago truncatula*, *Oryza sativa* и *Zea mays* экспрессируются в листовых примордиях [17–19]. При этом потеря функции ортолога *WUS* у риса, гена *MONOCULM3*, или *TILLERS ABSENT1* (*TAB1*), не влияет на активность ПАМ, но приводит к недоразвитию боковых побегов, связанную с дефектами при заложении пазушных меристем [20]. *TAB1* не экспрессируется в ПАМ, но активен в меристеме соцветия и при заложении пазушных меристем [20, 21]. Функцию поддержания ПАМ у *O. sativa* выполняет другой ген семейства *WOX* – *OsWOX4* (см. ниже). При формировании пазушных меристем *TAB1* экспрессируется до образования видимой пазушной меристемы, в так называемой премеристематической зоне, в дальнейшем его экспрессия исчезает, но уже непосредственно в пазушных меристемах начинает экспрессироваться *OsWOX4* [20].

WUS и CLV3. Наиболее известным регулятором экспрессии *WUS* является CLE-пептид CLAVATA3 (CLV3). Ген *CLV3* экспрессируется в центральной зоне ПАМ и меристемы соцветия (над ОЦ), и потеря его функции приводит к увеличению размера ПАМ, которая приобретает более выпуклую форму вследствие эктопической экспрессии *WUS* [22]. Напротив, сверхэкспрессия *CLV3* приводит к остановке развития ПАМ и к подавлению экспрессии *WUS* [23]. Рецепция CLV3 осуществляется с помощью мембранных рецепторных киназ с лейцин-богатыми повторами, в частности, CLAVATA1 (CLV1) и RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 (RPK2), способных формировать гомодимеры. В рецепции CLV3 также участвует комплекс из рецептороподобного мембранного белка CLV2, не имеющего киназного домена, и мембранной псевдокиназы CORYNE (CRN). Фенотипические проявления мутаций в генах, кодирующих белки CLV1, RPK2, CRN или CLV2, сходны с фенотипом растений с потерей функции *CLV3*. Помимо этого, гены рецепторных киназ из группы BARELY ANY MERISTEM (BAM1 и 2), которые в норме экспрессируются вокруг центральной зоны ПАМ и поддерживают ее стволовые клетки, в случае потери функции *CLV1* начинают экспрессироваться в центральной зоне. В этом случае данные киназы способны частично выполнять функции CLV1, по-видимому, также передавая сигнал от CLV3 к *WUS* [24]. Путь дальнейшей передачи сигнала от CLV3 до репрессии транскрипции *WUS* известен не до конца, однако выяснено, что в рецепции CLV3 участвуют также киназы CLAVATA3 INSENSITIVE RECEPTOR KINASE1-4 (CIK1-4), действующие после перечисленных рецепторов [25]. Другими посредниками в передаче сигнала от CLV3 к *WUS*

являются фосфатазы POLTERGEIST1 (POL1) и POLTERGEIST-LIKE 1 (PLL1) [26]. В норме CLV3 ингибирует работу фосфатаз POL и PLL1, активаторов экспрессии *WUS* [27]. Фосфатидилинозит-4-фосфат (PI(4)P) стимулирует активность POL и PLL1. Поскольку при передаче сигнала от рецепторов, связавших CLV3, активность POL и PLL1 должна подавляться, предполагается, что рецепторы могут блокировать либо синтез PI(4)P, либо его связывание с POL и PLL1 [28]. Другие предполагаемые посредники в передаче сигнала CLV3 – G-белки [29], MAP-киназы MPK3 и 6 [30], а также ионы кальция [31]. В свою очередь, ТФ WUS активирует экспрессию гена *CLV3*. Так, например, эктопическая экспрессия *WUS* в примордиях развивающихся листьев приводит к появлению в них клеток, сходных с меристематическими, в которых экспрессируется *CLV3* [22], а потеря функции *WUS* приводит к отсутствию или снижению активности промотора *CLV3* [23]. Эти данные говорят о существовании в ПАМ системы обратной связи WUS-CLV, которая ограничивает зону экспрессии *WUS* в ОЦ [22] (рис. 1). Аналогичные отношения между ортологами WUS и CLV3 наблюдаются также и у других видов, например у *Cucumis sativus* [32]. WUS активирует транскрипцию *CLV3* [14], связываясь, в частности, с пятью близко расположенными регуляторными элементами в 3'-области гена *CLV3*, которые образуют так называемый *цис*-регуляторный модуль [14, 33]. Анализ мутаций в этих элементах и соотнесение их с аффинностью к WUS, а также другие эксперименты позволили предположить, что при высокой концентрации WUS формирует гомодимеры и подавляет экспрессию *CLV3*, а в случае его низкой концентрации мономеры WUS, напротив, стимулируют экспрессию *CLV3*. Это позволяет не активировать *CLV3* в ОЦ, но активировать его в центральной зоне ПАМ [33]. Однако согласно другому исследованию, основным фактором, определяющим влияние WUS на экспрессию *CLV3*, являются белки HAIRY MERISTEM (HAM) (см. ниже) [34]. WUS также подавляет экспрессию *CLV1*, связываясь с его промотором [35].

WUS и AGAMOUS. Другой регуляторный модуль, включающий WUS, связан с геном *AGAMOUS* (*AG*), кодирующим ТФ с доменом MADS, и регуляцией терминации меристемы цветка. Согласно модели развития цветка ABCDE, *AG* – это ген класса C, отвечающий за развитие андроцея и гинецея [36]. В растениях с мутацией в гене *AG*, в отличие от растений дикого типа, меристема цветка остается недетерминированной, и гены *WUS* и *CLV3* не перестают экспрессироваться на поздних стадиях развития цветка. AG в норме подавляет транскрипцию *WUS*, тем самым способствуя терминации развития меристемы цветка после заложения всех цветковых органов [37]. WUS, действуя совместно с активатором цветения LFY, запускает экспрессию *AG*, связываясь с его локусом [37, 38]. Таким образом, гены *AG* и *WUS*, связанные петлей обратной связи (рис. 2), ответственны за прекращение активности стволовых клеток цветочной меристемы и детерминированность цветка. AG подавляет экспрессию *WUS* с помощью нескольких путей. В одном из них AG активирует транскрипцию гена, кодирующего ТФ KNUCKLES (KNU) с мотивом цинковых пальцев C2H2 и с доменом EAR [39], и гена ТФ MINI ZINC FINGER2 (MIF2) [40]. Белки KNU и MIF2 в составе комплекса с корепрессором TOPLESS (TPL) и деацетилазой гистонов HISTONE DEACETYLASE 19 (HDA19) подавляют экспрессию *WUS*, связываясь с его промотором; аналогичный регуляторный модуль обнаружен и у *Solanum lycopersicum* [40]. Репрессия локуса *WUS* под действием KNU опосредована не только деацетилированием гистонов: KNU также рекрутирует в локус *WUS* комплекс PRC2 (Polycomb-repressive complex 2), что приводит к накоплению репрессирующих меток H3K27me3, а также способствует снижению количества активирующих меток H3K4me3 в локусе *WUS* и вытеснению белка SPLAYED (SYD) – активатора *WUS* (см. ниже) [41].

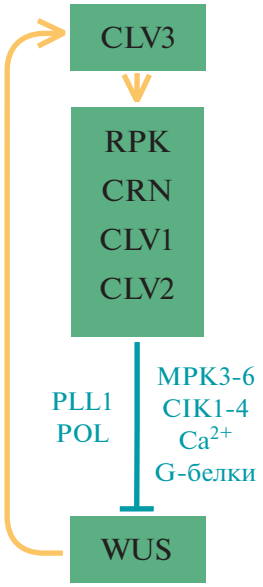


Рис. 1. Регуляторный модуль WUS-CLV3 (объяснения в тексте).

AG также репрессирует *WUS*, связываясь с регуляторными последовательностями в его локусе и, вероятно, рекрутируя PRC2 [42]. Кроме того, AG взаимодействует с компонентом PRC1 – белком TERMINAL FLOWER2 (TFL2)/LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 (LHP1), также участвующим во внесении метки H3K27me3. Методами 3C и ChIP-3C показано, что в меристеме цветка AG и TFL2, связываясь друг с другом,

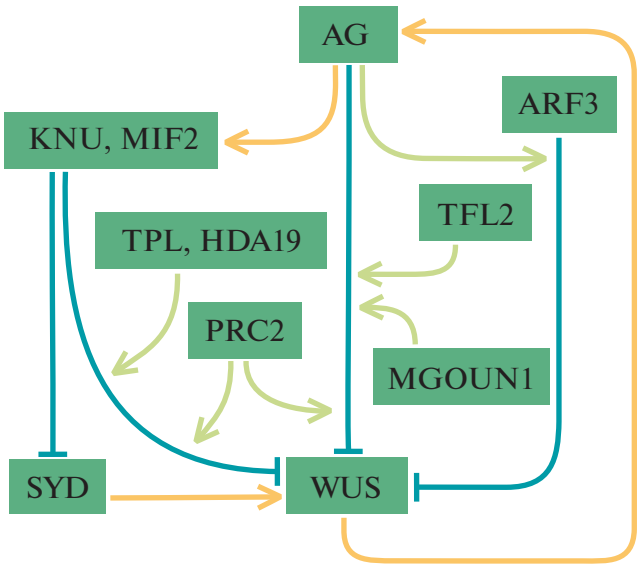


Рис. 2. Регуляторный модуль WUS-AG (объяснения в тексте).

участвуют в образовании хроматиновой петли в локусе *WUS*, подавляя тем самым экспрессию *WUS* [43]. В образование петли вовлечены так называемые CArG-боксы в 3'-регуляторной области *WUS* – сайты связывания AG. Интересно, что мутации в CArG-боксах в локусе ортолога *WUS* у *S. lycopersicum* – гена *Locule number* (*Lc*) – приводят к повышению уровня его экспрессии при развитии плодов и к увеличению размера плода и числа камер в нем; нуклеотидные замены в этих локусах можно обнаружить у многих культивируемых сортов томата [44, 45]. Еще один белок, вовлеченный в регуляцию локуса *WUS* белком AG – ДНК-топоизомераза IB MGOUN1/TOP1α, которая облегчает связывание AG с *WUS* посредством уменьшения количества нуклеосом в данном локусе, что в конечном счете приводит к подавлению экспрессии *WUS* [46].

Третий возможный путь репрессии *WUS* ТФ AG связан с действием ауксин-чувствительных факторов. Мутация в гене *AUXIN RESPONSE FACTOR 3* (*ARF3*) приводит к разрастанию медиальной части гинецея, что указывает на нарушение терминации меристемы цветка. ARF3 подавляет активность *WUS* в меристеме цветка, а связыванию ARF3 с локусом *WUS* способствует AG [47]. В то же время регулятор развития цветка из группы A – ген *APETALA2* (*AP2*), кодирующий ТФ из класса AP2/EREBP, действует как антагонист *AG*. AP2 опосредованно стимулирует экспрессию *WUS*, в том числе, вероятно, путем прямой репрессии *ARF3* [47].

С помощью генетического анализа, оценки взаимодействия белков и других экспериментов показано, что *AG*, ген класса C, функционирует в составе тетрамерных комплексов вместе с другими белками с доменом MADS из функциональных групп B, D и E [36]. Согласно данным генетического анализа и анализа экспрессии ортолога *WUS TERMINATOR* (*TER*) у *Petunia hybrida*, лишь совместное действие ТФ классов C, D и E может подавить экспрессию *TER* в меристеме цветка [48]. Эти данные и результаты генетического анализа других видов позволяют предполагать, что AG и его ортологи подавляют экспрессию *WUS* или его ортологов в составе тетрамерного комплекса [49, 50].

Другие белковые регуляторы *WUS*. Экспрессию *WUS* регулируют не только AG и CLV3, но и множество других факторов. В частности, к предполагаемым прямым репрессорам *WUS* относятся ULTRAPETALA1 (цистеин-богатый белок с B-боксом и ДНК-связывающим доменом SAND) [51, 52] и способный к взаимодействию с ним ULT1 INTERACTING FACTOR 1 (UIF1) с Myb- и EAR-доменами [53]. Потеря функции *ULT1* и/или *UIF* приводит к развитию цветков с увеличенным количеством чашелистиков и лепестков [53]. UIF1 способен связываться с промотором *WUS*. Можно предположить, что UIF1 и ULT1 взаимодействуют друг с другом и репрессируют активность *WUS* в меристеме цветка [53]. Согласно данным генетического анализа, при развитии соцветий и формировании меристем цветка WUS действует в том числе через подавление *ULT1* [51].

Важным регулятором развития ПАМ является также ген *STM* (*SHOOTMERISTEMLESS*). Показано, что в регуляции ПАМ *STM* и *WUS* действуют параллельно, при этом они необходимы для нормальной экспрессии друг друга [12, 54, 55]. Результаты многочисленных исследований указывают на связь между другими регуляторами развития ПАМ – ТФ HD-ZIPIII – и геном *WUS*. Анализ растений с мутацией *cna1* в гене *CORONA* (*CNA*), кодирующем ТФ семейства HD-ZIPIII, растений с мутацией *jba1D*, для которых характерна сверхэкспрессия гена микроРНК (miR166G, репрессор генов *HD-ZIPIII*), и сочетания этих мутаций с мутацией *wus-1* говорит о негативной регуляции экспрессии *WUS* факторами HD-ZIPIII [56, 57]. Тем не менее, показано прямое связывание ТФ HD-ZIPIII PHABULOSA (PHB), PHAVOLUTA (PHV) и REVOLUTA (REV) с локусом *WUS* в ходе регенерации побегов и их взаимодействие с ТФ ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR) типа B (ARR1 и ARR2), прямыми активаторами *WUS* (см. далее). Эти ТФ HD-ZIPIII, как и ARR1 и ARR2, важны для регенерации, хотя разные сочетания мутаций в этих генах приводят как к снижению, так и к повышению способности к регенерации побегов. Предполагается, что ARR типа B и указанные HD-ZIPIII образуют комплекс, который активирует *WUS* в ходе регенерации, однако влияние HD-ZIPIII на

развитие ПАМ и на экспрессию *WUS* в целом неоднозначно [11]. Также HD-ZIPIII могут, по-видимому, действовать на меристемы побега не только через *WUS*: одновременная потеря функции *PHB*, *PHV* и *CNA* приводит к частичной супрессии фенотипа мутантов *wus-1* и частичному восстановлению ПАМ [58].

Изучение ортологов *WUS* у других видов позволило обнаружить еще несколько ТФ, регулирующих экспрессию данных ортологов путем связывания с их локусами: специфическая форма ТФ с доменом MADS CsFRUITFULL1 – активатор *CsWUS* у *C. sativus* [32], ТФ из группы AP2/ERF EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS (ENO) – репрессор *Lc* (*SlWUS*) у *S. lycopersicum* [59], PtrTALE12 – активатор *PtrWUS* у *Populus trichocarpa* [60].

WUS и фитогормоны. Взаимодействию WUS и фитогормонов, главным образом ауксинов и цитокининов, посвящено множество работ. Сигнальные пути цитокининов и WUS связаны друг с другом положительной обратной связью. WUS подавляет экспрессию генов *ARR* типа A (*ARR5*, *6*, *7* и *15*), кодирующих репрессоры ответа на цитокинины, также подтверждено связывание WUS с промотором гена *ARR7*. Таким образом, WUS действует как стимулятор передачи цитокининового сигнала [61]. Тем не менее, данные генетического анализа и математическое моделирование показывают, что WUS, вероятно, негативно влияет на синтез цитокининов (возможно, посредством репрессии гена *LONELY GUY 4* (*LOG4*), кодирующего фермент активации цитокининов) [62].

Обработка растений цитокинином приводит к увеличению уровня экспрессии *WUS*, к расширению домена его экспрессии и к появлению фенотипа, сходного с фенотипом растений с мутациями в генах *CLAVATA* [63, 64]. Кроме того, цитокинины способны стабилизировать белок WUS, тем самым стимулируя его распространение в клетки, в которых ген *WUS* не экспрессируется [65]. Паттерн цитокининового ответа в ПАМ сходен с паттерном экспрессии *WUS,* а домены экспрессии *AHK4* (ген рецептора цитокинина) и *WUS* значительно перекрываются между собой [63]. Промотор гена *LOG4*, кодирующего фермент, активирующий цитокинины, работает в слое L1 в ПАМ, что позволяет предполагать наличие источника активных форм цитокининов в этом слое. Предполагается, что место экспрессии *WUS* и, соответственно, позиция ОЦ в ПАМ динамически определяются комбинированным антагонистическим влиянием концентраций цитокинина и CLV3 и устанавливаются в зоне, где содержание цитокининов, поставляемых из L1, еще достаточно высоко, содержание CLV3 уже достаточно мало, а также присутствует рецептор цитокинина AHK4 [62].

ТФ ARR типа B – положительные регуляторы цитокининового ответа – в частности, ARR1, 2, 10 и 12, активируют экспрессию *WUS* в ходе регенерации побегов, в ПАМ [66–68] и при заложении пазушных меристем [9]. При этом цитокинин стимулирует связывание ARR с локусом *WUS* [68, 69]. Нарушение работы ARR B-типа приводит к подавлению этих процессов и к уменьшению размера ПАМ из-за снижения уровня экспрессии *WUS* [9, 11, 66, 69]. Тем не менее, эффект ARR B-типа на регенерацию не всегда однозначен. Так, растения с потерей функции *ARR1* характеризуются повышенной способностью к каллусообразованию и побегообразованию корневых эксплантов, а сверхэкспрессия гена *ARR1* снижает эту способность. Однако в отсутствие функционального *ARR12 ARR1*, напротив, стимулирует побегообразование. Его ингибирующий эффект на регенерацию связан, в частности, с тем, что он вытесняет ARR12 из локусов *CLV3* и *WUS* – стимуляторов побегообразования – будучи при этом не таким эффективным стимулятором экспрессии, как *ARR12* [70].

Взаимное влияние WUS и ауксинов не однозначно. В ПАМ ауксиновый ответ локализуется в первую очередь в примордиях листьев, а в стволовых клетках центральной зоны наблюдается его минимум. Тем не менее, подавление действия ауксина в ПАМ зачастую приводит к ее терминации. Таким образом, стволовые клетки ПАМ требуют для своего поддержания определенного уровня ауксинового ответа. WUS способен непосредственно регулировать экспрессию множества генов, связанных с ауксиновым ответом и синтезом ауксина: *TIR1*, *MONOPTEROS (MP)/ARF5* и других *ARF*, *TARGET OF MONOPTEROS6/TMO6*, *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED2* (*TAR2*). Таким образом, WUS поддерживает в ПАМ уровень ауксинового ответа на стабильно низком, но не нулевом уровне [71].

Влияние ауксина на экспрессию *WUS* изучено в различных системах регенерации. В частности, для регенерации побегов *in vitro* экспланты часто культивируют сначала на среде с высоким содержанием ауксина (CIM, callus-inducing medium), а затем на среде с высоким содержанием цитокинина (SIM, shoot-inducing medium). Полярный транспорт ауксина, нужный для формирования его градиента, необходим для активации промотора *WUS* на SIM [72]. Необходимость определенной концентрации ауксина для экспрессии *WUS* показана и в системе получения соматических эмбрионов. Образование ауксиновых максимумов сначала в будущем апикальном домене соматического эмбриона, а затем в развивающихся примордиях семядолей коррелирует с активацией промотора *WUS* в зоне, соответствующей ПАМ [73]. Нарушение ауксинового ответа приводит к

изменению домена экспрессии *WUS* и к подавлению формирования соматических эмбрионов [74].

Эпигенетические регуляторы WUS. В регуляции *WUS* участвуют также многие эпигенетические факторы. Так, мутации в различных генах, кодирующих эпигенетические репрессоры, такие как метилтрансфераза гистонов KRYPTONITE, ДНК-метилтрансфераза METHYLTRANSFERASE1 (MET1) и другие, приводят к повышенному уровню экспрессии *WUS* в каллусах и увеличению скорости регенерации побегов из таких каллусов, что предполагает важную роль эпигенетических модификаций в активации *WUS* в ходе регенерации [75, 76]. В пазухах молодых листьев в локусе *WUS* наблюдаются высокие уровни репрессирующей метки H3K27me3 и низкие уровни активирующей метки H3ac, в то время как в пазухах зрелых листьев, в которых формируются пазушные меристемы, уровень H3ac возрастает, а H3K27me3 – снижается, что делает возможной активацию *WUS* и формирование пазушных меристем [9].

К числу эпигенетических активаторов экспрессии *WUS* можно отнести хроматин-ремоделирующий фактор SPLAYED (SYD) из семейства SNF, который связывается с промотором *WUS*. У растений с потерей функции гена *SYD* наблюдается более ранняя терминация меристемы соцветия и уменьшение уровня экспрессии *WUS* в ней [77]. Белок BARD1 (BRCA1-associated RING domain 1), или ROW1 (REPRESSOR OF WUS1), способен связываться с участком промотора *WUS*, близким к сайту связывания SYD, а также взаимодействовать с SYD, однако при этом он является репрессором *WUS* [78]. Влияние на паттерны и уровень экспрессии *WUS* выявлено при изучении множества других эпигенетических регуляторов и ТФ, таких как FASCIATA1 и 2 (субъединицы фактора сборки хроматина CAF-1 (Chromatin assembly factor-1)) [79], AtRING1a и AtRING1b (компоненты комплекса PRC1) [80], FILAMENTOUS FLOWER и YABBY3 из семейства YABBY [81], HANABA TARANU из семейства GATA [82], ТФ OBERON1-4 с PHD-доменом (plant homeodomain) [83] и другие.

Физиологические регуляторы WUS. Обнаружено влияние ряда небелковых веществ, а также факторов окружающей среды на экспрессию *WUS*. Так, супероксид-анион, содержание которого повышено в центральной зоне ПАМ, стимулирует экспрессию *WUS*, а пероксид водорода, который концентрируется в периферической зоне ПАМ – подавляет. Нарушение баланса данных веществ в ПАМ может привести к изменению ее размера или даже к терминации [84]. Кроме того, активность промотора *WUS* в проростках стимулируется продуктами фотосинтеза (сахароза), а также уровнем освещенности. Интересно, что активность phyB, фитохрома, отвечающего за восприятие красного света, в мезофилле, эпидермисе или проводящих тканях стимулирует активность промотора *WUS* в ПАМ. Таким образом, вероятно, существует некий мобильный сигнал, который переносится в ПАМ и активирует ее работу после восприятия света. Одним из передатчиков активирующего сигнала к *WUS* от света и продуктов фотосинтеза, является киназа TARGET OF RAPAMYCIN [85].

Иные мишени WUS. WUS поддерживает стволовые клетки ПАМ не только за счет взаимодействия с сигнальными путями цитокининов и ауксинов, но и с помощью регуляции экспрессии множества генов, кодирующих различные ТФ. Среди прямых мишеней WUS обнаружены гены ТФ, стимулирующих дифференцировку, включая KANADI1 (KAN1), KAN2, ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2) и YABBY3. В норме WUS мигрирует в периферическую зону ПАМ, подавляя экспрессию генов, отвечающих за дифференцировку, в то время как ТФ, кодируемые этими генами, в частности KAN1, напротив, ограничивают экспрессию *WUS*, делая ее возможной только в ОЦ [86]. WUS также подавляет в ПАМ гены группы *HECATE* (*HEC*), кодирующие ТФ из группы bHLH, связываясь с их локусами. Анализ мутантов показывает, что *HEC1, 2* и *3* действуют на ПАМ сходным с *WUS* образом, однако при этом оказывают противоположный эффект на гены, регулируемые WUS. Так, например, HEC1 активирует экспрессию генов *ARR* типа A. Таким образом, HEC1 может выполнять в ПАМ двоякую функцию, с одной стороны, стимулируя пролиферацию стволовых клеток за счет активации специфических мишеней и действуя параллельно WUS, но с другой, подавляя ее с помощью других механизмов, в частности, за счет репрессии цитокининового ответа [87]. CaWUS, ортолог WUS у *Cicer arietinum*, также связывается с промотором гена, кодирующего CabHLH121 – ТФ из группы bHLH, вовлеченный в контроль размеров ПАМ и растения в целом [88].

Партнеры WUS. Работа WUS в ПАМ осуществляется в том числе за счет взаимодействия с белками-партнерами. Одними из первых обраруженных кофакторов WUS были белки-корепрессоры TOPLESS (TPL) и TOPLESS-RELATED 1 (TPR1), 2 и 4 [89, 90]. Способностью к взаимодействию с ортологами TPR обладает ортолог WUS риса – белок MONOCULM3 (MOC3) [91]. Эксперименты по комплементации мутантов *wus-1* показали, что для выполнения WUS своих функций требуется его взаимодействие с TPL (или, возможно, TPR1, 2 и 4) [92]. Белки группы TOPLESS осуществляют репрессию транскрипции за счет взаимодействия с деацетилазами гистонов [93]. Активация *WUS* приводит к изменению уровня ацетилирования гистонов в большом количестве локусов, с которыми он связывается [71], что, ве-

роятно, и приводит к их репрессии данным ТФ. При этом WUS непосредственно активирует экспрессию *TPL* и подавляет экспрессию *TPR1* и *2* [35]. WUS также может взаимодействовать с ТФ HAIRY MERISTEM1-4 (HAM1-4) с доменом GRAS. Растения с мутациями *ham1*, *ham2*, *ham3* и *ham4* имеют укороченные корни, у них наблюдается остановка развития ПАМ и нарушено развитие сосудистых тканей. Таким образом, HAM1–4 необходимы, в частности, для поддержания функционирования ПАМ. Домены активности промоторов *HAM1* и *2* перекрываются с доменом активности промотора *WUS*. Уровень экспрессии прямых мишеней WUS изменяется сходным образом в мутантах *wus-1* или *ham1 ham2 ham3*, и было показано, что HAM2 связывается с некоторыми из этих локусов в тех же участках, в которых с ними связывается WUS [94]. Совместное участие HAM и ортолога WUS (TERMINATOR) в поддержании ПАМ обнаружено также у *P. hybrida* [95]. Тем не менее, HAM1 и 2 в отличие от WUS, подавляют экспрессию *CLV3*. Потеря функции генов *HAM* или отсутствие градиента их экспрессии (что наблюдается, например, при заложении придаточных меристем) приводит к формированию паттерна экспрессии *CLV3* с максимумом в зоне экспрессии *WUS*. Эти данные, а также математическое моделирование позволяют предположить, что гетеродимеры WUS-HAM подавляют экспрессию *CLV3*, а мономеры WUS – активируют [34]. К предполагаемым партнерам WUS и его ортологов можно также отнести белки из группы SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN у *Glycine max* [96] и *A. thaliana*, ТФ из группы CmCYC2 (семейство TCP) у *Chrysantemum morifolium* [97] и ТФ DRINK ME с доменом bZIP у *A. thaliana* [98].

Иные функции WUS. WUS участвует не только в поддержании меристем побега, но и в ряде других аспектов жизни растения. Так, проростки с потерей функции *WUS* имеют укороченный гипокотиль из-за снижения интенсивности пролиферации. WUS является непосредственным активатором гена *GRP23* (*GLUTAMINE-RICH PROTEIN 23*), кодирующего ядерный белок с PPR-мотивом, взаимодействующий с РНК-полимеразой II. Белок GRP23 опосредует влияние WUS на длину гипокотиля [99]. Мутация *jam* в промоторе гена *WUS* приводит к снижению уровня экспрессии *WUS* и к развитию растений, у которых не формируются листья ювенильного фенотипа (с меньшим количеством трихомов и более простым жилкованием) [100]. Подобный эффект обусловлен снижением у растений с мутацией в гене *WUS* уровня экспрессии гена микроРНК miR156 (регулятор перехода из ювенильной фазы в фазу взрослого фенотипа) и увеличением уровня экспрессии одной из мишеней этой микроРНК – гена *SPL9* (*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE9*) – в ПАМ и примордиях листьев [101]. У некоторых видов ортологи WUS еще более существенно влияют на развитие листьев. Так, у растений *M. truncatula* с потерей функции гена *HEADLESS* (*HDL*) – ортолога *WUS*, помимо прочего, уменьшена длина листьев и изменена их форма, что, возможно, связано с нарушением транспорта ауксина и паттернов ответа на ауксин [17, 18].

WUS влияет также на фенотип цветка, действуя не только как регулятор развития его меристемы, но и как непосредственный участник развития органов цветка. Так, экспрессия *WUS* обнаружена в развивающихся пыльниках между пыльцевыми гнездами и позднее, в ходе развития тычинки, – в периферических клетках пыльников [56, 102]. Пыльники растений с потерей функции *WUS* часто имеют меньшие или неправильно сформированные доли по сравнению с пыльниками дикого типа и не раскрываются [103]. ТФ PHB из семейства HD-ZIPIII непосредственно подавляет экспрессию *SPOROCYTELESS*(*SPL*)/*NOZZLES*(*NZZ*) – стимулятора развития микроспороцитов – и активирует экспрессию *WUS* для детерминации границ между микроспорангиями, в то время как miR165/166 ограничивает активность *PHB* и делает возможной экспрессию *SPL* в развивающихся микроспорангиях [102].

WUS также экспрессируется в нуцеллусе – дистальной части семязачатка. В растениях, у которых отсутствует экспрессия *WUS* в семязачатке, не формируются наружный и внутренний интегументы [104, 105]. Напротив, эктопическая экспрессия *WUS* в халазе достаточна для формирования в нижней части семязачатка дополнительных структур, похожих на интегументы [104–106]. Также в семязачатках растений с потерей функции *WUS* останавливается развитие зародышевого мешка или мегаспора вообще не формируется. Согласно генетическому анализу, WUS опосредованно активирует гены *WINDHOSE 1* и *2* (*WIH1* и *2*), кодирующие белки с GYPP-мотивом, которые стимулируют развитие мегаспоры и зародышевого мешка [106]. Тем не менее, *WUS* не экспрессируется в самой материнской клетке мегаспоры, его эктопическая активация в этой клетке приводит к развитию нескольких мегаспор и, в дальнейшем, зародышевых мешков. В норме экспрессия *WUS* в материнской клетке мегаспоры прямо репрессируется с помощью RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN 1 [107]. В свою очередь, стимулятором экспрессии *WUS* (опосредованным или прямым) является ТФ SPL/NZZ: потеря его функции приводит к нарушению развития нуцеллуса и снижению уровня экспрессии *WUS* в нем [105]. Подобная схема регуляции обнаружена также у *C. sativus*, при этом подавление экспрессии *CsSPL* приводит к снижению уровня экспрессии *CsWUS*

как в женских, так и в мужских цветках, а тычинки и семязачатки развиваются аномально. Интересно, что CsSPL и CsWUS способны к взаимодействию [108]. Напротив, эктопической экспрессии *WUS* в халазе и фуникулусе препятствуют белки BEL1, SEEDSTICK, SHATTERPROOF1 и 2 (возможно, образуя тримеры BEL1 + AG/SEEDSTICK/SHATTERPROOF1/2 + SEPALLATA1/3 [109]), а также ТФ группы HD-ZIPIII [110].

WUS также является стимулятором соматического эмбриогенеза (СЭ): *in vitro* его эктопическая экспрессия может приводить к формированию соматических эмбрионов на безгормональной среде [111], а подавление экспрессии *WUS* приводит к снижению количества соматических эмбрионов [73]. Сверхэкспрессия *WUS A. thaliana* в гипокотильных эксплантах *Gossypium hirsutum* и его индуцибельная экспрессия в *Capsicum chinense* стимулирует развитие соматических эмбрионов, хотя дальнейшая регенерация полноценных проростков в этих случаях не наблюдается [112–114]. Индуцибельная экспрессия *WUS A. thaliana* в *Coffea canephora* также может приводить к увеличению способности к СЭ [115]. Напротив, индукция экспрессии *WUS A. thaliana* негативно влияет на СЭ у *Picea glauca* [116]. Также показано, что эктопическая экспрессия *ZmWUS2* вместе с *ZmBABYBOOM* значительно улучшает (а в некоторых случаях делает возможной) трансформацию различных линий *Zea mays* и ряда других злаков за счет стимуляции регенерации [117], а использование тканеспецифичного промотора для *ZmBBM* и индуцибельного для *ZmWUS2* сделало возможным прямой (без стадии каллуса) СЭ после трансформации зиготических эмбрионов *Z. mays* [118]. Активация экспрессии ортологов *WUS* выявлена в ходе СЭ у *Vitis vinifera* [119], *Cocos nucifera* [120], *Panax ginseng* [121] и других видов. У *M. truncatula MtWUS* экспрессируется как в эмбриогенных, так и в неэмбриогенных каллусах [122, 123], однако в эмбриогенных каллусах экспрессируется *MtCLV3*, что, вероятно, ограничивает транскрипцию *MtWUS* в зонах формирования соматических эмбрионов [122]. *HaWUS* у *Helianthus annuus* способен связываться с локусом *LEC1*-подобного гена *HaL1L* [124], предполагаемого регулятора СЭ. В ходе развития эмбрионов уровень экспрессии *HaWUS* постепенно увеличивается, в то время как уровень активности *HaL1L* снижается, что позволяет предположить репрессию гена *HaL1L* HaWUS [124]. Подавление транскрипции *LEC1* наблюдали и после стимуляции экспрессии *WUS* в эксплантах *A. thaliana* [111].

WOX5

Ген *WOX5* и его ортологи у других видов растений – одни из основных регуляторов работы КАМ. Предполагаемая потеря функции *WOX5* у растений *A. thaliana* с мутацией *wox5-1* приводит к увеличению размера клеток ПЦ, а также к увеличению и дифференцировке стволовых клеток колумеллы, что подтверждается накоплением в них гранул крахмала [125]. При этом частота делений клеток ПЦ в мутантах *wox5-1* увеличивается, а число слоев клеток колумеллы уменьшается [126]. Такой же эффект потеря функции *WOX5* оказывает на КАМ боковых корней, а также снижает частоту образования боковых корней [127]. Индуцируемая сверхэкспрессия *WOX5* подавляет дифференцировку клеток колумеллы и боковых клеток корневого чехлика [125], а эктопическая экспрессия при ее низком уровне стимулирует клеточные деления [128]. *WOX5* обычно начинает экспрессироваться в ходе эмбриогенеза после стадии 16 клеток в гипофизе, а после ее деления – в линзовидной клетке, которая дает начало ПЦ, а затем в самом ПЦ. Экспрессия *WOX5* наблюдается также в примордиях семядолей [1]. Во взрослом растении, кроме ПЦ, промотор *WOX5* активируется на ранних стадиях развития боковых и придаточных корней, в дальнейшем активность остается в ПЦ корня [127, 129–131].

Известные на настоящий момент мишени и регуляторы WOX5 в КАМ представлены на рис. 3. Для поддержания стволовых клеток в КАМ WOX5 репрессирует ген ТФ CDF4 (CYCLING DOF FACTOR4), стимулирующего дифференцировку клеток колумеллы, путем рекрутирования факторов TPL/TPR к его промотору. В свою очередь, факторы TPL/TPR рекрутируют деацетилазу гистонов HDA19 для удаления активирующих ацетильных групп с гистонов в промоторе *CDF4*. При этом WOX5 перемещается из ПЦ в стволовые клетки колумеллы [129]. Тем не менее, немобильная версия WOX5, сшитая с двумя белками GFP, также способна восстановить присутствие стволовых клеток колумеллы в мутанте *wox5-1* [132], что говорит о существовании неизвестного пока механизма работы WOX5 в КАМ. Как и другие белки из ветви WUS, WOX5 способен к взаимодействию с белками HAM. Домены активности промоторов *WOX5* и *HAM2* перекрываются в ПЦ, а растения с мутациями *ham1*, *ham2*, *ham3* и *ham4* характеризуются, помимо прочего, нарушениями развития КАМ и укороченными корнями, что предполагает участие белков HAM в регуляции КАМ вместе с WOX5 [94].

WOX5 подавляет дифференцировку стволовых клеток и стимулирует клеточные деления в колумелле, однако в отношении клеток ПЦ он действует частично противоположным образом, подавляя их пролиферацию. Известно, что WOX5 прямо подавляет экспрессию *CYCD3;3*, кодирующего циклин группы D (регулятор перехода в S-фазу), в ПЦ [126]. Помимо WOX5, в детерминации ПЦ участвуют ТФ из семейства GRAS SHORTROOT (SHR) и SCARECROW (SCR), а

также ТФ PLETHORA (PLT) из семейства AP2/ERF. Уровень экспрессии *WOX5* уменьшен в растениях с мутациями по генам *SHR* или *SCR*, а потеря активности генов *PLT1* и *PLT2*, регулирующих развитие КАМ через ауксиновый сигнальный путь, приводит к расширению домена экспрессии *WOX5* [125]. В мутантах *wox5-1* активность промоторов *SHR*, *SCR*, *PLT1* и *2* в ПЦ и в КАМ в целом значительно снижена, а эктопическая активация *WOX5* в клетках колумеллы приводит к активации промоторов *PLT1* и *2* (но не *SHR* и *SCR*). Таким образом, возможно, WOX5 необходим для активации PLT1 и 2 в ПЦ [128, 130]. Согласно данным генетического анализа WOX5 вместе с SCR, SHR, PLT1 и 2 поддерживает также проксимальные стволовые клетки КАМ [125]. При этом ТФ TCP20/21 из семейства TCP (TEOSINTE BRANCHED 1, CYCLOIDEA AND PCF TRANSCRIPTION FACTOR), SCR и PLT образуют комплекс и активируют *WOX5* в ПЦ [133, 134]. Также ТФ JACKDAW (JKD) с цинковыми пальцами, взаимодействуя в ПЦ с SHR, активирует экспрессию *WOX5* [135].

Исследования взаимодействия WOX5 с фитогормонами посвящены главным образом ауксину. В растениях с мутациями по генам *MP* или *BODENLOS* с нарушением ауксинового ответа в эмбриогенезе экспрессия *WOX5* практически никогда не детектируется [125], однако обработка ауксином ингибирует экспрессию *WOX5* в главном корне. В подавлении экспрессии *WOX5* ауксином участвуют ауксин-чувствительные ТФ ARF10 и 16 [130], а INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 17 (IAA17), ингибитор ауксинового ответа, стимулирует экспрессию *WOX5* [136]. WOX5 также влияет на сигнальные пути ауксина: в норме максимальный ауксиновый ответ в КАМ выявляется в ПЦ, однако при потере функции *WOX5* он смещается из ПЦ в более дистальные клетки. Кроме того, WOX5 стимулирует продукцию ауксинов в корнях, способствуя экспрессии *YUCCA1*, кодирующего один из ферментов синтеза ауксина [136].

Экспрессия *WOX5*, как и *WUS*, регулируется также пептидом CLE. *CLE40* является близким гомологом *CLV3*. Этот ген экспрессируется в дифференцированных клетках колумеллы и в зоне дифференцировки в клетках стелы. Он подавляет деление стволовых клеток колумеллы и ограничивает домен экспрессии *WOX5*. Обработка растений синтетическим пептидом CLE40 приводит к уменьшению домена экспрессии *WOX5* и к его перемещению в более проксимальные зоны корня (туда же перемещается в этом случае и сам ПЦ, согласно анализу экспрессии других его маркеров) [132]. В рецепции CLE40 и регуляции КАМ участвуют рецепторные киназы ARABIDOPSIS CRINKLY4 (ACR4) [131], CLV1 [137] и белок CLV2 [132]. Интересно, что ACR4 способна фосфорилировать WOX5 *in vitro* по нескольким

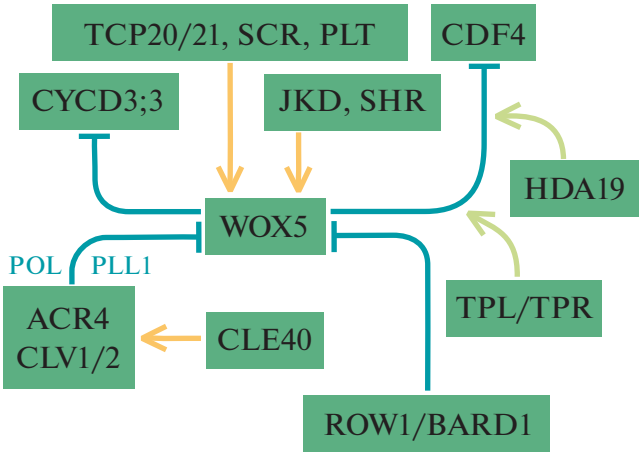


Рис. 3. Регуляторы и мишени WOX5 в КАМ (объяснения в тексте).

сайтам [138]. Дальнейший путь передачи сигнала от киназ до регуляции экспрессии *WOX5* не выявлен, однако на экспрессию *WOX5*, как и *WUS*, оказывают стимулирующее влияние фосфатазы POL и PLL1 [139]. Обратная связь – стимулирующее воздействие WOX5 на экспрессию *CLE40* – у *A. thaliana* не выявлена, однако обнаружена у гомологов данных генов в КАМ у *O. sativa* [140]. К другим прямым репрессорам *WOX5* относится ТФ ROW1/BARD1. Кодирующий его ген экспрессируется в проксимальной части КАМ, и потеря его функции приводит к развитию коротких корней, нарушению гравитропизма, к потере идентичности ПЦ и другим нарушениям КАМ, а также к расширению домена активности промотора *WOX5* [141].

WOX5 и его ортологи активируются также при взаимодействии корней растения с различными симбионтами и/или при развитии нерегулярных меристематических структур. В частности, экспрессия *WOX5* активируется в ходе развития корневых галлов при инфицировании нематодой *Meloidogyne javanica* [142]. Активность промотора *WOX5 A. thaliana* обнаружена в клетках, прилежащих к меристематическим очагам в генетических опухолях *Raphanus sativus* [143]. Экспрессия ортологов *WOX5* обнаружена в азотфиксирующих клубеньках у *M. truncatula*, *Pisum sativum* [144] и *Arachis hypogaea* [145]. Генетический анализ показал, что количество клубеньков и экспрессия *MtWOX5* и его ортолога *PsWOX5* в *M. truncatula* и в *P. sativum* регулируются, как и в случае КАМ и ПАМ, с помощью генов системы *CLAVATA* [144]. Экспрессия ортологов *WOX5* обнаружена также при прямой и непрямой регенерации корней и при каллусообразовании *in vitro*, в частности, у *M. truncatula* [122], *Rosa canina* [146] и *A. thaliana* [74]. Экспрессия *WOX5* при регенерации корней активируется ТФ WOX11 и 12 (см. ниже). Инте-

ресно, что уровень экспрессии *WOX5* и других корнеспецифичных генов *A. thaliana* возрастает при формировании каллуса на среде CIM [147, 148], но снижается при переносе на SIM. Значительную роль в активации *WOX5* и других корнеспецифичных генов в каллусе играет ацетилтрансфераза гистонов HAG1 (HISTONE ACETYLTRANSFERASE of the GNAT/MYST superfamily 1), ацетилирующая H3 в локусах *WOX5* и *14*, *SCR*, *PLT1* и *2* [149]; активация данных генов в каллусе важна для дальнейшей регенерации побегов.

WOX5 необходим также для прохождения СЭ у *A. thaliana*: подавление его экспрессии в эксплантах значительно снижает количество формируемых соматических эмбрионов и нарушает их развитие. Для формирования нормального паттерна экспрессии *WOX5* при СЭ необходим цитокининовый сигнальный путь. Возможно, цитокинин ограничивает зону экспрессии *WOX5*, делая возможным формирование ПЦ КАМ [74]. WOX5 также экспрессируется в ходе развития мужского гаметофита. У мутантов *tepiztin1* со сниженным уровнем экспрессии *WOX5* нарушено функционирование мужского гаметофита, в частности, их пыльцевые трубки растут медленнее и имеют меньшие размеры [150].

WOX1

Основная функция WOX1 и его ортологов – регуляция разрастания боковых органов. Одиночные мутанты *A. thaliana* с потерей функции *WOX1* лишь незначительно отличаются от растений дикого типа, однако потеря функции *WOX1* и другого гена *WOX* современной клады – *WOX3/PRESSED FLOWER* (*PRS*) – приводит к значительным изменениям: листовые пластинки, чашелистики и лепестки таких растений значительно сужены вследствие снижения количества делений клеток; у них нарушена также спецификация клеток кромок листа [151]. *WOX1* экспрессируется на стадии сердца и торпеды в закладывающихся сосудах [1], а после прорастания *WOX1* и *3* экспрессируются в кромках и срединных слоях примордиев листьев (в так называемом срединном домене листа) [151]. Интересно, что потеря функции *WUS* усиливает эффект от потери функции *WOX1* и *3*, в частности, делая листья мутантов еще более узкими. Можно предположить, что WUS также принимает участие в регуляции разрастания листовой пластинки [152]. В развитии листа ТФ семейства YABBY и KANADI определяют развитие абаксиального домена, а ТФ AS2 и REV – развитие адаксиального домена. Согласно анализу множественных мутантов, WOX1 и 3 вместе с данными факторами также участвуют в формировании адаксиально-абаксиальной полярности листа [151, 153]. При этом ТФ YABBY стимулируют активность *WOX1*, а ТФ KANADI, напротив, подавляют [151]. Другие репрессоры *WOX1* и *3* – ТФ из семейств NGATHA (NGA) и CINCINNATA-class-TCP (CIN-TCP), такие как TCP3, TCP4, NGA1 и NGA4, участвуют в подавлении роста листовой пластинки. Растения *A. thaliana* со сниженным уровнем экспрессии *TCP1-5* и *NGA1-4* имеют курчавые листья и расширенный домен активности промоторов *WOX1* и *3* [154].

Уровень экспрессии *WOX1* и *3* также регулируется ауксином. В абаксиальной части листовых примордиев содержание ауксина повышено, однако промоторы *MP* и ряда других *ARF* (*NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL4* (*NPH4*)/*ARF7*, *ARF6*, *8* и *19*) активны преимущественно в адаксиальной части примордиев. Срединный домен является единственной зоной перекрывания экспрессии *MP*, *ARF6*, *7*, *8* и *19* и повышенного содержания ауксина; именно в этой зоне активны промоторы генов *WOX1* и *3*. При этом MP активирует *WOX1* и *3*, связываясь с их локусами. Напротив, гены *ARF3* и, вероятно, *2* и *4* экспрессируются в абаксиальной части примордия на определенных стадиях его развития, и кодируемые ими ТФ подавляют экспрессию *WOX1* и *3* [155]. WOX1 также регулирует ауксиновый ответ: согласно транскриптомному анализу, многие из генов, на экспрессию которых влияет WOX1, участвуют в сигнальных путях, транспорте и синтезе ауксина. Так, положительная регуляция характерна для *PIN1*, *AUX1* и *MP,* а отрицательная, например, для *TAR2* и *YUC5* [156]. Также WOX1 способен к взаимодействию с S-AMDC1 (S-adenosylmethionine decarboxylase) – ферментом синтеза полиаминов, важных регуляторных молекул растений, а в мутантах со сверхэкспрессией *WOX1* уровень полиаминов снижен. Таким образом, WOX1 регулирует развитие латеральных органов, возможно, за счет регуляции синтеза полиаминов [157].

Механизмы работы генов группы *WOX1* подробно изучены у ортолога *WOX1 M. truncatula* – гена *STENOFOLIA* (*STF*). В отличие от растений *A. thaliana* с потерей функции *WOX1*, не имеющих выраженных фенотипических особенностей, мутанты *M. truncatula* с потерей функции *STF* характеризуются узкими листовыми пластинками, нарушениями в формировании проводящей системы листа, а также нарушенным разрастанием лепестков и плодолистиков [158]. STF регулирует разрастание листовой пластинки, связываясь с промотором гена *MtAS2*, подавляющего пролиферацию клеток в адаксиальном домене листа, и подавляя его экспрессию путем привлечения корепрессора MtTPL [159]. STF способен взаимодействовать с корепрессором (и возможным коактиватором) MtLEUNIG (MtLUG) и коактиватором MtANGUSTIFOLIA3 (MtAN3), а генетический анализ мутаций в генах *AN3*, *LUG*, *WOX1* и *3* у *A. thaliana* позволяет предположить, что AN3 и LUG участвуют в разрастании листо-

вой пластинки вместе с WOX3 и WOX1 [160]. Экспрессия *STF* в различных видах злаков может приводить, помимо прочего, к развитию более широкой листовой пластинки. STF способен подавлять экспрессию генов цитокининоксидаз, увеличивая содержание цитокининов в трансгенных растениях [161], а также участвовать в регуляции метаболизма сахаров [162]. Гены, ортологичные *WOX1* и *STF – LATHYROIDES* у *P. sativum* [163] и *MAEWEST* у *P. hybrida* – также необходимы для нормального разрастания боковых органов, в частности листьев и лепестков [164].

WOX3

WOX3, как и WOX1, участвует в регуляции разрастания боковых органов. У растений *A. thaliana* с мутацией в гене *WOX3,* или *PRESSED FLOWER* (*PRS*), не развиваются боковые чашелистики, а в абаксиальных и адаксиальных чашелистиках отсутствуют краевые ряды клеток. Число тычинок также уменьшено [165, 166]. Гораздо более серьезные дефекты развития наблюдаются у двойных мутантов *A. thaliana* с потерей функции *WOX3* и *WOX1* (см. раздел о WOX1). Интересно, что ортолог *WOX3* у *M. truncatula* – ген *LOOSE FLOWER* (*LFL*) – в отличие от своего ортолога *WOX3* и паралога *STF* не участвует в развитии листьев, но необходим для разрастания органов цветка. Согласно результатам генетического и комплементационного анализа, гены *STF* и *LFL* обладают функциональным сходством, однако они имеют разные домены экспрессии, что и определяет различия в их функциях в развитии растения [167].

Согласно данным филогенетического анализа, гены группы *WOX1* специфичны для двудольных и не встречаются у однодольных [168]. Разрастание боковых органов у однодольных регулируется генами ветви *WOX3*. Так, потеря функции ортологов *WOX3 NARROW SNEATH1* (*NS1*) и *2* у *Z. mays* приводит к отсутствию боковых доменов листьев и гомологичных им органов. Эти гены экспрессируются в боковых частях ПАМ (в слоях L1 и L2) и в кромках примордиев боковых органов [166, 169]. У риса ортологами *NS1/2* являются гены *NARROW LEAF2*(*NAL2*)*/3*, или ген *OsWOX3A/OsPRS/OsNS*, представленный двумя практически идентичными копиями. Сверхэкспрессия *NAL2/3* приводит, помимо других эффектов, к развитию растений с более широкими листьями с большим количеством проводящих пучков [170]. У растений с одновременной потерей функции генов *NAL2* и *3* наблюдается значительное недоразвитие листовых пластинок, у них отсутствуют щетинки на краях листа и нарушено развитие проводящих пучков в листьях [170, 171]. У таких мутантов нарушена экспрессия генов *ARF*, *YUC* и *PIN*, что предполагает изменение в сигнальных путях, транспорте и синтезе ауксина [170, 171], а согласно генетическому анализу и другим экспериментам, NAL2/3 непосредственно подавляет экспрессию *OsYAB3.* Как OsYAB3, так и NAL2/3 участвуют, предположительно, в дифференцировке листа, в частности, путем регуляции экспрессии генов семейства *KNOX* (*OSH1* и *OSH3*) [172]. Другой эффект потери функции *NAL2* и *3* – уменьшение количества боковых корней и увеличение количества корневых волосков. Эксперименты с обработкой ауксином позволяют предположить, что оба эти эффекта связаны с уменьшением уровня экспрессии генов *OsPIN1* и с концентрацией ауксина не в перицикле, а в эпидермисе, что и приводит к снижению количества боковых корней, которые закладываются в перицикле, но при этом к увеличению количества и длины корневых волосков, которые развиваются из клеток эпидермиса [171, 173]. Сверхэкспрессия *NAL2/3* приводит не только к изменениям фенотипа листьев, но и к увеличению количества боковых корней, а также к карликовости. Обработка гиббереллином восстанавливает нормальную высоту растения. *NAL2/3* взаимодействует с гиббереллинами по принципу отрицательной обратной связи: их избыток стимулирует экспрессию *NAL2/3*, тогда как NAL2/3 подавляет синтез этих гормонов, в частности, связываясь с локусом *KAO* (*ENT-KAURENE ACID OXIDASE*), кодирующим фермент биосинтеза гиббереллинов, и подавляя его экспрессию [174].

Согласно данным филогенетического анализа, у однодольных (по меньшей мере у риса и кукурузы) имеется дополнительная ветвь, содержащая гомологи *WOX3*, отличные от генов группы *NS* [175]. Подробно изучены функции одного из представителей этой ветви – гена *OsWOX3B/GLABROUS RICE1* (*GLR1*)*/DEPILOUS* (*DPL*)*/NUDA/LEAF LATERAL SYMMETRY1* (*LSY1*) *O. sativa*. Подавление экспрессии этого гена приводит к отсутствию трихомов или к сильному уменьшению их количества на листьях и колосковых чешуйках [176–178]. OsWOX3B стимулирует развитие трихомов совместно с ТФ из группы AP2/ERF HAIRY LEAF6 (HL6), близким гомологом ТФ EMBRYOMAKER (его сверхэкспрессия также приводит к развитию трихомов на семядолях *A. thaliana*). OsWOX3B способен к взаимодействию с HL6, также он непосредственно активирует *HL6* [179]. OsWOX3B и HL6 прямо или опосредованно стимулируют экспрессию ряда генов, вовлеченных в синтез, транспорт и передачу сигнала ауксина, таких как *OsYUCCA5*, *OsPIN1a*, *OsARF4* и *7.* HL6 способен связываться с локусом *OsYUCCA5*, а добавление гомеодомена OsWOX3B усиливает это связывание [179]. OsWOX3B, независимо от NAL2/3, участвует и в разрастании листовой пластинки. Один из эффектов потери его функции – формирование несимметричных ли-

стовых пластин из-за отсутствия латеральных разрастаний с одной из сторон листа и нарушение адаксиально-абаксиальной полярности. Кроме того, соцветия у таких мутантов часто не имеют колосковых чешуй, а развитие тычинок и семязачатков у них нарушено [180].

Ортологи *WOX3* у голосеменных, как и у покрытосеменных, также участвуют в разрастании боковых органов. Так, подавление экспрессии гена *PaWOX3 P. abies* – ортолога *WOX3* – нарушает развитие семядолей у соматических эмбрионов, а также влияет на морфологию иголок, делая их менее уплощенными и более цилиндрическими [181].

WOX2

WOX2 вместе с ТФ WOX8 и WOX9 регулирует эмбриональное развитие. Ген *WOX2* начинает экспрессироваться в яйцеклетке и в центральной клетке. Вместе с *WOX2* в этих клетках экспрессируется *WOX8*, член промежуточной ветви, однако после оплодотворения и деления зиготы эти гены начинают экспрессироваться в разных ее потомках: *WOX8* – в базальной клетке (см. раздел о WOX8), а *WOX2* – в основном в апикальном домене [1]. Экспрессия ортологов *WOX2* в зиготических эмбрионах и/или в семенах в целом выявлена также у *N. tabacum* [182], *O. sativa* [183], *P. abies* [184] и других видов. Потеря функции *WOX2* приводит к нарушению упорядоченности деления клеток в апикальном домене, что в данном случае не критично для развития растения [1]. У растений с потерей функции *WOX2* в некоторых случаях развивается только одна семядоля, часто нарушен сосудистый паттерн в семядолях [185, 186]. Как уже сказано, в ходе раннего эмбриогенеза *WOX2* и *8* экспрессируются в комплементарных друг другу областях, однако у части растений с мутациями в обоих генах наблюдаются различные дефекты семядолей (асимметричные семядоли, частичное их слияние), которые отсутствуют у одиночных мутантов [187]. WOX2 и 8 с помощью пока не выявленного механизма активируют транскрипцию *CUP-SHAPED COTYLEDON2* (*CUC2*) и *3*, обеспечивая симметричный характер их экспрессии. Предполагается, что потеря функции *WOX2* активирует экспрессию *WOX8* в апикальном домене, что, возможно, приводит к их избыточности в регуляции развития семядолей [186].

Одновременная потеря функции генов *WOX2*, *1* и *3* увеличивает частоту возникновения нарушений развития семядолей (по сравнению с потерей функции только *WOX2*). Добавление потери функции *WOX5* усиливает эти дефекты. Ключевую роль в регуляции клеточных делений апикального домена играет *WOX2*, а активность остальных генов в этих процессах становится важной только в отсутствие этого гена [185]. Кроме того, *WOX2* вместе с генами *WOX1*, *3* и *5*, играющими второстепенные роли, участвует в инициации ПАМ в эмбриогенезе и в первичной активации экспрессии маркеров ПАМ, включая *CLV3*. Интересно, что промотор *CLV3* на стадии сердца активируется за счет *WOX1*, *2*, *3*, *5* даже у мутантов *wus-1*, хотя в дальнейшем его активность пропадает. Таким образом, *WOX1*, *2*, *3*, *5*, но не *WUS*, необходимы для запуска экспрессии *CLV3* в эмбриогенезе. Нарушение инициации ПАМ у растений с мутациями в генах *WOX1*, *2*, *3* и *5* сопровождается повышением интенсивности ауксинового ответа в зоне ПАМ, что может быть связано с нарушением паттернов экспрессии гена *PIN1* в эмбрионах с таким генотипом. Также *WOX2* (вместе с *WOX1*, *3* и *5*) стимулирует развитие ПАМ, усиливая экспрессию *HD-ZIPIII* (*PHB*, *PHV*, *REV*) как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях. PHB, PHV и REV в свою очередь активируют биосинтез цитокининов, необходимых для закладки ПАМ [188].

Ортологи *WOX2* экспрессируются также в ходе СЭ у *P. pinaster* [189], *P. abies* [184], *V. vinifera* [119] и ряда других видов. Подавление экспрессии *PaWOX2* у *P. abies* приводит к нарушению развития соматических эмбрионов [184], а *WOX8* и *WOX2 A. thaliana* совместно индуцируют СЭ или регенерацию побегов *N. tabacum in vitro* [190].

WOX4

WOX4 и его ортологи у большинства видов растений регулируют развитие проводящих тканей. Так, снижение уровня экспрессии *WOX4 A. thaliana* приводит к уменьшению размера проводящих пучков и нарушению упорядоченной структуры стелы, перицикла и эндодермы. Потеря функции *WOX4* у мутантов *wox4-1* снижает активность пучкового и межпучкового камбия в стебле, хотя его активность исчезает не полностью [191]. *WOX4* экспрессируется в основном в камбии и прокамбии. Активность ортологов *WOX4* в камбии выявлена у многих видов растений, включая голосеменные [192].

Роль *WOX4* в регуляции развития проводящих тканей изучена в основном в рамках исследования работы сигнального модуля TDIF-TDR-WOX4. TDIF (TRACHEARY ELEMENT DIFFRENTIATION INHIBITORY FACTOR) – CLE-пептид, кодируемый двумя разными генами *A. thaliana* – *CLE41* и *CLE44*. TDIF и его рецептор TDR (TDIF RECEPTOR)/PXY(PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM) известны как регуляторы, подавляющие дифференцировку клеток камбия в ксилему и стимулирующие пролиферацию камбия [193]. Уровень экспрессии *WOX4* повышается в камбии *A. thaliana* в ответ на обработку TDIF. WOX4, в отличие от TDR и TDIF, не относится к белкам, необходимым для подавления дифференцировки ксилемы, однако, как и эти регулято-

ры, важен для стимуляции пролиферации клеток прокамбия и камбия. При этом сверхэкспрессия *WOX4* не вызывает утолщения стелы, что предполагает присутствие системы отрицательной обратной связи, нейтрализующей влияние излишней активности *WOX4*. Кроме того, сверхэкспрессия *WOX4* не влияет на уровни экспрессии *CLE41* и *44* [193]. Показано также, что ортологи WOX4 не влияют на интенсивность экспрессии ортологов *CLE41* у гибридов тополя [194]. TDR-зависимое повышение уровня экспрессии *WOX4* в проростках наблюдается также при обработке CLE-пептидом HsCLEB типа B, который синтезируют паразитические нематоды *Heterodera schachtii*, и который, по-видимому, является аналогом TDIF, мимикрирующим под него. Промотор *WOX4* активируется при заражении нематодой на определенных этапах развития синция – структуры, питающей нематоду [195].

Ауксин активирует экспрессию *WOX4*, что, в свою очередь, индуцирует развитие межпучкового камбия и способствует делению клеток внутри проводящих пучков. При этом TDR/PXY необходим для стабильной активации экспрессии *WOX4* ауксином. Усиление камбиальной активности ауксином зависит от клеточного контекста, что, вероятно, связано со специфическими ауксин-чувствительными ТФ [191]. Так, MP ограничивает количество клеток камбия в стебле, прямо репрессируя ген *WOX4*. В то же время другие ARF (ARF3 и 4), наоборот, стимулируют активность камбия. При этом MP работает в самом камбии, в клетках, экспрессирующих *WOX4*, а ARF3 и ARF4 – и в камбии, и за его пределами – в ксилеме и флоэме [196]. Тем не менее, в другом исследовании показано положительное влияние MP на *WOX4* и на развитие камбия в корне. Обнаружено, что прилегающий непосредственно к камбиальной зоне слой клеток с уже установленной ксилемной идентичностью выполняет функции ОЦ, поддерживающего работу камбия. Там сосредоточен локальный максимум индолилуксусной кислоты (ИУК), и экспрессируются гены группы *HD-ZIPIII* и *MP*, поддерживая идентичность этого слоя. Подавление экспрессии *MP* на фоне потери функции *ARF7* и *19* снижает уровень транскрипции *WOX4*, ряда генов *HD-ZIPIII*, а также дифференцировки вторичной ксилемы. Индукция экспрессии *miR-165a*, ингибитора всех пяти *HD-ZIPIII*, снижает уровень активности камбия и также подавляет экспрессию *WOX4* [197]. В регуляции пролиферации клеток проводящих тканей WOX4 действует совместно с WOX14 (см. WOX14) [198]. Кроме того, сверхэкспрессия *WOX4*, как и потеря его функции, снижает уровень экспрессии *WOX14* [199]. WOX4 способен взаимодействовать с белками группы HAM, а домены активности промоторов *HAM4* и *WOX4* перекрываются в меристемах проводящих тканей [94].

У *O. sativa* ортолог *WOX4* не только регулирует развитие проводящей системы, но и участвует в поддержании ПАМ и развитии листьев. При подавлении экспрессии *OsWOX4* формируются аномальные ПАМ, которые быстро терминируются, наблюдается нарушение закладки и роста листьев, а также развития их проводящей системы [200, 201]. При этом CLE-пептиды FCP1/2 подавляют экспрессию *OsWOX4* и стимулируют развитие листьев [201]. С помощью транскриптомного анализа и определения содержания гормонов показано, что OsWOX4 стимулирует синтез цитокининов путем активации экспрессии генов группы *LOG* [200].

Гены группы *WOX4*, как и многие другие гены *WOX*, участвуют не только в развитии проводящей системы и ПАМ, но и в регенерации: ортологи *WOX4* экспрессируются в развивающихся эмбриогенных каллусах *Coffea canefora* [202], *M. truncatula* [203], в соматических эмбрионах *V. vinifera* [119] и других видов.

WOX6

WOX6/PRETTY FEW SEEDS2 (PFS2)/HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 9 (HOS9) регулирует развитие семязачатков. *PFS2* экспрессируется в ПАМ и в примордиях листьев, в меристемах цветка, примордиях органов цветка, пыльниках, пестиках и семязачатках, а также, в меньшей степени, – в плодолистиках, лепестках и чашелистиках. У растений с нарушением функции этого гена (*pfs2-1*) уменьшена материнская клетка мегаспор и, по-видимому, вследствие этого нарушено развитие зародышевого мешка. У мутантов *pfs2-1* формируется намного меньше жизнеспособных семязачатков, чем у растений дикого типа. Также у них укорочены интегументы, нарушено развитие лепестков и листьев. Эта мутация проявляется на стадии спорофита: гетерозиготные растения *PFS2/pfs2-1* формируют нормальные семязачатки. [204, 205]. PFS2, по-видимому, участвует также в подавлении экспрессии *AG* [205], а возможными репрессорами экспрессии самого *PFS2* могут быть LRR-киназы ERECTA и ERECTA-LIKE1 и 2 [206].

Анализ другой мутации в гене *WOX6* показывает, что этот ген участвует в ответе на холодовой стресс: мутанты *hos9-1* со вставкой Т-ДНК в 3'-часть гена обладают большей чувствительностью к отрицательным температурам, у них повышены уровни экспрессии ряда генов, вовлеченных в ответ на холод. Эти мутанты отличаются более медленным ростом корней и побегов, а также более поздним цветением, они имеют узкие и мелкие листья и меньшее количество трихомов [207].

WOX7

WOX7 регулирует развитие боковых корней. Промотор гена *WOX7* активен в кончиках корней в клетках-инициалях кортекса и эндодермы и в самой эндодерме, а также в примордиях боковых корней, преимущественно до их появления на поверхности корня. У растений с мутацией в *WOX7* повышено количество боковых корней и примордиев боковых корней, а сверхэкспрессия *WOX7* приводит к снижению числа боковых корней. WOX7 подавляет экспрессию гена циклина *CYCD6;1*, однако у растений с мутацией в *CYCD6;1* количество боковых корней даже немного больше, чем у растений дикого типа. Активность промотора *WOX7* при этом подавляется при обработке ауксином, что соответствует противоположным ролям этих регуляторов в контроле заложения боковых корней. Добавление в среду глюкозы или сахарозы активирует промотор *WOX7*. Высокие концентрации этих сахаров при повышенном соотношении содержания углерода и азота подавляют образование боковых корней, однако этот эффект отсутствует в растениях с нарушением функции *WOX7*. Таким образом, возможно, WOX7 опосредует ингибирующее действие сахаров на образование боковых корней [208].

ПРОМЕЖУТОЧНАЯ ВЕТВЬ (T2)

ТФ WOX промежуточной клады обычно вовлечены в регуляцию эмбриогенеза и регенерации. Функционально и филогенетически ТФ данной ветви разделены на две группы: WOX8/9 и WOX11/12. ТФ WOX11/12 *A. thaliana* обладают сходными функциями, поэтому они рассмотрены вместе.

WOX8

WOX8/STIMPY-LIKE (STPL), как уже упоминалось, является регулятором эмбриогенеза, он участвует в формировании апикально-базальной оси полярности зародыша. *WOX8* экспрессируется в яйцеклетке и в центральной клетке, а после оплодотворения и деления зиготы – в базальной клетке и ее потомках, клетках суспензора и гипофизы, и в части эндосперма [1]. У растений с потерей функции *WOX8* часто нарушен сосудистый паттерн в семядолях, а ауксиновый максимум в базальном полюсе распространяется на весь суспензор, в отличие от растений дикого типа, у которых он локализован лишь в базальной части эмбриона и в самой верхней части суспензора. Возможно, WOX8 активирует экспрессию *PIN7* и обеспечивает отток ауксина из суспензора [186]. Функции *WOX8* в эмбриогенезе частично выполняют также гены *WOX2* и *WOX9* (см. соответствующие разделы). Важный регуляторный модуль, включающий (по меньшей мере, до настоящего времени) WOX8, но не WOX2 и 9, связан с CLE8 – пептидом из группы CLE. *CLE8* экспрессируется в эмбрионе и в эндосперме. У растений с потерей функции *CLE8* эндосперм недоразвит, а развитие эмбрионов и суспензора нарушено. CLE8 необходим также для активации *WOX8* в суспензоре и эндосперме. Сверхэкспрессия *CLE8* ведет к увеличению размера семян, однако потеря функции *WOX8* снимает этот эффект. Вероятно, WOX8 опосредует влияние CLE8 на развитие эмбриона и эндосперма [209].

WOX8 вместе с WOX9 участвует в формировании апикально-базальной оси полярности. Согласно данным генетического анализа, для их активации необходим ТФ WRKY2 с доменом типа “цинковые пальцы” [210]. Транскрипцию *WOX8* совместно активируют ТФ WRKY2 и ТФ из семейства HD-ZIPIV HOMEODOMAIN GLABROUS11/12 (HDG11/12). Активация ТФ WRKY2 опосредуется киназой SHORT SUSPENSOR, мРНК которой поступает в зиготу из спермия. В то же время *HDG11/12* экспрессируются в яйцеклетке, т.е. для активации *WOX8* необходимо совместное действие и материнских, и отцовских факторов [211].

WOX9

WOX9/STIMPY *A. thaliana* известен прежде всего как регулятор эмбрионального развития, однако у ряда видов его ортологи являются важными участниками развития соцветий. WOX9 регулирует прохождение ранних стадий эмбриогенеза. Данные об экспрессии *WOX9* в эмбриогенезе отчасти противоречивы, однако известно, что он начинает экспрессироваться после первого деления зиготы либо в базальной, либо в обеих клетках, затем в гипофизе и в самом эмбрионе, а в дальнейшем – в наружных слоях зародыша и в примордиях семядолей [1, 187]. Интересно, что в эмбрионах с нарушением функции *MP* или *BODENLOS* (гена репрессора ауксинового ответа из группы Aux/IAA) не наблюдается сдвиг экспрессии *WOX9* из гипофизы в собственно эмбрион [1]. Различные мутации в гене *WOX9* приводят к нарушению эмбриогенеза: недоразвитию базальной части зародыша, гипокотиля и семядолей и другим дефектам, и/или остановке развития на глобулярной стадии, или раньше, снижению частоты клеточных делений [187, 212]. Однако согласно другому исследованию, растения с мутацией в *WOX9* не имеют дефектов в развитии эмбрионов [185]. *WOX8* – близкий гомолог *WOX9*, и его экспрессия под промотором *WOX9* способна комплементировать мутацию в *WOX9* [187]. У части двойных мутантов с предполагаемой потерей функции генов *WOX8* и *9* наблюдаются нарушения в делениях клеток апикального и/или базального домена и остановка развития до формирования семядолей. У таких эмбрионов нарушены до-

мены активности промоторов генов-маркеров различных частей зародыша, в том числе *WOX8*, *WOX2*, *WOX5* и *ZWILLE* [185, 187]. Кроме того, для этих эмбрионов характерно нарушение экспрессии *PIN1* и, вероятно, вследствие этого отсутствие максимумов ауксина в зародыше [185, 187]. Эктопическая активность *WOX2* в эмбрионе и суспензоре способна частично восстановить нормальный фенотип эмбрионов данных мутантов [185]. Также потеря функции *DWARF TILLER1* (*DWT1*) и *DWT-LIKE2* (*DWL2*) – двух из трех ортологов *WOX8/9* у *O. sativa* – приводит к летальности эмбрионов [213]. Гены группы *WOX9* участвуют также и в СЭ: повышенный уровень экспрессии ортологов *WOX9* в ходе СЭ обнаружен у *M. truncatula* [214], *P. abies* [16] и других видов. Сверхэкспрессия *MtWOX9-1* стимулирует СЭ у *M. truncatula* [215], а подавление экспрессии *PaWOX8/9* у *P. abies* приводит к нарушению морфологии соматических эмбрионов и развитию на их основе вторичных соматических эмбрионов [216].

Вскоре после прорастания экспрессия *WOX9* наблюдается в ПАМ и примордиях листьев, а затем в меристемах цветков и развивающихся органах цветка на начальных стадиях роста, а также в эпидермисе плаценты [1, 212], в растущей перегородке плода и в верхней части КАМ [212]. Одна из мутаций в *WOX9* приводит к нарушению развития ПАМ: через несколько дней после прорастания она полностью дифференцируется. *WOX9* важен для поддержания экспрессии *WUS* и *CLV3* после прорастания. Тем не менее, функции WOX9 не ограничиваются, по-видимому, активацией *WUS*, поскольку после прекращения функционирования ПАМ мутанты с нарушением функции *WOX9* не формируют ни листьев, ни вторичных побегов, в отличие от мутантов с потерей функции *WUS*. Интересно, что при проращивании на среде с сахарозой, которая стимулирует деление клеток, такие мутанты развиваются практически нормально. После перехода ПАМ в стадию репродуктивного роста сахароза перестает быть необходимой. *WOX9* не экспрессируется в меристеме соцветия и, по-видимому, не требуется для ее функционирования [212]. Обнаружено, что по меньшей мере одной из непосредственных мишеней WOX9 является ген циклина *CYCP2;1*, регулирующего переход G2/M клеточного цикла. Сахароза также способна активировать *CYCP2;1* [217].

Ортологи WOX9 у пасленовых участвуют в регуляции развития соцветия. Так, ТФ EVERGREEN (EVG) *P. hybrida* – гомолог WOX9 и WOX8 – отвечает за архитектуру соцветия. *P. hybrida* имеет цимозное соцветие: в ходе его развития апикальная меристема делится на две: латеральную и меристему цветка. Меристема цветка образует цветок, а латеральная продолжает расти и занимает место апикальной. Затем этот цикл повторяется, и развивается зигзагообразное соцветие. *EVG* экспрессируется в меристеме соцветия, но не в меристеме цветка. У растений с мутацией в гене *EVG* меристемы соцветия не разделяются и продолжают формировать единый стебель, хотя и утолщенный. Через несколько узлов такие меристемы разделяются на несколько ветвей, и цикл повторяется. Кроме того, ни одна из этих меристем не может сформировать цветок [218, 219]. Согласно результатам генетического анализа, в норме EVG тем или иным способом активирует экспрессию *DOUBLE TOP* (*DOT*), гомолога *UFO A. thaliana*, белковый продукт которого, взаимодействуя с гомологом LEAFY – белком ALF (ABERRANT LEAF AND FLOWER), обеспечивает формирование цветков [218]. Также ортолог *WOX9* у *S. lycopersicum* – ген *COMPOUND INFLORESCENSE* (*S*) – участвует в регуляции ветвления соцветия; мутации в этом гене или его промоторе могут приводить к возникновению сильно разветвленного соцветия [45, 220], что связано с замедленным переходом вегетативной меристемы в меристему соцветия и замедленным переходом меристемы соцветия в меристему цветка, в результате чего рядом с ними успевает сформироваться больше новых вегетативных меристем и меристем соцветия, чем в норме [221]. Как и EVG, S активирует ортолог *UFO*, ген *ANANTHA*, в меристеме цветка [220]. Сходные взаимоотношения и функции выявлены у ортологов данных генов *Capsicum annuum* [222].

По меньшей мере один из ортологов *WOX8* и *9 O. sativa*, *DWT1*, участвует в регуляции баланса между ростом боковых побегов и основного побега. В норме эти побеги имеют одну высоту, однако потеря функции *DWT1* (мутация *dwt1*), не влияя на высоту основного побега, приводит к уменьшению длины боковых побегов. *DWT1* экспрессируется в различных частях растения, включая эмбрион, кончик корня и молодые метелки, но не в удлиняющихся междоузлиях, там также не детектируется его белковый продукт. Вероятно, действие этого ТФ приводит к возникновению пока не идентифицированного мобильного сигнала, влияющего на удлинение междоузлий [223]. Среди генов, экспрессия которых изменена в междоузлиях растений с потерей функции *DWT1*, много генов, связанных с цитоскелетом и делением клеток, а также с метаболизмом и сигнальными путями цитокининов. Также в междоузлиях мутантов *dwt1 O. sativa* повышен уровень экспрессии гена, кодирующего фермент OsGIBBERELLIN 2-OXIDASE 1 (OsGA2OX1), инактивирующий гиббереллины, снижен уровень экспрессии гена, участвующего в биосинтезе гиббереллинов (*OsENT-COPALYL DIPHOSPHATE SYNTHETASE 1*), и уменьшена интенсивность ответа на экзогенный гиббереллин [223]. DWT1 и его близкий гомолог DWT-LIKE2 (DWL2) способны к взаимо-

действию с OsPIP5K1, ферментом, вовлеченным в синтез важнейшего вторичного посредника – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата. Потеря функции *OsPIP5K1* приводит к развитию растений с укороченными основным и боковыми побегами, а сверхэкспрессия *OsPIP5K1* частично компенсирует дефекты мутантов *dwt1*, увеличивая длину боковых побегов, возможно, за счет взаимодействия OsPIP5K1 с DWL2 [213].

WOX11 и 12

WOX11 и его близкий гомолог WOX12 известны в первую очередь как регуляторы каллусообразования и развития придаточных корней, т.е. корней, которые возникают из некорневых органов, а также при регенерации *in vitro* или после поранения. У растений с мутациями в гене *WOX11* и/или *12* придаточные корни на листовых эксплантах образуются медленнее, а их количество снижено. Сверхэкспрессия *WOX11* приводит к усиленному формированию придаточных корней и каллуса у эксплантов на среде без гормонов и к усилению каллусообразования на среде CIM [224]. При регенерации корней на безгормональной среде из листовых эксплантов активность промоторов *WOX11* и *12* наблюдается на ранних сроках, в прокамбии центральной жилки листа вблизи места среза, а затем в клетках-основательницах придаточного корня. Затем в растущем примордии придаточного корня, где промоторы генов *WOX11* и *12* уже не активны, начинают работать промоторы *WOX5/7* [224, 225]. По своей природе и набору экспрессирующихся генов каллус сходен с примордием корня, и при формировании каллуса из листовых эксплантов промотор *WOX11* активен также в центральной жилке, маркируя формирование клеток-основательниц, а в уже образующемся каллусе промотор *WOX11* не активен, но начинает функционировать промотор *WOX5* [224].

WOX11/12 непосредственно активируют экспрессию *WOX5/7*, которые, согласно анализу мутантов, также важны для формирования придаточных корней [225]. Также WOX11 запускает экспрессию стимуляторов каллусообразования и формирования придаточных и боковых корней – генов ТФ LBD (LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN), в частности LBD16 и 29, причем показано, что *LBD16* прямо активируется WOX11 [224, 226]. Ауксин и полярный транспорт ауксина важны для активации *WOX11* и запуска экспрессии *WOX5/7* и, в конечном счете, для регенерации корней [224, 225]. Тем не менее, сверхэкспрессия *WOX11* способна частично восстанавливать способность к регенерации при подавлении синтеза ауксина [227]. Напротив, этилен подавляет регенерацию корней, а *WOX11* и *5* репрессируются этилен-чувствительным ТФ ETHYLENE-INSENSITIVE3 (EIN3). Интересно, что чем старше листовой эксплант, тем сильнее в нем экспрессируется *EIN3* и слабее – *WOX11*, и тем более затруднена регенерация корней [228]. Также обнаружен один из механизмов эпигенетической регуляции *WOX11* при каллусогенезе: атипичный вариант гистона H3 – H3.15 (без остатка лизина в позиции 27) связывается с локусом *WOX11* и активирует его экспрессию, вероятно, за счет уменьшения количества репрессирующих меток H3K27me3 [229]. Сходная схема взаимодействия ортологов WOX11/12 и WOX5 в каллусообразовании на среде CIM обнаружена у *O. sativa* [230]. Экспрессия ортологов *WOX5* и *11* при каллусогенезе выявлена у *Z. mays*, и у гибрида *P. davidiana* × *P. bollena* [230], а участие ортологов WOX11 в образовании придаточных корней показано у различных видов и гибридов *Populus* [231–233]. Как и у семенных растений, у папоротника *Ceratopteris richardii* обнаружен путь формирования придаточных корней, при котором факторы ауксинового ответа активируют ген промежуточной клады *WOX CrWOXA*, который активирует экспрессию гена клады *WUS – CrWUL*. Таким образом, этот путь формирования придаточных корней (ауксин–ген *WOX* промежуточной клады–ген *WOX* клады *WUS*) консервативен у папоротников и семенных растений [234]. *CrWOXA* экспрессируется и при образовании боковых корней [4]. Гены группы *WOX11* участвуют и в других вариантах регенерации, таких как побегообразование и СЭ. Так, показано положительное влияние *PtWOX11* на регенерацию побегов у *P. alba* × *P. glandulosa* [233]. Повышенный уровень экспрессии ортолога *WOX11* выявлен также в эмбриогенных каллусах *M. truncatula* [214] и в соматических эмбрионах и неэмбриогенных каллусах *V. vinifera* [119].

Помимо участия в процессах регенерации *in vitro*, ТФ группы WOX11/12 участвуют в развитии растения *in vivo* при формировании придаточных корней. У *A. thaliana* WOX11/12 не влияют на формирование боковых корней, которые в норме формируются за счет активации ARF7/19, и промотор *WOX11* не активируется в ходе образования бокового корня [226]. Однако при выращивании проростков в почве промотор *WOX11* активируется в различных участках корня, и изменение его функции влияет на количество вторичных, третичных и четвертичных корней. Вероятной причиной таких различий могут быть повреждения, которые корни получают при росте в почве и которые стимулируют образование корней, сходных с придаточными. В формировании как боковых, так и придаточных корней участвует ТФ LBD16. WOX11 за счет прямой активации *LBD16* стимулирует развитие придаточных корней и корней в месте повреждения, а ARF7/19 стимулируют *LBD16* в случае развития боковых корней без повреждения корня [226].

У *O. sativa* ортолог WOX11 выполняет более многочисленные функции. Растения с потерей функции *OsWOX11* практически не формируют придаточные корни, кроме того, их первичный корень и ПАМ тоже недоразвиты, и они не доживают до взрослого состояния. *OsWOX11* экспрессируется в КАМ, ПАМ и стебле, а также в примордиях придаточных корней, начиная с ранних стадий инициации, и в меристеме зрелых придаточных корней. Сверхэкспрессия *OsWOX11* приводит к развитию большого количества придаточных и боковых корней. Ауксины повышают уровень экспрессии *OsWOX11*, а цитокинины снижают. OsWOX11 необходим для стимулируемого ауксином развития придаточных корней у риса [235]. При этом OsWOX11, вероятно, положительно влияет на передачу цитокининового сигнала, являясь прямым репрессором гена *OsRR2*, кодирующего репрессор цитокининового ответа – ARR типа A [236]. Также показано взаимодействие OsWOX11 с ТФ OsERF3 из семейства AP2/ERF, стимулятором развития придаточных корней и роста главного корня. Уровень экспрессии *ERF3* уменьшен в растениях с потерей функции *OsWOX11*, однако ERF3 способен регулировать развитие корней по пути, не связанному с OsWOX11. OsERF3 также связывается с *OsRR2* (но не в том регионе, в котором с ним связывается OsWOX11), однако он не подавляет, а стимулирует экспрессию *OsRR2*. При этом OsERF3 способствует взаимодействию OsWOX11 со своим сайтом связывания в локусе *OsRR2*. *OsRR2* стимулирует заложение придаточных корней, однако его влияние на длину корней неоднозначно, что объясняет разнонаправленное влияние на него OsWOX11 и OsERF3 [237]. OsWOX11 также связывается с комплексом, включающим вспомогательный белок OsADA2 и гистон-ацетилтрансферазу OsGCN5 для активации экспрессии генов-мишеней (с помощью ацетилирования гистонов) и стимуляции развития придаточных корней, активируя в том числе гены, связанные с транспортом ауксина, в частности *OsPIN9*, а также с метаболизмом и построением клеточной стенки [238]. Ген ТФ DEGENERATED HULL 1 (DH1)/OsLOB16, близкий гомолог *LBD16 A. thaliana*, представляет собой мишень OsWOX11 [239]. Помимо регуляции образования придаточных корней, OsWOX11 регулирует поглощение корнями минеральных веществ и воды. Промотор *OsWOX11* активен в эпидермисе, в кончиках и зоне роста корня [236], а сам OsWOX11 стимулирует образование и рост корневых волосков. Уровень экспрессии данного гена повышается в ответ на водный стресс, а растения с мутацией в *OsWOX11* более чувствительны к засухе [240]. Кроме того, среди непосредственных мишеней OsWOX11 обнаружены гены, кодирующие предполагаемый ТФ OsABIOTIC STRESS RESPONSIVE3 (OsASR3), участвующий в ответе на дефицит воды и холодовой стресс, и OsFRD3-LIKE PROTEIN1 (OsFRDL1) – переносчик цитрата, необходимый для транспорта ионов железа в растении, а реакция ряда генов на дефицит воды зависит от присутствия функционального *OsWOX11* [239]. Интересно, что экспрессия *OsWOX11,* направляемая промотором, активирующимся в корнях при дефиците калия, приводит к стимуляции развития корневой системы растений как в нормальных условиях, так и в условиях дефицита калия [241].

Как сказано выше, потеря функции *OsWOX11* приводит также к замедлению роста побега, уменьшению размера ПАМ и соцветия. OsWOX11 способен к взаимодействию с деметилазой гистонов JMJ705, снимающей метку H3K27me3, которая также стимулирует рост побега и влияет на размер ПАМ. OsWOX11 и JMJ705 совместно регулируют множество генов, связанных, в частности, с энергообменом, фотосинтезом, развитием хлоропластов, ответом на стресс и формированием побега, например, *OSH15* из семейства *KNOX* [242]. Также *OsWOX11* вместе с другим геном из группы WOX11/12, *OsWOX6*, участвует в регуляции гравитропического ответа. Уровень их экспрессии увеличивается в ответ на гравистимуляцию проростков и в ответ на обработку ауксином, при гравистимуляции уровень их экспрессии повышен в нижней части проростка и снижен в верхней. Растения с потерей функции *OsWOX6* и *11* слабее реагируют на гравистимуляцию и имеют больший угол наклона побегов. В условиях гравистимуляции гены *OsWOX6* и *11* опосредованно регулируются ТФ HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR 2D (HSFA2D), который, посредством активации экспрессии гена ТФ LA1 (LAZY1) стимулирует асимметричное распределение ауксина, что приводит к асимметричному паттерну экспрессии *OsWOX6* и *11* и способствует ответу на гравистимуляцию [243].

ДРЕВНЯЯ ВЕТВЬ (T1)

Представители древней ветви семейства *WOX* обнаружены в геноме не только сосудистых растений, но также мхов (*Physcomitrella patens*) и даже одноклеточных водорослей (*Ostreococcus tauri*) [6]. У *A. thaliana* в состав данной ветви входят три гена: *WOX10*, *13* и *14*. *WOX10,* более сходный с *WOX14*, чем с *WOX13*, предположительно, является псевдогеном, поскольку его экспрессия не была детектирована [244], а *WOX13* и *14* регулируют развитие цветков, плодов и проводящих тканей. Члены древней клады у других видов характеризуются весьма разнообразными паттернами экспрессии. Так, у *P. ginseng PgWOX13a* экспрессируется в ксилемных лучах, паренхиме и камбии главного корня, а *PgWOX13b* – в кортексе [245], ген *AaWOX Araucaria angustifolia* активен в зародышах и в про-

ростках [246], у *G. hirsutum GhWOX13a_Dt*, *GhWOX13b_At* и *GhWOX13b_Dt* повышают уровень экспрессии во время развития семенных волокон [247], а *OsWOX13 O. sativa*, вероятно, участвует в ответе на засуху и в регуляции сроков цветения [248]. Мы рассмотрим наиболее изученных представителей древней клады.

WOX13

WOX13 *A. thaliana* изучен в первую очередь как регулятор развития плода. Потеря его функции приводит к уменьшению размеров медиальной части гинецея (перегородки), расширению кромки створок и к ускорению растрескивания плодов. Напротив, сверхэкспрессия *WOX13* ведет к тому, что гинецей дольше остается открытым, перегородка расширяется, а растрескивание плода не происходит или происходит намного позднее. *WOX13* регулирует развитие перегородки в том числе за счет прямого или опосредованного подавления экспрессии маркеров латеральных областей гинецея – генов ТФ семейства YABBY FILAMENTOUS FLOWER и ТФ с цинковыми пальцами JAGGED [249]. Помимо гинецея, активность промотора *WOX13* детектирована в закладывающихся боковых корнях, листовых примордиях и цветках, а также в кончике корня, проводящих тканях корня и листа и в ПАМ, а мутация в *WOX13* приводит также к уменьшению количества боковых корней и к более раннему цветению [244, 249].

У мха *P. patens* гены *WOX* представлены только членами древней клады, близкими к *WOX13*: *PpWOX13LA*, *B* и *C* [250]. Активность промоторов *PpWOX13LA* и *B* повышена в апикальных стволовых клетках хлоронемы и каулонемы, а также в яйцеклетке и зиготе. Потеря функции обоих генов приводит к уменьшению количества сформированных спорангиев и к остановке развития зигот, а также к нарушению регенерации вследствие сниженной интенсивности клеточных делений и подавления роста клеток [250].

Партнеры WOX13 или его ортологов *in vivo* еще не выявлены, однако показана способность ТФ PtrWOX13c *P. trichocarpa* формировать тример с ТФ PtrDRIF1 (PtrDIVARICATA AND RADIALIS INTERACTING FACTOR1) и PtrRADIALIS1 с доменом MYB/SANT; при этом гены, кодирующие PtrWOX13c и данные ТФ, экспрессируются в проводящих тканях [251].

WOX14

WOX14 регулирует развитие проводящих тканей и рост растений в целом. Потеря функции *WOX14* приводит к карликовости растений, задержке цветения и гиполигнификации сосудов, однако эти дефекты компенсируются при добавлении гиббереллинов. WOX14 стимулирует экспрессию *GA3ox1* и подавляет экспрессию *GA2ox1* – генов, кодирующих ферменты биосинтеза и инактивации гиббереллинов соответственно [199]. WOX14 вместе с WOX4 стимулирует пролиферацию клеток проводящих тканей. Сосудистые пучки двойных мутантов с нарушением функции генов *WOX4* и *14* (*wox4-1 wox14-1*) содержат меньше клеток, чем одиночные мутанты *wox4-1* [198]. Обнаружена связь WOX14 с другими ТФ, стимулирующими деление клеток проводящих тканей – TMO6 и LBD4. WOX14, вероятно, связываясь с его локусом, стимулирует экспрессию *TMO6*, белковый продукт которого, в свою очередь, вместе с WOX14 стимулирует экспрессию *LBD4* [252]. Экспрессия *WOX14*, как и *WOX4*, стимулируется CLE-пептидом TDIF. При этом обработка этим пептидом растений дикого типа вызывает активацию *LBD4* и *TMO6*, тогда как у мутантов *wox4-1 wox14-1* или у растений с мутацией в гене *PXY* этого не происходит [252]. Промотор *WOX14* активен в примордиях боковых корней, в перицикле и проводящей системе корня, а также на ранних стадиях развития тычинок. Потеря функции WOX14 приводит к подавлению развития боковых корней и увеличению количества придаточных корней, а также к недоразвитию тычинок и частичной стерильности [244]. Также WOX14 важен для регенерации побегов *in vitro* в системе CIM–SIM, а при образовании каллусов его экспрессия активируется гистон-ацетилтрансферазой HAG1 [149].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гены *WOX* участвуют в самых разнообразных аспектах развития растения, включая регуляцию функционирования меристем, развитие боковых органов, размножение, эмбриогенез и многое другое (рис. 4). В табл. 1S (см. Приложение на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2020/3/supp_Tvorogova_rus.pdf) приведены все описанные в обзоре мишени и партнеры WOX, а также регуляторы кодирующих их генов.

Таким образом, белки WOX, несмотря на разнообразие их функций, зачастую участвуют в сходных регуляторных модулях. Так, некоторые гены *WOX*, включая гены современной (*WUS*, *WOX4* и *5*) [22, 131, 193], промежуточной (*WOX8*) [209] и древней (*WOX14*) [252] ветвей, регулируются с помощью пептидов семейства CLE. Экспрессия генов *WUS* и *WOX5* репрессируется одним и тем же белком BARD1/ROW1 [78, 141], и большая часть WOX тесно взаимодействует с ауксинами и цитокининами. В целом, ТФ WOX обычно стимулируют пролиферацию клеток и регенерацию. Например, сверхэкспрессия генов современной клады (*PtoWUSa*, *PtoWOX4a*, *PtoWOX5a*), как и генов промежуточной клады (*PtoWOX11/12a*) сти-

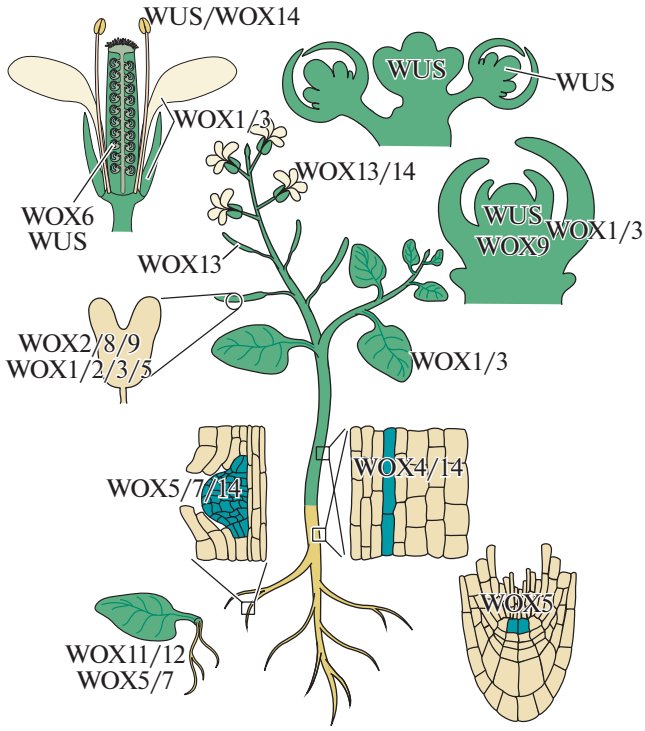


Рис. 4. Органы и ткани *A. thaliana*, на развитие и функционирование которых влияют ТФ WOX. WUS регулирует функционирование ПАМ, меристемы соцветия и меристемы цветка, WOX9 участвует в функционировании ПАМ, WOX1 и WOX3 важны для разрастания боковых органов побега, WOX4 и 14 регулируют работу камбия и прокамбия, WOX5 контролирует функции КАМ, WOX5, 7 и 14 участвуют в развитии боковых корней, WOX11, 12, 5 и 7 регулируют развитие придаточных корней, WOX13 и 14 контролируют сроки цветения, WUS и WOX14 регулируют развитие тычинок, WOX6 и WUS важны для развития семязачатков, WOX13 регулирует развитие плода, WOX2, 8, 9, 1, 3, 5 участвуют в эмбриогенезе.

мулирует регенерацию корней из черенков гибридного тополя (*P. alba* × *P. glandulosa*) [231]. Тем не менее обнаружены существенные различия между ТФ WOX различных клад, особенно выражено отличие современной клады от двух других. Так, комплементационный анализ мутантов *wus-1* показывает, что функции *WUS* могут в той или иной степени замещать все гены *WOX,* входящие в кладу *WUS*, кроме *WOX4*, но не гены из промежуточной и древней клады [90]. Гены *WOX A. thaliana*, входящие в кладу *WUS*, за исключением *WOX7*, но не гены промежуточной или древней клады, способны частично или полностью комплементировать мутацию *lam1* в ортологе *WOX1 N. tabacum* [253]. Изучение ТФ WOX не только представляет теоретический интерес, но и открывает новые возможности в биотехнологии, такие как разработка эффективных протоколов трансформации и регенерации злаков [118] и повышение урожайности сельскохозяйственных растений [161, 241]. Несмотря на активное изучение семейства *WOX*, детально определены далеко не все механизмы работы этих генов и генные сети, в которые они вовлечены. Табл. 2S (см. Приложение на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2020/3/supp_Tvorogova_rus.pdf), в которой сгруппированы регуляторы, мишени и партнеры каждого из генов *WOX A. thaliana*, наглядно показывает, механизмы работы каких генов *WOX* еще предстоит подробно исследовать. Таким образом, нас, вероятно, ждет еще множество исследований, посвященных семейству WOX.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-14-50209.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haecker A., Gross-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M., Laux T. (2004) Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development.* **131**, 657–668.
2. Nardmann J., Reisewitz P., Werr W. (2009) Discrete shoot and root stem cell-promoting WUS/WOX5 functions are an evolutionary innovation of angiosperms. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 1745–1755.
3. Wu C.-C., Li F.-W., Kramer E.M. (2019) Large-scale phylogenomic analysis suggests three ancient superclades of the WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX transcription factor family in plants. *PLoS One*. **14**, e0223521. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223521
4. Nardmann J., Werr W. (2012) The invention of WUS-like stem cell-promoting functions in plants predates leptosporangiate ferns. *Plant Mol. Biol.* **78**, 123–134.
5. Lian G., Ding Z., Wang Q., Zhang D., Xu J. (2014) Origins and evolution of WUSCHEL-related homeobox protein family in plant kingdom. *Sci. World J.* **2014**, 534140. https://doi.org/10.1155/2014/534140
6. Segatto A.L.A., Thompson C.E., Freitas L.B. (2016) Molecular evolution analysis of WUSCHEL-related homeobox transcription factor family reveals functional divergence among clades in the homeobox region. *Dev. Genes Evol.* **226**, 259–268.
7. Laux T., Mayer K.F., Berger J., Jürgens G. (1996) The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis. Development.* **122**, 87–96.
8. Yadav R.K., Tavakkoli M., Reddy G.V. (2010) WUSCHEL mediates stem cell homeostasis by regulating stem cell number and patterns of cell division and differentiation of stem cell progenitors. *Development.* **137**, 3581–3589.

9. Wang J., Tian C., Zhang C., Shi B., Cao X., Zhang T.-Q., Zhao Z., Wang J.-W., Jiao Y. (2017) Cytokinin signaling activates WUSCHEL expression during axillary meristem initiation. *Plant Cell.* **29**, 1373–1387.

10. Gallois J.-L., Nora F.R., Mizukami Y., Sablowski R. (2004) WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes Dev*. **18**, 375–380.

11. Zhang T.-Q., Lian H., Zhou C.-M., Xu L., Jiao Y., Wang J.-W. (2017) A two-step model for *de novo* activation of *WUSCHEL* during plant shoot regeneration. *Plant Cell.* **29**, 1073–1087.

12. Mayer K.F., Schoof H., Haecker A., Lenhard M., Jürgens G., Laux T. (1998) Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell.* **95**, 805–815.

13. Xin W., Wang Z., Liang Y., Wang Y., Hu Y. (2017) Dynamic expression reveals a two-step patterning of *WUS* and *CLV3* during axillary shoot meristem formation in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol*. **214**, 1–6.

14. Yadav R.K., Perales M., Gruel J., Girke T., Jönsson H., Reddy G.V. (2011) WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Genes Dev*. **25**, 2025–2030.

15. Daum G., Medzihradszky A., Suzaki T., Lohmann J.U. (2014) A mechanistic framework for noncell autonomous stem cell induction in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, 14619–14624.

16. Hedman H., Zhu T., von Arnold S., Sohlberg J.J. (2013) Analysis of the *WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX* gene family in the conifer picea abies reveals extensive conservation as well as dynamic patterns. *BMC Plant Biol*. **13**, 89.

17. Meng Y., Liu H., Wang H., Liu Y., Zhu B., Wang Z., Hou Y., Zhang P., Wen J., Yang H., Mysore K.S., Chen J., Tadege M., Niu L., Lin H. (2019) HEADLESS, a WUSCHEL homolog, uncovers novel aspects of shoot meristem regulation and leaf blade development in *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot*. **70**, 149–163.

18. Wang H., Xu Y., Hong L., Zhang X., Wang X., Zhang J., Ding Z., Meng Z., Wang Z.-Y., Long R., Yang Q., Kong F., Han L., Zhou C. (2019) HEADLESS regulates auxin response and compound leaf morphogenesis in *Medicago truncatula*. *Front. Plant Sci.* **10**, 1024. https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01024

19. Nardmann J., Werr W. (2006) The shoot stem cell niche in angiosperms: expression patterns of WUS orthologues in rice and maize imply major modifications in the course of mono- and dicot evolution. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 2492–2504.

20. Tanaka W., Ohmori Y., Ushijima T., Matsusaka H., Matsushita T., Kumamaru T., Kawano S., Hirano H.-Y. (2015) Axillary meristem formation in rice requires the *WUSCHEL* ortholog *TILLERS ABSENT1*. *Plant Cell.* **27**, 1173–1184.

21. Suzuki C., Tanaka W., Hirano H.-Y. (2019) Transcriptional corepressor ASP1 and CLV-like signaling regulate meristem maintenance in rice. *Plant Physiol*. **180**, 1520–1534.

22. Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K.F.X., Jürgens G., Laux T. (2000) The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* *Genes. Cell*. **100**, 635–644.

23. Brand U., Fletcher J.C., Hobe M., Meyerowitz E.M., Simon R. (2000) Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science*. **289**, 617–619.

24. Полюшкевич Л.О., Ганчева М.С., Додуева И.Е., Лутова Л.А. (2020) Рецепторы пептидов CLE у растений. *Физиология растений*. **67**, 3–19.

25. Hu C., Zhu Y., Cui Y., Cheng K., Liang W., Wei Z., Zhu M., Yin H., Zeng L., Xiao Y., Lv M., Yi J., Hou S., He K., Li J., Gou X. (2018) A group of receptor kinases are essential for CLAVATA signalling to maintain stem cell homeostasis. *Nat. Plants*. **4**, 205–211.

26. Yu L.P., Simon E.J., Trotochaud A.E., Clark S.E. (2000) POLTERGEIST functions to regulate meristem development downstream of the *CLAVATA* loci. *Development.* **127**, 1661–1670.

27. Song S.-K., Lee M.M., Clark S.E. (2006) POL and PLL1 phosphatases are CLAVATA1 signaling intermediates required for *Arabidopsis* shoot and floral stem cells. *Development.* **133**, 4691–4698.

28. Gagne J.M., Gish L.A., Clark S.E. (2010) The role of the acyl modification, palmitoylation, in *Arabidopsis* stem cell regulation. *Plant Signal. Behav*. **5**, 1048–1051.

29. Bommert P., Je B.I., Goldshmidt A., Jackson D. (2013) The maize Gα gene *COMPACT PLANT2* functions in CLAVATA signalling to control shoot meristem size. *Nature.* **502**, 555–558.

30. Lee H., Jun Y.S., Cha O.-K., Sheen J. (2019) Mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 are required for stem cell maintenance in the *Arabidopsis* shoot apical meristem. *Plant Cell Rep*. **38**, 311–319.

31. Chou H., Zhu Y., Ma Y., Berkowitz G.A. (2016) The CLAVATA signaling pathway mediating stem cell fate in shoot meristems requires Ca^{2+} as a secondary cytosolic messenger. *Plant J. Cell Mol. Biol*. **85**, 494–506.

32. Che G., Gu R., Zhao J., Liu X., Song X., Zi H., Cheng Z., Shen J., Wang Z., Liu R., Yan L., Weng Y., Zhang X. (2020) Gene regulatory network controlling carpel number variation in cucumber. *Developmen*t. **147**, dev184788. https://doi.org/10.1242/dev.184788

33. Perales M., Rodriguez K., Snipes S., Yadav R.K., Diaz-Mendoza M., Reddy G.V. (2016) Threshold-dependent transcriptional discrimination underlies stem cell homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **113**, E6298–E6306.

34. Zhou Y., Yan A., Han H., Li T., Geng Y., Liu X., Meyerowitz E.M. (2018) HAIRY MERISTEM with WUSCHEL confines CLAVATA3 expression to the outer apical meristem layers. *Science*. **361**, 502–506.

35. Busch W., Miotk A., Ariel F.D., Zhao Z., Forner J., Daum G., Suzaki T., Schuster C., Schultheiss S.J., Leibfried A., Haubeiss S., Ha N., Chan R.L., Lohmann J.U. (2010) Transcriptional control of a plant stem cell niche. *Dev. Cell*. **18**, 849–861.

36. Theißen G., Melzer R., Rümpler F. (2016) MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development: linking plant development and evolution. *Development*. **143**, 3259–3271.

37. Lenhard M., Bohnert A., Jürgens G., Laux T. (2001) Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell*. **105**, 805–814.

38. Lohmann J.U., Hong R.L., Hobe M., Busch M.A., Parcy F., Simon R., Weigel D. (2001) A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell*. **105**, 793–803.

39. Sun B., Xu Y., Ng K.-H., Ito T. (2009) A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the *Arabidopsis* floral meristem. *Genes Dev*. **23**, 1791–1804.

40. Bollier N., Sicard A., Leblond J., Latrasse D., Gonzalez N., Gévaudant F., Benhamed M., Raynaud C., Lenhard M., Chevalier C., Hernould M., Delmas F. (2018) At-MINI ZINC FINGER2 and Sl-INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY, a conserved missing link in the regulation of floral meristem termination in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Cell*. **30**, 83–100.

41. Sun B., Zhou Y., Cai J., Shang E., Yamaguchi N., Xiao J., Looi L.-S., Wee W.-Y., Gao X., Wagner D., Ito T. (2019) Integration of transcriptional repression and Polycomb-mediated silencing of WUSCHEL in floral meristems. *Plant Cell*. **31**, 1488–1505.

42. Liu X., Kim Y.J., Müller R., Yumul R.E., Liu C., Pan Y., Cao X., Goodrich J., Chen X. (2011) AGAMOUS terminates floral stem cell maintenance in *Arabidopsis* by directly repressing WUSCHEL through recruitment of Polycomb group proteins. *Plant Cell*. **23**, 3654–3670.

43. Guo L., Cao X., Liu Y., Li J., Li Y., Li D., Zhang K., Gao C., Dong A., Liu X. (2018) A chromatin loop represses *WUSCHEL* expression in *Arabidopsis*. *Plant J. Cell. Mol. Biol*. **94**, 1083–1097.

44. van der Knaap E., Chakrabarti M., Chu Y.H., Clevenger J.P., Illa-Berenguer E., Huang Z., Keyhaninejad N., Mu Q., Sun L., Wang Y., Wu S. (2014) What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape. *Front. Plant Sci*. **5**, 227.

45. Rodríguez-Leal D., Lemmon Z.H., Man J., Bartlett M.E., Lippman Z.B. (2017) Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. *Cell*. **171**, 470–480.e8.

46. Liu X., Gao L., Dinh T.T., Shi T., Li D., Wang R., Guo L., Xiao L., Chen X. (2014) DNA topoisomerase I affects Polycomb group protein-mediated epigenetic regulation and plant development by altering nucleosome distribution in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **26**, 2803–2817.

47. Liu X., Dinh T.T., Li D., Shi B., Li Y., Cao X., Guo L., Pan Y., Jiao Y., Chen X. (2014) AUXIN RESPONSE FACTOR 3 integrates the functions of AGAMOUS and APETALA2 in floral meristem determinacy. *Plant J. Cell Mol. Biol*. **80**, 629–641.

48. Ferrario S., Shchennikova A.V., Franken J., Immink R.G.H., Angenent G.C. (2006) Control of floral meristem determinacy in petunia by MADS-box transcription factors. *Plant Physiol*. **140**, 890–898.

49. Lu H., Klocko A.L., Brunner A.M., Ma C., Magnuson A.C., Howe G.T., An X., Strauss S.H. (2019) RNA interference suppression of AGAMOUS and SEEDSTICK alters floral organ identity and impairs floral organ determinacy, ovule differentiation, and seed-hair development in *Populus*. *New Phytol*. **222**, 923–937.

50. Pelaz S., Ditta G.S., Baumann E., Wisman E., Yanofsky M.F. (2000) B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA MADS-box* genes. *Nature*. **405**, 200–203.

51. Carles C.C., Lertpiriyapong K., Reville K., Fletcher J.C. (2004) The ULTRAPETALA1 gene functions early in *Arabidopsis* development to restrict shoot apical meristem activity and acts through WUSCHEL to regulate floral meristem determinacy. *Genetics*. **167**, 1893–1903.

52. Carles C.C., Choffnes-Inada D., Reville K., Lertpiriyapong K., Fletcher J.C. (2005) ULTRAPETALA1 encodes a SAND domain putative transcriptional regulator that controls shoot and floral meristem activity in *Arabidopsis*. *Development*. **132**, 897–911.

53. Moreau F., Thévenon E., Blanvillain R., Lopez-Vidriero I., Franco-Zorrilla J.M., Dumas R., Parcy F., Morel P., Trehin C., Carles C.C. (2016) The Myb-domain protein ULTRAPETALA1 INTERACTING FACTOR 1 controls floral meristem activities in *Arabidopsis*. *Development*. **143**, 1108–1119.

54. Endrizzi K., Moussian B., Haecker A., Levin J.Z., Laux T. (1996) The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. *Plant J*. **10**, 967–979.

55. Scofield S., Dewitte W., Murray J.A. (2014) STM sustains stem cell function in the *Arabidopsis* shoot apical meristem and controls *KNOX* gene expression independently of the transcriptional repressor AS1. *Plant Signal. Behav*. **9**, e28934. https://doi.org/10.4161/psb.28934

56. Green K.A., Prigge M.J., Katzman R.B., Clark S.E. (2005) *CORONA*, a member of the class III homeodomain leucine zipper gene family in *Arabidopsis*, regulates stem cell specification and organogenesis. *Plant Cell*. **17**, 691–704.

57. Williams L., Grigg S.P., Xie M., Christensen S., Fletcher J.C. (2005) Regulation of *Arabidopsis* shoot apical meristem and lateral organ formation by microRNA miR166g and its AtHD-ZIP target genes. *Development*. **132**, 3657–3668.

58. Lee C., Clark S.E. (2015) A WUSCHEL-independent stem cell specification pathway is repressed by PHB, PHV and CNA in *Arabidopsis*. *PLoS One*. **10**, e0126006.

59. Yuste-Lisbona F.J., Fernández-Lozano A., Pineda B., Bretones S., Ortíz-Atienza A., García-Sogo B., Müller N.A., Angosto T., Capel J., Moreno V.,

Jiménez-Gómez J.M., Lozano R. (2020) ENO regulates tomato fruit size through the floral meristem development network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117**, 8187–8195.

60. Bae S.-Y., Kim M.-H., Cho J.-S., Park E.-J., Lee H., Kim J.-H., Ko J.-H. (2020) Overexpression of *Populus* transcription factor PtrTALE12 increases axillary shoot development by regulating *WUSCHEL* expression. *Tree Physiol.* **40**, 1232–1246. https://doi.org/10.1093/treephys/tpaa062
61. Leibfried A., To J.P.C., Busch W., Stehling S., Kehle A., Demar M., Kieber J.J., Lohmann J.U. (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*. **438**, 1172–1175.
62. Chickarmane V.S., Gordon S.P., Tarr P.T., Heisler M.G., Meyerowitz E.M. (2012) Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical–basal axis of the growing *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**, 4002–4007.
63. Gordon S.P., Chickarmane V.S., Ohno C., Meyerowitz E.M. (2009) Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 16529–16534.
64. Lindsay D.L., Sawhney V.K., Bonham-Smith P.C. (2006) Cytokinin-induced changes in CLAVATA1 and WUSCHEL expression temporally coincide with altered floral development in *Arabidopsis*. *Plant Sci*. **170**, 1111–1117.
65. Snipes S.A., Rodriguez K., DeVries A.E., Miyawaki K.N., Perales M., Xie M., Reddy G.V. (2018) Cytokinin stabilizes WUSCHEL by acting on the protein domains required for nuclear enrichment and transcription. *PLoS Genet.* **14**, e1007351.
66. Meng W.J., Cheng Z.J., Sang Y.L., Zhang M.M., Rong X.F., Wang Z.W., Tang Y.Y., Zhang X.S. (2017) Type-B *Arabidopsis* response regulators specify the shoot stem cell niche by dual regulation of *WUSCHEL*. *Plant Cell*. **29**, 1357–1372.
67. Dai X., Liu Z., Qiao M., Li J., Li S., Xiang F. (2017) ARR12 promotes de novo shoot regeneration in *Arabidopsis thaliana* via activation of *WUSCHEL* expression. *J. Integr. Plant Biol.* **59**, 747–758.
68. Xie M., Chen H., Huang L., O'Neil R.C., Shokhirev M.N., Ecker J.R. (2018) A B-ARR-mediated cytokinin transcriptional network directs hormone cross-regulation and shoot development. *Nat. Commun*. **9**, 1604.
69. Zubo Y.O., Blakley I.C., Yamburenko M.V., Worthen J.M., Street I.H., Franco-Zorrilla J.M., Zhang W., Hill K., Raines T., Solano R., Kieber J.J., Loraine A.E., Schaller G.E. (2017) Cytokinin induces genome-wide binding of the type-B response regulator ARR10 to regulate growth and development in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**, E5995–E6004.
70. Liu Z., Dai X., Li J., Liu N., Liu X., Li S., Xiang F. (2020) The type-B cytokinin response regulator ARR1 inhibits shoot regeneration in an ARR12-dependent manner in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **32**, 2271–2291.
71. Ma Y., Miotk A., Šutiković Z., Ermakova O., Wenzl C., Medzihradszky A., Gaillochet C., Forner J., Utan G., Brackmann K., Galván-Ampudia C.S., Vernoux T., Greb T., Lohmann J.U. (2019) WUSCHEL acts as an auxin response rheostat to maintain apical stem cells in *Arabidopsis*. *Nat. Commun*. **10**, 5093.
72. Cheng Z.J., Wang L., Sun W., Zhang Y., Zhou C., Su Y.H., Li W., Sun T.T., Zhao X.Y., Li X.G., Cheng Y., Zhao Y., Xie Q., Zhang X.S. (2013) Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by auxin response factor 3. *Plant Physiol*. **161**, 240–251.
73. Su Y.H., Zhao X.Y., Liu Y.B., Zhang C.L., O'Neill S.D., Zhang X.S. (2009) Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol*. **59**, 448–460.
74. Su Y.H., Liu Y.B., Bai B., Zhang X.S. (2015) Establishment of embryonic shoot–root axis is involved in auxin and cytokinin response during *Arabidopsis* somatic embryogenesis. *Front. Plant Sci*. **5**, 792. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00792
75. Li W., Liu H., Cheng Z.J., Su Y.H., Han H.N., Zhang Y., Zhang X.S. (2011) DNA methylation and histone modifications regulate *de novo* shoot regeneration in *Arabidopsis* by modulating WUSCHEL expression and auxin signaling. *PLoS Genet*. **7**, e1002243.
76. Shemer O., Landau U., Candela H., Zemach A., Eshed Williams L. (2015) Competency for shoot regeneration from *Arabidopsis* root explants is regulated by DNA methylation. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* **238**, 251–261.
77. Kwon C.S., Chen C., Wagner D. (2005) *WUSCHEL* is a primary target for transcriptional regulation by SPLAYED in dynamic control of stem cell fate in *Arabidopsis*. *Genes Dev*. **19**, 992–1003.
78. Han P., Li Q., Zhu Y.-X. (2008) Mutation of *Arabidopsis BARD1* causes meristem defects by failing to confine wuschel expression to the organizing center. *Plant Cell*. **20**, 1482–1493.
79. Kaya H., Shibahara K.I., Taoka K.I., Iwabuchi M., Stillman B., Araki T. (2001) *FASCIATA* genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell*. **104**, 131–142.
80. Chen D., Molitor A.M., Xu L., Shen W.-H. (2016) *Arabidopsis* PRC1 core component *AtRING1* regulates stem cell-determining carpel development mainly through repression of class I *KNOX* genes. *BMC Biol*. **14**, 112.
81. Goldshmidt A., Alvarez J.P., Bowman J.L., Eshed Y. (2008) Signals derived from *YABBY* gene activities in organ primordia regulate growth and partitioning of *Arabidopsis* shoot apical meristems. *Plant Cell*. **20**, 1217–1230.
82. Zhao Y., Medrano L., Ohashi K., Fletcher J.C., Yu H., Sakai H., Meyerowitz E.M. (2004) HANABA TARANU is a GATA transcription factor that regulates shoot apical meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **16**, 2586–2600.

83. Saiga S., Furumizu C., Yokoyama R., Kurata T., Sato S., Kato T., Tabata S., Suzuki M., Komeda Y. (2008) The *Arabidopsis OBERON1* and *OBERON2* genes encode plant homeodomain finger proteins and are required for apical meristem maintenance. *Development.* **135**, 1751–1759.

84. Zeng J., Dong Z., Wu H., Tian Z., Zhao Z. (2017) Redox regulation of plant stem cell fate. *EMBO J.* **36**, 2844–2855.

85. Pfeiffer A., Janocha D., Dong Y., Medzihradszky A., Schöne S., Daum G., Suzaki T., Forner J., Langenecker T., Rempel E., Schmid M., Wirtz M., Hell R., Lohmann J.U. (2016) Integration of light and metabolic signals for stem cell activation at the shoot apical meristem. *eLife*. **5**, e17023.

86. Yadav R.K., Perales M., Gruel J., Ohno C., Heisler M., Girke T., Jönsson H., Reddy G.V. (2013) Plant stem cell maintenance involves direct transcriptional repression of differentiation program. *Mol. Syst. Biol*. **9**, 654.

87. Schuster C., Gaillochet C., Medzihradszky A., Busch W., Daum G., Krebs M., Kehle A., Lohmann J.U. (2014) A regulatory framework for shoot stem cell control integrating metabolic, transcriptional, and phytohormone signals. *Dev. Cell*. **28**, 438–449.

88. Narnoliya L., Basu U., Bajaj D., Malik N., Thakro V., Daware A., Sharma A., Tripathi S., Hegde V.S., Upadhyaya H.D., Singh A.K., Tyagi A.K., Parida S.K. (2019) Transcriptional signatures modulating shoot apical meristem morphometric and plant architectural traits enhance yield and productivity in chickpea. *Plant J. Cell Mol. Biol*. **98**, 864–883.

89. Kieffer M., Stern Y., Cook H., Clerici E., Maulbetsch C., Laux T., Davies B. (2006) Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *Plant Cell.* **18**, 560–573.

90. Dolzblasz A., Nardmann J., Clerici E., Causier B., van der Graaff E., Chen J., Davies B., Werr W., Laux T. (2016) Stem cell regulation by *Arabidopsis WOX* genes. *Mol. Plant*. **9**, 1028–1039.

91. Lu Z., Shao G., Xiong J., Jiao Y., Wang J., Liu G., Meng X., Liang Y., Xiong G., Wang Y., Li J. (2015) *MONOCULM 3*, an ortholog of *WUSCHEL* in rice, is required for tiller bud formation. *J. Genet. Genomics*. **42**, 71–78.

92. Causier B., Ashworth M., Guo W., Davies B. (2012) The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in *Arabidopsis. Plant Physiol*. **158**, 423–438.

93. Wang L., Kim J., Somers D.E. (2013) Transcriptional corepressor TOPLESS complexes with pseudoresponse regulator proteins and histone deacetylases to regulate circadian transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 761–766.

94. Zhou Y., Liu X., Engstrom E.M., Nimchuk Z.L., Pruneda-Paz J.L., Tarr P.T., Yan A., Kay S.A., Meyerowitz E.M. (2015) Control of plant stem cell function by conserved interacting transcriptional regulators. *Nature*. **517**, 377–380.

95. Stuurman J., Jäggi F., Kuhlemeier C. (2002) Shoot meristem maintenance is controlled by a *GRAS*-gene mediated signal from differentiating cells. *Genes Dev*. **16**, 2213–2218.

96. Yang Y., Sun M., Yuan C., Han Y., Zheng T., Cheng T., Wang J., Zhang Q. (2019) Interactions between WUSCHEL- and CYC2-like transcription factors in regulating the development of reproductive organs in *Chrysanthemum morifolium*. *Int. J. Mol. Sci*. **20**, https://doi.org/10.3390/ijms20061276

97. Sun Z., Su C., Yun J., Jiang Q., Wang L., Wang Y., Cao D., Zhao F., Zhao Q., Zhang M., Zhou B., Zhang L., Kong F., Liu B., Tong Y., Li X. (2019) Genetic improvement of the shoot architecture and yield in soya bean plants via the manipulation of GmmiR156b. *Plant Biotechnol. J.* **17**, 50–62.

98. Lozano-Sotomayor P., Montes R.A.C., Silvestre-Vañó M., Herrera-Ubaldo H., Greco R., Pablo-Villa J., Galliani B.M., Diaz-Ramirez D., Weemen M., Boutilier K., Pereira A., Colombo L., Madueño F., Marsch-Martínez N., Folter S. (2016) Altered expression of the bZIP transcription factor DRINK ME affects growth and reproductive development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. **88**, 437–451.

99. Zhang D., Wang X., Wang M., Li J., Guo X., Chong K., Xu Y. (2013) Ectopic expression of WUS in hypocotyl promotes cell division via GRP23 in *Arabidopsis. PLoS One*. **8**, e75773. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075773

100. Hamada S., Onouchi H., Tanaka H., Kudo M., Liu Y.-G., Shibata D., Machida C., Machida Y. (2000) Mutations in the *WUSCHEL* gene of *Arabidopsis thaliana* result in the development of shoots without juvenile leaves. *Plant J*. **24**, 91–101.

101. Fouracre J.P., Poethig R.S. (2019) Role for the shoot apical meristem in the specification of juvenile leaf identity in *Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **116**, 10168–10177.

102. Li X., Lian H., Zhao Q., He Y. (2019) MicroRNA166 Monitors SPOROCYTELESS/NOZZLE for building of the anther internal boundary. *Plant Physiol*. **181**, 208–220.

103. Deyhle F., Sarkar A.K., Tucker E.J., Laux T. (2007) WUSCHEL regulates cell differentiation during anther development. *Dev. Biol*. **302**, 154–159.

104. Gross-Hardt R., Lenhard M., Laux T. (2002) WUSCHEL signaling functions in interregional communication during *Arabidopsis* ovule development. *Genes Dev*. **16**, 1129–1138.

105. Sieber P., Gheyselinck J., Gross-Hardt R., Laux T., Grossniklaus U., Schneitz K. (2004) Pattern formation during early ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Biol*. **273**, 321–334.

106. Lieber D., Lora J., Schrempp S., Lenhard M., Laux T. (2011) *Arabidopsis WIH1* and *WIH2* genes act in the transition from somatic to reproductive cell fate. *Curr. Biol*. **21**, 1009–1017.

107. Zhao X., Bramsiepe J., Van Durme M., Komaki S., Prusicki M.A., Maruyama D., Forner J., Medzihradszky A., Wijnker E., Harashima H., Lu Y.,

Schmidt A., Guthörl D., Logroño R.S., Guan Y., Pochon G., Grossniklaus U., Laux T., Higashiyama T., Lohmann J.U., Nowack M.K., Schnittger A. (2017) RETINOBLASTOMA RELATED1 mediates germline entry in *Arabidopsis*. *Science*. **356**, eaaf6532. https://doi.org/10.1126/science.aaf653

108. Liu X., Ning K., Che G., Yan S., Han L., Gu R., Li Z., Weng Y., Zhang X. (2018) CsSPL functions as an adaptor between HD-ZIP III and CsWUS transcription factors regulating anther and ovule development in *Cucumis sativus* (cucumber). *Plant J*. **94**, 535–547.
109. Brambilla V., Battaglia R., Colombo M., Masiero S., Bencivenga S., Kater M.M., Colombo L. (2007) Genetic and molecular interactions between BELL1 and MADS box factors support ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **19**, 2544–2556.
110. Yamada T., Sasaki Y., Hashimoto K., Nakajima K., Gasser C.S. (2016) CORONA, PHABULOSA and PHAVOLUTA collaborate with BELL1 to confine WUSCHEL expression to the nucellus in *Arabidopsis* ovules. *Development*. **143**, 422–426.
111. Zuo J., Niu Q.-W., Frugis G., Chua N.-H. (2002) The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol*. **30**, 349–359.
112. Bouchabké-Coussa O., Obellianne M., Linderme D., Montes E., Maia-Grondard A., Vilaine F., Pannetier C. (2013) Wuschel overexpression promotes somatic embryogenesis and induces organogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues cultured *in vitro*. *Plant Cell Rep*. **32**, 675–686.
113. Zheng W., Zhang X., Yang Z., Wu J., Li F., Duan L., Liu C., Lu L., Zhang C., Li F. (2014) *AtWuschel* promotes formation of the embryogenic callus in *Gossypium hirsutum*. *PLoS One*. **9**, e87502.
114. Solís-Ramos L.Y., González-Estrada T., Nahuath-Dzib S., Zapata-Rodriguez L.C., Castaño E. (2008) Overexpression of WUSCHEL in *C. chinense* causes ectopic morphogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. **96**, 279–287.
115. Arroyo-Herrera A., Gonzalez A.K., Moo R.C., Quiroz-Figueroa F.R., Loyola-Vargas V.M., Rodriguez-Zapata L.C., D'Hondt C.B., Suárez-Solís V.M., Castaño E. (2008) Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. **94**, 171–180.
116. Klimaszewska K., Pelletier G., Overton C., Stewart D., Rutledge R.G. (2010) Hormonally regulated overexpression of *Arabidopsis* WUS and conifer LEC1 (CHAP3A) in transgenic white spruce: implications for somatic embryo development and somatic seedling growth. *Plant Cell Rep*. **29**, 723–734.
117. Lowe K., Wu E., Wang N., Hoerster G., Hastings C., Cho M.-J., Scelonge C., Lenderts B., Chamberlin M., Cushatt J., Wang L., Ryan L., Khan T., Chow-Yiu J., Hua W., Yu M., Banh J., Bao Z., Brink K., Igo E., Rudrappa B., Shamseer P., Bruce W., Newman L., Shen B., Zheng P., Bidney D., Falco C., Register J., Zhao Z.-Y., Xu D., Jones T., Gordon-Kamm W. (2016) Morphogenic regulators *Baby boom* and *Wuschel* improve monocot transformation. *Plant Cell*. **28**, 1998–2015.
118. Lowe K., La Rota M., Hoerster G., Hastings C., Wang N., Chamberlin M., Wu E., Jones T., Gordon-Kamm W. (2018) Rapid genotype "independent" *Zea mays* L. (maize) transformation via direct somatic embryogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol*. **54**, 240–252.
119. Gambino G., Minuto M., Boccacci P., Perrone I., Vallania R., Gribaudo I. (2011) Characterization of expression dynamics of WOX homeodomain transcription factors during somatic embryogenesis in *Vitis vinifera*. *J. Exp. Bot*. **62**, 1089–1101.
120. Rajesh M.K., Fayas T.P., Naganeeswaran S., Rachana K.E., Bhavyashree U., Sajini K.K., Karun A. (2016) *De novo* assembly and characterization of global transcriptome of coconut palm (*Cocos nucifera* L.) embryogenic calli using Illumina paired-end sequencing. *Protoplasma*. **253**, 913–928.
121. Киселев К.В., Шумакова О.А. (2014) Регуляция соматического эмбриогенеза в культурах клеток женьшеня *Panax ginseng* с помощью гена *PgCDPK2DS1*. *Генетика*. **50**, 683–691.
122. Chen S.-K., Kurdyukov S., Kereszt A., Wang X.-D., Gresshoff P.M., Rose R.J. (2009) The association of *homeobox* gene expression with stem cell formation and morphogenesis in cultured *Medicago truncatula*. *Planta*. **230**, 827–840.
123. Orłowska A., Kępczyńska E. (2018) Identification of Polycomb repressive complex1, *Trithorax* group genes and their simultaneous expression with *WUSCHEL*, *WUSCHEL*-related Homeobox5 and *SHOOT MERISTEMLESS* during the induction phase of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* Gaertn. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. **134**, 345–356.
124. Salvini M., Fambrini M., Giorgetti L., Pugliesi C. (2016) Molecular aspects of zygotic embryogenesis in sunflower (*Helianthus annuus* L.): correlation of positive histone marks with *HaWUS* expression and putative link *HaWUS/HaL1L*. *Planta*. **243**, 199–215.
125. Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R., Laux T. (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature*. **446**, 811–814.
126. Forzani C., Aichinger E., Sornay E., Willemsen V., Laux T., Dewitte W., Murray J.A.H. (2014) *WOX5* suppresses *CYCLIN D* activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Curr. Biol*. **24**, 1939–1944.
127. Tian H., Jia Y., Niu T., Yu Q., Ding Z. (2014) The key players of the primary root growth and development also function in lateral roots in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*. **33**, 745–753.
128. Xu M., Gu X., Liang N., Bian X., Wang H., Qin Y., Pi L., Wu S. (2020) Intersected functional zone of transcriptional regulators patterns stemness within stem cell niche of root apical meristem. *J. Integr. Plant Biol*. **62**, 897–911.
129. Pi L., Aichinger E., van der Graaff E., Llavata-Peris C.I., Weijers D., Hennig L., Groot E., Laux T. (2015) Or-

ganizer-derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of CDF4 expression. *Dev. Cell*. **33**, 576–588.

130. Ding Z., Friml J. (2010) Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 12046–12051.

131. Stahl Y., Wink R.H., Ingram G.C., Simon R. (2009) A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Curr. Biol. CB*. **19**, 909–914.

132. Berckmans B., Kirschner G., Gerlitz N., Stadler R., Simon R. (2020) CLE40 signaling regulates root stem cell fate. *Plant Physiol*. **182**, 1776–1792.

133. Shimotohno A., Heidstra R., Blilou I., Scheres B. (2018) Root stem cell niche organizer specification by molecular convergence of PLETHORA and SCARECROW transcription factor modules. *Genes Dev*. **32**, 1085–1100.

134. Santuari L., Sanchez-Perez G.F., Luijten M., Rutjens B., Terpstra I., Berke L., Gorte M., Prasad K., Bao D., Timmermans-Hereijgers J.L.P.M., Maeo K., Nakamura K., Shimotohno A., Pencik A., Novak O., Ljung K., Heesch S. van, Bruijn E. de, Cuppen E., Willemsen V., Mähönen A.P., Lukowitz W., Snel B., Ridder D. de, Scheres B., Heidstra R. (2016) The PLETHORA gene regulatory network guides growth and cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*. **28**, 2937–2951.

135. Long Y., Stahl Y., Weidtkamp-Peters S., Postma M., Zhou W., Goedhart J., Sánchez-Pérez M.-I., Gadella T.W.J., Simon R., Scheres B., Blilou I. (2017) *In vivo* FRET–FLIM reveals cell-type-specific protein interactions in *Arabidopsis* roots. *Nature*. **548**, 97–102.

136. Tian H., Wabnik K., Niu T., Li H., Yu Q., Pollmann S., Vanneste S., Govaerts W., Rolcík J., Geisler M., Friml J., Ding Z. (2014) WOX5-IAA17 feedback circuit-mediated cellular auxin response is crucial for the patterning of root stem cell niches in *Arabidopsis*. *Mol. Plant*. **7**, 277–289.

137. Stahl Y., Grabowski S., Bleckmann A., Kühnemuth R., Weidtkamp-Peters S., Pinto K.G., Kirschner G.K., Schmid J.B., Wink R.H., Hülsewede A., Felekyan S., Seidel C.A.M., Simon R. (2013) Moderation of *Arabidopsis* root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes. *Curr. Biol*. **23**, 362–371.

138. Meyer M.R., Shah S., Zhang J., Rohrs H., Rao A.G. (2015) Evidence for intermolecular interactions between the intracellular domains of the *Arabidopsi*s receptor-like kinase ACR4, Its homologs and the Wox5 transcription factor. *PLoS One*. **10**, e0118861.

139. Song S.-K., Hofhuis H., Lee M.M., Clark S.E. (2008) Key divisions in the early *Arabidopsis* embryo require POL and PLL1 phosphatases to establish the root stem organizer and vascular axis. *Dev. Cell*. **15**, 98–109.

140. Chu H., Liang W., Li J., Hong F., Wu Y., Wang L., Wang J., Wu P., Liu C., Zhang Q., Xu J., Zhang D. (2013). A CLE-WOX signalling module regulates root meristem maintenance and vascular tissue development in rice. *J. Exp. Bot*. **64**, 5359–5369.

141. Zhang Y., Jiao Y., Liu Z., Zhu Y.-X. (2015) ROW1 maintains quiescent centre identity by confining WOX5 expression to specific cells. *Nat. Commun*. **6**, 6003.

142. Olmo R., Cabrera J., Díaz-Manzano F.E., Ruiz-Ferrer V., Barcala M., Ishida T., García A., Andrés M.F., Ruiz-Lara S., Verdugo I., Pernas M., Fukaki H., del Pozo J.C., Moreno-Risueno M.Á., Kyndt T., Gheysen G., Fenoll C., Sawa S., Escobar C. (2020) Root-knot nematodes induce gall formation by recruiting developmental pathways of post-embryonic organogenesis and regeneration to promote transient pluripotency. *New Phytol*. **227**, 200–215.

143. Lebedeva (Osipova) M.A., Tvorogova V.E., Vinogradova A.P., Gancheva M.S., Azarakhsh M., Ilina E.L., Demchenko K.N., Dodueva I.E., Lutova L.A. (2015) Initiation of spontaneous tumors in radish (*Raphanus sativus*): cellular, molecular and physiological events. *J. Plant Physiol*. **173**, 97–104.

144. Osipova M.A., Mortier V., Demchenko K.N., Tsyganov V.E., Tikhonovich I.A., Lutova L.A., Dolgikh E.A., Goormachtig S. (2012) Wuschel-related homeobox5 gene expression and interaction of CLE peptides with components of the systemic control add two pieces to the puzzle of autoregulation of nodulation. *Plant Physiol*. **158**, 1329–1341.

145. Kundu A., DasGupta M. (2018) Silencing of putative cytokinin receptor histidine kinase1 inhibits both inception and differentiation of root nodules in *Arachis hypogaea*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. **31**, 187–199.

146. Gao B., Wen C., Fan L., Kou Y., Ma N., Zhao L. (2014) A *Rosa canina* WUSCHEL-related homeobox gene, *RcWOX1*, is involved in auxin-induced rhizoid formation. *Plant Mol. Biol*. **86**, 671–679.

147. Liu S., Wang B., Li X., Pan J., Qian X., Yu Y., Xu P., Zhu J., Xu X. (2019) Lateral organ boundaries domain 19 (LBD19) negative regulate callus formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. **137**, 485–494.

148. Jiang F., Xu X., Liu H., Zhu J. (2015) DRM1 and DRM2 are involved in *Arabidopsis* callus formation. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. **123**, 221–228.

149. Kim J., Yang W., Forner J., Lohmann J.U., Noh B., Noh Y. (2018) Epigenetic reprogramming by histone acetyltransferase HAG1/AtGCN5 is required for pluripotency acquisition in *Arabidopsis*. *EMBO J*. **37**, e98726.

150. Dorantes-Acosta A.E., Vielle-Calzada J.-P. (2006) The male gametophytic mutant tepitzin1 indicates a requirement of the homeobox gene *WOX5* for pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Sex. Plant Reprod*. **19**, 163–173.

151. Nakata M., Matsumoto N., Tsugeki R., Rikirsch E., Laux T., Okada K. (2012) Roles of the middle domain-specific *WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX* genes in early development of leaves in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **24**, 519–535.

152. Zhang F., Tadege M. (2015) Repression of AS2 by WOX family transcription factors is required for leaf development in *Medicago* and *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav*. **10**, e993291.

153. Nakata M., Okada K. (2012) The three-domain model: a new model for the early development of leaves in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav*. **7**, 1423–1427.

154. Alvarez J.P., Furumizu C., Efroni I., Eshed Y., Bowman J.L. (2016) Active suppression of a leaf meristem orchestrates determinate leaf growth. *eLife*. **5**, e15023.

155. Guan C., Wu B., Yu T., Wang Q., Krogan N.T., Liu X., Jiao Y. (2017) Spatial auxin signaling controls leaf flattening in *Arabidopsis*. *Curr. Biol*. **27**, 2940–2950. e4.

156. Nakata M.T., Tameshige T., Takahara M., Mitsuda N., Okada K. (2018) The functional balance between the *WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX1* gene and the phytohormone auxin is a key factor for cell proliferation in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Biotechnol*. **35**, 141–154.

157. Zhang Y., Wu R., Qin G., Chen Z., Gu H., Qu L.-J. (2011) Over-expression of WOX1 leads to defects in meristem development and polyamine homeostasis in *Arabidopsis*. *J. Integr. Plant Biol*. **53**, 493–506.

158. Tadege M., Lin H., Bedair M., Berbel A., Wen J., Rojas C.M., Niu L., Tang Y., Sumner L., Ratet P., McHale N.A., Madueño F., Mysore K.S. (2011) STENOFOLIA regulates blade outgrowth and leaf vascular patterning in *Medicago truncatula* and *Nicotiana sylvestris*. *Plant Cell*. **23**, 2125–2142.

159. Zhang F., Wang Y., Li G., Tang Y., Kramer E.M., Tadege M. (2014) STENOFOLIA recruits TOPLESS to repress *ASYMMETRIC LEAVES2* at the leaf margin and promote leaf blade outgrowth in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*. **26**, 650–664.

160. Zhang F., Wang H., Kalve S., Wolabu T.W., Nakashima J., Golz J.F., Tadege M. (2019) Control of leaf blade outgrowth and floral organ development by LEUNIG, ANGUSTIFOLIA3 and WOX transcriptional regulators. *New Phytol*. **223**, 2024–2038.

161. Wang H., Niu L., Fu C., Meng Y., Sang D., Yin P., Wu J., Tang Y., Lu T., Wang Z.-Y., Tadege M., Lin H. (2017) Overexpression of the *WOX* gene *STENOFOLIA* improves biomass yield and sugar release in transgenic grasses and display altered cytokinin homeostasis. *PLoS Genet*. **13**, e1006649.

162. Liu M., Lei L., Miao F., Powers C., Zhang X., Deng J., Tadege M., Carver B.F., Yan L. (2018) The *STENOFOLIA* gene from *Medicago* alters leaf width, flowering time and chlorophyll content in transgenic wheat. *Plant Biotechnol. J*. **16**, 186–196.

163. Zhuang L.-L., Ambrose M., Rameau C., Weng L., Yang J., Hu X.-H., Luo D., Li X. (2012) LATHYROIDES, encoding a WUSCHEL-related Homeobox1 transcription factor, controls organ lateral growth, and regulates tendril and dorsal petal identities in garden pea (*Pisum sativum* L.). *Mol. Plant*. **5**, 1333–1345.

164. Vandenbussche M., Horstman A., Zethof J., Koes R., Rijpkema A.S., Gerats T. (2009) Differential recruitment of WOX transcription factors for lateral development and organ fusion in *Petunia* and *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **21**, 2269–2283.

165. Matsumoto N., Okada K. (2001) A homeobox gene, *PRESSED FLOWER*, regulates lateral axis-dependent development of *Arabidopsis* flowers. *Genes Dev*. **15**, 3355–3364.

166. Nardmann J., Ji J., Werr W., Scanlon M.J. (2004) The maize duplicate genes *narrow sheath1* and *narrow sheath2* encode a conserved homeobox gene function in a lateral domain of shoot apical meristems. *Development*. **131**, 2827–2839.

167. Niu L., Lin H., Zhang F., Watira T.W., Li G., Tang Y., Wen J., Ratet P., Mysore K.S., Tadege M. (2015) *LOOSE FLOWER*, a WUSCHEL-like homeobox gene, is required for lateral fusion of floral organs in *Medicago truncatula*. *Plant J. Cell Mol. Biol*. **81**, 480–492.

168. Tadege M., Lin H., Bedair M., Berbel A., Wen J., Rojas C.M., Niu L., Tang Y., Sumner L., Ratet P., McHale N.A., Madueño F., Mysore K.S. (2011) STENOFOLIA regulates blade outgrowth and leaf vascular patterning in *Medicago truncatula* and *Nicotiana sylvestris*. *Plant Cell*. **23**, 2125–2142.

169. Shimizu R., Ji J., Kelsey E., Ohtsu K., Schnable P.S., Scanlon M.J. (2009) Tissue specificity and evolution of meristematic WOX3 function. *Plant Physiol*. **149**, 841–850.

170. Ishiwata A., Ozawa M., Nagasaki H., Kato M., Noda Y., Yamaguchi T., Nosaka M., Shimizu-Sato S., Nagasaki A., Maekawa M., Hirano H.-Y., Sato Y. (2013) Two WUSCHEL-related homeobox genes, *narrow leaf2* and *narrow leaf3*, control leaf width in rice. *Plant Cell Physiol*. **54**, 779–792.

171. Cho S.-H., Yoo S.-C., Zhang H., Pandeya D., Koh H.-J., Hwang J.-Y., Kim G.-T., Paek N.-C. (2013) The rice narrow *leaf2* and *narrow leaf3* loci encode WUSCHEL-related homeobox 3A (OsWOX3A) and function in leaf, spikelet, tiller and lateral root development. *New Phytol*. **198**, 1071–1084.

172. Dai M., Hu Y., Zhao Y., Liu H., Zhou D.-X. (2007) A WUSCHEL-LIKE HOMEOBOX gene represses a *YABBY* gene expression required for rice leaf development. *Plant Physiol*. **144**, 380–390.

173. Yoo S.-C., Cho S.-H., Paek N.-C. (2013) Rice WUSCHEL-related homeobox 3A (OsWOX3A) modulates auxin-transport gene expression in lateral root and root hair development. *Plant Signal. Behav*. **8**, e25929.
https://doi.org/10.4161/psb.25929

174. Cho S.-H., Kang K., Lee S.-H., Lee I.-J., Paek N.-C. (2016) OsWOX3A is involved in negative feedback regulation of the gibberellic acid biosynthetic pathway in rice (*Oryza sativa*). *J. Exp. Bot*. **67**, 1677–1687.

175. Nardmann J., Zimmermann R., Durantini D., Kranz E., Werr W. (2007) *WOX* gene phylogeny in Poaceae: a comparative approach addressing leaf and embryo development. *Mol. Biol. Evol*. **24**, 2474–2484.

176. Li J., Yuan Y., Lu Z., Yang L., Gao R., Lu J., Li J., Xiong G. (2012) Glabrous rice 1, encoding a homeodomain protein, regulates trichome development in rice. *Rice*. **5**, 32.

177. Angeles-Shim R.B., Asano K., Takashi T., Shim J., Kuroha T., Ayano M., Ashikari M. (2012) A WUSCHEL-

related homeobox 3B gene, depilous (dep), confers glabrousness of rice leaves and glumes. *Rice*. **5**, 28.

178. Zhang H., Wu K., Wang Y., Peng Y., Hu F., Wen L., Han B., Qian Q., Teng S. (2012) A WUSCHEL-like homeobox gene, *OsWOX3B* responses to NUDA/GL-1 locus in rice. *Rice*. **5**, 30.
179. Sun W., Gao D., Xiong Y., Tang X., Xiao X., Wang C., Yu S. (2017) Hairy Leaf 6, an AP2/ERF transcription factor, interacts with *OsWOX3B* and regulates trichome formation in rice. *Mol. Plant*. **10**, 1417–1433.
180. Honda E., Yew C.-L., Yoshikawa T., Sato Y., Hibara K.-I., Itoh J.-I. (2018) LEAF LATERAL SYMMETRY1, a member of the *WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX3* gene family, regulates lateral organ development differentially from other paralogs, NARROW LEAF2 and NARROW LEAF3 in rice. *Plant Cell Physiol*. **59**, 376–391.
181. Alvarez J.M., Sohlberg J., Engström P., Zhu T., Englund M., Moschou P.N., von Arnold S. (2015) The WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX 3 gene *PaWOX3* regulates lateral organ formation in Norway spruce. *New Phytol*. **208**, 1078–1088.
182. Zhou X., Guo Y., Zhao P., Sun M.-X. (2018) Comparative analysis of *WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX* genes revealed their parent-of-origin and cell type-specific expression pattern during early embryogenesis in tobacco. *Front. Plant Sci*. **9**, 311.
183. Wang L., Yuan J., Ma Y., Jiao W., Ye W., Yang D.-L., Yi C., Chen Z.J. (2018) Rice interploidy crosses disrupt epigenetic regulation, gene expression, and seed development. *Mol. Plant*. **11**, 300–314.
184. Zhu T., Moschou P.N., Alvarez J.M., Sohlberg J.J., von Arnold S. (2016) *WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX 2* is important for protoderm and suspensor development in the gymnosperm Norway spruce. *BMC Plant Biol*. **16**, 19.
185. Breuninger H., Rikirsch E., Hermann M., Ueda M., Laux T. (2008) Differential expression of *WOX* genes mediates apical-basal axis formation in the *Arabidopsis* embryo. *Dev. Cell*. **14**, 867–876.
186. Lie C., Kelsom C., Wu X. (2012) *WOX2* and *STIMPY-LIKE/WOX8* promote cotyledon boundary formation in *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol*. **72**, 674–682.
187. Wu X., Chory J., Weigel D. (2007) Combinations of WOX activities regulate tissue proliferation during *Arabidopsis* embryonic development. *Dev. Biol*. **309**, 306–316.
188. Zhang Z., Tucker E., Hermann M., Laux T. (2017) A molecular framework for the embryonic initiation of shoot meristem stem cells. *Dev. Cell*. **40**, 264–277. e4.
189. Alvarez J.M., Bueno N., Cañas R.A., Avila C., Cánovas F.M., Ordás R.J. (2018) Analysis of the *WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX* gene family in *Pinus pinaster*: new insights into the gene family evolution. *Plant Physiol. Biochem*. **123**, 304–318.
190. Kyo M., Maida K., Nishioka Y., Matsui K. (2018) Co-expression of *WUSCHEL* related homeobox (*WOX*) *2* with *WOX8* or *WOX9* promotes regeneration from leaf segments and free cells in *Nicotiana tabacum* L. *Plant Biotechnol*. **35**, 23–30.
191. Suer S., Agusti J., Sanchez P., Schwarz M., Greb T. (2011) WOX4 imparts auxin responsiveness to cambium cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **23**, 3247–3259.
192. Nardmann J., Werr W. (2013) Symplesiomorphies in the WUSCHEL clade suggest that the last common ancestor of seed plants contained at least four independent stem cell niches. *New Phytol*. **199**, 1081–1092.
193. Hirakawa Y., Kondo Y., Fukuda H. (2010) TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the *WOX4* homeobox gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **22**, 2618–2629.
194. Kucukoglu M., Nilsson J., Zheng B., Chaabouni S., Nilsson O. (2017) *WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX4* (*WOX4*)-like genes regulate cambial cell division activity and secondary growth in *Populus* trees. *New Phytol*. **215**, 642–657.
195. Guo X., Wang J., Gardner M., Fukuda H., Kondo Y., Etchells J.P., Wang X., Mitchum M.G. (2017) Identification of cyst nematode B-type CLE peptides and modulation of the vascular stem cell pathway for feeding cell formation. *PLoS Pathog*. **13**, e1006142.
196. Brackmann K., Qi J., Gebert M., Jouannet V., Schlamp T., Grünwald K., Wallner E.-S., Novikova D.D., Levitsky V.G., Agustí J., Sanchez P., Lohmann J.U., Greb T. (2018) Spatial specificity of auxin responses coordinates wood formation. *Nat. Commun*. **9**, 875.
197. Smetana O., Mäkilä R., Lyu M., Amiryousefi A., Sánchez Rodríguez F., Wu M.-F., Solé-Gil A., Leal Gavarrón M., Siligato R., Miyashima S., Roszak P., Blomster T., Reed J.W., Broholm S., Mähönen A.P. (2019) High levels of auxin signalling define the stem-cell organizer of the vascular cambium. *Nature*. **565**, 485–489.
198. Etchells J.P., Provost C.M., Mishra L., Turner S.R. (2013) WOX4 and WOX14 act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organisation. *Development*. **140**, 2224–2234.
199. Denis E., Kbiri N., Mary V., Claisse G., Silva N.C., Kreis M., Deveaux Y. (2017) WOX14 promotes bioactive gibberellin synthesis and vascular cell differentiation in *Arabidopsis*. *Plant J*. **90**, 560–572.
200. Yasui Y., Ohmori Y., Takebayashi Y., Sakakibara H., Hirano H.-Y. (2018) WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX4 acts as a key regulator in early leaf development in rice. *PLoS Genet*. **14**, e1007365.
201. Ohmori Y., Tanaka W., Kojima M., Sakakibara H., Hirano H.-Y. (2013) WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX4 is involved in meristem maintenance and is negatively regulated by the *CLE* gene *FCP1* in rice. *Plant Cell*. **25**, 229–241.
202. Nic-Can G.I., López-Torres A., Barredo-Pool F., Wrobel K., Loyola-Vargas V.M., Rojas-Herrera R., De-la-Peña C. (2013) New insights into somatic embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX4 are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PLoS One*. **8**, e72160.

203. Imin N., Nizamidin M., Wu T., Rolfe B.G. (2007) Factors involved in root formation in *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot*. **58**, 439–451.

204. Park S.O., Hwang S., Hauser B.A. (2004) The phenotype of *Arabidopsis* ovule mutants mimics the morphology of primitive seed plants. *Proc. R. Soc. B. Biol. Sci*. **271**, 311–316.

205. Park S.O., Zheng Z., Oppenheimer D.G., Hauser B.A. (2005) The *PRETTY FEW SEEDS2* gene encodes an *Arabidopsis* homeodomain protein that regulates ovule. *Development*. **132**, 841–849.

206. Pillitteri L.J., Bemis S.M., Shpak E.D., Torii K.U. (2007) Haploinsufficiency after successive loss of signaling reveals a role for ERECTA-family genes in *Arabidopsis* ovule development. *Development*. **134,** 3099–3109.

207. Zhu J., Shi H., Lee B., Damsz B., Cheng S., Stirm V., Zhu J.-K., Hasegawa P.M., Bressan R.A. (2004) An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor gene, *HOS9,* mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**, 9873–9878.

208. Kong D., Hao Y., Cui H. (2016) The WUSCHEL related homeobox protein WOX7 regulates the sugar response of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant*. **9**, 261–270.

209. Fiume E., Fletcher J.C. (2012) Regulation of *Arabidopsis* embryo and endosperm development by the polypeptide signaling molecule CLE8. *Plant Cell*. **24**, 1000–1012.

210. Ueda M., Zhang Z., Laux T. (2011) Transcriptional activation of *Arabidopsis* axis patterning genes *WOX8/9* links zygote polarity to embryo development. *Dev. Cell*. **20**, 264–270.

211. Ueda M., Aichinger E., Gong W., Groot E., Verstraeten I., Vu L.D., De Smet I., Higashiyama T., Umeda M., Laux T. (2017) Transcriptional integration of paternal and maternal factors in the *Arabidopsis* zygote. *Genes Dev*. **31**, 617–627.

212. Wu X., Dabi T., Weigel D. (2005) Requirement of homeobox gene *STIMPY/WOX9* for *Arabidopsis* meristem growth and maintenance. *Curr. Biol*. **15**, 436–440.

213. Fang F., Ye S., Tang J., Bennett M.J., Liang W. (2020) DWT1/DWL2 acts together with OsPIP5K1 to regulate plant uniform growth in rice. *New Phytol*. **225**, 1234–1246.

214. Творогова В.Е., Лебедева М.А., Лутова Л.А. (2015) Экспрессия генов *WOX* и *PIN* в соматическом и зиготическом эмбриогенезе у *Medicago truncatula*. *Генетика*. **51**, 1376–1385.

215. Tvorogova V.E., Fedorova Y.A., Potsenkovskaya E.A., Kudriashov A.A., Efremova E.P., Kvitkovskaya V.A., Wolabu T.W., Zhang F., Tadege M., Lutova L.A. (2019) The WUSCHEL-related homeobox transcription factor MtWOX9-1 stimulates somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. **138**, 517–527.

216. Zhu T., Moschou P.N., Alvarez J.M., Sohlberg J.J., von Arnold S. (2014) WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX 8/9 is important for proper embryo patterning in the gymnosperm Norway spruce. *J. Exp. Bot*. **65**, 6543–6552.

217. Peng L., Skylar A., Chang P.L., Bisova K., Wu X. (2014) CYCP2;1 integrates genetic and nutritional information to promote meristem cell division in *Arabidopsis*. *Dev. Biol*. **393**, 160–170.

218. Rebocho A.B., Bliek M., Kusters E., Castel R., Procissi A., Roobeek I., Souer E., Koes R. (2008) Role of EVERGREEN in the development of the *Cymose petunia* inflorescence. *Dev. Cell*. **15**, 437–447.

219. Schorderet M., Duvvuru Muni R.R., Fiebig A., Reinhardt D. (2018) Deregulation of MADS-box transcription factor genes in a mutant defective in the *WUSCHEL-LIKE HOMEOBOX* gene *EVERGREEN* of *Petunia hybrida*. *Plant Signal. Behav*. **13**, e1471299.

220. Lippman Z.B., Cohen O., Alvarez J.P., Abu-Abied M., Pekker I., Paran I., Eshed Y., Zamir D. (2008) The making of a compound inflorescence in tomato and related nightshades. *PLoS Biol*. **6**, e288.

221. Park S.J., Jiang K., Schatz M.C., Lippman Z.B. (2012) Rate of meristem maturation determines inflorescence architecture in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**, 639–644.

222. Cohen O., Borovsky Y., David-Schwartz R., Paran I. (2014) Capsicum annuum S (CaS) promotes reproductive transition and is required for flower formation in pepper (*Capsicum annuum*). *New Phytol*. **202**, 1014–1023.

223. Wang W., Li G., Zhao J., Chu H., Lin W., Zhang D., Wang Z., Liang W. (2014) Dwarf Tiller1, a Wuschel-related homeobox transcription factor, is required for tiller growth in rice. *PLoS Genet*. **10**, e1004154.

224. Liu J., Sheng L., Xu Y., Li J., Yang Z., Huang H., Xu L. (2014) WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **26**, 1081–1093.

225. Hu X., Xu L. (2016) Transcription factors WOX11/12 directly activate WOX5/7 to promote root primordia initiation and organogenesis. *Plant Physiol*. **172**, 2363–2373.

226. Sheng L., Hu X., Du Y., Zhang G., Huang H., Scheres B., Xu L. (2017) Non-canonical WOX11-mediated root branching contributes to plasticity in *Arabidopsis* root system architecture. *Development*. **144**, 3126–3133.

227. Chen L., Tong J., Xiao L., Ruan Y., Liu J., Zeng M., Huang H., Wang J.-W., Xu L. (2016) YUCCA-mediated auxin biogenesis is required for cell fate transition occurring during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot*. **67**, 4273–4284.

228. Li H., Yao L., Sun L., Zhu Z. (2020) ETHYLENE INSENSITIVE 3 suppresses plant *de novo* root regeneration from leaf explants and mediates age-regulated regeneration decline. *Development*. **147**, dev179457.

229. Yan A., Borg M., Berger F., Chen Z. (2020) The atypical histone variant H3.15 promotes callus formation in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. **147**, dev184895.

230. Hu B., Zhang G., Liu W., Shi J., Wang H., Qi M., Li J., Qin P., Ruan Y., Huang H., Zhang Y., Xu L. (2017) Divergent regeneration-competent cells adopt a com-

mon mechanism for callus initiation in angiosperms. *Regen. Oxf. Engl.* **4**, 132–139.

231. Liu B., Wang L., Zhang J., Li J., Zheng H., Chen J., Lu M. (2014) WUSCHEL-related homeobox genes in *Populus tomentosa:* diversified expression patterns and a functional similarity in adventitious root formation. *BMC Genomics*. **15**, 296.
232. Xu M., Xie W., Huang M. (2015) Two WUSCHEL-related HOMEOBOX genes, *PeWOX11a* and *PeWOX11b*, are involved in adventitious root formation of poplar. *Physiol. Plant.* **155**, 446–456.
233. Liu B., Zhang J., Yang Z., Matsui A., Seki M., Li S., Yan X., Kohnen M.V., Gu L., Prasad K., Tuskan G.A., Lu M., Oka Y. (2018) PtWOX11 acts as master regulator conducting the expression of key transcription factors to induce de novo shoot organogenesis in poplar. *Plant Mol. Biol*. **98**, 389–406.
234. Yu J., Zhang Y., Liu W., Wang H., Wen S., Zhang Y., Xu L. (2020) Molecular evolution of auxin-mediated root initiation in plants. *Mol. Biol. Evol*. **37**, 1387–1393.
235. Zhang T., Li R., Xing J., Yan L., Wang R., Zhao Y. (2018) The YUCCA-auxin-WOX11 module controls crown root development in rice. *Front. Plant Sci*. **9**, 523.
236. Zhao Y., Hu Y., Dai M., Huang L., Zhou D.-X. (2009) The WUSCHEL-related homeobox gene *WOX11* is required to activate shoot-borne crown root development in rice. *Plant Cell*. **21**, 736–748.
237. Zhao Y., Cheng S., Song Y., Huang Y., Zhou S., Liu X., Zhou D.-X. (2015) The interaction between rice ERF3 and WOX11 promotes crown root development by regulating gene expression involved in cytokinin signaling. *Plant Cell*. **27**, 2469–2483.
238. Zhou S., Jiang W., Long F., Cheng S., Yang W., Zhao Y., Zhou D.-X. (2017) Rice homeodomain protein WOX11 recruits a histone acetyltransferase complex to establish programs of cell proliferation of crown root meristem. *Plant Cell*. **29**, 1088–1104.
239. Jiang W., Zhou S., Zhang Q., Song H., Zhou D.-X., Zhao Y. (2017) Transcriptional regulatory network of WOX11 is involved in the control of crown root development, cytokinin signals, and redox in rice. *J. Exp. Bot.* **68**, 2787–2798.
240. Cheng S., Zhou D.-X., Zhao Y. (2016) *WUSCHEL*-related homeobox gene *WOX11* increases rice drought resistance by controlling root hair formation and root system development. *Plant Signal. Behav*. **11**, e1130198.
241. Chen G., Feng H., Hu Q., Qu H., Chen A., Yu L., Xu G. (2015) Improving rice tolerance to potassium deficiency by enhancing OsHAK16p:WOX11-controlled root development. *Plant Biotechnol. J.* **13**, 833–848.
242. Cheng S., Tan F., Lu Y., Liu X., Li T., Yuan W., Zhao Y., Zhou D.-X. (2018) WOX11 recruits a histone H3K27me3 demethylase to promote gene expression during shoot development in rice. *Nucl. Acids Res.* **46**, 2356–2369.
243. Zhang N., Yu H., Yu H., Cai Y., Huang L., Xu C., Xiong G., Meng X., Wang J., Chen H., Liu G., Jing Y., Yuan Y., Liang Y., Li S., Smith S.M., Li J., Wang Y. (2018) A core regulatory pathway controlling rice tiller angle mediated by the LAZY1-dependent asymmetric distribution of auxin. *Plant Cell.* **30**, 1461–1475.
244. Deveaux Y., Toffano-Nioche C., Claisse G., Thareau V., Morin H., Laufs P., Moreau H., Kreis M., Lecharny A. (2008) Genes of the most conserved *WOX* clade in plants affect root and flower development in *Arabidopsis. BMC Evol. Biol.* **8**, 291.
245. Liu J., Jiang C., Chen T., Zha L., Zhang J., Huang L. (2019) Identification and 3D gene expression patterns of *WUSCEHEL*-related homeobox (*WOX*) genes from *Panax ginseng. Plant Physiol. Biochem*. **143**, 257–264.
246. Schlögl P.S., dos Santos A.L.W., do Nascimento Vieira L., Floh E.I.S., Guerra M.P. (2012) Gene expression during early somatic embryogenesis in Brazilian pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze). *Plant Cell Tissue Organ Cult*. **108**, 173–180.
247. He P., Zhang Y., Liu H., Yuan Y., Wang C., Yu J., Xiao G. (2019) Comprehensive analysis of *WOX* genes uncovers that WOX13 is involved in phytohormone-mediated fiber development in cotton. *BMC Plant Biol*. **19**, 312.
248. Minh-Thu P.-T., Kim J.S., Chae S., Jun K.M., Lee G.-S., Kim D.-E., Cheong J.-J., Song S.I., Nahm B.H., Kim Y.-K. (2018) A WUSCHEL homeobox transcription factor, OsWOX13, enhances drought tolerance and triggers early flowering in rice. *Mol. Cells*. **41**, 781–798.
249. Romera-Branchat M., Ripoll J.J., Yanofsky M.F., Pelaz S. (2013) The *WOX13* homeobox gene promotes replum formation in the *Arabidopsis thaliana* fruit. *Plant J*. **73**, 37–49.
250. Sakakibara K., Reisewitz P., Aoyama T., Friedrich T., Ando S., Sato Y., Tamada Y., Nishiyama T., Hiwatashi Y., Kurata T., Ishikawa M., Deguchi H., Rensing S.A., Werr W., Murata T., Hasebe M., Laux T. (2014) *WOX13-like* genes are required for reprogramming of leaf and protoplast cells into stem cells in the moss *Physcomitrella patens. Development.* **141**, 1660–1670.
251. Petzold H.E., Chanda B., Zhao C., Rigoulot S.B., Beers E.P., Brunner A.M. (2018) DIVARICATA AND RADIALIS INTERACTING FACTOR (DRIF) also interacts with WOX and KNOX proteins associated with wood formation in *Populus trichocarpa. Plant J.* **93**, 1076–1087.
252. Smit M.E., McGregor S.R., Sun H., Gough C., Bågman A.-M., Soyars C.L., Kroon J.T., Gaudinier A., Williams C.J., Yang X., Nimchuk Z.L., Weijers D., Turner S.R., Brady S.M., Etchells J.P. (2020) A PXY-mediated transcriptional network integrates signaling mechanisms to control vascular development in *Arabidopsis. Plant Cell*. **32**, 319–335.
253. Lin H., Niu L., McHale N.A., Ohme-Takagi M., Mysore K.S., Tadege M. (2013) Evolutionarily conserved repressive activity of WOX proteins mediates leaf blade outgrowth and floral organ development in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **110**, 366–371.

WHAT DOES THE WOX SAY? REVIEW OF REGULATORS, TARGETS, PARTNERS

V. E. Tvorogova[1, *], E. Y. Krasnoperova[1], E. A. Potsenkovskaya[1], A. A. Kudriashov[1], I. E. Dodueva[1], and L. A. Lutova[1]

[1]*Saint Petersburg State University, St Petersburg, 199034 Russia*

**e-mail: krubaza@mail.ru*

WOX (WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX) is a family of homeodomain-containing transcription factors in plants. WOX proteins maintain the activity of different types of meristems and regulate formation of plant organs, controlling cell proliferation and differentiation. Study of the WOX family is important for the development of plant transformation and genome editing techniques. Here we review the functions of the WOX transcription factors as well as their targets, partners, and regulators. The WOX family can be divided into three phylogenetically distinct clades: so-called ancient, intermediate, and WUS clade; each clade is covered in a separate section. The *WOX* genes of *Arabidopsis thaliana* are described most comprehensively, with their orthologues in other plant species also considered. Summary tables with the described targets, regulators and partners of members of the *WOX* family are provided.

Keywords: trancription factors, WUS, WOX, plant development

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 3, с. 392–401

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 578.24:576.385.4;616-006

ПАТТЕРНЫ ЭКСПРЕССИИ p53 И Ki-67 ПРИ HBV-АССОЦИИРОВАННОЙ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЕ: КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ[1]

© 2021 г. Z. Heidari[a, b], B. Moudi[a, b, *], H. Mahmoudzadeh-Sagheb[a, b]

[a] *Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Resistant Tuberculosis Institute, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, 9816743111 Iran*

[b] *Department of Histology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, 9816743463 Iran*

**e-mail: bita.moudi@yahoo.com*

Поступила в редакцию 02.05.2020 г.
После доработки 27.07.2020 г.
Принята к публикации 05.08.2020 г.

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), развивающаяся на фоне хронической инфекции вируса гепатита B (HBV), – широко распространенное в мире злокачественное заболевание печени, имеющее неблагоприятный прогноз. Для успешного лечения ГЦК необходима точная диагностика. Целью исследования была оценка взаимосвязи между уровнями экспрессии определенных молекулярных маркеров и диагнозом ГЦК в образцах ткани больных из Ирана. Проанализированы уровни экспрессии генов и белков p53 и Ki-67 в тканях печени 121 пациента с ГЦК и/или HBV, а также 30 здоровых доноров. Для этого использованы методы количественной ПЦР в реальном времени и иммуногистохимии. Выявлены повышенные уровни экспрессии как p53, так и Ki-67 у пациентов с ГЦК на фоне хронической HBV-инфекции по сравнению с пациентами только с HBV, что указывает на наличие связи между уровнями экспрессии p53 и Ki-67 и диагнозом ГЦК. Показано, что как прогностический маркер для диагностики ГЦК уровень экспрессии p53 – более достоверный и чувствительный параметр, чем Ki-67 (чувствительность и специфичность составили для p53 77.3 и 76.4% и для Ki-67 51.0 и 97.9%). Диагностическая панель с двумя позитивными маркерами имела более высокую специфичность и сопоставимую чувствительность с панелями, оценивающими экспрессию только из этих маркеров (чувствительность и специфичность соответствовали 94.8 и 97.9% для двух положительных маркеров и 96.5 и 86.4% для одного положительного маркера). В целом, комбинированный анализ экспрессии p53 и Ki-67 позволяет повысить специфичность и чувствительность диагностики HBV-ассоциированной ГЦК до приемлемого уровня.

Ключевые слова: p53, Ki-67, гепатоцеллюлярная карцинома, иммуногистохимия, ПЦР в реальном времени

DOI: 10.31857/S0026898421030083

ВВЕДЕНИЕ

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) широко распространена в мире и является злокачественным новообразованием печени с неблагоприятным прогнозом [1]. Это онкологическое заболевание обычно диагностируют поздно – когда ответ пациента на лечение и шансы на выживание низкие.

Хронические заболевания печени считаются основными причинами развития ГЦК и одной из важнейших причин смерти от рака [1]. Хронические вирусные инфекции, такие как вирус гепатита B (HBV) и C (HCV), могут провоцировать развитие ГЦК через многоступенчатые механизмы канцерогенеза. ДНК HBV может интегрироваться в геном хозяина и вызывать хромосомные перестройки и мутации [2]. Также при ГЦК воспалительные клетки вызывают окислительный стресс и хроническое повреждение печени, что приводит к образованию опухолей и канцерогенезу в гепатоцитах [3–5]. HBV-инфекция имеет две формы: острую и хроническую [6]. Хроническая форма может привести к развитию тяжелых заболеваний, таких как цирроз печени и ГЦК [7].

[1] Статья представлена авторами на английском языке.
Сокращения: HBV (hepatitis B virus) – вирус гепатита B; HCV (hepatitis C virus) – вирус гепатита C; ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома.

По меньшей мере 200 млн. человек в мире страдает хронической HBV-инфекцией и почти две трети из них проживает в Азии. Двадцать пять процентов этих пациентов обычно умирает от HBV-ассоциированного онкологического заболевания [8, 9].

На процесс канцерогенеза сильно влияет пролиферация клеток [10]. Экспрессия гена *TP53*, кодирующего белок p53, как онкосупрессора гепатоканцерогенеза достаточно хорошо изучена [11]. Белок p53 контролирует репарацию ДНК, пролиферацию клеток и апоптоз [12], а его мутации могут приводить к образованию и прогрессии опухоли [13]. Действительно, p53 дикого типа (wt) – онкосупрессор, тогда как у мутированной формы доминируют онкогенные свойства. Белок wt-p53 характеризуется низким уровнем экспрессии и имеет короткий период полужизни, что затрудняет его детекцию иммуногистохимическими методами в нормальных условиях [14]. Ряд стрессовых факторов может повышать продукцию и стабильность wt-p53 или синтез мутантной формы p53 с более длительным периодом полужизни. В этих условиях облегчается детекция белка методом иммуноокрашивания [15]. Мутации в гене *TP53* обнаружены в тканях ГЦК человека [16]. Частота выявления этих мутаций коррелирует с определенными факторами, такими как географические, а также гистологическим классом и размером опухоли [16]. В тоже время повышенная продукция белка p53 у пациентов с ГЦК не всегда связана с наличием мутаций [17]. Однако рак, связанный с дефицитом p53, чрезвычайно агрессивен и летален и, к сожалению, не поддается химиотерапии [18].

Белок Ki-67 представляет собой ядерный антиген и молекулярный маркер пролиферации раковых клеток. Этот белок детектируют на всех фазах клеточного цикла [19]. Его экспрессию (ген *MKI67*) исследуют при изучении пролиферации злокачественных опухолевых клеток и используют как прогностический маркер при раке простаты, молочной железы, легкого [20] и колоректальной аденокарциноме [10, 11]. Однако уровень экспрессии Ki-67 не имеет прогностического значения при раке шейки матки [20] и раке поджелудочной железы [21]. Обнаружено, что экспрессия Ki-67 при ГЦК и раннем рецидиве заболевания коррелирует со скоростью роста опухоли [22, 23]. Следовательно, он может быть ценным маркером при изучении регенерации печени, процессов канцерогенеза и естественного течения ГЦК.

Целью исследования была оценка взаимосвязи между паттернами экспрессии молекулярных маркеров p53 и Ki-67 и наличием HBV-ассоциированной гепатоцеллюлярной карциномы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты. Свежие биоптаты печени были получены от 121 пациента из Ирана, в том числе 40 пациентов только с хронической HBV-инфекцией, 41 пациент с ГЦК на ранних стадиях в отсутствие HBV-инфекции (единичная опухоль <5 см без сосудистой инвазии), 40 пациентов с ГЦК на фоне HBV-инфекции и 30 здоровых волонтеров с нормальным уровнем АЛТ и отсутствием в анамнезе ГЦК, HBV- и HCV-инфекции. Образцы ткани печени были собраны в двух больницах Ирана (Namazi Hospital и Shaheed Labbafinezhad Hospital) в период с сентября 2015 г. по май 2016 г. Каждый образец делили на две части. Одну часть образца замораживали при –80°C для проведения молекулярно-генетического исследования, а другую хранили в растворе формалина для проведения иммуногистохимического анализа. Гистологический диагноз ГЦК был поставлен в соответствии с международными критериями [24]. У всех пациентов с HBV был выявлен HBsAg. Исследование проведено в Захеданском университете медицинских наук (Zahedan University of Medical Sciences; ZAUMS) после получения информированного согласия от всех участников. Комитет по этике ZAUMS одобрил исследование (№ 7262).

Количественная ОТ-ПЦР. Выделение РНК проводили по методике, описанной нами ранее [25]. Экстрагированную РНК замораживали при –80°C для дальнейшего молекулярного анализа. После количественной и качественной оценки препарат выделенной РНК использовали для синтеза кДНК с помощью набора для двухэтапной ОТ-ПЦР (“Vivantis Technologies”, Малайзия), как описано ранее [25]. В табл. 1 приведены последовательности праймеров, использованных для оценки уровней экспрессии генов-мишеней (*TP53* и *MKI67*) и контрольного гена (*GAPDH*). Метод 2^{-C_T} [26] использовали для определения относительного количества копий и подсчета экспрессии гена по сравнению с контролем. Каждую реакцию проводили в двух технических повторах, и для каждого образца рассчитывали значение $\Delta\Delta C_T$.

Иммуногистохимическое исследование. Депарафинизированные срезы гидратировали в серии градиентных растворов этанола. Раствор H_2O_2 использовали для дезактивации эндогенной пероксидазы. Для демаскировки антигена использовали автоклавирование и обработку Na-цитратным буфером (10 мМ) при 120°C в течение 20 мин. Иммуноокрашивание проводили моноклональными антителами к p53 и Ki-67 (NCL-L-p53-DO7 и NCL-L-Ki-67-MM1; “Leica Biosystems”, США), как описано ранее [25, 27]. Образцы рака толстой кишки и ткань аппендикса использовали в качестве положительного контроля экспрессии p53 и Ki-67 соответственно. Предметные стекла были

закодированы. Рассчитывали интенсивность окрашивания, процент положительных клеток и затем уровни экспрессии биомаркеров. Двумя экспертами-гистологами на основе интенсивности окрашивания и процента положительных клеток на слайдах были получены индексы биомаркеров (biomarker labeling indices). При этом на каждом срезе случайным образом выбирали 10 полей (в среднем 500 гепатоцитов). Картина окрашивания для p53 и Ki-67 свидетельствовала о ядерной локализации белков. В серию срезов всегда включали внешние положительные контроли. Положительные клетки подсчитывали в последовательных полях с большим увеличением (×400) и результаты выражали как среднее число положительных клеток на площадь поверхности. Плотность окрашивания оценивали следующим образом: отсутствие окрашивания или менее 5% окрашенных клеток, слабое окрашивание (менее 5–25%), умеренное (25–75%) и сильное (более 75%) [28]. Интенсивность окрашивания оценивали от 0 до 3 (0 – отсутствие, 1 – слабое, 2 – умеренное и 3 – сильное).

Статистический анализ. В исследовании использовали программный пакет SPSS 20. Расчеты выполняли с помощью непараметрических методов Манна–Уитни, точного теста Фишера, однофакторного дисперсионного анализа, апостериорных критериев Бонферрони и критерия χ^2 с учетом $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемая группа состояла из 30 здоровых индивидов (контрольная группа, C) и 121 пациента (только инфекция HBV – 40, только ГЦК – 41, ГЦК на фоне HBV – 40). Демографические и клинические данные 4 групп представлены в табл. 2. Значительные различия между четырьмя группами по возрасту и полу отсутствовали ($P > 0.05$).

С целью определить взаимосвязь между биомаркерами p53 и Ki-67 и ГЦК мы изучили их экспрессию в четырех группах пациентов. Между группами наблюдались значительные различия (рис. 1 и 2). У пациентов с HBV, ГЦК и ГЦК на фоне HBV (HBV+ГЦК) выявлены более высокие уровни относительной экспрессии гена *TP53* по сравнению с контрольной группой (4.50 ± 1.24, 6.10 ± 1.34, 11.00 ± 1.42, 1.00 ± 1.22 соответственно; $P < 0.001$). В частности, пациенты с ГЦК на фоне HBV имели повышенные уровни экспрессии *TP53* по сравнению с пациентами с хронической инфекцией HBV ($P < 0.001$). Более того, у пациентов с HBV, ГЦК и ГЦК на фоне HBV зарегистрированы повышенные относительные уровни экспрессии гена *MKI67* по сравнению с контрольной группой (1.26 ± 0.34, 1.42 ± 0.63, 1.87 ± 0.94, 1.00 ± ± 0.32 соответственно; $P < 0.001$). Кроме того, у пациентов с ГЦК на фоне HBV выявлены более высокие уровни экспрессии гена *MKI67* чем у пациентов, инфицированных HBV ($P < 0.001$).

Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии биомаркеров в четырех группах приведены в табл. 3. В этом исследовании положительными считали образцы, где была выявлена ядерная локализация p53 и Ki-67. У пациентов с HBV+ГЦК экспрессия p53 и Ki-67 была значительно выше, чем у пациентов, инфицированных HBV, или больных ГЦК другой этиологии.

На рисунках 3*а*–3*г* и 4*а*–4*г* показаны результаты иммуногистохимического исследования. У пациентов с HBV+ГЦК экспрессия биомаркеров (как p53, так и Ki-67) была значительно выше, чем у пациентов, инфицированных HBV, или больных ГЦК, образовавшейся в отсутствие вирусной инфекции.

Результаты по специфичности и чувствительности обнаружения ГЦК с использованием комбинации двух положительных биомаркеров приведены в табл. 4. Когда хотя бы один маркер был по-

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Ген	Последовательность[a], 5' → 3'	Размер ампликона, п.о.
MKI67	F: TGAACCTGCGGAAGAGCTGAA	102
	R: GAGCGCAGGGATATTCCCTTA	
	P: GACATGAAAACCAACAAAGAGGAAC	
TP53	F: TGTAACAGTTCCTGCATGGGC	121
	R: GACAGGCACAAACACGCACC	
	P: CGGAGGCCCATCCTCACCATC	
GAPDH (внутренний контроль)	F: CATGAGAAGTATGACAACAGCC	70
	R: GGGGTGCTAAGCAGTTGGTG	
	P: CATCAGCAATGCCTCCTGCACC	

[a] Обозначения: F – прямой праймер, R – обратный праймер, P – зонд.

Таблица 2. Демографические и клинические данные

Параметры	C, *N* (%)[a]	HBV, *N* (%)	ГЦК, *N* (%)	HBV+ГЦК, N (%)	*P*/*F*[b]
Возраст (лет)					
Средний возраст	33.00 ± 6.22	53.85 ± 9.58	55.44 ± 10.31	57.13 ± 9.82	0.161/1.740
Диапазон возрастов	37–61	31–71	30–72	37–72	
(медиана)	(51.50)	(58)	(56)	(59)	
Пол					
M	24 (80.0)	28 (70.0)	32 (78.0)	29 (72.5)	0.738/0.413
Ж	6 (20.0)	12 (30.0)	9 (22.0)	11 (27.5)	
Гепатоцеллюлярная карцинома					
Высоко- или умереннодифференцированная	–	–	37 (90.2)	35 (87.5)	
Низкодифференцированная			4 (9.8)	5 (12.5)	
Гистологическая степень злокачественности ГЦК:					
Ранняя	–	–	39 (95.1)	38 (95.0)	
G1			1 (2.4)	2(5.0)	
G2–G3			1 (2.4)	0	
Билирубин (мкМ)	15.43 ± 5.65	18.76 ± 6.75	28.45 ± 12.24	33.10 ± 11.77	
АЛТ (U/л)	26.23 ± 10.90	45.76 ± 32.03	88.25 ± 95.32	117.76 ± 102.54	
α-Фетопротеин (нг/мл)	2.12 ± 1.14	3.12 ± 2.79	421.21 ± 104.33	534.54 ± 420.76	
Уровень ДНК HBV в сыворотке (среднее, lg(IU/мл) (1SD)[c]	–	7.6 ± 0.8	–	7.8 ± 0.1	
HBsAg-позитивные	–	40 (100.0)	–	40 (100.0)	
HBeAg-позитивные	–	12 (30.0)	–	15 (37.5)	

[a]Здесь и далее: *N* (%) – число человек в группе (процент от общего числа в группе). [b]*P* – *p*-value; *F* – число степеней свободы. [c]1SD относится к Первому международному стандарту ВОЗ.

Таблица 3. Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов ткани печени пациентов антителами к биомаркерам

Группа	Число образцов	p53-положительные клетки (среднее ± SEM)	*P*[a]	Ki-67-положительные клетки (среднее ± SEM)	*P*[a]
C	30	1.43 ± 0.62	<0.001	9.26 ± 2.06	<0.001
HBV	40	3.75 ± 1.23		10.85 ± 1.90	
ГЦК	41	5.07 ± 1.48		12.21 ± 1.86	
HBV + ГЦК	40	8.20 ± 2.54[a]		16.02 ± 1.87[a]	

[a]$P < 0.001$ по сравнению с контрольной группой C и группами HBV и ГЦК. Коррекция Бонферрони. $P_{BC} < 0.001$.

ложительным, независимо от того, какой именно, чувствительность, специфичность, а также положительное и отрицательное прогностические значения составляли 96.5, 86.4, 90.0 и 94.5% соответственно. Когда оба маркера были положительными, эти показателя соответствовали 94.8, 97.9, 96.3 и 56.9%. Таким образом, специфичность и положительное прогностическое значение этой комбинации были заметно выше. Это значит, что комбинация из двух маркеров способ-

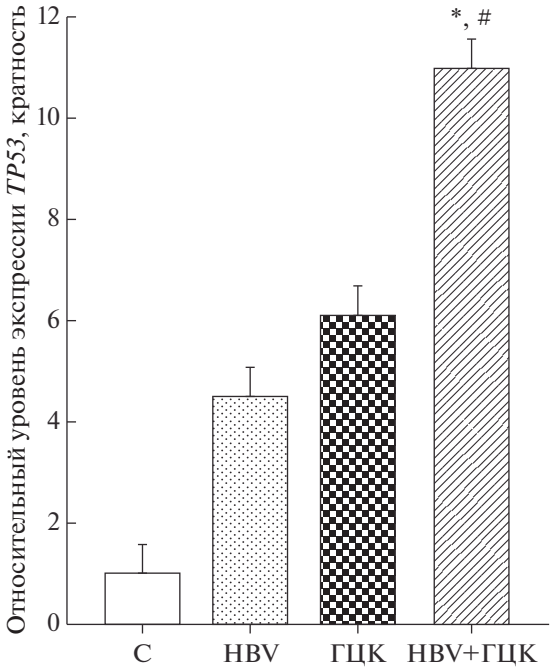


Рис. 1. Относительная экспрессия мРНК p53. Между группами наблюдались существенные различия. У пациентов с ГЦК на фоне HBV-инфекции (HBV+ГЦК) уровень экспрессии *TP53* повышен по сравнению с HBV-инфицированными пациентами и контрольной группой (C). Уровень экспрессии *TP53* в контрольной группе принят за единицу. $^{\#}P < 0.001$ по сравнению с контрольной группой; $^{*}P < 0.001$ по сравнению с группой HBV.

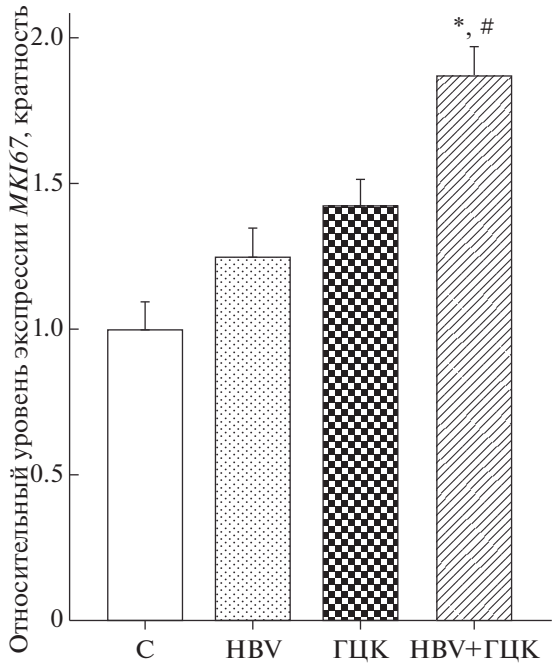


Рис. 2. Относительная экспрессия мРНК Ki-67. Между группами наблюдались значительные различия. У пациентов с HBV+ГЦК повышен уровень экспрессии *MKI67* по сравнению с HBV-инфицированными пациентами и контрольной группой (C). Уровень экспрессии *MKI67* в контрольной группе принят за единицу. $^{\#}P < 0.001$ по сравнению с контрольной группой; $^{*}P < 0.001$ по сравнению с группой HBV.

ствует более точной диагностике ГЦК на ранней стадии по сравнению с панелью для анализа только одного маркера.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хронические заболевания печени, в особенности хронический гепатит и цирроз, считаются основными причинами развития ГЦК. По этой причине прогрессирование этих заболеваний необходимо предотвращать до возникновения ГЦК, что до сих пор остается проблемой глобального масштаба. Учитывая, что существует взаимосвязь между инфекцией вирусами гепатита и ГЦК, исследования хронических заболеваний печени имеют первостепенное значение. Наиболее эффективный способ снизить заболеваемость раком – это ранняя диагностика. Гистологические изменения, вызван-

Таблица 4. Чувствительность, специфичность, а также положительные и отрицательные прогностические значения, полученные при использовании для диагностики ГЦК панелей с одним или двумя биомаркерами[a]

Панель	Чувствительность, %	Специфичность, %	PPV, %	NPV, %	LR^{+}	LR^{-}
Один маркер:						
p53	77.3	76.4	82.5	75.8	4.21	0.30
Ki-67	51.0	97.9	98.4	63.7	47.2	0.70
Два маркера:						
Как минимум один положительный маркер	96.5	86.4	90.0	94.5	6.8	0.04
Оба маркера положительные	94.8	97.9	96.3	56.9	31.20	0.71

[a]Обозначения: PPV – положительное прогностическое значение; NPV – отрицательное прогностическое значение; $LR^{+/-}$ – отношение правдоподобия для положительного/отрицательного результата.

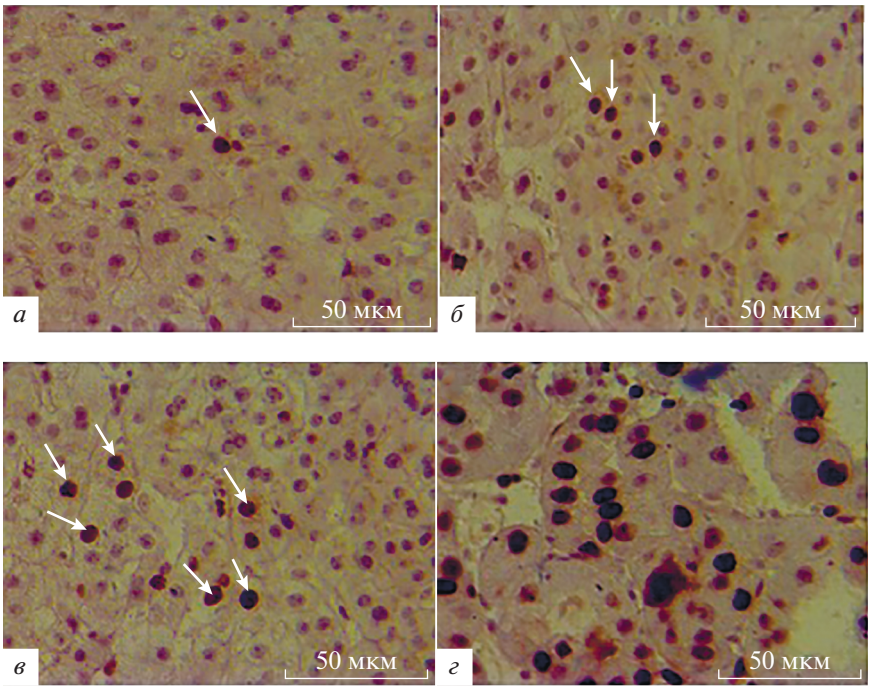


Рис. 3. Экспрессия p53 в тканях печени пациентов из групп C (*а*), HBV (*б*), ГЦК (*в*), HBV+ГЦК (*г*) (окрашивание иммунопероксидазой, увеличение ×400). Локализация p53 в ядрах гепатоцитов показана стрелками.

ные развитием ГЦК, различаются у разных пациентов, что создает значительные сложности при диагностике. Следовательно, необходимы точные методы выявления ГЦК на ранней стадии.

В проведенном нами исследовании показано, что у пациентов с HBV+ГЦК повышена экспрессия p53 и Ki-67 по сравнению с пациентами, инфицированными HBV. Следовательно, эти биомаркеры могут быть использованы для выявления HBV-ассоциированной ГЦК на ранних стадиях. Данные по экспрессии генов *TP53* и *MKI67*, по-видимому, могут указывать на риск развития рака у людей, инфицированных HBV, так как уровни экспрессии этих генов коррелируют со стадиями процесса канцерогенеза и значительно повышены у пациентов с HBV+ГЦК. Следует отметить, что Ki-67 как маркер оказался более специфичным и менее чувствительным, чем p53. В тоже время одновременное тестирование на оба биомаркера позволяет повысить специфичность и чувствительность диагностики ГЦК до приемлемых уровней. Важно отметить, что использование комбинации p53 и Ki-67 вместо одного из этих биомаркеров позволит повысит точность диагностики ГЦК и тем самым оптимизировать схему терапии.

В этом исследовании, проанализировав экспрессию двух онкомаркеров: p53 и Ki-67, – мы оценили риск развития ГЦК у пациентов, инфицированных HBV. Ранее показано, что более чем в половине известных случаев рака белок p53 детектируется в следовых количествах [29]. Генетические мутации, а также структурные или функциональные изменения белка p53 считаются основными причинами рака печени [30]. Заболеваемость ГЦК варьирует в разных географических регионах от 10 до 60%. В опухолях высокой степени злокачественности выявляют повышенный уровень p53 [31]. Иммуногистохимия – один из лучших способов определения уровня p53 при ГЦК, что, вероятно, связано с присутствием мутантного белка p53 [32].

Выявленные в данной работе уровни экспрессии p53 в группах HBV+ГЦК и ГЦК, в целом, согласуются с данными других авторов [33]. В образцах от пациентов из группы HBV+ГЦК зарегистрированы более высокие уровни экспрессии p53, чем в группах HBV и ГЦК. Обнаружена статистически значимая разница между пациентами с HBV-ассоциированной ГЦК на ранних стадиях и больными хронической HBV-инфекцией. На основании этих данных можно сделать вывод, что p53 может быть использован для идентификации HBV-инфицированных пациентов с предрасположенностью к развитию ГЦК. Эти результаты согласуются с данными Chen Ban и др. [34], полученными в Китае, Waleed и др. [28] и Zekri и др. [35], полученными в Египте, и Koskinas и др. [36], полученными в Греции. Однако наши результаты отличаются от данных исследования Boix-Ferroro и соав. [37], выполненного на населении Испании, где в HBV-ассоциированных гепатокарци-

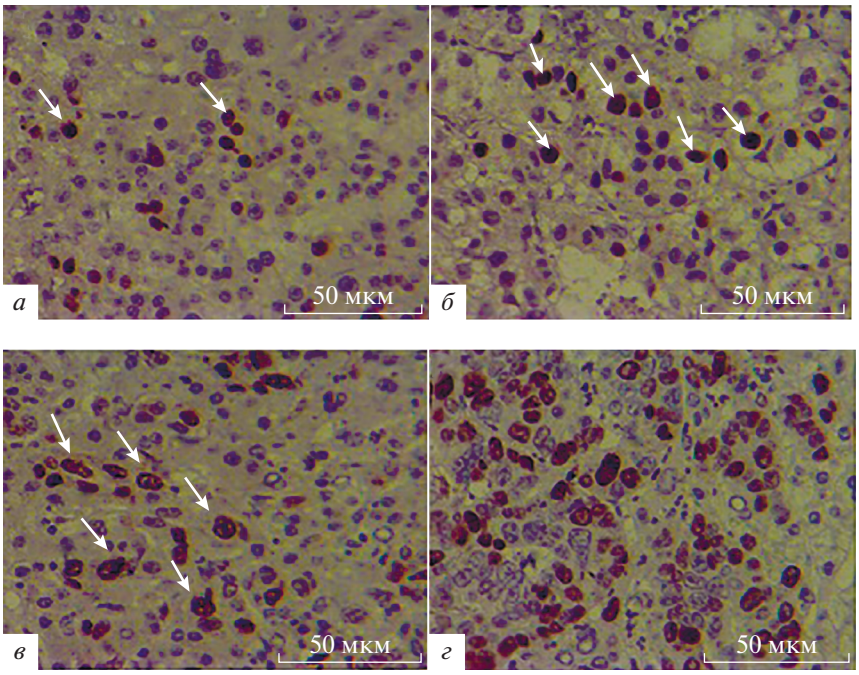


Рис. 4. Экспрессия Ki-67 в тканях печени пациентов из групп C (*а*), HBV (*б*), ГЦК (*в*), HBV+ГЦК (*г*) (окрашивание иммунопероксидазой, увеличение ×400). Локализация Ki-67 в ядрах гепатоцитов показана стрелками.

номах были выявлены пониженные уровни экспрессии p53. Расхождения в результатах могут быть обусловлены различными факторами, в том числе различной чувствительностью используемых в иммуногистохимическом анализе моноклональных антител; маскированием распознаваемых антителами эпитопов p53, различными пороговыми значениями при проведении количественной ПЦР, мутациями и однонуклеотидными полиморфизмами в *TP53*, а также использованием различных канцерогенов [31, 38]. Любой из этих факторов может быть причиной несовпадения результатов при оценке экспрессии p53 разными группами исследователей.

Нами показано, что у пациентов с HBV+ГЦК и только с ГЦК повышены уровни экспрессии гена и белка Ki-67 по сравнению с HBV-инфицированными пациентами без ГЦК, а также здоровыми волонтерами из контрольной группы. Ранее сообщалось, что экспрессия Ki-67 значительно повышена в метастазах в печени, и был сделан вывод, что этот белок может быть использован для изучения естественного течения онкологического заболевания на поздних стадиях [39]. Нами обнаружено, что экспрессия Ki-67 постепенно увеличивается с прогрессированием заболевания печени до ГЦК. Выявлена статистически значимая разница в экспрессии Ki-67 между образцами от больных гепатитом B и HBV-ассоциированной ГЦК. Более того, в образцах, взятых от пациентов из обеих групп с ГЦК (HBV+ГЦК и ГЦК), детектировали повышенный уровень Ki-67 по сравнению с образцами от больных из группы HBV. На основании этих результатов можно сделать вывод, что Ki-67 следует рассматривать как возможный биомаркер для выявления естественного течения ГЦК у пациентов с хронической HBV-инфекцией.

Нами показано, что экспрессия p53 и Ki-67 выше в образцах больных HBV+ГЦК по сравнению с больными ГЦК без HBV-инфекции в анамнезе. Ранее сообщалось, что использование комбинаций различных биомаркеров позволяет повысить точность диагностики [40]. Это подтверждено нами на примере двух биомаркеров: p53 и Ki-67. Нами показано, что экспрессия p53 и Ki-67 выше в образцах больных HBV+ГЦК по сравнению с больными ГЦК без HBV-инфекции в анамнезе. Их одновременное определение позволило повысить специфичность и чувствительность выявления ГЦК и довести точность диагностики ГЦК до приемлемого уровня. В том случае, когда экспрессия обоих маркеров по данным иммуногистохимического исследования была положительной (++), чувствительность и специфичность составляли 94.8 и 97.9% соответственно. Следует заметить, что на панели с одним положительным маркером (+) показатели чувствительности были лучше (96.5%), а специфичности – хуже. Это указывает на то, что наличие как минимум двух положительных маркеров может повысить надежность диагностики ГЦК. Кроме того, правильная комбинация маркеров (p53 и Ki-67) на панели с двумя (++) и одним (+ –) положительным марке-

ром, по-видимому, позволит улучшить как специфичность, так и чувствительность диагностики ГЦК по сравнению с тестированием на один маркер.

Учитывая, что образцы, использованные в этом исследовании, взяты у больных на ранних стадиях онкологического процесса, можно надеяться, что панель пригодна для диагностики трудноизлечимых и дифференцированных поражений у пациентов, инфицированных HBV.

Применимость результатов исследования может быть ограничена из-за размера выборки. Использование выборки бóльшего размера в когортном исследовании, проведенном несколькими научными центрами, позволит уточнить роль p53 и Ki-67 в канцерогенезе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов можно говорить о наличии корреляции между экспрессией p53 и Ki-67 и развитием HBV-ассоциированной ГЦК. Эти два биомаркера могут быть использованы для выявления ГЦК на ранних стадиях, в особенности у HBV-инфицированных индивидов. Одновременное применение этих биомаркеров позволит сделать правильный выбор схемы терапии для лечения злокачественных новообразований печени на разных стадиях. Из-за высокой распространенности гепатитов и ГЦК в различных популяциях необходимы дополнительные исследования для оценки эффективности предложенной модели на других этнических группах.

Авторы благодарят Elizabeth McConchie за редактирование статьи на английском языке. Авторы выражают благодарность всем участникам исследования (№7262, IR.ZAUMS.REC.1394.211).

Исследование поддержано диссертационным грантом (№ 7262) от заместителя декана по научной работе Zahedan University of Medical Sciences.

Работа одобрена Комитетом по этике Zahedan University of Medical Sciences (№7262, IR.ZAUMS.REC.1394.211), в рамках которого проводилась работа, и соответствует положениям Хельсинкской декларации. Информированное согласие получено от всех участников.

Все авторы участвовали в разработке концепции и дизайна исследования, подготовке материалов, сборе и анализе данных, а также в написании рукописи. Все авторы прочитали, отредактировали и одобрили окончательную рукопись.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferenci P., Fried M., Labrecque D., Bruix J., Sherman M., Omata M., Heathcote J., Piratsivuth T., Kew M., Otegbayo J.A., Zheng S.S., Sarin S., Hamid S., Modawi S.B., Fleig W., Fedail S., Thomson A., Khan A., Malfertheiner P., Lau G., Carillo F.J., Krabshuis J., Le Mair A. (2010) World Gastroenterology Organisation Guideline. Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective. *J. Gastrointestin. Liver Dis.* **19**(3), 311–317.
2. Matsubara K., Tokino T. (1990) Integration of hepatitis B virus DNA and its implications for hepatocarcinogenesis. *Mol. Biol. Med.* **7**(3), 243–260.
3. Maeda S., Kamata H., Luo J.L., Leffert H., Karin M. (2005) IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell.* **121**(7), 977–990.
4. Moudi B., Heidari Z., Mahmoudzadeh-Sagheb H. (2019) Meta-analysis and systematic review of prognostic significance of Glypican-3 in patients with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Virus Dis.* **30**(2), 193–200.
5. Moudi B., Heidari Z., Mahmoudzadeh-Sagheb H. (2018) Study of liver in HBV-related hepatocellular carcinoma: stereology shows quantitative differences in liver structure. *Eur. J. Histochem.* **62**(3), 238–246.
6. Heidari Z., Moudi B., Mahmoudzadeh-Sagheb H., Hashemi M. (2016) The correlation between interferon lambda 3 gene polymorphisms and susceptibility to hepatitis B virus infection. *Hepat. Mon.* **16**(3), e34266. https://doi.org/10.5812/hepatmon.34266
7. Moudi B., Heidari Z., Mahmoudzadeh-Sagheb H., Hashemi M. (2016) Gene polymorphisms of macrophage migration inhibitory factor affect susceptibility to chronic hepatitis B virus infection in an Iranian cohort. *Microbiol. Immunol.* **60**(6), 390–396.
8. Moudi B., Heidari Z., Mahmoudzadeh-Sagheb H. (2016) Impact of host gene polymorphisms on susceptibility to chronic hepatitis B virus infection. *Infect. Genet. Evol.* **44**, 94–105.
9. Alavian S.M., Haghbin H. (2016) Relative importance of hepatitis B and C viruses in hepatocellular carcinoma in EMRO Countries and the Middle East: a systematic review. *Hepat. Mon.* **16**(3), e35106. https://doi.org/10.5812/hepatmon.35106
10. Heidari Z., Mahmoudzadeh-Sagheb H., Charkhat Gorgich E.A. (2017) Immunohistochemical expression of $P16^{ink4a}$ in colorectal adenocarcinoma compared to adenomatous and normal tissue samples: a study on Southeast Iranian samples. *Iran Red Crescent Med. J.* **19**(6), e15174. https://doi.org/10.5812/ircmj.15174
11. Mahmoudzadeh Sagheb H., Heidari Z., Jahantigh M., Narouei M. (2016) Immunohistochemical expression of p53 and Ki-67 genes in gastric cancer and precancerous lesions in the patients with *Helicobacter pylori* infection. *Gene Cell Tissue.* **3**(4), e41341. https://doi.org/10.17795/gct-41341
12. Yang H.W., Chung M., Kudo T., Meyer T. (2017) Competing memories of mitogen and p53 signalling control cell-cycle entry. *Nature.* **549**(7672), 404–408.
13. Cox L.S., Lane D.P. (1995) Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *Bioessays.* **17**(6), 501–508.

14. Porter P.L., Gown A.M., Kramp S.G., Coltrera M.D. (1992) Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. An immunohistochemical study using methacarn-fixed, embedded tissue. *Am. J. Pathol.* **140**(1), 145–153.

15. Attallah A.M., Shiha G.E., Ismail H., Mansy S.E., El-Sherbiny R., El-Dosoky I. (2009) Expression of p53 protein in liver and sera of patients with liver fibrosis, liver cirrhosis or hepatocellular carcinoma associated with chronic HCV infection. *Clin. Biochem.* **42**(6), 455–461.

16. Tannapfel A., Wasner M., Krause K., Geissler F., Katalinic A., Hauss J., Mossner J., Engeland K., Wittekind C. (1999) Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**(13), 1154–1158.

17. Kang Y.K., Kim C.J., Kim W.H., Kim H.O., Kang G.H., Kim Y.I. (1998) p53 mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules in the liver. *Virchows Arch.* **432**(1), 27–32.

18. Li J.Q., Zhang C.Q., Zhang Y.Q., Yuan Y.F., Chen M.S., Li G.H. (1996) Immunohistochemical study of PCNA and p53 in primary liver cancer – an implication for prognosis and treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **15**, 77–80.

19. Guzman G., Alagiozian-Angelova V., Layden-Almer J.E., Layden T.J., Testa G., Benedetti E., Kajdacsy-Balla A., Cotler S.J. (2005) p53, Ki-67, and serum alpha fetoprotein as predictors of hepatocellular carcinoma recurrence in liver transplant patients. *Mod. Pathol.* **18**(11), 1498–1503.

20. Graflund M., Sorbe B., Karlsson M. (2002) MIB-1, p53, bcl-2, and WAF-1 expression in pelvic lymph nodes and primary tumors in early stage cervical carcinomas: correlation with clinical outcome. *Int. J. Oncol.* **20**(5), 1041–1047.

21. Stanton K.J., Sidner R.A., Miller G.A., Cummings O.W., Schmidt C.M., Howard T.J., Wiebke E.A. (2003) Analysis of Ki-67 antigen expression, DNA proliferative fraction, and survival in resected cancer of the pancreas. *Am. J. Surg.* **186**(5), 486–492.

22. Stroescu C., Dragnea A., Ivanov B., Pechianu C., Herlea V., Sgarbura O., Popescu A., Popescu I. (2008) Expression of p53, Bcl-2, VEGF, Ki67 and PCNA and prognostic significance in hepatocellular carcinoma. *J. Gastrointestin. Liver Dis.* **17**(4), 411–417.

23. Nakanishi K., Sakamoto M., Yamasaki S., Todo S., Hirohashi S. (2005) Akt phosphorylation is a risk factor for early disease recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* **103**(2), 307–312.

24. Gibson J.B., Sobin L.H. (1978) Histological typing of tumors of the liver, biliary tract and pancreas. *Series:* International histological classification of tumors number, no. 20. Geneva: World Health Organization, 12–30.

25. Moudi B., Heidari Z., Mahmoudzadeh-Sagheb H., Alavian S.M., Lankarani K.B., Farrokh P., Randel Nyengaard J. (2018) Concomitant use of heat-shock protein 70, glutamine synthetase and glypican-3 is useful in diagnosis of HBV-related hepatocellular carcinoma with higher specificity and sensitivity. *Eur. J. Histochem.* **62**(1), 42–50.

26. Yuan J.S., Reed A., Chen F., Stewart C.N. (2006) Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics.* **7**, 85. https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85

27. Heidari Z., Mahmoudzade Sagheb H., Asemi Rad A., Keikhaee M.A. (2015) Immunocytochemical study of p53 protein in exfoliated cells of oral mucosa in patients with type 2 diabetes. *Gene Cell Tissue.* **2**(1), e24881.

28. Mohamed W.S., Omar M.M., Khayri T.M., Fakhr I.M. (2008) Assessment of the proliferative marker Ki-67 and p53 protein expression in HBV- and HCV-related hepatocellular carcinoma cases in Egypt. *Int. J. Health Sci.* (*Qassim*). **2**(1), 27–34.

29. Marcel V., Catez F., Diaz J.J. (2015) p53, a translational regulator: contribution to its tumour-suppressor activity. *Oncogene.* **34**(44), 5513–5523.

30. Meng X., Franklin D.A., Dong J., Zhang Y. (2014) MDM2-p53 pathway in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **74**(24), 7161–7167.

31. Lee S.N., Park C.K., Sung C.O., Choi J.S., Oh Y.L., Cho J.W., Yoo B.C. (2002) Correlation of mutation and immunohistochemistry of p53 in hepatocellular carcinomas in Korean people. *J. Korean Med. Sci.* **17**(6), 801–805.

32. Mitsumoto Y., Nakajima T., Marutani M., Kashiwazaki H., Moriguchi M., Kimura H., Okanoue T., Kagawa K., Tada M. (2004) Loss of p53 transcriptional activity in hepatocellular carcinoma evaluated by yeast-based functional assay: comparison with p53 immunohistochemistry. *Hum. Pathol.* **35**(3), 350–356.

33. Wang Z., Gou W., Liu M., Sang W., Chu H., Zhang W. (2015) Expression of P53 and HSP70 in chronic hepatitis, liver cirrhosis, and early and advanced hepatocellular carcinoma tissues and their diagnostic value in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Med. Sci. Monit.* **21**, 3209–3215.

34. Chen Ban K., Singh H., Krishnan R., Fong Seow H. (2004) Comparison of the expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma in areas with high and low levels of exposure to aflatoxin B1. *J. Surg. Oncol.* **86**(3), 157–163.

35. Zekri A.R., Bahnassy A.A., Madbouly M.S., Asaad N.Y., El-Shehaby A.M., Alam El Din H.M. (2006) p53 mutation in HCV-genotype-4 associated hepatocellular carcinoma in Egyptian patients. *J. Egypt. Natl. Cancer Inst.* **18**(1), 17–29.

36. Koskinas J., Petraki K., Kavantzas N., Rapti I., Kountouras D., Hadziyannis S. (2005) Hepatic expression of the proliferative marker Ki-67 and p53 protein in HBV or HCV cirrhosis in relation to dysplastic liver cell changes and hepatocellular carcinoma. *J. Viral Hepat.* **12**(6), 635–641.

37. Boix-Ferrero J., Pellin A., Blesa R., Adrados M., Llombart-Bosch A. (1999) Absence of p53 gene mutations in hepatocarcinomas from a Mediterranean area of Spain. A study of 129 archival tumour samples. *Virchows Arch.* **434**(6), 497–501.

38. Otsuka M., Kato N., Lan K., Yoshida H., Kato J., Goto T., Shiratori Y., Omata M. (2000) Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation

of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J. Biol. Chem.* **275**(44), 34122–34130.

39. King K.L., Hwang J.J., Chau G.Y., Tsay S.H., Chi C.W., Lee T.G., Wu L.H., Wu C.W., Lui W.Y. (1998) Ki-67 expression as a prognostic marker in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **13**(3), 273–279.
40. Tremosini S., Forner A., Boix L., Vilana R., Bianchi L., Reig M., Rimola J., Rodriguez-Lope C., Ayuso C., Sole M., Bruix J. (2012) Prospective validation of an immunohistochemical panel (glypican 3, heat shock protein 70 and glutamine synthetase) in liver biopsies for diagnosis of very early hepatocellular carcinoma. *Gut.* **61**(10), 1481–1487.

EXPRESSION PATTERNS OF p53 AND Ki-67 IN HBV-RELATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA: A QUANTITATIVE REAL-TIME PCR AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

Z. Heidari[1, 2], B. Moudi[1, 2, *], and H. Mahmoudzadeh-Sagheb[1, 2]

[1]*Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Resistant Tuberculosis Institute, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, 9816743111 Iran*

[2]*Department of Histology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, 9816743463 Iran*

**e-mail: bita.moudi@yahoo.com*

The HBV-related hepatocellular carcinoma (HCC) is an important liver malignancy worldwide and carries a poor prognosis. In this regard, an accurate diagnosis is necessary to enable successful treatment. The aim of the current study was to assess the relationship between the expression of certain molecular markers and HCC diagnosis in Iran. Immunohistochemistry and quantitative RT-PCR techniques were used to evaluate the expression patterns of p53 and Ki-67 in liver tissues from 121 HCC and/or HBV-infected patients and 30 healthy volunteers. Patients with HBV+HCC demonstrated increased expression of both p53 and Ki-67 compared to patients with HBV only, highlighting correlation between the p53 and Ki-67 expression levels and HCC diagnosis. The prognostic value of p53 for the diagnosis of HCC was more reliable. The p53 demonstrated higher sensitivity compared to the Ki-67 (sensitivity and specificity, 77.3 and 76.4% for the p53, and 51.0 and 97.9% for the Ki-67, respectively). A panel containing two positive markers had higher specificity and comparable sensitivity to a panel with one positive marker regardless of which one (sensitivity and specificity, 94.8 and 97.9%, for two positive markers and 96.5% and 86.4% for one positive marker, respectively). Taken together the combined analysis of p53 and Ki-67 expression provides a mean to increase the specificity and sensitivity of HBV-related HCC diagnosis to an acceptable level.

Keywords: p53, Ki-67, hepatocellular carcinoma, immunohistochemistry, quantitative real-time PCR

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 3, с. 402–411

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21

ПЕПТИДНЫЙ ПРЕПАРАТ АКТГ(4-7)PGP (СЕМАКС) ПОДАВЛЯЕТ ТРАНСКРИПЦИЮ ГЕНОВ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ МЕДИАТОРОВ, ИНДУЦИРОВАННУЮ ОБРАТИМОЙ ИШЕМИЕЙ МОЗГА КРЫС

© 2021 г.
Л. В. Дергунова[a, *, **], В. Г. Дмитриева[a], И. Б. Филиппенков[a], В. В. Ставчанский[a], А. Е. Денисова[b], В. В. Южаков[c], Л. Е. Севанькаева[c], Л. В. Валиева[a], О. Ю. Сударкина[a], Л. В. Губский[b], Н. Ф. Мясоедов[a], С. А. Лимборская[a]

[a] *Научно-исследовательский центр "Курчатовский институт" – Институт молекулярной генетики, Москва, 123182 Россия*

[b] *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997 Россия*

[c] *Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, Калужская область, 249036 Россия*

**e-mail: lvd@img.ras.ru*

***e-mail: lvdergunova@mail.ru*

Поступила в редакцию 29.07.2020 г.
После доработки 16.08.2020 г.
Принята к публикации 23.08.2020 г.

Пептидный препарат семакс успешно применяется при ишемическом инсульте. Семакс обладает ярко выраженным ноотропным, нейропротективным и иммуномодулирующим действием. Проведенный нами ранее RNA-Seq-анализ повреждающего действия ишемии на уровне транскриптома в условиях моделирования обратимой окклюзии средней мозговой артерии обнаружил увеличение содержания мРНК ряда генов, участвующих в воспалении, тогда как семакс снижал их экспрессию. Однако RNA-Seq не выявил значимых эффектов ишемии–реперфузии и семакса на экспрессию мРНК многих генов, кодирующих хорошо известные медиаторы воспаления, в том числе IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α. По данным RNA-Seq значения FPKM, характеризующие число фрагментов на 1 т.п.н., отнесенное на миллион прочтений, свидетельствовали о низком содержании мРНК таких генов. В связи с этим нами проанализировано влияние пептида на экспрессию низко представленных мРНК нескольких генов провоспалительных медиаторов с помощью метода ОТ-ПЦР в реальном времени, который позволяет наиболее точно определить содержание транскриптов в исследуемых образцах. По данным ОТ-ПЦР в реальном времени в условиях эксперимента под воздействием семакса происходило статистически значимое снижение экспрессии мРНК генов интерлейкинов (*Il1a*, *Il1b*, *Il6*) и хемокинов (*Ccl3* и *Cxcl2*), компенсировавшее активацию транскрипции этих генов, вызванную ишемией–реперфузией. Таким образом, протективный эффект семакса при инсульте может быть обусловлен выраженным противовоспалительным действием пептида. Обсуждаются ограничения метода RNA-Seq и значимость ОТ-ПЦР в реальном времени для количественной оценки содержания низко представленных транскриптов.

Ключевые слова: церебральная ишемия, воспаление, провоспалительные цитокины, крысы Wistar, экспрессия генов, ОТ-ПЦР в реальном времени, RNA-Seq

DOI: 10.31857/S0026898421010043

ВВЕДЕНИЕ

Ишемический инсульт – одно из тяжелейших заболеваний с высокой инвалидизацией и смертностью. Острое снижение мозгового кровотока до критического уровня приводит к гибели нейронов и клеток глии, сопровождающейся масси-

Сокращения: АКТГ – адренокортикотропный гормон; ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; МРТ – магнитно-резонансная томография; СМА – средняя мозговая артерия; 3D-TOF MRA – трехмерная времяпролетная магнитно-резонансная ангиография; ADC – измеряемый коэффициент диффузии (apparent diffusion coefficient); Ct – пороговый цикл амплификации; DWI – диффузионно-взвешенное изображение (diffusion-weighted imaging); FPKM – число фрагментов на 1 т.п.н., отнесенное на миллион прочтений (fragments per kilobase per million reads); PGP – Pro-Gly-Pro; pMCAO – модель перманентной окклюзии средней мозговой артерии (permanent middle cerebral artery occlusion model); RNA-Seq – метод высокопроизводительного секвенирования РНК; T2 WI – T2-взвешенное изображение в поперечной плоскости; tMCAO – модель обратимой окклюзии средней мозговой артерии (transient middle cerebral artery occlusion model).

рованным воспалением. Накопившиеся экспериментальные данные убедительно свидетельствуют о ключевой роли медиаторов воспаления в патогенезе ишемического инсульта. С первых часов ишемии в мозге экспрессируются провоспалительные цитокины IL-1α, IL-1β, IL-6 и TNF-α, которые оказывают мощное инициирующее и усиливающее действие на воспалительный ответ [1–3]. Показано, что уровень провоспалительных цитокинов в крови может коррелировать с объемом и тяжестью инсульта [4]. Кроме того, имеются данные, что ингибирование экспрессии или нейтрализация с помощью антител к IL-1β эффективно снижает объем инфаркта на моделях инсульта у крыс [1], а одновременный нокаут генов *IL-1α* и *IL-1β* в модели обратимой окклюзии средней мозговой артерии (tMCAO) мыши снижает объем очага инсульта в 3 раза [5]. Многочисленные исследования свидетельствуют об увеличении экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов в мозге животных, подвергнутых церебральной ишемии [6–8]. В число провоспалительных цитокинов входят многие хемокины. Индукция хемокинов Ccl3 и Cxcl2 при инсульте ассоциирована с инфильтрацией лейкоцитов в очаг ишемии и увеличением проницаемости гематоэнцефалического барьера [9–11], поэтому подавление синтеза провоспалительных цитокинов относится к числу терапевтических стратегий, направленных на лечение ишемической травмы головного мозга.

В терапии ишемического инсульта успешно используется пептидный препарат семакс (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro), на N-конце которого находится фрагмент АКТГ(4–7), а С-конец стабилизирован присоединением трипептида Pro-Gly-Pro (PGP). Семакс обладает ярко выраженным ноотропным, нейропротективным и иммуномодулирующим действием [12–14]. Транскриптомные исследования с использованием неполной глобальной ишемии мозга крыс и перманентной окклюзии СМА крыс (pMCAO) показали, что пептид активирует экспрессию мРНК генов нейротрофинов и их рецепторов [15, 16], существенно влияет на экспрессию генов, ассоциированных с процессами иммунного ответа [17, 18].

Ранее для изучения эффектов ишемии и защитных свойств семакса на уровне транскриптома с помощью высокопроизводительного секвенирования РНК (RNA-Seq) мы использовали модель tMCAO [19, 20]. С помощью метода RNA-Seq в подкорковых структурах мозга крыс спустя сутки после начала 90-минутной окклюзии СМА обнаружено, что под действием пептида изменяется экспрессия мРНК 394 генов, участвующих в различных клеточных процессах, включая воспаление [20]. Введение семакса преимущественно подавляло экспрессию мРНК генов, связанных с воспалением (*Ccl6*, *Ccl9*, *Cxcl16*, *Icam1*, *Cd14* и других), активация которых наблюдалась при ишемии–реперфузии в отсутствие пептида. Функциональная аннотация семакс-индуцированных дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) в условиях tMCAO также показала, что пептид подавляет многие сигнальные пути, участвующие в воспалении [20]. Однако проведенный нами RNA-Seq-анализ не выявил статистически значимого влияния семакса на экспрессию мРНК многих генов, кодирующих хорошо известные медиаторы воспаления, в том числе генов *IL-1α*, *IL-1β*, *IL-6*, *TNF-α*. По данным RNA-Seq значения FPKM, характеризующие число фрагментов на 1 т.п.н., отнесенное на миллион прочтений, свидетельствовали о низком содержании мРНК таких генов. В связи с этим нам представлялось важным проанализировать влияние пептида на экспрессию низко представленных мРНК нескольких генов провоспалительных медиаторов. С этой целью мы использовали метод ОТ-ПЦР в реальном времени, который позволяет наиболее точно определить содержание транскриптов в образцах [21].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. Исследование проводили на двухмесячных самцах крыс линии Wistar массой 200–250 г, содержавшихся в условиях 12-часового цикла день/ночь, при температуре 22–24°C и свободном доступе к пище и воде. Исследование проведено с соблюдением биоэтических норм обращения с экспериментальными животными в соответствии с “Правилами лабораторной практики в РФ” (Приказ МЗ РФ №267 от 19.06.2003).

Модель tMCAO. Обратимую фокальную церебральную ишемию вызывали эндоваскулярной окклюзией правой СМА с использованием филамента с силиконовым наконечником (“Doccol Corporation”, США) как описано ранее [19, 20]. Окклюзия проходила в течение 90 мин, после чего филамент вынимали, и кровоток восстанавливался. Перед оперативным вмешательством животное вводили в наркоз с помощью 3%-го изофлурана, затем использовали 1.5–2%-ный изофлуран с 78%-ной смесью воздуха для поддержания наркоза при помощи системы для анестезии животных EZ-7000 (E-Z Anesthesia systems, США). Животные, подвергнутые полуторачасовой окклюзии, получали семакс (группа “ишемия–реперфузия + семакс”) в дозе 10 мкг на 100 г массы животного или физиологический раствор (группа “ишемия–реперфузия”). Пептид или физиологический раствор вводили животным интраперитонеально через 90 мин, 2.5 и 6.5 ч от начала окклюзии. Группу крыс, обозначенную как “ложная операция”, также подвергали хирургическому вмешательству под наркозом (разрез на шее, выделение бифуркации), но не производили окклюзию СМА. Животные группы “ложная операция” получали физиологи-

ческий раствор в те же временные точки. Каждая экспериментальная группа состояла не менее чем из 10 животных. Крыс выводили из эксперимента методом декапитации спустя 24 ч после операции. Из мозга крыс выделяли подкорковые структуры. Образцы мозга помещали в раствор RNAlater (“Sigma-Aldrich” , США) на 24 ч при 0°C, а затем хранили при –70°C.

Магнитно-резонансная томография. Магнитно-резонансную томографию (МРТ) ишемического повреждения головного мозга крыс проводили с использованием системы ClinScan (“Bruker BioSpin”, США) для небольших животных с индукцией магнитного поля 7 Тл, как описано ранее [20]. Стандартный протокол включал следующие режимы: диффузионно-взвешенные изображения (DWI) с построением карт измеряемого коэффициента диффузии (ADC) и T2-взвешенные изображения (T2 WI) в поперечной плоскости. Трехмерную времяпролетную магнитно-резонансную ангиографию (3D-TOF MRA) использовали для визуализации основных артерий и контроля реканализации. Количественная оценка объема очага инфаркта выполнена с использованием программного пакета ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, США). У крыс из групп “ишемия–реперфузия” и “ишемия–реперфузия + семакс” МРТ проводили непосредственно перед декапитацией.

Гистологическое исследование головного мозга крыс. Извлеченный из черепной коробки головной мозг крыс фиксировали в течение 48 ч в кислой жидкости Буэна, затем тщательно отмывали от пикриновой кислоты в четырех сменах 70%-ного этанола. Гистотопографическую вырезку мозга выполняли с фронтальной ориентацией двух тканевых блоков на уровнях –0.5...+5.0 мм и –4.0...–0.5 мм от брегмы для их последующего микротомирования в каудорострального направлении. После стандартной гистологической проводки на гистопроцессоре Leica TP1020 (Германия) ориентированные фрагменты мозга заключали в Гистомикс (“БиоВитрум”, Россия) на станции заливки HistoStar (“ThermoFisher Scientific”, США). Для гистологических исследований серийные срезы толщиной 5–6 мкм, полученные с блоков через 0.5–1 мм на микротоме Leica RM2235 (Германия), после депарафинирования окрашивали гематоксилином и эозином (“БиоВитрум”). Патоморфологический анализ выполнен с учетом критериев вариантов нормы и патологии нервных клеток, а также артифициальных, суправитальных и реактивных изменений клеток нервной ткани, вызванных манипуляциями при выделении головного мозга и его погружением в фиксирующие смеси [22–24]. Гистотопографическое картирование зон повреждения и точное определение уровней коронарных срезов проводили по стереотаксическому атласу головного мозга крыс [25].

Выделение РНК и синтез кДНК. Суммарную РНК из образцов тканей выделяли с помощью реагента TRIzol (“Invitrogen”, США), обрабатывали ДНКазой I (“ThermoFisher Scientific”). Целостность препаратов РНК проверяли путем электрофореза в агарозном геле в денатурирующих условиях. кДНК синтезировали с использованием набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (“ThermoFisher Scientific”) с праймером oligo$(dT)_{18}$ согласно инструкции производителя.

Количественный анализ экспрессии генов с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени. В качестве матрицы ПЦР использовали первую цепь кДНК. Содержание транскриптов генов *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Cxcl2* анализировали с использованием праймеров фирмы “Qiagen” (США) (https://geneglobe.qiagen.com/product-groups/quantitect-primer-assays).

Праймеры, специфичные для генов *Ccl3*, *Tnfa*, *Gapdh*, *Rpl3*, подобранные с использованием программного обеспечения OligoAnalyzer Tool (https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer), синтезированы акционерной компанией “Евроген” (Россия) и представлены в табл. 1. Реакционные сме-

Таблица 1. Характеристика ПЦР-праймеров

Ген	Праймер, 5' → 3'	RefSeq	ПЦР-продукт, п.н.
Ccl3	F: ACTGCCTGCTGCTTCTCCTA	NM_013025	206
	R: GTTCCTTGCTGCCTCTAATCTC		
Tnfa	F: CAGACCCTCACACTCAGAT	NM_012675	213
	R: TTGTCCCTTGAAGAGAACCT		
Gapdh	F: ACTCTACCCACGGCAAGTTCAACG	NM_017008.4	148
	R: GTAGACTCCACGACATACTCAGCAC		
Rpl3	F: ATGGGTCCTTGGGCTTCTTG	NM_198753.2	239
	R: CACAATACCCACAACCACCA		

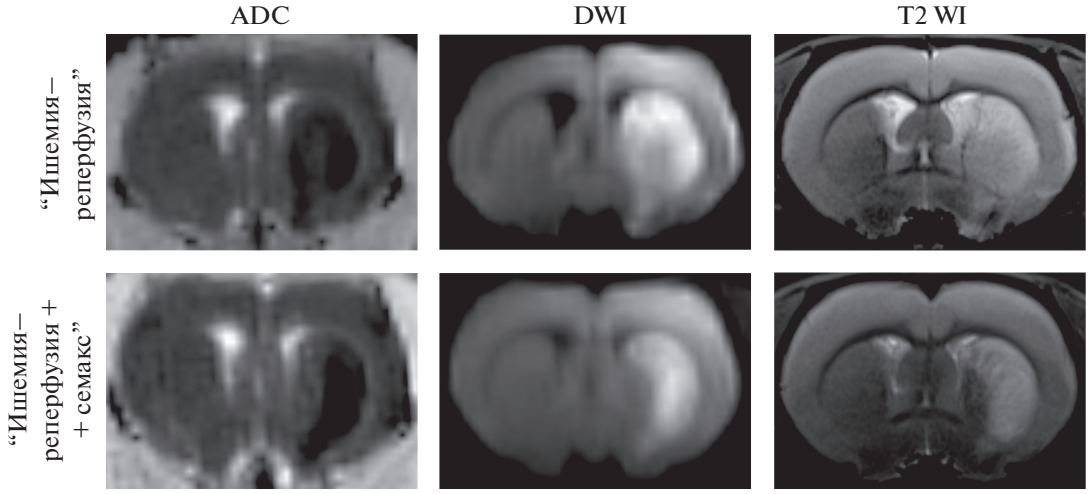


Рис. 1. Контроль окклюзии средней мозговой артерии с помощью МРТ в условиях tMCAO. DWI-сканы с картой ADC и T2 WI-сканы мозга крыс, получавших физиологический раствор или семакс, через 24 ч от начала tMCAO.

си объемом 25 мкл содержали 1 мкл кДНК, прямой и обратный праймеры (5 пмоль каждого) и 5 мкл 5× реакционной смеси (“Евроген”), содержащей Taq ДНК-полимеразу, нуклеотиды и SYBR Green I. Реакции проводили с использованием прибора StepOnePlus (“Applied Biosystems”, США) в следующих условиях: (1) денатурация при 95°C – 10 мин; (2) амплификация с одним измерением флуоресценции при 95°C – 15 с, 65°C – 25 с, 72°C – 35 с (40 циклов); (3) анализ температуры плавления продуктов амплификации. Каждый образец кДНК анализировали трижды.

В качестве внутреннего контроля для нормализации содержания мРНК использовали гены *Gapdh* и *Rpl3*. Расчеты проводили с использованием программы BestKeeper, version 1 и Relative Expression Software Tool (REST) 2005 software. Руководство доступно на сайте “REST.-gene-quantification.info” (http://www.genequantification.de/rest-2009.html). Содержание исследуемых РНК относительно мРНК генов сравнения оценивали по-формуле $2^{Ct(ref) - Ct(tar)}$, где Ct(tar) – средняя величина порогового цикла амплификации (Ct) исследуемых РНК, Ct(ref) – среднее значение Ct мРНК генов сравнения. В каждую группу сравнения включено не менее семи животных. При сравнении данных статистически значимыми считали различия с величиной вероятности $p < 0.05$. Дополнительную обработку данных осуществляли при помощи программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Магнитно-резонансная томография

Ишемический очаг в мозге животных, подвергнутых tMCAO, детектировали с помощью МРТ непосредственно перед декапитацией. Данные о варьировании объема очага ишемии у животных групп “ишемия–реперфузия” и “ишемия–реперфузия + семакс” представлены в табл. 2. У всех животных очаг ишемического повреждения локализовался в подкорковых структурах мозга со стороны окклюзии, при этом у 40% крыс он распространялся на область коры. На рис. 1 представлены результаты МРТ исследования очага ишемии с подкорковой локализацией через 24 ч после tMCAO при введении крысам физиологического раствора или семакса. Воздействие семакса на содержание транскриптов генов цитокинов и хемокинов в условиях tMCAO изучали на области подкорки.

Таблица 2. Объем очагов ишемического повреждения мозга через 24 ч после tMCAO

Группа	Вид очага	DWI, мм^3	T2 WI, мм^3
Ишемия–реперфузия	Подкорковый	19.10–72.40	20.15–81.31
	Полушарный	85.30–332.57	59.39–332.70
Ишемия–реперфузия + семакс	Подкорковый	31.03–59.26	23.66–53.64
	Полушарный	42.26–436.25	51.83–384.46

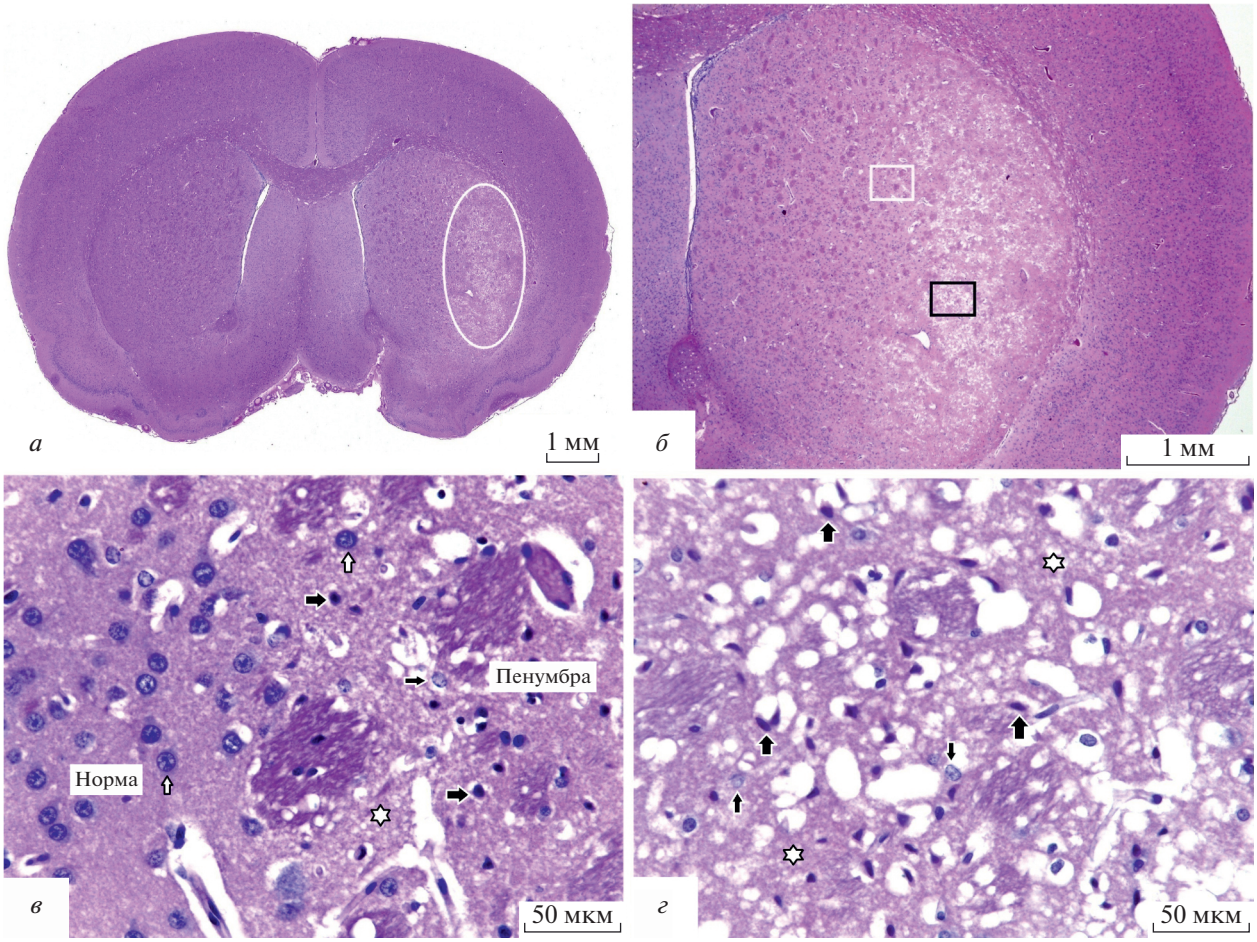


Рис. 2. Микрофотографии коронарных срезов головного мозга крысы, окрашенных гематоксилином и эозином, через 24 ч после обратимой окклюзии правой средней мозговой артерии. *а* – Коронарный срез головного мозга на уровне +0.5 мм от брегмы; овалом отмечена зона ишемического повреждения стриатума правого полушария. *б* – Фокальная ишемия латеральной области стриатума; фрагмент части *а* при большем увеличении. *в* – Фрагмент части *б*, отмеченный белым прямоугольником; зона перехода нормальной ткани в перифокальную область инфаркта; белые стрелки – интактные нейроны, тонкие черные стрелки – снижение базофилии хроматина в ядрах нейронов, толстые черные стрелки – пикноз ядер и перицеллюлярный отек ишемически поврежденных нейронов, белые звездочки – отек и вакуолизация нейропиля. *г* – Фрагмент части *б*, отмеченный черным прямоугольником; локус формирования ядра инфаркта; тонкие черные стрелки – снижение базофилии хроматина в ядрах нейронов, толстые черные стрелки – пикноморфные нейроны, белые звездочки – отек и деструкция нейропиля.

Морфология тканей мозга у крыс экспериментальных групп

У крыс группы “ишемия–реперфузия” через 24 ч после обратимой окклюзии правой СМА ишемические повреждения ткани мозга в виде отека и очагов “просветления” определяли в латеральных участках базальных ядер подкорковой области правого полушария в диапазоне от +1.7 до –3.3 мм от брегмы. Одно из составляющих базальных ядер полушарий головного мозга – полосатое тело (*corpus striatum*), образованное комплексом хвостатое тело–скорлупа (*nucleus caudatus–putaimen*) и бледным шаром (*globus pallidus*). У грызунов стриатум не дифференцирован на хвостатое ядро и скорлупу и представлен единым образованием, которое называют каудопутамен.

Типичная картина формирования фокальной ишемии в стриатуме показана на рис. 2. Зоны инфаркта имели вытянутую форму в дорсовентральном направлении и захватывали большую часть латеральной области каудопутамена (рис. 2*а*, *б*) с отчетливой визуализацией пенумбры – пограничной зоны между ядром инфаркта и нормальной тканью мозга (рис. 2*в*), и очагов формирования ядра инфаркта с необратимым повреждением нервной ткани, наличием участков некроза с деструкцией элементов нейропиля и погибшими пикноморфными нейронами (рис. 2*г*). При этом зоны ишемического инсульта охватывали значительную часть базальных ядер до мозолистого тела и наружной капсулы. Менее выраженные патоморфологические изменения наблюдались в

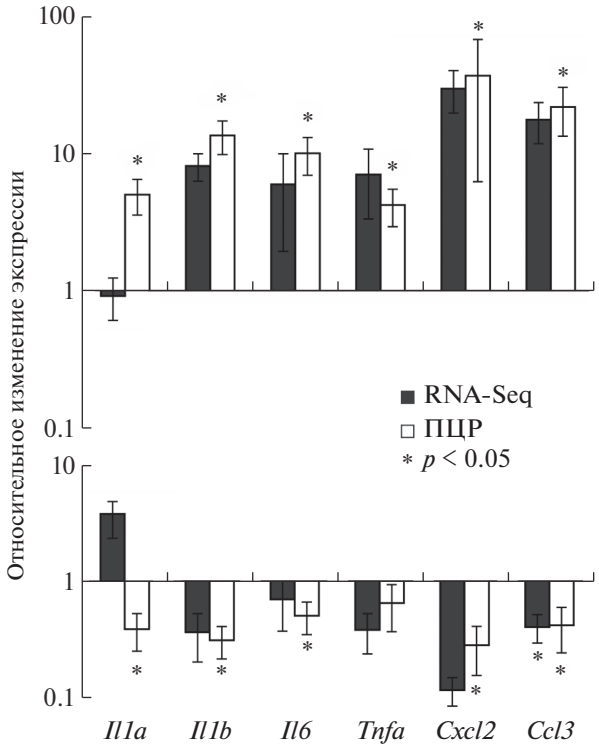


Рис. 3. Изменение экспрессии генов провоспалительных цитокинов через 24 ч от начала tMCAO в подкорке крыс, получавших физиологический раствор или семакс. *а* – Группа "ишемия–реперфузия" относительно группы "ложная операция". *б* – Группа "ишемия–реперфузия + семакс" относительно группы "ишемия–реперфузия". Для нормализации содержания мРНК в группах использовали два гена сравнения: *Gapdh* и *Rpl3*, уровень мРНК которых принят за 100%. Данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

пенумбре (рис. 2*в*). Необходимо отметить, что пенумбра, или "ишемическая полутень" – это перифокальная область гипоксически поврежденных, но сохраняющих жизнеспособность клеток, окружающая очаг первичного необратимого ишемического повреждения. Область полутени может оставаться жизнеспособной в течение нескольких часов после ишемического события и сохраняет возможность обратимых поражений мозга. Согласно патоморфологическим критериям, часть нейронов в перифокальной области инфаркта находилась в состоянии гипоксического повреждения (снижение базофилии хроматина в ядрах, отек и гомогенизация цитоплазмы) и гибели (пикноз и деструкция ядер, лизис цитоплазмы). В пенумбре располагались также нейроны без выраженных патологических изменений (рис. 2*в*). В медиальной области каудопутамена вне зон визуализируемой фокальной ишемии грубых патологических изменений в перикарионе большинства нейронов не выявлено.

Действие семакса на экспрессию мРНК генов цитокинов

Анализ изменений содержания мРНК генов *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Tnfa*, *Cxcl2*, *Ccl3* через 24 ч от начала окклюзии СМА в подкорковом отделе мозга крыс группы "ишемия–реперфузия" по сравнению с группой "ложная операция" и животных группы "ишемия–реперфузия + семакс" относительно группы "ишемия–реперфузия" представлен на рис. 3. Согласно проведенному ранее RNA-Seq анализу [19, 20] при воздействии ишемии–реперфузии наблюдается тенденция к увеличению содержания транскриптов генов *Il1b*, *Il6*, *Tnfa*, *Cxcl2*, *Ccl3* (рис. 3*а*), тогда как введение семакса привело к снижению уровня мРНК гена *Ccl3* и выявило статистически незначимое снижение уровня мРНК генов *Il1b*, *Il6*, *Tnfa*, *Cxcl2* (рис. 3*б*). В табл. 3 приведены значения FPKM, характеризующие уровень экспрессии мРНК исследуемых генов, а также представленных для сравнения генов, кодирующих хемокины *Cxcl16, Ccl9* и молекулы клеточной адгезии *Icam1*, экспрессия которых по данным проведенного секвенирования изменилась статистически значимо. Как видим из табл. 3, содержание мРНК большинства исследованных генов было низким в образцах мозга животных всех групп: значение FPKM транскриптов генов *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Tnfa*, *Cxcl2* было в десятки раз ниже значений FPKM выявленных ДЭГ (*Cxcl16*, *Ccl9* и *Icam1*) и на несколько порядков ниже FPKM генов домашнего хозяйства (*Rpl3* и *Gapdh*). Низкая представленность мРНК гена *Ccl3* в мозге ложнооперированных животных (FPKM – 0.551), по-видимому, также не позволила получить статистически значимых результатов изменения уровня его транскриптов под действием повреждения (табл. 3).

По данным ПЦР в реальном времени через 24 ч от начала окклюзии СМА содержание мРНК всех исследованных генов в группе животных "ишемия–реперфузия" по сравнению с группой "ложная операция" повышалось статистически значимо (рис. 3*а*). Содержание транскриптов генов провоспалительных цитокинов Il1b и Il6 было увеличено более чем в 10 раз, генов *Il1a* и *Tnfa* – более чем в 5 раз относительно контроля. Транскрипция генов хемокинов также существенно повысилась: *Cxcl2* – более чем в 30 раз, *Ccl3* – более чем в 20 раз. Согласно результатам ПЦР в реальном времени под воздействием семакса содержание мРНК генов *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Cxcl2*, *Ccl3* в подкорке снизилось более чем в 2 раза по сравнению с контролем, тогда как снижение уровня мРНК гена *Tnfa* не было статистически значимым (рис. 3).

Таким образом, по данным ПЦР в реальном времени в условиях использованной нами модели церебральной ишемии tMCAO через 24 ч после начала окклюзии в подкорке крыс значительно

повысилась экспрессия генов провоспалительных цитокинов, включая интерлейкины и хемокины. Введение семакса животным с ишемией снижало активацию транскрипции генов провоспалительных интерлейкинов IL-1α, IL-1β, IL-6 и хемокинов Cxcl2, Ccl3, но не оказало заметного эффекта на экспрессию цитокина Tnfa.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Влияние пептидного препарата семакс на экспрессию генов, кодирующих провоспалительные цитокины, мы анализировали на модели обратимой ишемии мозга экспериментальных животных с использованием филаментов. Эта модель наилучшим образом отражает события, происходящие при ишемическом инсульте у человека и его лечении тромболитическими препаратами [26, 27]. Согласно данным МРТ при постановке модели к концу первых суток после окклюзии СМА у всех животных детектировали очаг повреждения, который локализовался в подкорковой области и частично (у 40% крыс) распространялся на кору. Известно, что при постановке данной модели размер повреждения в мозге животных может значительно варьировать из-за их анатомических особенностей, размера филамента, точности позиционирования нити, прилежания филамента к стенкам сосуда, степенью его перекрытия [28]. В связи с этим для применения данной модели чрезвычайно важны ее воспроизводимость и локализация очага повреждения. В условиях нашей модели tMCAO с помощью МРТ (рис. 1) и гистопатологического исследования (рис. 2) ишемический очаг и область пенумбры были локализованы в подкорковых структурах головного мозга крыс, взятой для исследования экспрессии мРНК ряда генов провоспалительных цитокинов с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени.

Сравнительный анализ изменений содержания мРНК генов *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Tnfa*, *Cxcl2*, *Ccl3* в подкорковых структурах головного мозга крыс, подвергнутых ишемии–реперфузии, и у ложнооперированных животных, проведенный с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени, выявил существенное увеличение уровня транскриптов всех цитокинов, что подтверждает результаты других экспериментаторов [6–8]. В то же время под воздействием семакса детектировалось статистически значимое снижение экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов IL-1α, IL-1β, IL-6, Ccl3, Cxcl2, свидетельствующее о выраженном противовоспалительном действии пептида (рис. 3).

Ранее мы провели сравнительный RNA-Seq-анализ ДЭГ в подкорковой области мозга животных, подвергнутых ишемии–реперфузии, и у ложнооперированных животных. Группы сравнения содержали по три животных, были сгенерированы 10 млн ридов в каждом образце, и использована программа Cuffdiff для анализа ДЭГ. В результате обнаружено около 2000 ДЭГ, экспрессия которых изменилась более чем в 1.5 раза

Таблица 3. Средние значения FPKM, характеризующие уровень экспрессии мРНК генов, кодирующих провоспалительные факторы, и генов домашнего хозяйства *Rpl3* и *Gapdh* в подкорковых структурах мозга крыс

Ген	FPKM		
	группа “ишемия–реперфузия”	группа “ишемия–реперфузия + семакс”	группа “ложнооперированные”
	Гены медиаторов воспаления		
Il1a	0.069	0.268	0.076
Il1b	1.390	0.509	0.166
Il6	1.501	1.005	0.244
Tnfa	1.637	0.602	0.225
Cxcl2	1.803	0.201	0.059
Ccl3	10.017	3.813	0.551
	Гены сравнения (ДЭГ по данным RNA-Seq)		
Cxcl16	26.550	17.545	5.185
Ccl9	12.806	6.605	5.068
Icam1	9.687	6.158	2.845
	Гены домашнего хозяйства		
Gapdh	2305.257	2123.387	2385.423
Rpl3	482.763	448.423	363.870

Примечание. Значения FPKM приведены по данным проведенного ранее RNA-Seq-анализа [19, 20].
Использовали три группы сравнения (три животных в группе спустя 24 ч от начала tMCAO).

(Padj <0.05) [19]. Однако среди выявленных ДЭГ мы не обнаружили генов, кодирующих известные медиаторы воспаления – IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α, Ccl3, Cxcl2. Согласно данным RNA-Seq, наблюдается тенденция к увеличению уровня транскриптов большинства этих генов под действием ишемии–реперфузии. В аналогичном исследовании выявлено около 400 генов (ДЭГ), экспрессия которых отличалась в подкорке животных, подвергнутых tMCAO, и получавших семакс или физиологический раствор. При этом статистически значимо снизилось только содержание мРНК гена *Ccl3* [20]. По данным RNA-Seq значение FPKM для транскриптов большинства исследованных генов цитокинов было в десятки раз ниже значений выявленных ДЭГ (*Cxcl16*, *Ccl9* и *Icam1*), что свидетельствовало о низком их содержании (табл. 3).

В настоящее время метод RNA-Seq, позволяющий оценить транскрипционную активность всего генома единовременно, является основным подходом к поиску ДЭГ, построению сигнальных путей, которые участвуют в ответе на то или иное специфическое воздействие [29, 30]. Однако применение технологий секвенирования мРНК для количественной оценки транскриптов с низким содержанием затруднено из-за возможных технических требований (число животных в группах, глубина секвенирования, биоинформатический анализ данных и других). К числу важных показателей, используемых при RNA-Seq, относится порог экспрессии генов [31]. Значения FPKM, отсекающие низко представленные транскрипты, строго не обозначены и в разных исследованиях варьируют от 0.3 до 12 [31–33]. При этом наряду с экспериментальным шумом могут отсекаться активные, но достаточно низко представленные транскрипты. Видно, что в условиях использованного нами метода RNA-Seq в число транскриптов с показателем FPKM ниже 0.3 вошли активные транскрипты, содержание которых определено с помощью метода ОТ-ПЦР в реальном времени. Имеются данные, что для получения высоконадежных оценок экспрессии генов в случае низко представленных транскриптов необходимо проанализировать не менее 20–30 млн ридов в каждом образце [32]. Однако высокая стоимость RNA-Seq не всегда позволяет достичь такой глубины секвенирования. По-видимому, при меньшем, допустимом для анализа, количестве считываний (10 млн) для получения статистически значимых количественных оценок уровня экспрессии мРНК с низким FPKM незаменимым остается метод ПЦР в реальном времени. Можно полагать, что применение данного метода, позволяющего использовать большее число экспериментальных точек и большее количество мРНК, необходимо не только для верификации результатов RNA-Seq, но и для выявления возможных активных участников обнаруженных сигнальных путей, кодирующих низко представленные транскрипты.

Таким образом, используя метод ОТ-ПЦР в реальном времени, мы показали, что в условиях tMCAO спустя 24 ч после окклюзии СМА пептидный препарат семакс статистически значимо снизил экспрессию мРНК медиаторов воспаления IL-1α, IL-1β, IL-6, Ccl3 и Cxcl2, компенсировав активацию транскрипции этих генов под действием ишемии–реперфузии. Полученные результаты дополнили число выявленных ранее с помощью RNA-Seq ДЭГ, участвующих в воспалении, экспрессия которых снизилась под действием пептида в условиях tMCAO. Наряду с обнаруженными нами ранее нейропротективным и иммуномодулирующим эффектами, семакс проявил выраженное противовоспалительное действие, важное при лечении инсульта.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00268).

Все процедуры, проведенные с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждений или принятой практике таких исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lambertsen K.L., Biber K., Finsen B. (2012) Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**(9), 1677–1698.
2. Fouda A.Y., Kozak A., Alhusban A., Switzer J.A., Fagan S.C. (2013) Anti-inflammatory IL-10 is upregulated in both hemispheres after experimental ischemic stroke: hypertension blunts the response. *Exp. Transl. Stroke Med.* **5**(1), 12.
3. Jayaraj R.L., Azimullah S., Beiram R., Jalal F.Y., Rosenberg G.A. (2019) Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke. *J. Neuroinflammation* **16**(1), 142.
4. Ramiro L., Simats A., García-Berrocoso T., Montaner (2018) Inflammatory molecules might become both biomarkers and therapeutic targets for stroke management. *J. Ther. Adv. Neurol. Disord.* **11**, 1756286418789340.
5. Boutin H., LeFeuvre R.A., Horai R., Asano M., Iwakura Y., Rothwell N.J. (2001) Role of IL-1alpha and IL-1beta in ischemic brain damage. *J. Neurosci.* **21**(15), 5528–5534.
6. Zhai Q.H., Futrell N., Chen F.J. (1997) Gene expression of IL-10 in relationship to TNF-alpha, IL-1beta and IL-2 in the rat brain following middle cerebral artery occlusion. *J. Neurol. Sci.* **152**(2), 119–124.
7. Schroeter M., Küry P., Jander S. (2003) Inflammatory gene expression in focal cortical brain ischemia: differences between rats and mice. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **117**(1), 1–7.

8. Vikman P., Ansar S., Henriksson M., Stenman E., Edvinsson L. (2007) Cerebral ischemia induces transcription of inflammatory and extracellular-matrix-related genes in rat cerebral arteries. *Exp. Brain Res.* **183**(4), 499–510.

9. Reichel C.A., Rehberg M., Lerchenberger M., Berberich N., Bihari P., Khandoga A.G., Zahler S., Krombach F. (2009) Ccl2 and Ccl3 mediate neutrophil recruitment via induction of protein synthesis and generation of lipid mediators. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**(11), 1787–1793.

10. Lee S., Chu H.X., Kim H.A., Real N.C., Sharif S., Fleming S.B., Mercer A.A., Wise L.M., Drummond G.R., Sobey C.G. (2015) Effect of a broad-specificity chemokine-binding protein on brain leukocyte infiltration and infarct development. *Stroke*. **46**(2), 537–544.

11. Zaremba J., Ilkowski J., Losy J. (2006) Serial measurements of levels of the chemokines CCL2, CCL3 and CCL5 in serum of patients with acute ischaemic stroke. *Folia Neuropathol.* **44**(4), 282–289.

12. de Wied D. (1997) Neuropeptides in learning and memory processes, *Behav. Brain Res*. **83**, 83–90.

13. Гривенников И.А., Долотов О.В., Гольдина Ю.И. (1999) Факторы пептидной природы в процессах пролиферации, дифференцировки и поддержания жизнеспособности клеток нервной системы млекопитающих. *Молекуляр. биология*. **33**, 120–126.

14. Kolomin T., Shadrina M., Slominsky P., Limborska S., Myasoedov N. (2013) A new generation of drugs: synthetic peptides based on natural regulatory peptides, *Neurosci. Med*. **4**, 223–252.

15. Dmitrieva V.G., Povarova O.V., Skvortsova V.I., Limborska S.A., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. (2010) Semax and Pro-Gly-Pro activate the transcription of neurotrophins and their receptor genes after cerebral ischemia. *Cell. Mol. Neurobiol.* **30**(1), 71–79.

16. Stavchansky V.V., Yuzhakov V.V., Botsina A.Y., Skvortsova V.I., Bondurko L.N., Tsyganova M.G., Limborska S.A., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. (2011) The effect of Semax and its C-end peptide PGP on the morphology and proliferative activity of rat brain cells during experimental ischemia: a pilot study. *J. Mol. Neurosci*. **45**, 177–185.

17. Medvedeva E.V., Dmitrieva V.G., Povarova O.V., Limborska S.A., Skvortsova V.I., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. (2014) The peptide semax affects the expression of genes related to the immune and vascular systems in rat brain focal ischemia: genome-wide transcriptional analysis. *BMC Genomics.* **15**, 228.

18. Medvedeva E.V., Dmitrieva V.G., Limborska S.A., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. (2017) Semax, an analog of ACTH(4–7), regulates expression of immune response genes during ischemic brain injury in rats. *Mol. Genet. Genomics*. **292**(3), 635–653.

19. Dergunova L.V., Filippenkov I.B., Stavchansky V.V., Denisova A.E., Yuzhakov V.V., Mozerov S.A., Gubsky L.V., Limborska S.A. (2018) Genome-wide transcriptome analysis using RNA-Seq reveals a large number of differentially expressed genes in a transient MCAO rat model. *BMC Genomics.* **19**(1), 655.

20. Filippenkov I.B., Stavchansky V.V., Denisova A.E., Yuzhakov V.V., Sevan'kaeva L.E., Sudarkina O.Yu., Dmitrieva V.G., Gubsky L.V., Myasoedov N.F., Limborska S.A., Dergunova L.V. (2020) Novel insights into the protective properties of ACTH(4–7)PGP (Semax) peptide at the transcriptome level following cerebral ischaemia-reperfusion in rats. *Genes (Basel).* **11**(6), E681.

21. Costa C., Giménez-Capitán A., Karachaliou N., Rosell R. (2013) Comprehensive molecular screening: from the RT-PCR to the RNA-seq. *Transl. Lung Cancer Res.* **2**(2), 87–91.

22. Garcia J.H., Liu K.F., Ho K.L. (1995) Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke.* **26**(4), 636–642

23. Li Y., Powers C, Jiang N., Chopp M. (1998) Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat. *J. Neurol. Sci.* **156**(2), 119–132.

24. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. (1999) *Physiol. Rev.* **79**(4), 1431–1568.

25. Paxinos G., Watson C. (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Compact 3-rd ed. San Diego: Acad. Press.

26. Nieswandt B., Kleinschnitz C., Stoll G. (2011) Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease? *J. Physiol.* **589**(17), 4115–4123.

27. Ryang Y.M., Dang J., Kipp M., Petersen K.U., Fahlenkamp A.V., Gempt J., Wesp D., Rossaint R., Beyer C., Coburn M. (2011) Solulin reduces infarct volume and regulates gene-expression in transient middle cerebral artery occlusion in rats. *BMC Neurosci*. **12**, 113.

28. Canazza A., Minati L., Boffano C., Parati E., Binks S. (2014) Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies. *Front. Neurol*. **5**, 19.

29. Stark R., Grzelak M., Hadfield J. (2019) RNA sequencing: the teenage years. *Nat. Rev. Genet.* **20**(11), 631–656.

30. Hitzemann R., Bottomly D., Darakjian P., Walter N., Iancu O. Searles R. Wilmot B. McWeeney S. (2013) Genes, behavior and next-generation RNA sequencing. *Genes Brain Behav*. **12**, 1–12.

31. Hart T., Komori H.K., LaMere S., Podshivalova K., Salomon D.R. (2013) Finding the active genes in deep RNA-seq gene expression studies. *BMC Genomics*. **14**, 778.

32. Koch C.M., Chiu S.F., Akbarpour M., Bharat A., Ridge K.M., Bartom E.T., Winter D.R. (2018) A beginner's guide to analysis of RNA sequencing data. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **59**, 145–157.

33. Ramsköld D., Wang E.T., Burge C.B., Sandberg R. (2009) An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000598.

THE PEPTIDE DRUG ACTG(4-7)PGP (SEMAX) SUPPRESSES mRNA TRANSCRIPTS ENCODING PROINFLAMMATORY MEDIATORS INDUCED BY REVERSIBLE ISCHEMIA OF THE RAT BRAIN

L. V. Dergunova[1, *, **], V. G. Dmitrieva[1], I. B. Filippenkov[1], V. V. Stavchansky[1], A. E. Denisova[2], V. V. Yuzhakov[3], L. E. Sevan'kaeva[3], L. V. Valieva[1], O. Yu. Sudarkina[1], L. V. Gubsky[2], N. F. Myasoedov[1], and S. A. Limborska[1]

[1]*National Research Center "Kurchatov Institute" – Institute of Molecular Genetics, Moscow, 123182 Russia*

[2]*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow; Federal Center of Cerebrovascular Pathology and Stroke, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 117997 Russia*

[3]*Tsyb Medical Radiological Research Center – Branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga region, 249036 Russia*

**e-mail: lvd@img.ras.ru*

***e-mail: lvdergunova@mail.ru*

Due to its nootropic, neuroprotective and immunomodulatory effects, the peptide Semax is utilized in the treatment of ischemic stroke. Our earlier RNA-Seq analysis of the transcriptome in ischemic model of transient occlusion of the middle cerebral artery showed an increase in the mRNA levels of many proinflammatory genes, and the suppression their induction by Semax. However, for many relevant genes, including *IL-1*α, *IL-1*β, *IL-6* and *TNF*-α, the levels of their expression were too low for detailed quantitative evaluation. Here we utilize qRT-PCR to analyze the effects of the Semax peptide on the expression of weakly expressed mRNAs encoding several proinflammatory mediators and show that an exposure to Semax leads to a statistically significant decrease in the Il1a, Il1b, Il6, Ccl3 and Cxcl2 mRNAs, which compensated for the increase in the transcription of these genes induced by ischemia–reperfusion. We conclude that observed protective effect of Semax in the model of stroke may be due to its anti-inflammatory effects. We also discuss limitations of the RNA-Seq when applied to quantifying less abundant transcripts as compared to the real-time RT-PCR method.

Keywords: cerebral ischemia, inflammation, proinflammatory cytokines, chemokines, gene expression, real-time RT-PCR, RNA-Seq

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 3, с. 412–421

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.2

СПЕКТР ГЕРМИНАЛЬНЫХ И СОМАТИЧЕСКИХ МУТАЦИЙ В АРХИВНЫХ ОБРАЗЦАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С РАЗЛИЧНЫМ РЕЦЕПТОРНЫМ СТАТУСОМ

© 2021 г. И. С. Абрамов[a], Ю. С. Корнева[b], О. А. Шистерова[c], А. Ю. Иконникова[a], М. А. Емельянова[a], Т. С. Лисица[a], Г. С. Краснов[a], Т. В. Наседкина[a, *]

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

[b] *Смоленский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Смоленск, 214019 Россия*

[c] *Смоленский областной онкологический клинический диспансер, Смоленск, 214000 Россия*

**e-mail: nased@biochip.ru*

Поступила в редакцию 02.09.2020 г.
После доработки 25.09.2020 г.
Принята к публикации 29.09.2020 г.

Молекулярное профилирование опухолей – перспективное направление персонализированной медицины. Важную роль в выборе эффективной стратегии терапии играет герминальный или соматический статус мутаций. Мы определили спектр герминальных и соматических мутаций у 23 пациенток с раком молочной железы различных молекулярных подтипов, включая опухоли, экспрессирующие рецепторы эстрогена, прогестерона и/или рецептор эпидермального фактора роста HER2/neu, и опухоли с трижды негативным подтипом – отсутствием экспрессии всех этих рецепторов. Геномную ДНК выделяли из архивных образцов опухолевой и нормальной ткани. Проведено таргетное секвенирование кодирующих участков 25 генов, ассоциированных с раком молочной железы, со средним покрытием ×1000. Эффективность биоинформатического подхода при определении герминального или соматического статуса мутаций этих генов оценивали в сравнении с результатами прямого секвенирования ДНК из образцов нормальной ткани. В группе пациенток с трижды негативным подтипом рака молочной железы выявлены патогенные герминальные мутации *BRCA1* c.66_67delAG (185delAG) и *BRCA1* c.3226_3227AG (3347delAG). У пациенток с позитивным рецепторным статусом опухоли обнаружена герминальная мутация *BRCA2* c.658_659del (886delGT). Мутации *BRCA1* представлены с высокой частотой аллельного варианта (80%), что указывает на потерю гетерозиготности в клетках опухоли. Соматические мутации в гене *TP53* обнаружены у 7/10 (70%) пациенток с трижды негативным подтипом рака молочной железы и у 3/13 (23%) – в группе с положительным рецепторным статусом. В обеих группах выявлены соматические мутации генов *PTEN, MSH2, MSH6, MUTYH*.

Ключевые слова: рак молочной железы (РМЖ), трижды негативный подтип, архивные образцы опухоли, таргетное секвенирование, герминальные и соматические мутации

DOI: 10.31857/S0026898421030022

Рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место в структуре онкологических заболеваний у женщин [1]. Ежегодно в мире регистрируется более 2 млн новых случаев РМЖ, что представляет медицинскую и социальную проблему в связи с высокой смертностью (около 30%) среди женского населения [2]. Наиболее высокие показатели заболеваемости отмечены в США, несколько более низкие в странах Европы и России, еще реже РМЖ встречается в странах Азии и Африки [3, 4]. Для прогноза заболевания и выбора схемы терапии РМЖ важен целый ряд факторов, включая возраст, стадию заболевания, степень злокачественности, молекулярный фенотип опухолевых клеток [5, 6].

Заболевание с манифестацией в возрасте 40–50 лет и ранее ассоциировано с плохим прогнозом, высокой частотой рецидивов и высокой смертностью по сравнению с РМЖ, диагностированным после 50 лет. В то время как РМЖ с поздней манифестацией (после 50 лет) лучше поддается контролю и лечению, РМЖ у женщин моложе 50 лет остается серьезной проблемой с тенденцией к неуклонному росту заболеваемости и требует интенсивного изучения молекулярных характеристик опухоли [7–10].

Другой важный прогностический фактор – экспрессия рецепторов эстрогена (ER), прогестерона (PR) и рецептора эпидермального фактора

роста типа 2 (HER2/neu) на поверхности опухолевых клеток [7, 11]. Трижды негативный подтип РМЖ (ТНРМЖ), который характеризуется отсутствием экспрессии ER, PR и повышенной экспрессией/амплификацией HER2/neu, это крайне агрессивное и плохо поддающееся лечению заболевание [12, 13]. ТНРМЖ встречается в 10–20% вновь диагностируемых случаев РМЖ и чаще у молодых женщин. К ТНРМЖ относятся, как правило, низкодифференцированные опухоли с высокой пролиферативной активностью, склонностью к отдаленному метастазированию и плохим ответом на терапию [14].

Ответ на противоопухолевую терапию у пациенток с РМЖ сильно различается, поэтому все большее значение для диагностики и лечения РМЖ приобретают биологические маркеры, определяемые непосредственно в опухолевой ткани [11, 15]. Молекулярно-генетический анализ опухолевых клеток широко используется в настоящее время для прогноза и выбора схемы терапии у пациентов с онкологическими заболеваниями [16]. Наиболее полную информацию о молекулярном профиле опухоли безусловно предоставляют полноэкзомное секвенирование и анализ транскриптома, но это дорогостоящие и затратные по времени методы, поэтому на сегодняшний день наибольшее практическое применение находят целевые (таргетные) панели генов, ассоциированных с раком [17, 18]. Поскольку в опухолевой ткани присутствуют и наследуемые, и вновь приобретенные генетические варианты, крайне важно точно дифференцировать соматические и герминальные мутации. “Золотым стандартом” считается парное тестирование образцов ДНК опухоли и клеток зародышевой линии (кровь или нормальная ткань), однако интерес представляет возможность идентификации наследуемых генетических вариантов на основе секвенирования только опухолевой ДНК без анализа ДНК зародышевой линии [19–21]. С одной стороны, это позволяет минимизировать стоимость и длительность генетического тестирования, с другой – дает возможность анализировать архивный материал в тех случаях, когда в наличии имеется только опухолевая ткань.

В настоящей работе проанализированы кодирующие последовательности 25 наиболее изученных генов, ассоциированных с РМЖ. Исследованы архивные образцы опухолей молочной железы в группах с ТНРМЖ и с положительным рецепторным статусом (люминальный А, люминальный В, HER2-позитивный подтип РМЖ). На момент манифестации заболевания подавляющее большинство пациенток были моложе 50 лет. Для определения герминального или соматического статуса мутаций использовали биоинформатические подходы, а также прямое секвенирование ДНК из образцов нормальной ткани, если они были доступны. В результате выявлены редкие наследственные мутации в генах *BRCA1/2*, а также клинически значимые соматические мутации в генах *TP53*, *PTEN*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты. В исследование вошли 23 пациентки с диагнозом РМЖ в возрасте от 27 до 68 лет (средний возраст 44 года). Возраст 21 пациентки на момент постановки диагноза не превышал 50 лет, три пациентки с ТНРМЖ были старше 60 лет (63, 66 и 68 лет). Все пациентки постоянно проживали в Смоленске или Смоленской области. Хирургическое удаление первичной опухоли выполнено в период с 2013 по 2016 гг. в Смоленском областном онкологическом диспансере. У 10 пациенток выявлен ТНРМЖ. У 13 пациенток в клетках опухоли обнаружена экспрессия ER и/или PR, и/или HER2/neu – эти опухоли отнесены к люминальному А, люминальному В и HER2/neu-позитивному подтипам РМЖ.

Выделение ДНК. Геномную ДНК выделяли из архивных образцов опухолевой или нормальной ткани молочной железы с использованием набора QIAamp DNA FFPETissueKit (“Qiagen”, Германия). Концентрацию ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 2 (“Invitrogen”, США) и набора реагентов Qubit® ds DNA HS (“Invitrogen”). Степень фрагментации и чистоту ДНК оценивали с использованием микроспектрофотометра NanoDrop™ 3300 (“ThermoScientific”, США), а также с помощью электрофореза в агарозном геле.

Массовое параллельное секвенирование. Целевые последовательности ДНК отбирали с использованием панели жидких зондов NimbleGenIDP (“Roche”, Швейцария). Библиотека олигонуклеотидных зондов включала последовательности, комплементарные кодирующим участкам следующих генов: *APC*, *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *CDH3*, *CDK4*, *CHEK2*, *MET*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RET*, *STK11*, *TP53*, *VHL*. Подготовку образцов проводили по стандартному протоколу для приготовления быстрых библиотек KAPA LibraryPreparationKit (“Roche”) согласно инструкциям производителя. Образцы ДНК фрагментировали ультразвуком (технология Covaris). Качество библиотек оценивали с помощью системы капиллярного электрофореза (“Agilent”, США). Секвенирование проводили на платформе MiSeq (“Illumina”, США) со средним покрытием ×1000.

Анализ результатов секвенирования и использованные базы данных. Биоинформатический анализ проводили, как описано ранее [22]. В качестве референсного генома использовали версию GRCh38 (Ensembl). Полученные VCF-файлы анализировали с помощью GATK FilterMutectCalls. В дальнейшем анализировали только варианты,

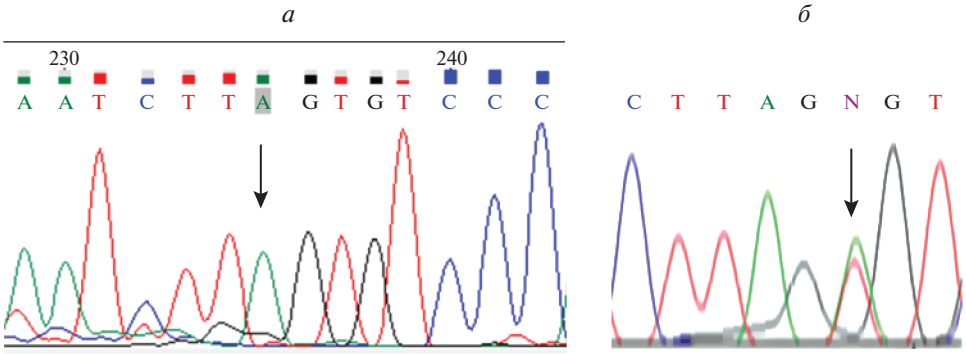


Рис. 1. Результаты секвенирования ДНК из образцов опухолевой (*а*) и нормальной (*б*) тканей пациентки с герминальной мутацией *BRCA1* c.66_67delAG (p.Glu23fs). Мутация присутствует в гомозиготном состоянии в опухоли и в гетерозиготном – в нормальной ткани (указаны стрелкой).

прошедшие фильтры. Полученный список вариантов аннотировали с помощью сервера Annovar (http://wannovar.wglab.org). Варианты с популяционной частотой более 1% по базам данных ExAC, 1000 Genomes и dbSNP из анализа исключали. Также исключали мотивы polyN, в частности GGGTG> GGGGG, CCCCG> CCCCC.

К значимым герминальным мутациям-кандидатам относили следующие варианты: 1) мутации в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *NF1*, *PTEN*, *STK11* и *TP53*; 2) частота вариантного аллеля более 30% при достаточной глубине покрытия; 3) варианты, зарегистрированные в базе данных ClinVar как патогенные или вероятно патогенные (а); или варианты с потерей функции (nonsense или frameshift мутации) (б); или варианты в генах *BRCA1/2*, не зарегистрированные в ClinVar или HGMD, но имеющие уровень выше 15 согласно предиктору патогенности CADD (Combined Annotation Dependent Depletion) (https://cadd.gs.washington.edu) (в). Соматические мутации-кандидаты удовлетворяли следующим требованиям: 1) любые несинонимичные замены, включая мутации в сайтах сплайсинга; 2) частота аллельного варианта 10–50% при достаточной глубине покрытия; 3) число прочтений альтернативного аллеля не менее 10; 4) аннотация в базе данных COSMIC с оценкой патогенности по FATHMM (Functional Analysis through Hidden Marcov Models) (http://fathmm.biocompute.org.uk).

Верификация мутаций методом секвенирования по Сэнгеру. Выявленные мутации определяли в образцах опухолевой и нормальной ткани с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру с использованием специфичных праймеров, подобранных для каждой мутации. Результаты анализировали с помощью программы ChromasLite.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В архивных образцах опухолевой ткани 23 пациенток с РМЖ методом таргетного секвенирования геномной ДНК исследованы кодирующие участки генов *APC*, *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *CDH3*, *CDK4*, *CHEK2*, *MET*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RET*, *STK11*, *TP53*, *VHL*. Клинико-генетические характеристики пациенток представлены в табл. 1 и 2.

Первичная оценка герминальных и соматических вариантов в образцах опухоли проведена с использованием алгоритмов, предложенных ранее [20], а также согласно рекомендациям NCCN (National Comprehensive Cancer Network) [23].

В группе пациенток с ТНРМЖ выявлены две герминальные мутации гена *BRCA1*. Мутация c.68_69del (185delAG) относится к известным в России мутациям с эффектом основателя (founder mutation) [24]. Напротив, мутация *BRCA1* c.3226_3227AG (3347delAG) описана как мутация с эффектом основателя в популяциях Италии [25] и Норвегии [26]. Герминальная мутация в гене *BRCA2* c.658_659del (886delGT) обнаружена у пациентки с гормоноположительным, HER2-положительным РМЖ. Ранее эта мутация была описана как наиболее частая мутация с эффектом основателя в популяции Литвы [27] и Польши [28]. Мутации в гене *BRCA1* представлены в опухолях РМЖ с частотой 77 и 80%, что указывает на утрату аллеля дикого типа. Секвенирование по Сэнгеру образцов опухолевой и нормальной ткани подтвердило этот факт (рис. 1).

Наибольшее количество мутаций в обеих группах выявлено в гене *TP53*. Большинство мутаций отнесено к соматическим, однако у двух пациенток с ТНРМЖ обнаружены мутации, которые предположительно относятся к герминальным вариантам. Мутации p.Y220C (rs121912666) и p.G245S (rs28934575) зарегистрированы в базе данных ClinVar как патогенные генетические варианты, ассо-

Таблица 1. Клинические характеристики и мутационный профиль пациенток с ТНРМЖ

Возраст, лет	Диагноз	Ген	Замена нуклеотида	Замена АА	Тип мутации		ID	Тип опухоли (по Cosmic database)	VAF, %
					биоинформатический анализ	анализ по Сэнгеру			
31	РМЖ	*TP53*	c.503A>C	p.H168P	S	S	COSM1480071	РМЖ	26
46	То же	*TP53*	c.536A>C	p.H179P	S	S	COSM44218	РМЖ	65
		MUTYH	c.725G>A	p.R242H	S	Н.о.	COSM681164	РЛ	12
44	»	*TP53*	c.659A>G	p.Y220C	G (rs121912666)	S	COSM99718	РМЖ	57
34	»	*BRCA1*	c.68_69delAG	p.E23fs	G	G	rs80357914	–	77
63	»	*BRCA1*	c.3226_3227AG	p.G1077fs	G	G	rs80357635	–	80
66	»	*TP53*	c.723del	p.C242Afs*5	S	S	COSM3718845	РМЖ	84
49	ДМРМЖ	*TP53*	c.733G>A	p.G245S	G (rs28934575)	S	COSM6932	РТК	44
		PTEN	c.286C>A	p.P96T	S	S	COSM921085	РЭ	19
49	РМЖ	*MSH6*	c.2633T>C	p.V878A	S	Н.о.	COSM4985848	РП	25
		TP53	c.396G>T	p.K132N	S	S	COSM213186	РЛ, РМЖ	53
		MSH2	c.965G>A	p.G322D	S	Н.о.	COSM26086	РП	47
44	РМЖ, ММ, Ф	*TP53*	c.818G>T	p.R273L	S	S	COSM318169	РЛ	16
68	РМЖ	–	–	–	–	–	–		–

Примечание. ДМРМЖ – двусторонний метахронный РМЖ, ММ – миома матки, Ф – дерматофиброма; S, somatic – соматическая, G, germline – герминальная мутация; VAF, variant allele frequency – частота аллельного варианта в образце опухоли, РМЖ – рак молочной железы, РЛ – рак легкого, РП – рак предстательной железы, РЭ – рак эндометрия.

Таблица 2. Клинические характеристики и спектр герминальных и соматических мутаций у пациенток с позитивным рецепторным статусом РМЖ*

Возраст, лет	Рецепторный статус	Ген	Замена нуклеотида	Замена AA	Тип мутации		ID	Тип опухоли (по Cosmic database)	VAF, %
					биоинформатический анализ	Анализ по Сэнгеру			
33	ER+/PR+/HER2–	*MSH2*	c.1204C> A	p.Q402K	S	Н.о.	COSM7340167	М, РЩЖ	19
40	ER+/PR+/HER2+	*BRCA2*	c.658_659del	p.Val220fs	G	G	rs80359604		54
		MSH2	c.965G> A	p.G322D	S	Н.о.	COSM26086	РПР	98
45	ER+/PR+/HER2+	–	–	–	–	–	–		–
44	ER+/PR+/HER2–	*TP53*	c.1136G> A	p.R379H	S	S	COSM44189	ПКР	18
27	ER+/PR+/HER2–	*CHEK2*	c.470T> C	p.I157T	G	G	rs17879961		42
		PTEN	c.640C> T	p.Q214*	G (rs121909227)	S	COSM5150	РЭ	47
44	ER+/PR+/HER2–	–	–	–	–	–	–		–
39	ER+/PR+/HER2–	*PTEN*	c.511C> T	p.Q171*	S	Н.о.	COSM5149	РМЖ	15
44	ER–/PR+/HER2–	*TP53*	c.637C> T	p.R213*	S	S	COSM99618	РТК, РМЖ	14
27	ER–/PR–/HER2+	–	–	–	–		–		–
42	ER+/PR+/HER2–	–	–	–	–		–		–
46	ER+/PR+/HER2+	*TP53*	c.751A> C	p.I251L	S	S	COSM10931	РЖ	25
		TP53	c.731G> A	p.G244D	S	S	COSM1646854	РТК	25
41	ER+/PR+/HER2–	–	–	–	–	–	–		–
45	ER–/PR–/HER2+	–	–	–	–	–	–		–

*Все пациентки имели диагноз РМЖ с односторонним поражением молочных желез.
Примечание. S, somatic – соматическая, G, germline – герминальная мутация; VAF, variant allele frequency – частота аллельного варианта в образце опухоли, М –меланома, РЩЖ – рак щитовидной железы, РП – рак предстательной железы, ПКР – рак почки, РЭ – рак эндометрия, РТК – рак толстой кишки, РЖ – рак желудка.

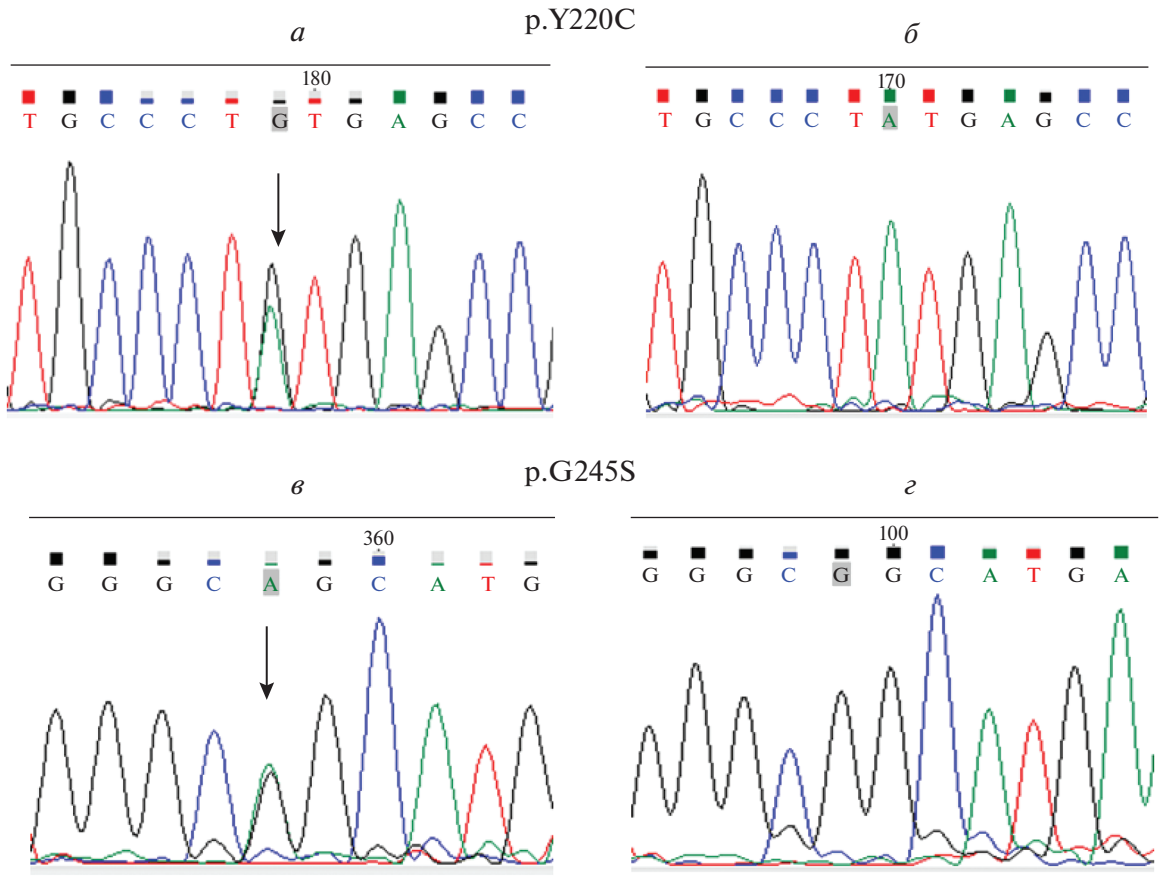


Рис. 2. Результаты секвенирования ДНК из образцов опухолевой и нормальной ткани пациенток с мутациями в гене *TP53*. Мутации p.Y220C и p.G245S выявлены только в опухоли (*а*, *в*) и отсутствуют в нормальной ткани (*б*, *г*).

циированные с синдромом Ли–Фраумени. Частота вариантного аллеля составила 57 и 44% соответственно. Так как был доступен архивный материал нормальной ткани молочной железы, мы провели сравнительный анализ ДНК, выделенной из парных образцов (опухоль–норма), методом секвенирования по Сэнгеру. В обоих случаях мутации обнаружены только в опухолевой ткани, но не в нормальных клетках, что позволило однозначно отнести их к соматическим (рис. 2).

Около 55% соматических мутаций, выявленных в нашем исследовании в гене *TP53*, описаны при РМЖ ранее, в то время как 45% мутаций *TP53*, а также мутации в генах *MSH2*, *MSH6*, *PTEN*, *MUTYH* обнаружены и при других типах опухолей. Частота вариантного аллеля варьировала от 12 до 98%. Различные соматические мутации в гене *TP53* представлены на рис. 3.

Сравнительный анализ спектра герминальных и соматических мутаций у пациенток с ТНРМЖ и пациенток с позитивным рецепторным статусом представлен в табл. 3. Мутации в генах *BRCA1/2* обнаружены у 20% пациенток с ТНРМЖ и у 8% – в объединенной подгруппе с позитивным рецепторным статусом ($p = 0.56$). Соматические мутации в гене *TP53* при ТНРМЖ выявлены у 70% пациенток по сравнению с 23% при других подтипах РМЖ, различия статистически значимы ($p = 0.04$).

Эти данные согласуются с результатами, полученными другими авторами. Герминальные мутации *BRCA1/2* выявляли в 10–20% случаев ТНРМЖ, и более 30% приходилось на пациенток старше 60 лет [29, 30]. Нами также выявлена мутация *BRCA1* у пациентки 63 лет. Важным следствием этого наблюдения стал вывод о необходимости тестирования мутаций *BRCA1/2* при ТНРМЖ независимо от возраста манифестации заболевания [30], тогда как согласно рекомендациям NCCN, проведение генетического анализа наиболее актуально для пациенток моложе 45–50 лет. В ряде случаев – при онкологическом отягощении семейного или персонального анамнеза, генетический анализ показан и для пациенток с ТНРМЖ моложе 60 лет [31]. Определение мутаций в генах *BRCA1/2* имеет большое значение для выбора схемы терапии, так как опухоли с дефектом системы репарации двухцепочечных разрывов ДНК чувствительны к действию ингибиторов поли-(ADP-

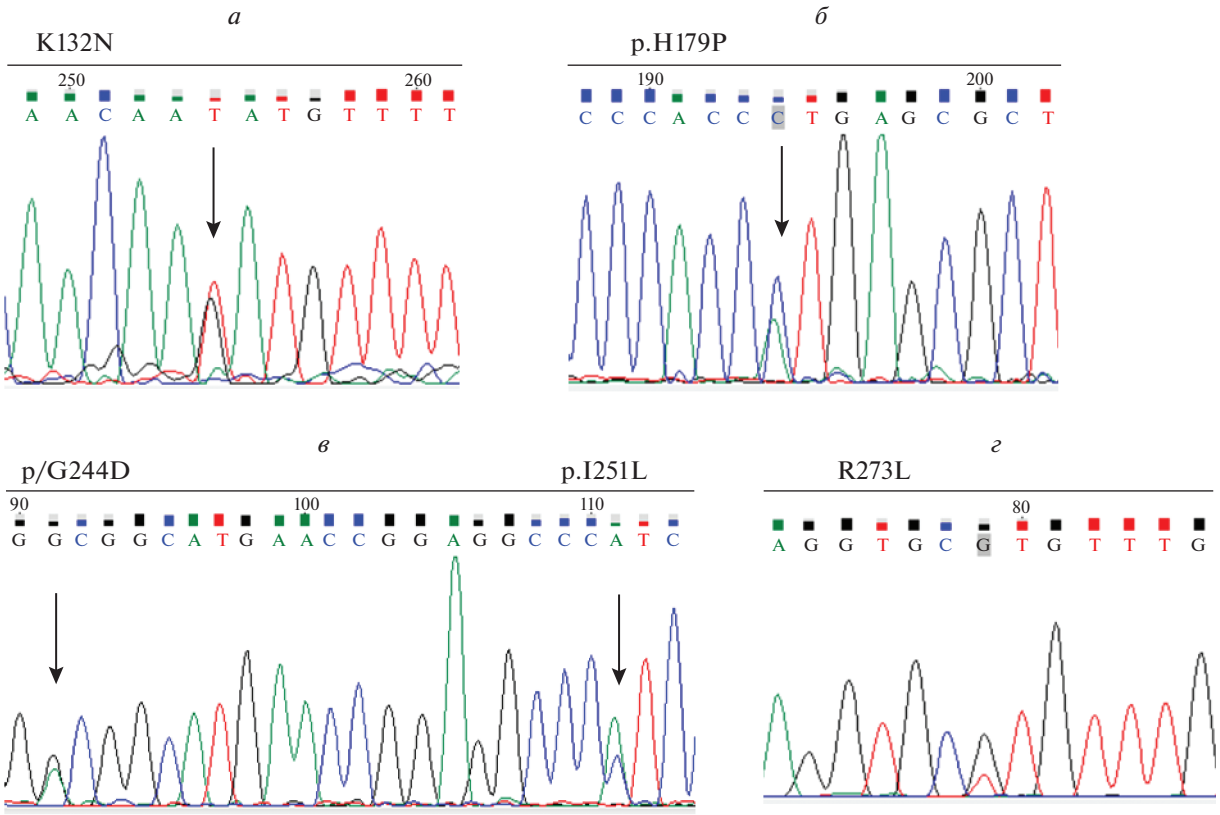


Рис. 3. Верификация соматических мутаций гена *TP53*, обнаруженных в архивных образцах опухолевой ткани пациенток с РМЖ (*а–г*). В одном образце одновременно выявлены две мутации гена *TP53* (*в*).

рибоза)-полимеразы (ингибиторы PARP) [32]. Повышенная частота мутаций *BRCA1/2* при ТНРМЖ делает их важной молекулярной мишенью при этом агрессивном виде рака [33]. Потеря гетерозиготности наблюдается примерно в 10% случаев РМЖ с герминальными мутациями гена *BRCA1* и ассоциирована с повышенной чувствительностью к ДНК-повреждающим агентам, в том числе к соединениям платины (цисплатин, карбоплатин) [34]. В нашем исследовании у обеих пациенток с мутациями *BRCA1* отмечена потеря гетерозиготности в опухоли.

Ген *TP53* относится к генам, наиболее часто мутирующим при РМЖ. Мутации *TP53* ассоциированы с плохим прогнозом [35]. Суммарная частота соматических мутаций в гене *TP53* при РМЖ составляет около 30%, однако частота и спектр мутаций, а также их клиническое значение различаются

Таблица 3. Сравнительный анализ спектра клинически значимых герминальных и соматических мутаций в группах с ТНРМЖ и с позитивным статусом хотя бы одного из рецепторов (Р + РМЖ)

Ген	ТНРМЖ (n = 10)		Р + РМЖ (n = 13)		p
	пациентки, n	%	пациентки, n	%	
Герминальные мутации					
BRCA1	2	20	–	–	0.56
BRCA2	–	–	1	8	
CHEK2	–	–	1	8	1.00
Соматические мутации					
TP53	7	70	3	23	**0.04**
PTEN	1	10	2	15	–
MSH2	1	10	2	15	–

между подтипами РМЖ [36]. Наиболее высокая частота соматических мутаций наблюдается при ТНРМЖ (до 70–80%). В нашей работе частота соматических мутаций при ТНРМЖ, представленных в большинстве случаев миссенс-мутациями и в одном – делецией нуклеотида со сдвигом рамки считывания, составила 70%. Показано, что мутации *TP53* повышают риск возникновения метастазов [37], однако это более характерно для подтипов РМЖ с позитивным рецепторным статусом [15]. Таким образом, вопрос о прогностической роли соматических мутаций *TP53,* особенно в случае ТНРМЖ, требует дальнейшего изучения. Следует отметить принципиальную важность определения терминального или соматического статуса мутаций *TP53*, так как герминальные мутации ассоциированы с наследственными онкопатологиями – синдромом Ли–Фраумени и Ли–Фраумени-подобным синдромом, что требует специфичных подходов к ведению пациентов [38].

Таким образом, молекулярно-генетический анализ архивных образцов опухолевой и нормальной ткани 23 пациенток с РМЖ позволил выявить как герминальные, так и соматические мутации, которые служат важными прогностическими маркерами, а кодируемые мутантными генами белки могут быть потенциальными молекулярными мишенями для терапии различных подтипов РМЖ, в первую очередь ТНРМЖ.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” (соглашение № 05.604.21.0234, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60419X0234).

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От пациентов получено письменное добровольное информированное согласие на использование результатов исследования в обезличенной форме в научных целях.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. (2019) Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена, 250 с.
2. Любченко Л.Н., Батенева Е.И. (2014) Медико-генетическое консультирование и ДНК-диагностика при наследственной предрасположенности к раку молочной железы и раку яичников. Москва: ИГ РОНЦ, 75 с.
3. Ahmad A. (2019) Breast cancer statistics: recent trends. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1152**, 1–7.
4. Li N., Deng Y., Zhou L., Tian T., Yang S., Wu Y., Zheng Y., Zhai Z., Hao Q., Song D., Zhang D., Kang H., Dai Z. (2019) Global burden of breast cancer and attributable risk factors in 195 countries and territories, from 1990 to 2017: results from the Global Burden of Disease Study 2017. *J. Hematol. Oncol.* **12**(1), 140.
5. Hunter C.P. (2000) Epidemiology, stage at diagnosis, and tumor biology of breast carcinoma in multiracial and multiethnic populations. *Cancer.* **88**(S5), 1193–1202.
6. Stevanovic L., Choschzick M., Moskovszky L., Varga Z. (2019) Variability of predictive markers (hormone receptors, Her2, Ki67) and intrinsic subtypes of breast cancer in four consecutive years 2015–2018. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **145**(12), 2983–2994.
7. González-Reymúndez A., de los Campos G., Gutiérrez L., Lunt S. Y., Vazquez A. I. (2017) Prediction of years of life after diagnosis of breast cancer using omics and omic-by-treatment interactions. *Eur. J. Hum. Genet.* **25**(5), 538–544.
8. Yankaskas B.C. (2006) Epidemiology of breast cancer in young women. *Breast Disease.* **23**(1), 3–8.
9. Anders C.K., Johnson R., Litton J., Phillips M., Bleyer A. (2009) Breast cancer before age 40 years. *Seminars Oncol.* **36**(3), 237–249.
10. Narod S.A. (2012) Breast cancer in young women. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **9**(8), 460.
11. Perou C.M., Sørlie T., Eisen M.B., Van De Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S.X., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L., Brown P.O., Botstein D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* **406**(6797), 747–752.
12. Foulkes W.D., Smith I.E., Reis-Filho J.S. (2010) Triple-negative breast cancer. *N. Eng. J. Med.* **363**(20), 1938–1948.
13. Ahn S.G., Kim S.J., Kim C., Jeong J. (2016) Molecular classification of triple-negative breast cancer. *J. Breast Cancer.* **19**(3), 223–230.
14. Dent R., Trudeau M., Pritchard K.I., Hanna W.M., Kahn H.K., Sawka C.A., Lickley L.A., Rawlinson E., Sun P., Narod S.A. (2007) Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* **13**(15), 4429–4434.
15. Cancer Genome Atlas Network. (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* **490**(7418), 61.
16. Damodaran S., Sember Q.C., Arun B.K. (2020) Clinical implications of breast cancer tumor genomic testing. *Breast J.* **26**(8), 1565–1571.
17. Easton D.F., Pharoah P., Antoniou A.C., Tischkowitz M., Tavtigian S.V., Nathanson K.L., Devilee P., Meindl A., Couch F.J., Southey M., Goldgar D.E., Evans D., Chenevix-Trench G., Rahman N., Robson M., Domchek S.M., Foulkes W.D. (2015) Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *N. Eng. J. Med.* **372**(23), 2243–2257.
18. Xuan J., Yu Y., Qing T., Guo L., Shi L. (2013) Next-generation sequencing in the clinic: promises and challenges. *Cancer Lett.* **340**(2), 284–295.

19. Raymond V.M., Gray S.W., Roychowdhury S., Joffe S., Chinnaiyan A.M., Parsons D.W., Plon S.E. (2016) Germline findings in tumor-only sequencing: points to consider for clinicians and laboratories. *J. Natl. Cancer Inst.* **108**(4), djv351. https://doi.org/10.1093/jnci/djv351

20. Kamio T., Kamio H., Aoki T., Ondo Y., Uchiyama T., Yamamoto-Shimojima K., Watanabe M., Okamoto T., Kanno H., Yamamoto T. (2020) Molecular profiles of breast cancer in a single institution. *Anticancer Res.* **40**(8), 4567–4570.

21. Meric-Bernstam F., Brusco L., Daniels M., Wathoo C., Bailey A.M., Strong L., Shaw K., Lu K., Qi Y., Zhao H., Lara-Guerra H., Litton J., Arun B., Eterovic A.K., Aytac U., Routbort M., Subbiah V., Janku F., Davies M.A., Kopetz S., Mendelsohn J., Mills G.B., Chen K. (2016) Incidental germline variants in 1000 advanced cancers on a prospective somatic genomic profiling protocol. *Ann. Oncol.* **27**(5), 795–800.

22. Абрамов И.С., Емельянова М.А., Рябая О.О., Краснов Г.С., Заседателев А.С., Наседкина Т.В. (2019) Соматические мутации, вносящие вклад в метастазирование акральной меланомы. *Молекуляр. биология.* **53**(4), 648–653.

23. Daly M.B., Pilarski R., Berry M., Buys S.S., Farmer M., Friedman S., Garber J.E., Kauff N.D., Khan S., Klein C., Kohlmann W., Kurian A., Litton J.K., Madlensky L., Merajver S.D., Offit K., Pal T., Reiser G., Shannon K.M., Swisher E., Vinayak S., Voian N.C., Weitzel J.N., Wick M.J., Wiesner G.L., Dwyer M., Darlow S. (2017) NCCN guidelines insights: genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian, version 2.2017. *J. Natl. Comprehensive Cancer Network.* **15**(1), 9–20.

24. Наседкина Т.В., Громыко О.Е., Емельянова М.А., Игнатова Е.О., Казубская Т.П., Портной С.М., Заседателев А.С., Любченко Л.Н. (2014) Определение герминальных мутаций в генах *BRCA1, BRCA2* и *CHEK2* с использованием биочипов у больных раком молочной железы. *Молекуляр. биология.* **48** (2), 243–250.

25. Papi L., Putignano A.L., Congregati C., Zanna I., Sera F., Morrone D., Falchetti M, Turco M.R., Ottini L., Palli D., Genuardi M. (2009) Founder mutations account for the majority of BRCA1-attributable hereditary breast/ovarian cancer cases in a population from Tuscany, Central Italy. *Breast Cancer Kes. Treat.* **117**(3), 497–504.

26. Heimdal K., Maehle L., Apold J., Pedersen J.C., Møller P. (2003) The Norwegian founder mutations in *BRCA1*: high penetrance confirmed in an incident cancer series and differences observed in the risk of ovarian cancer. *Eur. J. Cancer.* **39**(15), 2205–2213.

27. Janavičius R., Rudaitis V., Mickys U., Elsakov P., Griškevičius L. (2014) Comprehensive *BRCA1* and *BRCA2* mutational profile in Lithuania. *Cancer Genet.* **207**(5), 195–205.

28. Jakubowska A., Scott R., Menkiszak J., Gronwald J., Byrski T., Huzarski T., Górski B., Cybulski C., Debniak T., Kowalska E., Starzyńska T., Ławniczak M., Narod S., Lubinski J. (2003) A high frequency of *BRCA2* gene mutations in Polish families with ovarian and stomach cancer. *Eur. J. Hum. Genet*, **11**(12), 955–958.

29. Gonzalez-Angulo A.M., Timms K.M., Liu S., Chen H., Litton J.K., Potter J., Lanchbury J.S., Stemke-Hale K., Hennessy B.T., Arun B.K., Hortobagyi G.N., Do K.-A., Mills G.B., Meric-Bernstam F. (2011) Incidence and outcome of *BRCA* mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **17**(5), 1082–1089.

30. Wong-Brown M.W., Meldrum C.J., Carpenter J.E., Clarke C.L., Narod S.A., Jakubowska A., Rudnicka H., Lubinski J., Scott R.J. (2015) Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* germline mutations in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **150**(1), 71–80.

31. National Comprehensive Cancer Network. (2010) NCCN Clinical Practice Guidelines in OncologyTM: genetic/familial high risk assessment: breast and ovarian VI 2010.

32. Fong P.C., Boss D.S., Yap T.A., Tutt A., Wu P., Mergui-Roelvink M., Mortimer P., Swaisland H., Lau A., O'Connor M.J., Ashworth A., Carmichael J., Kaye S.B., Schellens J.H.M., de Bono J.S. (2009). Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase in tumors from *BRCA* mutation carriers. *N. Eng. J. Med.* **361**(2), 123–134.

33. Geenen J.J., Linn S.C., Beijnen J.H., Schellens J.H. (2018) PARP inhibitors in the treatment of triple-negative breast cancer. *Clin. Pharmacokinet.* **57**(4), 427–437.

34. Maxwell K.N., Wubbenhorst B., Wenz B.M., De Sloover D., Pluta J., Emery L., Barrett A., Kraya A.A., Anastopoulos I.N., Yu S., Jiang Y., Chen H., Zhang N.R., Hackman N., D'Andrea K., Daber R., Morrissette J.J.D., Mitra N., Feldman M., Domchek S.M., Nathanson K.L. (2017). *BRCA* locus-specific loss of heterozygosity in germline *BRCA1* and *BRCA2* carriers. *Nat. Commun.* **8**(1), 1–11.

35. Olivier M., Langerød A., Carrieri P., Bergh J., Klaar S., Eyfjord J., Charles Theillet, Rodriguez C., Lidereau R., Bièche I., Varley J., Bignon Y., Uhrhammer N., Winqvist R., Jukkola-Vuorinen A., Niederacher D., Kato S., Ishioka C., Hainaut P., Børresen-Dale A.-L. (2006). The clinical value of somatic *TP53* gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**(4), 1157–1167.

36. Silwal-Pandit L., Vollan H.K., Chin S.F., Rueda O.M., McKinney S., Osako T., Quigley D.A., Kristensen V.N., Aparicio S., Børresen-Dale A.L., Caldas C., Langerød A. (2014) *TP53* mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. *Clin. Cancer Res.* **20**(13), 3569–3580.

37. Meric-Bernstam F., Zheng X., Shariati M., Damodaran S., Wathoo C., Brusco L., Demirhan M.E., Tapia C., Eterovic A.K., Basho R.K., Ueno N.T., Janku F., Sahin A, Rodon J., Broaddus R., Kim T.B., Mendelsohn J., Mills Shaw K.R., Tripathy D., Mills G.B., Chen K. (2018) Survival outcomes by TP53 mutation status in metastatic breast cancer. *JCO Precision Oncol.* **2**, 1–15.

38. Nandikolla A.G., Venugopal S., Anampa J. (2017) Breast cancer in patients with Li–Fraumeni syndrome – a case-series study and review of literature. *Breast Cancer* (Dove Med. Press). **9**, 207–215.

GERMLINE AND SOMATIC MUTATIONS IN ARCHIVED BREAST CANCER SPECIMENS OF DIFFERENT SUBTYPES

I. S. Abramov[1], Yu. S. Korneva[2], O. A. Shisterova[3], A. Yu. Ikonnikova[1], M. A. Emelyanova[1], T. S. Lisitsa[1], G. S. Krasnov[1], and T. V. Nasedkina[1, *]

[1]*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*
[2]*Smolensk State Medical University, Smolensk, 214019 Russia*
[3]*Smolensk Regional Clinical Oncologic Dispensary, Smolensk, 214000 Russia*
**e-mail: nased@biochip.ru*

Molecular profiling of tumors may provide promising leads for personalized treatment. We examined the spectrum of germline and somatic mutations in 23 breast cancers (BC) of various molecular subtypes, including tumors 1) with expression of estrogen, progesterone and/or epidermal growth factor receptor HER2/neu, 2) with a triple negative phenotype. Genomic DNA specimens were isolated from archived tumor and normal tissue samples and subjected to a targeted sequencing of the coding regions of 25 cancer-associated genes with a mean coverage of ×1000. In a triple negative subtype of BC, pathogenic germline mutations *BRCA1* c.66_67delAG (185delAG) and *BRCA1* c.3226_3227AG (3347delAG) were detected, while the germline mutation of *BRCA2* 658_659del (886delGT) was found in patients with the positive receptor status. Mutations BRCA1/2 presented were overrepresented by frequency (80%), pointing at common loss of heterozygosity affecting normal allele. Somatic mutations in the gene *TP53* were found in 7/10 (70%) patients with a triple negative subtype of BC and in 3/13 (23%) in the group with a positive receptor status. Additionally, in both groups of patients, somatic mutations of *PTEN*, *MSH2*, *MSH6* and *MUTYH* genes were detected.

Keywords: breast cancer, triple negative subtype, archived tumor samples, targeted sequencing, germline and somatic mutations

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 3, с. 422–430

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.25

ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc* И *FoxG1* В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ МОЗГЕ МЫШЕЙ С НОКАУТОМ ГЕНА *Zbtb33*

© 2021 г. Н. Б. Илларионова[a], *, М. А. Борисова[a], Е. Ю. Баженова[a], Д. С. Забелина[b], Д. В. Фурсенко[c], А. В. Куликов[a]

[a] *Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия*

[b] *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия*

[c] *Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия*

**e-mail: nina.illarionova@gmail.com*

Поступила в редакцию 19.06.2020 г.
После доработки 25.09.2020 г.
Принята к публикации 07.10.2020 г.

Фактор транскрипции KAISO важен для правильного эмбрионального развития животных. KAISO участвует в регуляции деления клеток и апоптоза, он широко представлен в ЦНС, но его функции в развитии ЦНС изучены недостаточно. Нами изучено влияние нокаута гена *Zbtb33* мыши на транскрипцию нескольких генов, регулирующих развитие ЦНС, в том числе *Fgf9*, *Fgfr3*, *Sox9*, *Sox2*, *c-Myc*, *NeuroD1*, *FoxG1*. Эти гены относятся к генам сигнального пути Wnt/β-катенин, который тесно связан с KAISO. В качестве модели использовали мышей линии C57BL/6j с нокаутом гена *Zbtb33*, кодирующего KAISO (ZBTB33-), и мышей дикого типа (ZBTB33+). Транскрипцию генов анализировали в гиппокампе, фронтальной коре и стриатуме мышей ZBTB33+ и ZBTB33- на разных стадиях развития. Впервые определены возрастзависимые и регион-специфичные различия в уровнях мРНК генов *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc*, *FoxG1* в развивающемся мозге мышей ZBTB33– и ZBTB33+.

Ключевые слова: KAISO, сигнальный путь Wnt/β-катенин, *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc*, *FoxG1*, ПЦР в реальном времени, мышь, гиппокамп, стриатум, фронтальная кора

DOI: 10.31857/S0026898421030095

ВВЕДЕНИЕ

Фактор транскрипции KAISO, вовлеченный в ключевые сигнальные пути развития и влияющий на экспрессию большого числа генов, участвует в регуляции эмбрионального развития рыб и земноводных [1–4]. У мышей KAISO регулирует деление клеток селезенки, влияет на дифференцировку клеток-предшественников эпителия кишечника [1, 5]. Мыши с нокаутом гена *Zbtb33* жизнеспособны. Хорошо изучена роль KAISO в регуляции деления опухолевых клеток, где в зависимости от типа клеток он может играть роль как проонкогена, так и супрессора опухолевого роста [6–11]. Вероятно, тканеспецифичная регуляция экспрессии генов-мишеней определяется способностью KAISO связываться с двумя различными сайтами в области промоторов. KAISO может взаимодействовать не только со специфическими последовательностями TCCTGCNA в промоторах, но также с двумя последовательно расположенными симметрично метилированными CpG-сайтами [12–14] и с одиночными метилированными CpG-сайтами [12, 14, 15]. Таким образом, регуляция экспрессии генов-мишеней зависит также от статуса метилирования CpG-сайтов связывания KAISO в их промоторах. В основном KAISO описан как репрессор транскрипции, однако показано, что сайленсинг KAISO приводит к снижению экспрессии многих генов [16]. Интересно, что в зависимости от типа клеток KAISO может как увеличивать, так и снижать экспрессию протоонкогена *c-Myc* и гена, кодирующего циклин D1 (*Ccnd1*) [2, 5, 6, 16, 17].

Транскрипционный фактор KAISO связан с сигнальным путем Wnt/β-катенин, играющим важную роль в развитии [2, 9, 18–20]. В ЦНС этот путь регулирует нейрогенез и глиогенез, влияет на формирование синаптических контактов и гематоэнцефалического барьера [21–25]. Сигнальный путь Wnt/β-катенин вызывает стабилизацию β-катенина, который транспортируется в ядро, где активирует транскрипцию многих генов-мишеней. Промоторы некоторых ключевых генов-мишеней сигнального пути Wnt/β-катенин, таких как *Matrilysin*, *Ccnd1*, *Siamois*, *c-Myc*, *Rapsyn*, содержат сайты связывания KAISO [5, 14, 17, 20, 26]. В присутствии Wnt-лиганда KAISO может взаимодействовать с катенином p120 в клеточном ядре, что способствует освобождению промоторов

генов-мишеней от KAISO [2, 18]. KAISO способен связываться не только с катенином p120, но также, хотя и с меньшей аффинностью, с β-катенином и мешать активации генов-мишеней сигнального пути Wnt/β-катенин [19]. Кроме того, промотор гена β-катенина содержит специфический сайт связывания KAISO и несколько метилированных CpG-сайтов [9]. Таким образом, KAISO регулирует непосредственно экспрессию эффектора самого сигнального пути Wnt/β-катенин. Можно говорить о взаимной регуляции сигнального пути Wnt/β-катенин и фактора транскрипции KAISO. Следовательно, генами-мишенями KAISO могут быть гены сигнального пути Wnt/β-катенин, из которых интерес представляют *Fgf9*, *Fgfr3*, *Sox9*, *Sox2*, *c-Myc*, *NeuroD1*, *FoxG1*. Фактор роста фибробластов FGF9 активирует рост и дифференцировку глии [27, 28], а одним из основных рецепторов FGF9 является рецептор FGF3 (FGFR3) [29], c-Myc участвует в регуляции клеточного деления и апоптоза [30], SOX2 поддерживает плюрипотентность нейрональных клеток-предшественников [31–33], SOX9 участвует в инициации глиогенеза [34–37], NeuroD1 регулирует нейрональную дифференцировку клеток [38, 39], FOXG1 играет важную роль в развитии и организации структуры конечного мозга и дифференцировки глутаматергических нейронов в развивающейся коре [40–42]. Таким образом, эти гены вносят существенный вклад в формирование и развитие мозга.

Нами проведен сравнительный анализ транскрипции генов *Fgf9*, *Fgfr3*, *Sox9*, *Sox2*, *c-Myc*, *NeuroD1*, *FoxG1* у мышей с нокаутом гена *Zbtb33* [7], кодирующего KAISO, в разных структурах головного мозга и на разных этапах развития.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. В работе использовали мышей линии C57BL/6j дикого типа и с нокаутом гена *Zbtb33* [7]. Животных содержали в индивидуально вентилируемых клетках при искусственном дневном/ночном режиме (14 ч свет/10 ч темнота), температуре 22–24°C и влажности 40–50%. Воду и гранулированный корм Chara SPF для лабораторных грызунов (“Ассортимент-Агро”, Пущино, Россия) давали *ad libitum*. Корм и подстилку перед использованием автоклавировали. Все процедуры с участием животных соответствовали этическим стандартам FELASA. Путем датированного по времени скрещивания самок, гетерозиготных по гену *Zbtb33* (ZBTB33+/–), с самцами дикого типа в одном помете получили самцов с нокаутом гена *Zbtb33* (ZBTB33–) и самцов дикого типа (ZBTB33+). Такая схема позволяет сравнивать транскрипцию генов при уменьшенном влиянии генетического разнообразия каждой линии мышей и обнаруживать непосредственное влияние нокаута гена *Zbtb33*. При датированном по времени скрещивании возможен забор материалов с точностью до 12 ч развития эмбрионального мозга. Таким образом, структуры мозга (фронтальная кора, стриатум и гиппокамп) были взяты на 16.5 сутки эмбрионального развития (E16, повышенный уровень нейрогенеза), на второй день после рождения (P2, повышенный уровень глиогенеза), а также на 40-й день после рождения (P40, взрослые мыши) [43] (6–10 животных в каждой группе). Эвтаназию проводили декапитацией с последующей диссекцией структур головного мозга: гиппокамп, стриатум и фронтальная кора.

Выделение РНК. РНК выделяли с помощью реактивов TRIzol Reagent (“ThermoFisher Scientific,” США) и TRI Reagent (“Sigma Aldrich”, США) согласно инструкциям производителей. Концентрацию РНК в пробах измеряли спектрофотометрически (спектрофотометр NanoDrop 2000, “ThermoFisher Scientific”) при длине волны 260 и 280 нм. Все пробы разводили водой, обработанной DEPC mQ, до концентрации РНК 128 нг/мкл.

Получение кДНК в реакции обратной транскрипции. Реакцию обратной транскрипции проводили с гексануклеотидными праймерами со случайной последовательностью нуклеотидов с помощью набора R01-250 (“Биолабмикс”, Россия) согласно инструкции производителя. В каждую реакцию добавляли 1024 нг РНК в качестве матрицы.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Для определения экспрессии генов подбирали специфические праймеры (табл. 1): межэкзонные праймеры на гены *c-Myc*, *Fgf9*, *Fgfr3*, *Gapdh*, *NeuroD1*, *Sox9* и *Pol2A* и внутриэкзонные праймеры на гены *Sox2*, *FoxG1* и *Zbtb33*. В случае внутриэкзонных праймеров проверяли загрязнение образцов РНК геномной ДНК. Для этого проводили ПЦР, используя в качестве матрицы образцы РНК. Допустимым загрязнением считали увеличение сигнала SYBR Green на Cq 35–45 при увеличении сигнала с кДНК-матрицы на Cq 20–30. Пробы, не отвечающие данному условию, исключали. Для количественного определения продукта готовили стандартные растворы: в пробирке смешали по 2 мкл матрицы каждого образца одной структуры мозга. Концентрацию кДНК в этой пробирке условно принимали за 100. Из первого стандартного раствора путем последовательного разведения водой в 2 раза приготовлены 11 последующих растворов с условными концентрациями 50, 25, 12.5, 6.25, 3.25, 1.56, 0.78, 0.39, 0.195, которые использовали для построения калибровочной кривой. Экспериментальные образцы разбавляли водой в 4 раза. Полученный условный уровень экспрессии нормировали на соответствующий уровень экспрессии гена домашнего хозяйства *Gapdh* или *Pol2A*. Амплификацию прово-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'	$T_{отж}$, °C
*c-Myc*_F	CACCACCAGCAGCGACTC	58
*c-Myc*_R	GATGGAGATGAGCCCGACT	58
*Fgf9*_F	TGGACTCTACCTCGGCATGA	63
*Fgf9*_R	GGTTGGAAGAGTAGGTGTTGT	63
*Fgfr3*_F	GAGAGCGGCAGAGGTTCCA	58
*Fgfr3*_R	CCATCCTTAGCCCAGACCGT	58
*Gapdh*_F	GTCGGTGTGAACGGATTTGG	63
*Gapdh*_R	CGTGAGTGGAGTCATACTGGA	63
*NeuroD1*_F	CGAGGCTCCAGGGTTATGAG	63
*NeuroD1*_R	CGTCCTCTTTCTTGTCTGCC	63
*Sox2*_F	CTCGCAGACCTACATGAACG	60
*Sox2*_R	GGAGTGGGAGGAAGAGGTAA	60
*Sox9*_F	CAAGACTCTGGGCAAGCTCT	63
*Sox9*_R	TCCGTTCTTCACCGACTTCC	63
*FoxG1*_F	CACCGGCCTCACCTTCAT	63
*FoxG1*_R	GGTGGAGAAGGAGTGGTTGT	63
*mPol2A*_F	CATCTCCTTTGATGGTTCTTATGTCAA	63
*mPol2A*_R	CCATGTGCTGCTGCTTCCATA	63
*Zbtb33*_ F	GTCTCTTTTGTGATGTTACTG	57
*Zbtb33*_R	GTTCTGTACCTGATATGCTTT	57
E1_F	TCAAAGGAAGGCGACCAAGGAGAT	58
E2_R	AGCAGTACCATCCTGTTCTG	58
E5_R	ATAGTTTAAAGGCATATAGTGGCC	58
*SRY*_F	TTGTCTAGAGAGCATGGAGGGCCATGTCAA	64
*SRY*_R	CCACTCCTCTGTGACACTTTAGCCCTCCGA	64

дили с помощью набора R-402 (“Синтол”, Россия) согласно инструкции производителя на амплификаторе CFX 96 (“Bio Rad”, США).

Генотипирование. Мышей ZBTB33+ и ZBTB33– генотипировали методом ПЦР с парами праймеров E1–E2 и E1–E5 (табл. 1) [7]. Пол мышей групп E16 и P2 дополнительно определяли с помощью пар праймеров SRY_F и SRY_R (табл. 1). Для эксперимента отбирали самцов дикого типа и самцов с нокаутом гена *Zbtb33*.

Статистический анализ. Данные представляли как средние значения ± ошибка среднего и анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим *post hoc* анализом по Фишеру и поправкой Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами проведен сравнительный анализ транскрипции генов *c-Myc*, *Fgf9*, *Fgfr3*, *NeuroD1*, *Sox9*, *Sox2*, *FoxG1* и *Zbtb33* в гиппокампе, фронтальной коре и стриатуме мышей дикого типа и с нокаутом гена *Zbtb33* на разных стадиях развития.

Транскрипция гена *Zbtb33* выявлена во всех исследованных структурах мозга мышей ZBTB33+ на разных этапах развития (рис. 1*а*, 2*а*, 3*а*), при этом уровень транскрипции гена *Zbtb33* в гиппокампе взрослых мышей (P40) был ниже, чем в E16 (рис. 1*а*, $p < 0.05$), а в стриатуме в P40 ниже, чем в E16 ($p < 0.05$) и P2 ($p < 0.05$) (рис. 3*а*). В каждой структуре мозга транскрипция гена *Fgf9* увеличивалась от E16 к P2 (рис. 1*б*, $p < 0.001$, рис. 2*б*, $p < 0.001$, рис. 3*б*, $p < 0.001$) и от P2 к P40 (рис. 1*б*, $p < 0.001$, рис. 2*б*, $p < 0.001$, рис. 3*б*, $p < 0.001$). При этом впервые показано, что в стриатуме взрослых мышей ZBTB33– (P40) уровень транскрипции этого гена был ниже, чем у мышей ZBTB33+ ($F_{1.18} = 9.06$, $p < 0.01$, рис. 3*б*). Мы также определили транскрипцию гена *Fgfr3*, кодирующего рецептор FGF9, так как возможно существование корреляции между экспрессией лиганда и его рецептора. Транскрипция гена *Fgfr3* в гиппокампе взрослых мышей ZBTB33– была выше, чем у мышей ZBTB33+ ($F_{1.18} = 6.93$, $p < 0.05$, рис. 1*в*). Однако корреляции между экспрессией генов *Fgf9* и *Fgfr3* в стриатуме не обнаружено (рис. 3*в*).

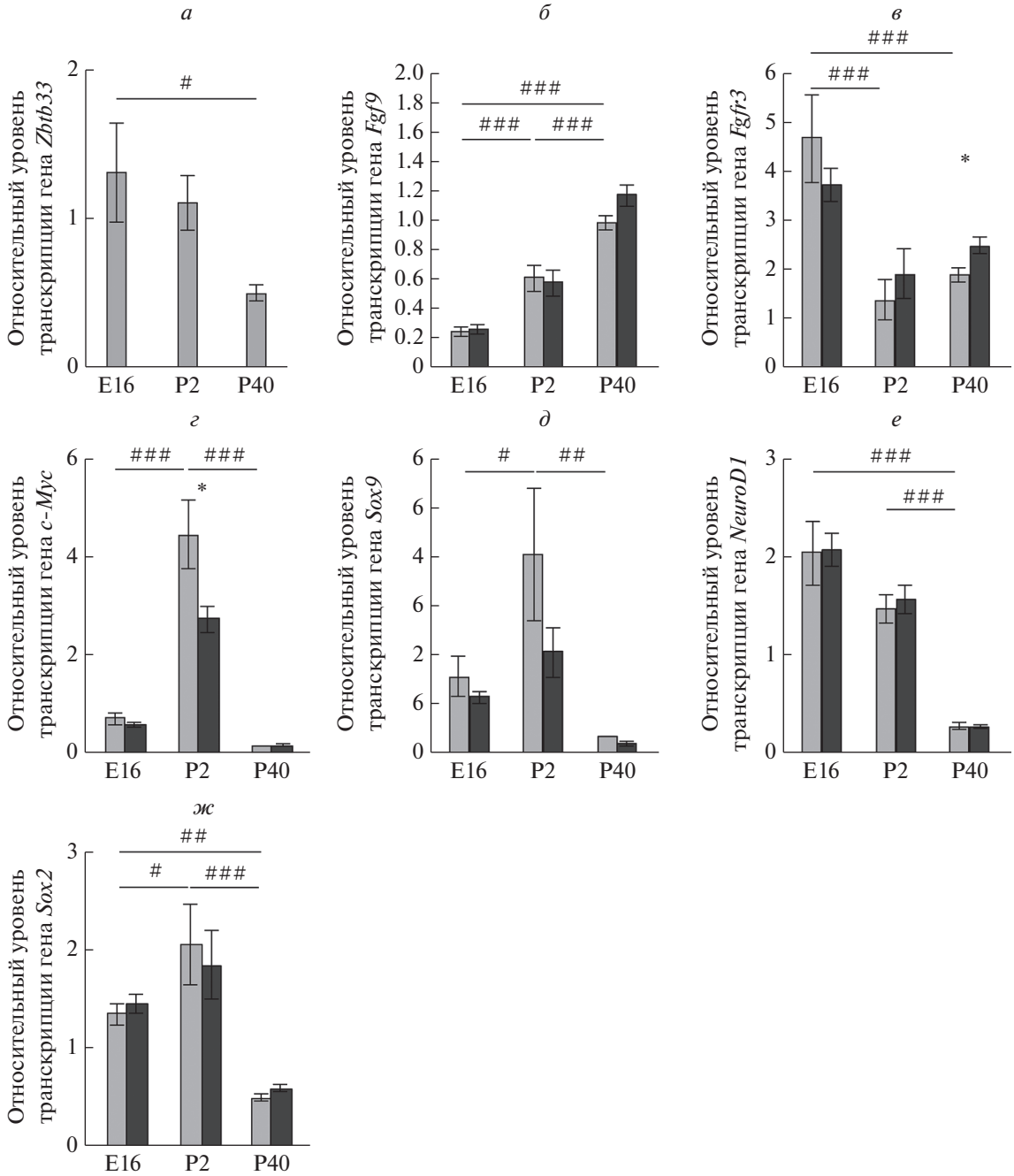


Рис. 1. Транскрипция генов в гиппокампе мышей с нокаутом гена *Zbtb33* (ZBTB33–) и у мышей дикого типа (ZBTB33+) на разных стадиях развития. Гистограммы относительного уровня транскрипции генов: *а* – *Zbtb33*; *б* – *Fgf9*; *в* – *Fgfr3*; *г* – *c-Myc*; *д* – *Sox9*; *е* – *NeuroD1*; *ж* – *Sox2*. Статистически значимые отличия от уровня у мышей дикого типа отмечены * (*$p < 0.05$), значимые возрастные отличия (ZBTB33+) показаны знаком # (#$p < 0.05$; ##$p < 0.01$; ###$p < 0.001$). Светло-серым цветом показан уровень транскрипции генов в мозге мышей ZBTB33+, темно-серым – в мозге мышей ZBTB33–.

С помощью сравнительного анализа выявлен более высокий уровень транскрипции гена *c-Myc* в гиппокампе мышей в возрасте P2 по сравнению с E16 ($p < 0.001$) и P40 ($p < 0.001$) (рис. 1*г*), а также во фронтальной коре (рис. 2*г*) и стриатуме (рис. 3*г*). Впервые обнаружено, что в гиппокампе мышей ZBTB33– в P2 транскрипция гена *c-Myc* была ниже, чем у мышей ZBTB33+ (рис. 1*г*, $F_{1.15} = 4.79$, $p < 0.05$).

Транскрипция гена *Sox9* в гиппокампе и стриатуме мышей P2 была выше, чем в E16 ($p < 0.05$) и P40 ($p < 0.01$) (рис. 1*д*, рис. 3*д*), тогда как во фронтальной коре транскрипция этого гена в возрасте

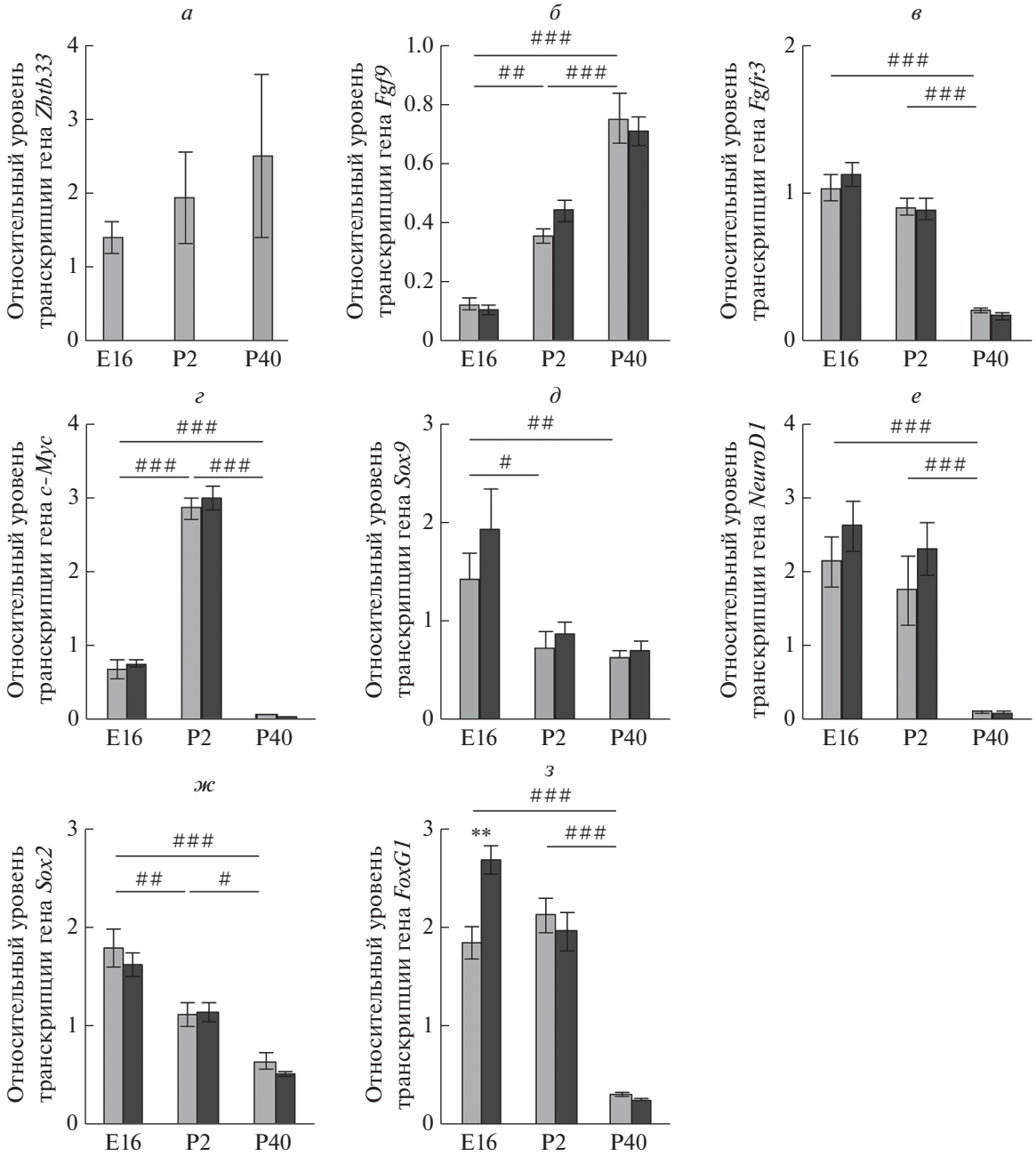


Рис. 2. Транскрипция генов во фронтальной коре мышей с нокаутом гена *Zbtb33* (ZBTB33–) и у мышей дикого типа (ZBTB33+) на разных стадиях развития. Гистограммы относительного уровня транскрипции генов: *а* – *Zbtb33*; *б* – *Fgf9*; *в* – *Fgfr3*; *г* – *c-Myc*; *д* – *Sox9*; *е* – *NeuroD1*; *ж* – *Sox2*; *з* – *FoxG1*. Статистически значимые отличия от уровня у мышей дикого типа отмечены ** (**$p < 0.01$), значимые возрастные отличия (ZBTB33+) показаны знаком # (#$p < 0.05$; ##$p < 0.01$; ###$p < 0.001$). Светло-серым цветом показан уровень транскрипции генов в мозге мышей ZBTB33+, темно-серым – в мозге мышей ZBTB33–.

E16 была статистически значимо выше, чем в P2 ($p < 0.05$) и P40 ($p < 0.01$, рис. 2*д*). Транскрипция гена *NeuroD1*, была одинаковой на стадиях E16 и P2, значительно снижалась во всех исследованных структурах мозга у взрослых мышей (гиппокамп, рис. 1*е*, $p < 0.001$; фронтальная кора, рис. 2*е*, $p < 0.001$ и стриатум, рис. 3*е*, $p < 0.05$). Транскрипция гена *Sox2* в возрасте P40 была ниже по сравнению с E16 ($p < 0.01$) и P2 ($p < 0.001$) в гиппокампе (рис. 1*ж*). У взрослых мышей (P40) транскрипция *Sox2* была ниже и в стриатуме по сравнению с E16 ($p < 0.001$) и P2 ($p < 0.001$) (рис. 3*ж*), и во фронтальной коре по сравнению с E16 ($p < 0.001$) и P2 ($p < 0.05$) (рис. 2*ж*).

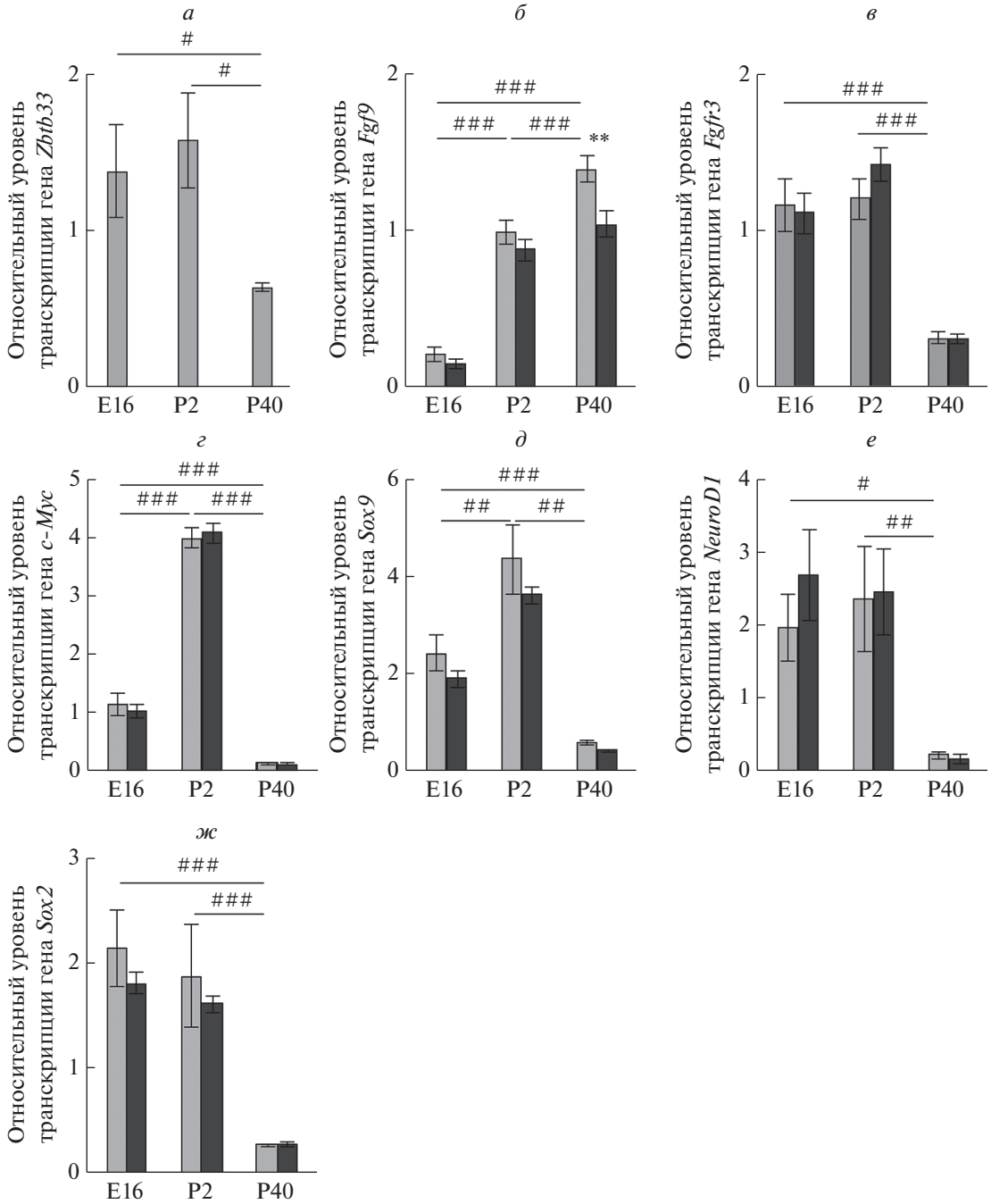


Рис. 3. Транскрипция генов в стриатуме мышей с нокаутом гена *Zbtb33* (ZBTB33–) и у мышей дикого типа (ZBTB33+) на разных стадиях развития. Гистограммы относительного уровня транскрипции генов: *а* – *Zbtb33*; *б* – *Fgf9*; *в* – *Fgfr3*; *г* – *c-Myc*; *д* – *Sox9*; *е* – *NeuroD1*; *ж* – *Sox2*. Статистически значимые отличия от уровня у мышей дикого типа отмечены ** (** $p < 0.01$), значимые возрастные отличия (ZBTB33+) показаны знаком # (#$p < 0.05$; ##$p < 0.01$; ###$p < 0.001$). Светло-серым показан уровень транскрипции генов в мозге мышей ZBTB33+, темно-серым – в мозге мышей ZBTB33–.

Транскрипция гена *FoxG1* была одинаковой в E16 и P2 и снижалась во взрослом возрасте во фронтальной коре ($p < 0.001$, рис. 2*з*). В этой структуре транскрипция гена *FoxG1* у мышей ZBTB33- на стадии E16 была выше, чем у ZBTB33+ (рис. 1*г*, $F_{1.15} = 14.41$, $p < 0.01$).

Статистически значимых различий в транскрипции генов *Sox9*, *NeuroD1* и *Sox2* в исследованных структурах мозга мышей ZBTB33– и ZBTB33+ не обнаружено.

Таким образом, нами впервые выявлены различия в транскрипции генов *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc* и

FoxG1 в мозге мышей ZBTB33– и ZBTB33+ на разных стадиях развития. Все эти гены необходимы для правильного развития ЦНС. Предстоит установить, являются ли эти гены прямыми мишенями транскрипционного фактора KAISO или они регулируются KAISO через другие сигнальные пути, например, путь Wnt/β-катенина.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами выявлено несколько генов, транскрипция которых в различных отделах развивающегося мозга мышей с нокаутом гена *Zbtb33* отличается от транскрипции у мышей дикого типа. Транскрипция гена *FoxG1* увеличивалась во фронтальной коре мозга эмбрионов мыши на стадии E16 в отсутствие транскрипционного фактора KAISO (рис. 2*з*, 1*в*). Известно, что сверхэкспрессия гена *FoxG1* в эмбрионах лягушки и курицы приводит к увеличению конечного и среднего мозга, что, вероятно, связано со снижением интенсивности апоптоза клеток развивающегося мозга [44]. Влияние нокдауна гена *Zbtb33* и увеличения транскрипции гена *FoxG1* на стадии E16 на организацию коры головного мозга мышей еще предстоит оценить.

Впервые обнаружено снижение транскрипции гена *c-Myc* в гиппокампе мышей ZBTB33- перинатального возраста (P2). Регуляцию этого гена фактором KAISO уже показали ранее на ооцитах лягушки и спленоцитах мыши, а также на клеточных культурах человека, но не в ЦНС [2, 5, 6]. В клетках селезенки нокдаун гена *Zbtb33* приводил к увеличению экспрессии гена *c-Myc*. Также выявлен потенциальный предпочтительный сайт связывания KAISO на промоторе гена *c-Myc* мыши внутри первого экзона [5]. Описано также снижение уровня экспрессии *c-Myc* в клетках рака молочной железы, вызванное сайленсингом KAISO [6]. По-видимому, существуют тканеспецифичные различия в регуляции экспрессии гена *c-Myc* фактором KAISO, что может быть связано с бимодальной ролью KAISO в регуляции генов и, в частности, гена *c-Myc* в разных тканях [2, 5, 6, 16]. Условный нокаут гена *c-Myc* в нейрональных клетках-предшественниках сдерживает рост мозга, а двойной нокаут *c-Myc* и его гомолога *N-Myc* в клетках-предшественниках головного мозга приводит к серьезным нарушениям развития ЦНС, уменьшению объема мозга, снижению числа нейрональных клеток-предшественников [45, 46]. Предстоит установить, регулирует ли KAISO пролиферацию и апоптоз клеток-предшественников в развивающемся гиппокампе мыши – структуре мозга, важной для формировании эпизодической памяти и ориентации в пространстве [47].

Нами впервые показано, что отсутствие фактора KAISO приводит к снижению уровня транскрипции гена фактора роста FGF9 в стриатуме мышей ZBTB33– по сравнению с ZBTB33+. Фактор роста FGF9 активирует рост и дифференцировку глии, которая, в свою очередь, влияет на функцию нейронов [27, 28]. Однако регион-специфичной корреляции транскрипции генов *Fgf9* и рецептора FGFR3 не обнаружено.

Транскрипция генов *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc* и *FoxG1* в мозге мышей ZBTB33+ и ZBTB33– имеет различный возрастзависимый и регион-специфичный характер. Это может быть связано со сложной регуляцией транскрипции этих генов в структурах мозга на разных стадиях развития. Влияние нокаута *Zbtb33* на транскрипцию этих генов может, вероятно, варьировать в зависимости от статуса метилирования CpG-сайтов, которое может зависеть от стадии развития, отдела мозга и от таких факторов, как гомологи KAISO (ZBTB4, ZBTB38), а также от непрямой регуляции, опосредованной, например, сигнальным путем WNT/β-катенин.

Выполнение экспериментальной части работы поддержано грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-04-00869 А, диссекция мозга, выделение РНК и ПЦР в реальном времени) и бюджетным проектом № 0259-2021-0015 (содержание и разведение животных) и выполнено с использованием оборудования ЦКП “Центр генетических ресурсов лабораторных животных” ФИЦ ИЦиГ СО РАН, поддержанного Минобрнауки России (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI62119X0023).

Обращение с животными соответствовало рекомендациям руководства по уходу и использованию лабораторных животных Российского национального центра генетических ресурсов лабораторных животных на основе вивария, свободного от специфических патогенов. Все процедуры с участием животных соответствовали этическим стандартам FELASA.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chaudhary R., Pierre C.C., Nanan K., Wojtal D., Morone S., Pinelli C., Wood G.A., Robine S., Daniel J.M. (2013) The POZ-ZF transcription factor Kaiso (ZBTB33) induces inflammation and progenitor cell differentiation in the murine intestine. *PLoS One*. **8**, e74160.
2. Park J.I., Kim S.W., Lyons J.P., Ji H., Nguyen T.T., Cho K., Barton M.C., Deroo T., Vleminckx K., Moon R.T., McCrea P.D. (2005) Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical *Wnt* gene targets. *Dev. Cell*. **8**, 843–854.
3. Ruzov A., Dunican D.S., Prokhortchouk A., Pennings S., Stancheva I., Prokhortchouk E., Meehan R.R. (2004) Kaiso is a genome-wide repressor of transcription that is essential for amphibian development. *Development*. **131**, 6185–6194.
4. Ruzov A., Savitskaya E., Hackett J.A., Reddington J.P., Prokhortchouk A., Madej M.J., Chekanov N., Li M., Dunican D.S., Prokhortchouk E., Pennings S., Mee-

han R.R. (2009) The non-methylated DNA-binding function of Kaiso is not required in early *Xenopus laevis* development. *Development*. **136**, 729–738.

5. Koh D.I., Yoon J.H., Kim M.K., An H., Kim M.Y., Hur M.W. (2013) Kaiso is a key regulator of spleen germinal center formation by repressing Bcl6 expression in splenocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **442**, 177–182.
6. Bassey-Archibong B.I., Rayner L.G., Hercules S.M., Aarts C.W., Dvorkin-Gheva A., Bramson J.L., Hassell J.A., Daniel J.M. (2017) Kaiso depletion attenuates the growth and survival of triple negative breast cancer cells. *Cell Death Dis*. **8**, e2689.
7. Prokhortchouk A., Sansom O., Selfridge J., Caballero I.M., Salozhin S., Aithozhina D., Cerchietti L., Meng F.G., Augenlicht L.H., Mariadason J.M., Hendrich B., Melnick A., Prokhortchouk E., Clarke A., Bird A. (2006) Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer. *Mol. Cell. Biol*. **26**, 199–208.
8. Jones J., Wang H., Zhou J., Hardy S., Turner T., Austin D., He Q., Wells A., Grizzle W.E., Yates C. (2012) Nuclear Kaiso indicates aggressive prostate cancers and promotes migration and invasiveness of prostate cancer cells. *Am. J. Pathol*. **181**, 1836–1846.
9. Liu Y., Dong Q.Z., Wang S., Xu H.T., Miao Y., Wang L., Wang E.H. (2014) Kaiso interacts with p120-catenin to regulate beta-catenin expression at the transcriptional level. *PLoS One*. **9**, e87537.
10. van de Ven R.A., Tenhagen M., Meuleman W., van Riel J.J., Schackmann R.C., Derksen P.W. (2015) Nuclear p120-catenin regulates the anoikis resistance of mouse lobular breast cancer cells through Kaiso-dependent Wnt11 expression. *Dis. Model Mech*. **8**, 373–384.
11. Pierre C.C., Hercules S.M., Yates C., Daniel J.M. (2019) Dancing from bottoms up – roles of the POZ-ZF transcription factor Kaiso in cancer. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. **1871**, 64–74.
12. Buck-Koehntop B.A., Stanfield R.L., Ekiert D.C., Martinez-Yamout M.A., Dyson H.J., Wilson I.A., Wright P.E. (2012) Molecular basis for recognition of methylated and specific DNA sequences by the zinc finger protein Kaiso. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**, 15229–15234.
13. Prokhortchouk A., Hendrich B., Jorgensen H., Ruzov A., Wilm M., Georgiev G., Bird A., Prokhortchouk E. (2001) The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev*. **15**, 1613–1618.
14. Daniel J.M., Spring C.M., Crawford H.C., Reynolds A.B., Baig A. (2002) The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucl. Acids Res*. **30**, 2911–2919.
15. Жигалова Н.А., Соколов А.С., Прохорчук Е.Б., Женило С.В. (2015) *S100A3* – новый ген-мишень белка Каизо в коже млекопитающих. *Молекуляр. биология*. **49**, 362–365.
16. Pozner A., Terooatea T.W., Buck-Koehntop B.A. (2016) Cell-specific Kaiso (ZBTB33) regulation of cell cycle through cyclin D1 and cyclin E1. *J. Biol. Chem*. **291**, 24538–24550.
17. Donaldson N.S., Pierre C.C., Anstey M.I., Robinson S.C., Weerawardane S.M., Daniel J.M. (2012) Kaiso represses the cell cycle gene cyclin D1 via sequence-specific and methyl-CpG-dependent mechanisms. *PLoS One*. **7**, e50398.
18. Spring C.M., Kelly K.F., O'Kelly I., Graham M., Crawford H.C., Daniel J.M. (2005) The catenin p120ctn inhibits Kaiso-mediated transcriptional repression of the beta-catenin/TCF target gene matrilysin. *Exp. Cell Res*. **305**, 253–265.
19. Del Valle-Perez B., Casagolda D., Lugilde E., Valls G., Codina M., Dave N., de Herreros A.G., Dunach M. (2011) Wnt controls the transcriptional activity of Kaiso through CK1epsilon-dependent phosphorylation of p120-catenin. *J. Cell. Sci*. **124**, 2298–2309.
20. Kim S.W., Park J.I., Spring C.M., Sater A.K., Ji H., Otchere A.A., Daniel J.M., McCrea P.D. (2004) Non-canonical Wnt signals are modulated by the Kaiso transcriptional repressor and p120-catenin. *Nat. Cell. Biol*. **6**, 1212–1220.
21. Liebner S., Corada M., Bangsow T., Babbage J., Taddei A., Czupalla C.J., Reis M., Felici A., Wolburg H., Fruttiger M., Taketo M.M., von Melchner H., Plate K.H., Gerhardt H., Dejana E. (2008) Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood–brain barrier. *J. Cell. Biol*. **183**, 409–417.
22. Okuda T., Yu L.M., Cingolani L.A., Kemler R., Goda Y. (2007) beta-Catenin regulates excitatory postsynaptic strength at hippocampal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 13479–13484.
23. Maguschak K.A., Ressler K.J. (2012) The dynamic role of beta-catenin in synaptic plasticity. *Neuropharmacology*. **62**, 78–88.
24. Chenn A., Walsh C.A. (2003) Increased neuronal production, enlarged forebrains and cytoarchitectural distortions in beta-catenin overexpressing transgenic mice. *Cereb. Cortex*. **13**, 599–606.
25. Backman M., Machon O., Mygland L., van den Bout C.J., Zhong W., Taketo M.M., Krauss S. (2005) Effects of canonical Wnt signaling on dorso-ventral specification of the mouse telencephalon. *Dev. Biol*. **279**, 155–168.
26. Rodova M., Kelly K.F., VanSaun M., Daniel J.M., Werle M.J. (2004) Regulation of the rapsyn promoter by kaiso and delta-catenin. *Mol. Cell. Biol*. **24**, 7188–7196.
27. Falcone C., Filippis C., Granzotto M., Mallamaci A. (2015) Emx2 expression levels in NSCs modulate astrogenesis rates by regulating EgfR and Fgf9. *Glia*. **63**, 412–422.
28. Lin Y., Chen L., Lin C., Luo Y., Tsai R.Y., Wang F. (2009) Neuron-derived FGF9 is essential for scaffold formation of Bergmann radial fibers and migration of granule neurons in the cerebellum. *Dev. Biol*. **329**, 44–54.
29. Hecht D., Zimmerman N., Bedford M., Avivi A., Yayon A. (1995) Identification of fibroblast growth factor 9 (FGF9) as a high affinity, heparin dependent ligand for FGF receptors 3 and 2 but not for FGF receptors 1 and 4. *Growth Factors*. **12**, 223–233.
30. Sears R.C., Nevins J.R. (2002) Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J. Biol. Chem*. **277**, 11617–11620.
31. Boyer L.A., Lee T.I., Cole M.F., Johnstone S.E., Levine S.S., Zucker J.P., Guenther M.G., Kumar R.M., Murray H.L., Jenner R.G., Gifford D.K., Melton D.A., Jaenisch R., Young R.A. (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. **122**, 947–956.

32. Mercurio S., Serra L., Motta A., Gesuita L., Sanchez-Arrones L., Inverardi F., Foglio B., Barone C., Kaimakis P., Martynoga B., Ottolenghi S., Studer M., Guillemot F., Frassoni C., Bovolenta P., Nicolis S.K. (2019) Sox2 acts in thalamic neurons to control the development of retina-thalamus-cortex connectivity. *Science*. **15**, 257–273.
33. Mercurio S., Serra L., Nicolis S.K. (2019) More than just stem cells: functional roles of the transcription factor Sox2 in differentiated glia and neurons. *Int. J. Mol. Sci*. **20**, e4540.
34. Kang P., Lee H.K., Glasgow S.M., Finley M., Donti T., Gaber Z.B., Graham B.H., Foster A.E., Novitch B.G., Gronostajski R.M., Deneen B. (2012) Sox9 and NFIA coordinate a transcriptional regulatory cascade during the initiation of gliogenesis. *Neuron*. **74**, 79–94.
35. Cheng L.C., Pastrana E., Tavazoie M., Doetsch F. (2009) miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat. Neurosci*. **12**, 399–408.
36. Ambrozkiewicz M.C., Schwark M., Kishimoto-Suga M., Borisova E., Hori K., Salazar-Lazaro A., Rusanova A., Altas B., Piepkorn L., Bessa P., Schaub T., Zhang X., Rabe T., Ripamonti S., Rosario M., Akiyama H., Jahn O., Kobayashi T., Hoshino M., Tarabykin V., Kawabe H. (2018) Polarity acquisition in cortical neurons is driven by synergistic action of Sox9-regulated Wwp1 and Wwp2 E3 ubiquitin ligases and intronic miR-140. *Neuron*. **100**, 1097–1115 e1015.
37. Cheng C.C., Uchiyama Y., Hiyama A., Gajghate S., Shapiro I.M., Risbud M.V. (2009) PI3K/AKT regulates aggrecan gene expression by modulating Sox9 expression and activity in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc. *J. Cell. Physiol*. **221**, 668–676.
38. Pataskar A., Jung J., Smialowski P., Noack F., Calegari F., Straub T., Tiwari V.K. (2016) NeuroD1 reprograms chromatin and transcription factor landscapes to induce the neuronal program. *EMBO J*. **35**, 24–45.
39. Chen Y.C., Ma N.X., Pei Z.F., Wu Z., Do-Monte F.H., Keefe S., Yellin E., Chen M.S., Yin J.C., Lee G., Minier-Toribio A., Hu Y., Bai Y.T., Lee K., Quirk G.J., Chen G. (2020) A NeuroD1 AAV-based gene therapy for functional brain repair after ischemic injury through *in vivo* astrocyte-to-neuron conversion. *Mol. Ther*. **28**, 217–234.
40. Kumamoto T., Hanashima C. (2017) Evolutionary conservation and conversion of Foxg1 function in brain development. *Dev. Growth Differ*. **59**, 258–269.
41. Hanashima C., Li S.C., Shen L., Lai E., Fishell G. (2004) Foxg1 suppresses early cortical cell fate. *Science*. **303**, 56–59.
42. Kumamoto T., Toma K., Gunadi, McKenna W.L., Kasukawa T., Katzman S., Chen B., Hanashima C. (2013) FoxG1 coordinates the switch from nonradially to radially migrating glutamatergic subtypes in the neocortex through spatiotemporal repression. *Cell Rep*. **3**, 931–945.
43. Reemst K., Noctor S.C., Lucassen P.J., Hol E.M. (2016) The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development. *Front. Hum. Neurosci*. **10**, 566.
44. Ahlgren S., Vogt P., Bronner-Fraser M. (2003) Excess FoxG1 causes overgrowth of the neural tube. *J. Neurobiol*. **57**, 337–349.
45. Hatton B.A., Knoepfler P.S., Kenney A.M., Rowitch D.H., de Alboran I.M., Olson J.M., Eisenman R.N. (2006) N-myc is an essential downstream effector of Shh signaling during both normal and neoplastic cerebellar growth. *Cancer Res*. **66**, 8655–8661.
46. Wey A., Knoepfler P.S. (2010) C-myc and N-myc promote active stem cell metabolism and cycling as architects of the developing brain. *Oncotarget*. **1**, 120–130.
47. Bird C.M., Burgess N. (2008) The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat. Rev. Neurosci*. **9**, 182–194.

Zbtb33 GENE KNOCKOUT CHANGES TRANSCRIPTION OF THE *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc* AND *FoxG1* GENES IN THE DEVELOPING MOUSE BRAIN

N. B. Illarionova[1, *], M. A. Borisova[1], E. Yu. Bazhenova[1], D. S. Zabelina[2], D. V. Fursenko[3], and A. V. Kulikov[1]

[1]*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*
[2]*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*
[3]*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*
**e-mail: nina.illarionova@gmail.com*

The transcription factor KAISO is important for proper development of animal embryos. In the cell, KAISO regulates cell division and apoptosis. KAISO is abundant in the central nervous system. Here we describe the effects of the *Zbtb33* gene knockout on the transcription of several genes that regulate the development of the central nervous system, including *Fgf9*, *Fgfr3*, *Sox9*, *Sox2*, *c-Myc*, *NeuroD1* and *FoxG1*. These genes are related to the Wnt/β-catenin signaling pathway, which is closely connected to KAISO. Hippocampus, frontal cortex, and striatum tissues of C57BL/6j mice with a knockout in the *Zbtb33* gene encoding KAISO (ZBTB33–) and wild-type mice (ZBTB33+) were collected and profiled at different stages of development. Age-dependent and region-specific differences in the mRNA levels of the *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc*, *FoxG1* genes in the developing brain of ZBTB33– and ZBTB33+ mice were described and discussed.

Keywords: Kaiso, Wnt/β-catenin signaling, *Fgf9*, *Fgfr3*, *c-Myc*, *FoxG1*, Real-time PCR, mouse, hippocampus, striatum, frontal cortex

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 3, с. 431–440

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 57.022

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ 5'-НЕТРАНСЛИРУЕМОЙ ОБЛАСТИ ГЕНОМА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ИЗ РАЗНЫХ РЕГИОНОВ СЕВЕРНОЙ ЕВРАЗИИ[1]

© 2021 г. Е. П. Пономарева[a], *, В. А. Терновой[a], Т. П. Микрюкова[a], Е. В. Протопопова[a], Н. Л. Тупота[a], В. Б. Локтев[a]

[a] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор", Кольцово, Новосибирская обл., 630559 Россия*

**e-mail: ponomareva_ep@vector.nsc.ru, ponomareva-eugenia2014@yandex.ru*

Поступила в редакцию 22.07.2020 г.
После доработки 13.10.2020 г.
Принята к публикации 15.11.2020 г.

Проведен анализ нуклеотидных последовательностей 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) геномной РНК вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), выделенной из 39 особей таежных клещей, собранных в различных регионах Северной Евразии. Идентичность последовательностей 5'-UTR сибирского и дальневосточного генотипов ВКЭ составила 89 и 95%, соответственно, в сравнении с прототипными штаммами (Заусаев и 205). Обнаруженные замены характерны для этих двух генотипов ВКЭ, что позволяет однозначно идентифицировать их. В 5'-UTR РНК выявлены вариабельные и консервативные мотивы. Наибольшей вариабельностью отличались элементы B2, C1 и C2 Y-образной структуры 5'-UTR и предполагаемый сайт связывания вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы. Элементы A2, CS A, CS B и стартовый кодон были консервативными. При этом в вариабельном элементе C1 5'-UTR ВКЭ, выделенного из клещей из различных географических районов, пять замен были строго консервативными, тогда как у лабораторных вариантов ВКЭ в этом элементе выявлено 11 различных замен. Чуть менее трети нуклеотидных замен картированы вне основных элементов Y-образной структуры. Нуклеотидные замены, как правило, локализовались в петлевых структурах, не затрагивая шпилечные области 5'-UTR ВКЭ. Полученные результаты показывают существенную вариабельность 5'-UTR геномной РНК лабораторных штаммов и полевых изолятов ВКЭ из таежных клещей, собранных в различных географических районах. Высказано предположение, что генетическая вариабельность 5'-UTR ВКЭ характерна для организации 5'-UTR генома ВКЭ и может быть структурной основой эффективной репликации ВКЭ в различных клетках птиц, млекопитающих и иксодовых клещей.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, вирусный геном, нуклеотидная последовательность, 5'-нетранслируемая область, геномная РНК

DOI: 10.31857/S0026898421030149

ВВЕДЕНИЕ

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) относится к семейству Flaviviridae, род *Flavivirus* [1]. Этот род включает относительно просто устроенные РНК-содержащие сферические оболочечные вирусы размером 40–60 нм. Геном ВКЭ представлен одноцепочечной РНК(+) длиной ~9200–11000 нуклеотидов [1]. Геномная РНК кодирует один полипротеин, который подвергается процессингу вирусными и клеточными протеазами с образованием структурных и неструктурных вирусных белков. Геномная флавивирусная РНК фланкирована 5'- и 3'-нетраслируемыми районами (UTR), принципиально важными для инициации вирусной репликации и формирования репликативного комплекса с участием вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы [2, 3]. Принято считать, что для репликации флавивирусной РНК необходима циклизация генома с образованием дцРНК из последовательностей 5'- и 3'-UTR и формированием структуры типа "сковорода с ручкой" [4–6] (рис. 1). Последовательность внутри консервативной петли "A" (A1, A2) опознается вирусной РНК-полимеразой, что необходимо для начала синтеза минус-цепи вирусной РНК.

Нуклеотидные замены в элементах CS A и CS B могут блокировать репликацию, даже если эле-

[1] Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898421030149 для авторизованных пользователей.

Сокращения: 5'-UTR – 5'-нетранслируемая область; ВКЭ – вирус клещевого энцефалита.

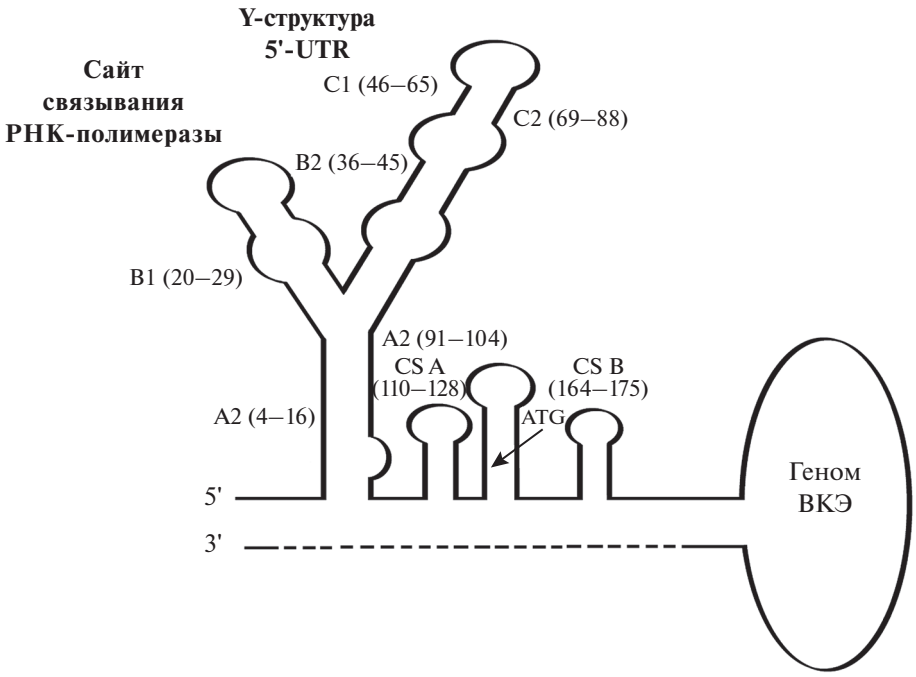


Рис. 1. Предполагаемая вторичная структура генома вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) с обозначением основных структурных элементов 5'-UTR. Вторичная структура 5'-UTR геномной РНК ВКЭ предсказана с помощью сервера MFOLD 3.4 [7].

менты не теряют способность образовывать стабильные комплексы с 3'-UTR [8]. Показано, что вариабельная область 5'-UTR геномной РНК критична для проявления вирулентности у мышей, а различия в 5'-UTR РНК природных вариантов ВКЭ приводят к различиям в эффективности репликации вируса [9, 10]. Вариабельность 5'-UTR связывают также с адаптацией вируса к новым видам хозяев. Возможно, на особенности организации 5'-UTR влияет также длительность локальной микроэволюции ВКЭ в природных экосистемах [6, 11].

В нашей работе представлены результаты изучения генетического разнообразия 5'-UTR РНК ВКЭ, выделенной непосредственно из иксодовых клещей, преимущественно *Ixodes persulcatus*, собранных в различных регионах Северной Евразии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследованные образцы. Клещей (всего 591) собирали в Новосибирской области, в районе с. Бурмистрово, в городских биотопах Томска, Екатеринбурга и Владивостока, в южных и центральных районах Республики Коми и в Алтайском крае в весенний период 2014–2015 гг. Участки для сбора выбирали в типичных местах обитания клещей: лиственные и смешанные леса с хорошо развитым травянистым покровом, вырубки с естественным возобновлением лиственных пород, луга, обочины дорог. В городской черте клещей отлавливали в парковых зонах. Сбор клещей проводили методом отлова “на флаг“ во второй половине дня, когда наблюдается максимальная активность иксодовых клещей. Клещей транспортировали на влажной салфетке в сумках-холодильниках при температуре 4°C и хранили при температуре минус 18–24°C. Для определения вида клеща секвенировали фрагмент 16S рРНК, кодируемой митохондриальным геномом [12].

Пробоподготовка. Образцы растирали в ступке с 300 мкл стерильного физраствора. Нуклеиновые кислоты выделяли из 100 мкл гомогената с использованием пяти обьемов монофазного водного раствора фенола и гуанидинизотиоцианата (ExtractRNA, “Евроген”, Россия), согласно инструкции производителя. кДНК синтезировали с использованием набора “MMLVRT kit” (“Евроген”) согласно инструкции производителя. ПЦР проводили с использованием наборов “БиоМастер LRHS-ПЦР” (“BioLabMix”, Россия) в прилагаемом буфере с олигонуклеотидными праймерами, комплементарными исследуемым локусам РНК ВКЭ [6]. Температурные параметры ПЦР (амплификатор T100, “Bio-Rad”, США): 94°C, 10 с; 58°C, 20 с; 72°C, 30 с (40 циклов); 72°C – 7 мин.

Электрофоретический анализ и выделение фрагментов ДНК из геля. Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле в буфере 1× TAE (40 мМ Трис, 2 мМ Na_2EDTA, уксусная кислота, pH 8.0). Для выделе-

ния продуктов амплификации из агарозного геля использовали набор diaGene (“Диа-М”, Россия).

Определение нуклеотидных последовательностей ДНК. Нуклеотидные последовательности продуктов амплификации определяли с использованием автоматического генетического анализатора ABI 3130*xl* (“Applied Biosystems”, США) и набора реактивов BigDye Terminatorv 3.1 Cycle Sequencing Kit (“Applied Biosystems”) согласно инструкции производителя. Нуклеотидные последовательности определяли не менее 2 раз в независимых экспериментах. Нуклеотидные последовательности выравнивали при помощи приложения Lasergene 7 (DNASTAR). Последовательности сравнения получены из базы данных GenBank. Множественное выравнивание проводили при помощи приложения AlignX программного пакета Vector NTI 11 (InforMax). Филогенетический анализ последовательностей штаммов и изолятов ВКЭ проводили при помощи программы MEGA [13]. Экспериментально определенные последовательности депонированы в GenBank под номерами: MT002379–MT002390, MT002802–MT002815, MT015646–M015648, KT205274–KT205282.

Вторичная структура 5'-UTR геномной РНК ВКЭ предсказана с помощью сервера MFOLD 3.4 [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обнаружение ВКЭ в клещах. В работе использовали 591 взрослого клеща *I. persulcatus*. Соотношение самцов и самок в выборке было примерно одинаковым. Вирусная РНК обнаружена в 39 образцах, что составило в среднем 6.6%.

Генотипирование природных изолятов ВКЭ. Определение нуклеотидной последовательности 5'-UTR вирусного генома позволило провести генотипирование 39 природных изолятов ВКЭ. Обнаружены сибирский и дальневосточный генотипы ВКЭ (рис. 2). Средний уровень идентичности 5'-UTR ВКЭ у отдельных дальневосточных клещей составил 95, 89% – у сибирского генотипа ВКЭ в сравнении с прототипными штаммами.

Анализ вариабельности 5'-UTR ВКЭ. Сравнение нуклеотидных последовательностей 5'-UTR ВКЭ выявило множественные замены с паттерном, характерным для сибирского и дальневосточного генотипов. Дальневосточные варианты отличались от прототипных лабораторных штаммов ВКЭ (205 и Заусаев) 17–22 заменами, а сибирские генотипы – 16–19. Паттерн нуклеотидных замен позволяет генотипировать изоляты ВКЭ на основе анализа относительно короткого фрагмента генома и показывает выраженную изменчивость нуклеотидной последовательности 5'-UTR у лабораторных и клещевых вариантов ВКЭ.

Замены располагались неравномерно, так анализ 5'-UTR дальневосточных и сибирских изолятов показал, что элементы B2, C1, C2 Y-образной структуры 5'-UTR (табл. 1) содержат множественные нуклеотидные замены. В то же время элементы A2, CS A и CS B и стартовый кодон не содержат или содержат единичные замены. Полученные данные подтверждают существование консервативных и вариабельных районов в 5'-UTR РНК ВКЭ. Причем районы вне основных структурных элементов 5'-UTR также содержали множественные замены. Следует отметить, что в штаммах ВКЭ, культивируемых в лабораторных условиях, количество замен в элементе C1 и вне основных доменов было в 2 раза больше, чем в природных изолятах ВКЭ. В штаммах ВКЭ, культивируемых в условиях лаборатории, накапливаются адаптивные нуклеотидные/аминокислотные замещения. Это позволяет предположить, что эти районы могут быть вовлечены в адаптацию ВКЭ к культивированию на клетках млекопитающих.

Следует отметить, что во всех 39 изолятах ВКЭ, выделенных из клещей, вариабельный элемент C1 содержит пять строго консервативных замен, абсолютно идентичных во всех сибирских вариантах. Другой вариант замен в этом же элементе характерен для всех дальневосточных ВКЭ из клещей, собранных в разных географических районах. Консервативность замен в элементе C1 клещевых изолятов и более выраженная вариабельность этого района у лабораторных штаммов ВКЭ говорят о возможной значимости этих замен для репликации вирусного генома в различных типах клеток.

Практически для всех изолятов ВКЭ из Республики Молдова характерна сдвоенная замена в позициях T(30) и T(35) на C между элементами B1 и B2 (рис. 3).

Эта сдвоенная замена ассоциирована с участком связывания вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы [14]. Одним из возможных объяснений наблюдаемой ситуации может быть участие данных замен в адаптации ВКЭ к различным природным условиям и/или к новым типам хозяев.

На рис. 4 представлена предполагаемая модель циклизации 5'-UTR ВКЭ. Стрелками показано расположение нуклеотидных замен, обнаруженных в различных изолятах ВКЭ. В рамках модели Y-структуры 5'-UTR ВКЭ выявленные нуклеотидные замены картируются преимущественно в петлевых структурах, не затрагивая шпилечные. Это дополнительно подтверждает предположение, согласно которому нуклеотидные замены в петлевых районах Y-структуры могут быть вовлечены в обеспечение эффективной репликации ВКЭ в клетках таежного клеща в различных районах Северной Евразии.

Ареал ВКЭ в основном совпадает с ареалом обитания клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus* на значительной части Северной Евразии. ВКЭ вызывает

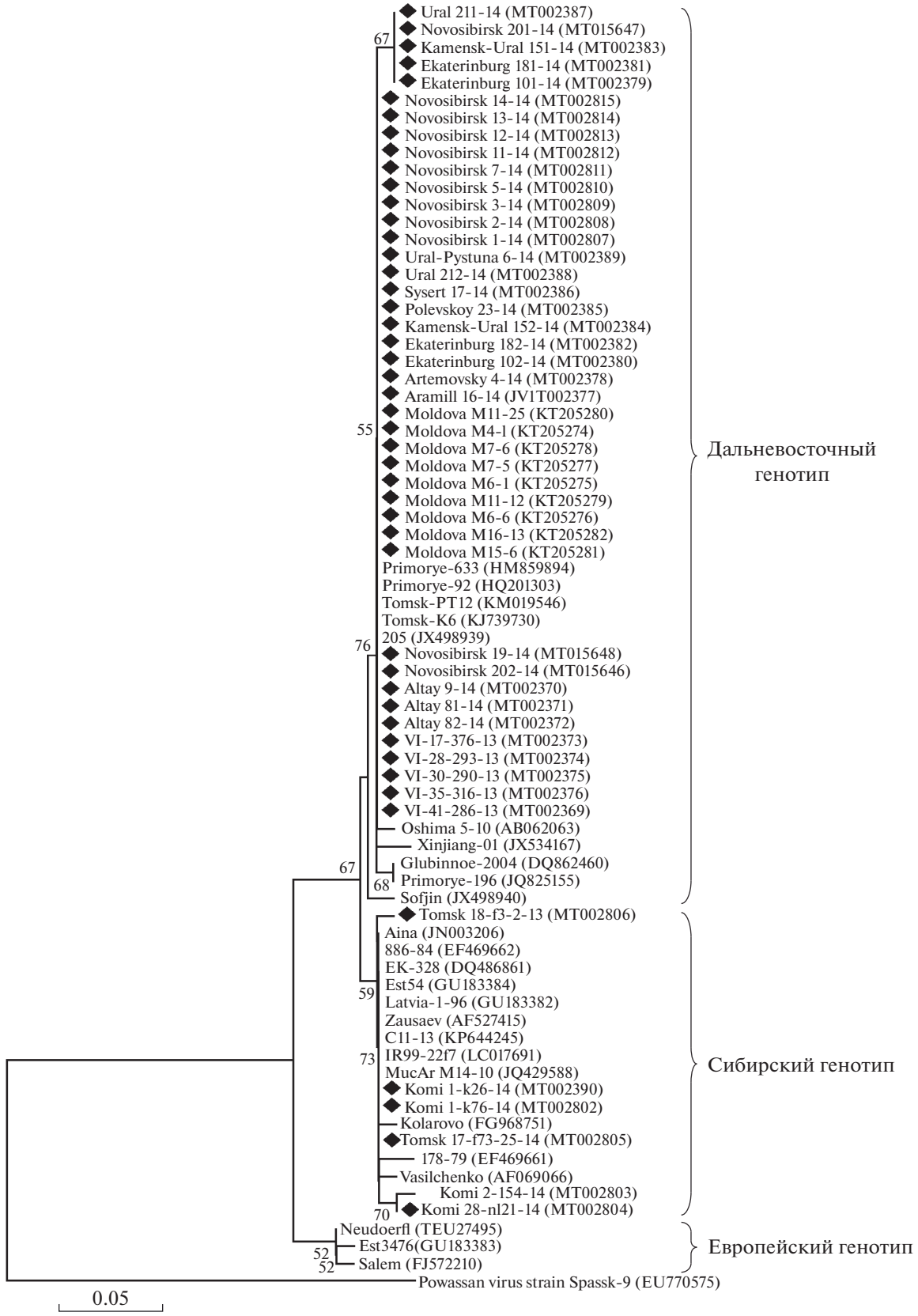


Рис. 2. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей 5'-UTR ВКЭ, выделенных из отдельных таежных клещей. Дополнено 9 последовательностями 5'-UTR ВКЭ из клещей, собранных ранее в Республике Молдова [14]. ◆ – секвенированные последовательности 5'-UTR ВКЭ. Анализ проведен методом объединения ближайших соседей с использованием двухпараметрической модели Кимуры.

клещевой энцефалит (КЭ), поражающий преимущественно центральную нервную систему человека. Максимальная заболеваемость КЭ совпадает с пиками сезонной активности иксодовых клещей, обычно весной и в начале лета. В природных очагах КЭ клещи питаются на мелких млекопитающих и птицах, многие из которых также поддерживают циркуляцию ВКЭ [15, 16]. Заболеваемость КЭ постоянно регистрируется в новых странах Западной Европы, что указывает на формирование природных очагов КЭ в районах, которые ранее считались неэндемичными по КЭ [17]. В настоящее время в странах Балтии и Словении КЭ встречается почти с такой же частотой, как и в европейской части Российской Федерации. Это предполагает, что ВКЭ должен обеспечивать репликацию собственного генома и получение вирусного потомства в различных видах хозяев. Птицы, мелкие млекопитающие и клещи обеспечивают формирование природных очагов КЭ и служат принципиальными хозяевами ВКЭ. Биологические различия клеток клещей, птиц и млекопитающих очень существенны, как и температурные факторы, необходимые для эффективной репликации ВКЭ в этих типах клеток.

Успешность адаптации ВКЭ к изменяющимся условиям может быть обеспечена определенными генетическими механизмами. Предполагается, что вариабельность нуклеотидной последовательности 5'-UTR может предопределять эффективность репликации ВКЭ в иксодовых клещах и в клетках других резервуарных хозяев в природных очагах [11]. Это предположение основано на данных о локализации в 5'-UTR геномной РНК флавивирусов сайтов связывания вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы и взаимодействии с рибосомами клетки хозяина для обеспечения синтеза вирусного полипротеина.

Проведенный ранее анализ нуклеотидной последовательности 5'-UTR геномной РНК ВКЭ, выделенной из таежных клещей, показал, что этот район вирусного генома весьма вариабелен и содержит как консервативные, так и вариабельные структурные элементы [6, 18]. В нашей работе география сбора клещей была расширена. Вирусная РНК обнаружена в 6.6% тестированных таежных клещей. Большинство изолятов ВКЭ принадлежали к дальневосточному генотипу, и только образцы из Республики Коми и Томска группировались с известными геновариантами сибирского генотипа ВКЭ. Выраженное доминирование дальневосточного генотипа ВКЭ у иксодовых клещей свидетельствует в пользу того, что в исследованных природных и городских очагах

Таблица 1. Распределение количества нуклеотидных замен в основных элементах 5'-UTR ВКЭ

Элемент 5'-UTR ВКЭ	Общее количество нуклеотидных замен в изолятах и лабораторных штаммах в сравнении с прототипными штаммами ВКЭ			
	штамм Заусаев/последовательности клещевых изолятов ВКЭ*	штамм 205/последовательности клещевых изолятов ВКЭ*	штамм Заусаев/лабораторные штаммы ВКЭ**	штамм 205/лабораторные штаммы ВКЭ**
Консервативные элементы 5'-UTR ВКЭ				
A2	0	0	1	1
CS A	0	0	0	0
ATG	0	0	0	0
CS B	1	1	2	2
Вариабельные элементы 5'-UTR ВКЭ				
B2	4	4	3	3
C1	5	5	11	11
C2	8	10	10	12
Замены вне основных элементов	8	8	19	19

Примечание. Указано общее количество нуклеотидных замен в изолятах и в лабораторных штаммах по отношению к прототипным ВКЭ (штаммы 205 и Заусаев).

* Использованы природные изоляты: Республика Молдова – 9 изолятов ВКЭ (KT205274–KT205282), Уральский регион – 13 (MT002377–MT002389), Республика Коми – 4 (MT002390, MT002802–MT002804), Томск – 2 (MT002805, MT002806), Новосибирск – 12 (MT002807–MT002815, MT015646–MT015648), Алтай – 3 (MT002370–MT002372), Владивосток – 5 (MT002369, MT002373–MT002376).

** Использованы лабораторные штаммы ВКЭ: Заусаев, Васильченко, C11-13, Коларово, Латвия-1-96, EK-328 (все сибирский генотип), 205, Глубинное-2004, Софьин, Томск-PT12, Томск K6, Oshima 5-10 (дальневосточный генотип), Neudoerf (европейский генотип).

| Элементы 5'-UTR | | | | | | | B2 | | | | | | |

| | | |

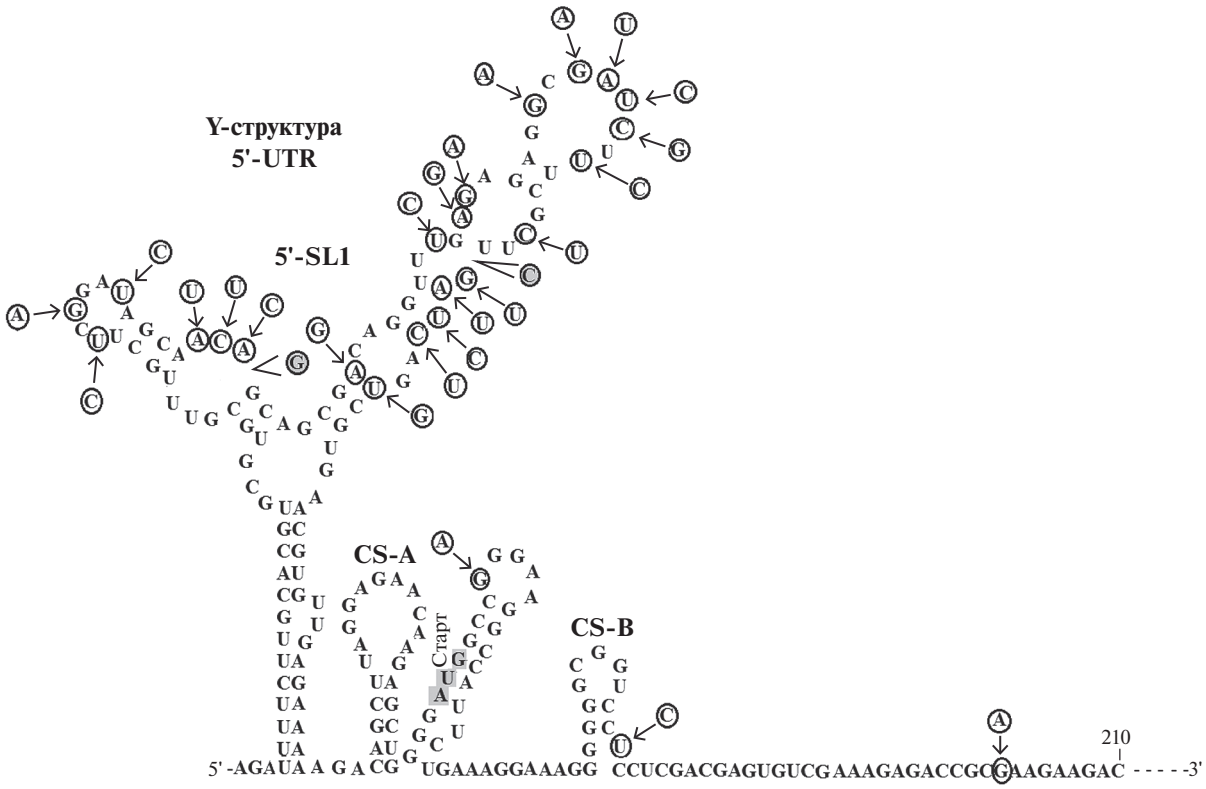


Рис. 4. Локализация нуклеотидных замещений в 5'-UTR ВКЭ таежных клещей. Стрелками показаны замещения и их позиции в 5'-UTR различных изолятов ВКЭ. Структура РНК построена на основе последовательности генома штамма 205. Вторичная структура 5'-UTR геномной РНК ВКЭ предсказана с помощью сервера MFOLD 3.4 [7].

КЭ доминирует именно дальневосточный генотип ВКЭ. Эпидемиологическая значимость широкого распространения дальневосточного генотипа ВКЭ связана с его более высокой патогенностью для человека. Так, летальность от КЭ, вызываемого вариантами ВКЭ, циркулирующими в Приморском крае, может достигать 30% и более. Европейские и сибирские геноварианты ВКЭ вызывают более легкую форму заболевания с низким уровнем летальности (1–2%) [19].

Сравнение нуклеотидных последовательностей 5'-UTR сибирских и дальневосточных клещевых вариантов ВКЭ выявило множественные нуклеотидные замены даже в относительно короткой последовательности из 181 нуклеотида. Варианты дальневосточного генотипа ВКЭ отличаются 17–22 нуклеотидными заменами от последовательности штамма Заусаев сибирского генотипа. В исследованных вариантах сибирского генотипа картированы 16–19 замен, отличающие их от штамма 205 ВКЭ. Столь выраженные генетические различия в 5'-UTR ВКЭ позволяют на основе анализа последовательности короткого фрагмента генома однозначно генотипировать различные изоляты ВКЭ в пределах сибирского и дальневосточного генотипов ВКЭ. С другой стороны, это дополнительно подтверждает существование выраженных генетических различий в 5'-UTR генома ВКЭ, изолированных из таежных клещей и собранных в различных географических регионах.

Наблюдаемые генетические отличия крайне неравномерно распределены по основным элементам 5'-UTR ВКЭ. Элементы CS A и старт-кодон ATG абсолютно консервативны, и нам не удалось выявить замен во всех секвенированных вариантах этих элементов. Консервативность элемента CS A, по всей вероятности, связана с его участием в эффективной инициации РНК-полимеразы и синтезом РНК различных флавивирусов [20]. Конформация этого района определяет как циклизацию генома, так и репликацию вирусной РНК, что предопределяет консервативность нуклеотидной последовательности данных элементов 5'-UTR генома ВКЭ.

В элементах B2, C1, C2 клещевых вариантов 5'-UTR ВКЭ выявлено от 4 до 10 замен, а в культивируемых в лаборатории штаммах ВКЭ – от 3 до 11 замен. Вне основных элементов 5'-UTR в клещевых вариантах ВКЭ обнаружено восемь замен, а в культивируемых штаммах найдено 19 замен, что позволило отнести эти районы к вариабельным последовательностям 5'-UTR. Биологический смысл подобной генетической изменчивости

может быть связан с необходимостью обеспечить репликацию вируса в различных типах клеток и в различных хозяевах. Клетки клещей существенно отличаются от клеток птиц и млекопитающих. Температура клеща фактически не отличается от температуры окружающей среды, поэтому для синтеза вирусной РНК и вирусных белков ферментные системы должны сохранять активность при пониженных температурах.

Показано, что во всех 39 изолятах ВКЭ, выделенных из клещей, вариабельный элемент C1 несет пять замен, абсолютно идентичных во всех сибирских вариантах, для дальневосточных вариантов ВКЭ характерны другие замены.

В последовательности между элементами B1 и B2 выявлены две замены в позициях T(30) и T(35) на C, характерные только для клещевых вариантов ВКЭ из Республики Молдова [14] и ассоциированные с участком связывания 5'-UTR с вирусной РНК-полимеразой. Ранее эту сдвоенную замену выявили в высокопатогенном для человека дальневосточном штамме Глубинное ВКЭ [21], который отличается высокой эффективностью синтеза вирусных белков и формирования инфекционных частиц. По этим показателям штамм Глубинное в 5–10 раз превышает прототипный штамм 205 дальневосточного генотипа ВКЭ.

Полученные данные подтверждают идею о том, что вариабельность 5'-UTR ВКЭ отражает особенности строения генома флавивирусов, обеспечивающие максимальную эффективность репликации в клетках птиц, млекопитающих и клещей. Обнаруженные множественные нуклеотидные замены, по всей вероятности, могут приводить к изменению вторичной структуры РНК 5'-UTR генома ВКЭ и имеют принципиальное значение для адаптации вируса в природных очагах к новым видам переносчиков и хозяев. Знание и понимание пределов вариабельности вирусного генома принципиально важно как для лучшей диагностики флавивирусных инфекций, так и для совершенствования профилактики и лечения КЭ.

Статья поддержана Отраслевой научно-исследовательской программой Роспотребнадзора № 141-00080-20-02.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Simmonds P., Becher B., Bukh J., Gould E.A., Meyers G., Monath T., Muerhoff S., Pletnev A., Rico-Hesse R., Smith D.B., Stapleton J.T., ICTV Report Consortium. (2017) ICTV virus taxonomy profile: flaviviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 2–3. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672
2. Markoff L. (2003) 5'- and 3'-noncoding regions in flavivirus RNA. *Adv. Virus Res.* **59**, 177–228. https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)59006-6
3. Khromykh A.A., Sedlak P.L., Westaway E.G. (2000) Cis- and trans-acting elements in flavivirus RNA replication. *J. Virol.* **74**, 3253–3263, https://doi.org/10.1128/JVI.74.7.3253-3263.2000
4. Alvarez D.E., Lodeiro M.F., Luduena, J, Pietrasanta L.I., Gamarnik A.V. (2005) Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J. Virol.* **79**, 6631–6643. https://doi.org/10.1128/JVI.79.11
5. Filomatori C.V., Lodeiro M.F., Alvarez D.E., Samsa M.M., Pietrasanta L., Gamarnik A.V. (2006) A 5' RNA element promotes dengue virus RNA synthesis on a circular genome. *Genes Dev.* **20**, 2238–2249. https://doi.org/10.1101/gad.1444206
6. Chausov E.M., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Kononova J.V., Konovalova S.N., Pershikova N.L., Loktev V.B., Romanenko V.N., Ivanova N.V., Bolshakova N.P., Moskvitina N.S. (2010) Variability of the tick-borne encephalitis virus genome in the 5' noncoding region derived from ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* in Western Siberia. *Vector-Borne Zoonotic Diseases.* **10**, 365–375. https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0064
7. Markham N.R., Zuker M. (2008) *UNAFold. Bioinformatics.* Humana Press. 3–31.
8. Alvarez D.E., Filomatori C.V., Gamarnik A.V. (2008) Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3' UTRs. *Virology.* **375**, 223–235. https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.01.014
9. Sakai M., Yoshii K., Sunden Y., Yokozawa K., Hirano M., Kariwa H. (2014) Variable region of the 3' UTR is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model. *J. Gen. Virol.* **95**, 823–835. https://doi.org/10.1099/vir.0.060046-0
10. Sakai M., Muto M., Hirano M., Kariwa H., Yoshii K. (2015) Virulence of tick-borne encephalitis virus is associated with intact conformational viral RNA structures in the variable region of the 3'-UTR. *Virus Res.* **203**, 36–40. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.03.006
11. Casati S., Gern L., Pifaretti J.-C. (2006) Diversity of the population of tick-borne encephalitis virus infecting *Ixodes ricinus* ticks in an endemic area of central Switzerland (Canton Bern). *J. Gen. Virol.* **87**, 2235–2241. https://doi.org/10.1099/vir.0.81783-0
12. Kartashov M.Y., Glushkova L.I., Mikryukova T.P., Korabelnikov I.V., Egorova Y.I., Tupota N.L., Protopopova E.V., Konovalova, S.N., Ternovoi V.A., Loktev V.B. (2017) Detection of *Rickettsia helvetica* and candidatus *R. tarasevichiae* DNA in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Northeastern European Russia (Komi Republic). *Ticks Tick-Borne Diseases.* **8**, 588–592. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.04.001
13. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary ge-

netics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739. https://doi.org/10.1093/molbev/msr121

14. Ponomareva E.P., Mikryukova T.P., Kartashov M.Y., Protopopova E.V., Chausov E.V., Konovalova S.N., Tupota N.L., Gheorghita S.D., Burlacu V.I., Ternovoi V.A., Loktev V.B. (2015) Detection of Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis viral RNA in ticks collected in the Republic of Moldova. *J. Vector Borne Diseases*. **52**, 334–336.

15. Achazi K., Ruzek D., Donoso-Mantke D., Schlegel M., Ali H.S., Wenk M., Schmidt-Chanasit J., Ohlmeyer L., Ruhe F., Vor T., Kiffner T., Kallies R., Ulrich R.G., Niedrig M. (2011) Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus. *Vector-Borne Zoonotic Diseases*. **11**, 641–647. https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0236

16. Knap N., Korva M., Dolinsek V., Sekirnik M., Trilar T., Avsic-Zupanc T. (2012) Patterns of tick-borne encephalitis virus infection in rodents in Slovenia. *Vector-Borne Zoonotic Dis. Larchmt*. **12**, 236–242. https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0728

17. Caracciolo I., Bassetti M., Paladini G., Luzzati R., Santon D., Merelli M., Sabbata G.D., Carletti T., Marcell A., D'Agaro P. (2015) Persistent viremia and urine shedding of tick-borne encephalitis virus in an infected immunosuppressed patient from a new epidemic cluster in north-eastern Italy. *J. Clin. Virol*. **69**, 48–51. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.05.019

18. Микрюкова Т.П., Чаусов Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Протопопова Е.В., Карташов М.Ю., Терновой В.А., Глушкова Л.И., Корабельников И.В., Егорова Ю.И., Локтев В.Б. (2014) Генетическое разнообразие вируса клещевого энцефалита в клещах *Ixodes persulcatus* в Северо-Восточном регионе европейской части России. *Паразитология*. **48**, 131–149.

19. Gritsun T.S., Nuttall P.A., Gould E.A. (2003) Tick-borne flaviviruses. *Adv. Virus Res*. **61**, 317–371. https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)61008-0

20. Liu Z.-Y., Li X.-F., Jiang T., Deng Y.-Q., Ye Q., Zhao H., Yu J.-Y., Qin C.-F. (2016) Viral RNA switch mediates the dynamic control of flavivirus replicase recruitment by genome cyclization. *eLife*. **5**, e17636. https://doi.org/10.7554/eLife.17636

21. Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Chausov E.V., Novikov D.V., Leonova G.N., Netesov S.V., Loktev V.B. (2007) Novel variant of tickborne encephalitis virus, Russia. *Emerg. Infect. Dis*. **13**, 1574–1578. https://doi.org/10.3201/eid1310.070158

GENETIC VARIABILITY OF 5'-UNTRASLATED REGION OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS GENOME IN VARIOUS REGIONS OF NORTHERN EURASIA

E. P. Ponomareva[1, *], V. A. Ternovoi[1], T. P. Mikryukova[1], E. V. Protopopova[1], N. L. Tupota[1], and V. B. Loktev[1]

[1]*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia*

**e-mail: ponomareva_ep@vector.nsc.ru*

The analysis of nucleotide sequences of 5'-noncoding region (5'-UTR) of tick-borne encephalitis virus (TBEV) genomic RNA isolated from 39 of taiga ticks collected in various geographical regions of Northern Eurasia was performed. The sequences of the 5'-UTR were 89 and 95% similar to that of the prototype strains of Siberian and Far Eastern TBEV genotypes, respectively (Zausaev and 205). Detected substitutions allowed unequivocal differentiation of the genotypes of TBEV. In 5'-UTR variable and conserved motifs of RNA were identifiable. Structural elements B2, C1 and C2 of the Y-shaped structure of 5'-UTR and the putative binding site for the viral RNA dependent RNA polymerase were the most variable. Elements A2, CS A and CS B as well as the start codon were conserved. Within the variable element C1, five nucleotide substitutions were strictly conserved in various geographical areas, while the laboratory TBE strain had 11 substitutions. Nearly a third of identified nucleotide substitutions were mapped outside of the main elements of the Y-shaped structure. Typically, nucleotide substitutions were located in loop structures, without affecting TBE 5'-UTR hairpins. This study points at the genetic variability of the TBE virus 5'-UTR as a common feature which may aid in effective replication of TBEV in various cell types of birds, mammals and ticks.

Keywords: encephalitis virus, genome virus, nucleotide sequences, of 5'-noncoding region, genomic RNA

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 3, с. 441–459

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 575.22:575.822:575.827.2

РОЛЬ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА В ФОРМИРОВАНИИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОМПОНЕНТЫ ПРЕЭКЛАМПСИИ

© 2021 г. В. Н. Сереброва[a], *, Е. А. Трифонова[a], В. А. Степанов[a]

[a] Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

*e-mail: vika.serebrova@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 25.09.2020 г.
После доработки 28.11.2020 г.
Принята к публикации 01.12.2020 г.

Преэклампсия – тяжелая гипертензивная патология, затрагивающая в мировом масштабе от 2 до 8% беременностей. Плохо изученный этиопатогенез, отсутствие предсказательных биомаркеров и эффективных методов лечения данного осложнения беременности определяют высокую частоту материнской и перинатальной заболеваемости и смертности. Существование расовых и этнических различий в частоте развития преэклампсии представляет интерес с точки зрения эволюционной медицины, поскольку такую вариабельность можно рассматривать в качестве побочного эффекта адаптивных изменений генетической структуры современных популяций, происходящих с момента расселения *Homo sapiens* из Африки. Нами впервые изучено генетическое разнообразие популяций Северной Евразии и мировых популяций проекта “1000 геномов” по 10 ассоциированным с преэклампсией регуляторным полиморфным вариантам, а также оценена роль естественного отбора на микроэволюционном уровне в его формировании. Показан высокий уровень межпопуляционного разнообразия, наибольший вклад в который внесли различия по частотам аллелей rs3802252 гена *NDRG1* (F_{ST} = 0.157). Выявлено действие естественного отбора для rs10423795 гена *LHB*, rs2167270 гена *LEP*, rs2227262 и rs3802252 гена *NDRG1*, rs56153523 и rs8109071 гена *SYDE1*, rs72959687 гена *INHA*. Полученные результаты соответствуют представлениям двух эволюционных гипотез возникновения преэклампсии: гипотезе “предковой предрасположенности” и гипотезе “генетического конфликта интересов”.

Ключевые слова: преэклампсия, дифференциально экспрессирующиеся гены, регуляторный однонуклеотидный полиморфизм (rSNP), популяции человека, генетическое разнообразие, естественный отбор

DOI: 10.31857/S0026898421030162

ВВЕДЕНИЕ

Преэклампсия (ПЭ) – тяжелая гипертензивная патология, частота возникновения которой варьирует в диапазоне от 2 до 8% беременностей во всем мире [1–3]. Плохо изученный этиопатогенез, отсутствие предсказательных биомаркеров и эффективных методов лечения ПЭ определяют высокую частоту материнской и перинатальной заболеваемости и смертности [1–6]. Несмотря на большое количество исследований, посвященных генетической архитектуре данной патологии, и использование различных подходов, главные гены подверженности к ПЭ не выявлены [7–9].

Изучение ПЭ в аспекте эволюционной медицины является одним из перспективных направлений поиска новых генетических маркеров, которые согласно эволюционным гипотезам могут быть вовлечены в этиопатогенез этого осложнения беременности. В этом контексте особый интерес представляют расовые и этнические различия в частотах развития ПЭ в современных популяциях человека [2, 6, 10, 11]. Так, минимальная частота данной патологии наблюдается среди монголоидов (1.2–1.9%), тогда как ее максимальные значения отмечаются у европеоидов и негроидов (2–5%) [10–12]. Примечательно, что такие различия можно рассматривать в качестве побочного результата адаптивной эволюции, действующей с момента расселения *Homo sapiens* из Африки на протяжении формирования генофондов данных попу-

Сокращения: ПЭ – преэклампсия; SNP – однонуклеотидный полиморфизм; rSNP – регуляторный SNP; ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; РХВ – равновесие Харди–Вайнберга; ПА – предковый аллель; ТФ – транскрипционный фактор.

ляций. Результаты ряда исследований свидетельствуют о том, что вариабельность частоты развития ПЭ в современных популяциях человека может зависеть от ряда факторов: количества потребляемой соли, характерного для традиционной диеты [11, 13, 14], адаптации к гипоксическому воздействию при проживании в высокогорных регионах [14, 15], различий в размерах малого таза у представительниц разных этносов [11, 16]. Таким образом, анализ роли естественного отбора на микроэволюционном уровне в формировании наследственной подверженности к ПЭ наряду с изучением средовых особенностей и традиционного образа жизни, вероятно, будет способствовать лучшему пониманию этиопатогенеза, а также причин происхождения и распространения данной патологии беременности в современных популяциях человека.

Представленная работа посвящена изучению вклада адаптивной эволюции в формирование наследственной подверженности к развитию ПЭ по системе регуляторных полиморфных вариантов (rSNP) дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), выявленных благодаря анализу транскриптома плацентарной ткани. В рамках данного исследования впервые охарактеризовано генетическое разнообразие популяций Северной Евразии и мировых популяций из проекта “1000 геномов” по ассоциированным с ПЭ 10 rSNP восьми ДЭГ (rs10985257 гена *CORO2A*, rs72959687 гена *INHA*, rs2167270 гена *LEP*, rs10423795 гена *LHB*, rs2227262, rs3802252 гена *NDRG1*, rs1671215 гена *RDH13*, rs34845949 гена *SASH1*, rs56153523 и rs8109071 гена *SYDE1*), а также оценена роль естественного отбора на микроэволюционном уровне в его формировании.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материал для исследования представлен 1880 образцами ДНК из биологической коллекции “Биобанк населения Северной Евразии” НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (табл. 1). Первая группа образцов ДНК охватывает этнические выборки из 10 популяций Северной Евразии: русские, удмурты, цезы, ханты, хакасы, киргизы, якуты, буряты, калмыки, нивхи. Численность этой группы составила 955 неродственных индивидов, не разделенных по полу, возрасту и с отсутствием метисации более чем в трех поколениях. Этническая принадлежность и родословная каждого индивида установлена в соответствии с результатами индивидуального анкетирования. Вторая группа включает 925 образцов ДНК женщин из русской (N = 498) и якутской (N = 427) популяций, которые согласно течению и исходам беременности были разделены на группу больных ПЭ (195 русских и 217 якуток) и контрольную группу с физиологическим течением беременности (303 русские и 210 якуток). Эта выборка включена в исследование на этапе проведения ассоциативного анализа 46 rSNP 21 ДЭГ с развитием ПЭ у русских и якутов [17]. В состав выборки мировых популяций вошли 1986 индивидов, представителей 20 популяций из проекта “1000 геномов” (табл. 1): ишаны, гамбийцы, лухья, менде, йоруба, финны, британцы, иберийцы, тосканцы, индийцы, индийцы телугу, пенджабцы, ланкийские тамилы, бенгальцы, китайцы (разделены в соответствии с регионом проживания на три группы), японцы, вьеты, перуанцы [18]. Суммарный объем используемых выборок составил 3866 индивидов.

Характеристику генетического разнообразия 10 популяций Северной Евразии по 10 rSNP восьми ДЭГ (rs10985257 гена *CORO2A*, rs72959687 гена *INHA*, rs2167270 гена *LEP*, rs10423795 гена *LHB*, rs56153523 и rs8109071 гена *SYDE1*, rs1671215 гена *RDH13*, rs34845949 гена *SASH1*, rs2227262 и rs3802252 гена *NDRG1*), ассоциированным с развитием ПЭ в нашем предыдущем исследовании [17, 19–22], проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием TaqMan-зондов от “Applied Biosystems” (США) и “ДНК-синтез” (Россия). Нуклеотидные последовательности праймеров доступны по запросу.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакетов программ Statistica 7.0 и Arlequin 3.1. Соответствие распределения частот аллелей и генотипов равновесию Харди–Вайнберга (РХВ) оценивали с помощью критерия χ^2. Уровень генетического разнообразия и межпопуляционной дифференциации вычисляли методом анализа молекулярной вариабельности (AMOVA). Анализ генетических взаимоотношений между 30 популяциями проводили методом главных компонент. Селективную нейтральность изученных генетических маркеров оценивали с помощью теста Юинса–Ваттерсона [23]. Роль давления отбора в формировании генетического разнообразия в группах негроидов, европеоидов и монголоидов по ассоциированным с ПЭ 10 rSNP оценивали с использованием тестов нейтральности Таджимы и Фу [24, 25].

Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Экспериментальные исследования выполнены на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом “Медицинская геномика” НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Таблица 1. Характеристика обследуемых популяционных выборок

Регион	Этнос		Локализация	N
Африка	ESN	Ишаны	Нигерия	99
	GWD	Гамбийцы	Гамбия	113
	LWK	Лухья	г. Уэбуай, Кения	99
	MSL	Менде	Сьерра-Леоне	85
	YRI	Йоруба	г. Ибадан, Нигерия	108
Западная Европа	FIN	Финны	Финляндия	99
	GBR	Британцы	Англия, Шотландия	91
	IBS	Иберийцы	Испания	107
	TSI	Тосканцы	Италия	107
Кавказ	**DAG**	Цезы	с. Бежта, с. Кидеро, респ. Дагестан, РФ	96
Восточная Европа	**UDB**	Удмурты	пос. Балезино, Удмуртская респ., РФ	91
	RUS	Русские	г. Кемерово, Кемеровская обл., РФ	96
	RUSCON*	Русские	г. Томск, Томская обл., РФ	303
	RUSPE*	Русские	г. Томск, Томская обл., РФ	195
Индостан	GIH	Индийцы	Выходцы из штата Гуджарат, проживающие в г. Хьюстон, США	103
	ITU	Индийцы телугу	Выходцы, проживающие в Великобритании	102
	PJL	Пенджабцы	г. Лахор, Пакистан	96
	STU	Ланкийские тамилы	Выходцы, проживающие в Великобритании	102
	BEB	Бенгальцы	Бангладеш	86
Центральная Азия	**KAL**	Калмыки	г. Элиста, респ. Калмыкия, РФ	96
Средняя Азия	**KGS**	Киргизы	г. Ош, Киргизия	96
Сибирь	**BUR**	Буряты	пгт Агинское, Забайкальский край, РФ	96
	KHA	Хакасы	Аскизский р-н, респ. Хакасия, РФ	96
	HAR	Ханты	д. Русскинская, ХМАО, РФ	96
	YAK	Якуты	с. Бяди, респ. Саха (Якутия), РФ	96
	YAKCON*	Якуты	г. Якутск, респ. Саха (Якутия), РФ	210
	YAKPE*	Якуты	г. Якутск, респ. Саха (Якутия), РФ	217
Восточная Азия	CDX	Китайцы	Сишуанбаньна-Дайский АО, Китай	93
	CHB	Китайцы	г. Пекин, Китай	103
	CHS	Китайцы	Южный Китай	105
	JPT	Японцы	г. Токио, Япония	104
	KHV	Вьеты	г. Хошимин, Вьетнам	99
Дальний Восток	**NIN**	Нивхи	Охинский р-н, Сахалинская обл., РФ	96
Америка	PEL	Перуанцы	г. Лима, Перу	85

Примечание. N – численность исследованной выборки (чел.), АО – автономный округ, ХМАО – Ханты-Мансийский автономный округ. Полужирным выделены популяции Северной Евразии. *Выборка, включенная в исследование на этапе проведения анализа методом случай–контроль [17]. CON – контрольная группа, PE – группа больных ПЭ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика генетического разнообразия исследуемых популяций по 10 rSNP, ассоциированным с развитием ПЭ

Распределения частот предковых аллелей (ПА) исследованных 10 rSNP в популяциях Северной Евразии и мировых популяциях из проекта "1000 геномов" приведены в табл. 2. Отклонение в соответствии распределения частот генотипов РХВ выявлено среди популяций Северной Евразии в 8% случаев, при этом накоплений по отдельным маркерам или популяциям не наблюдалось. С учетом поправки Бонферрони только три из восьми отклонений от РХВ достигли порогового уровня значимости ($p = 0.005$): rs56153523 гена *SYDE1* (в популяции удмуртов) и rs3802252 гена *NDRG1* (в популяциях цезов и нивхов). Такие результаты могут отражать как специфику популяционно-генетических процессов, происходящих в данных популяциях, так и вероятное действие естественного отбора [26]. В целом, частоты аллелей и генотипов исследуемых rSNP в популяциях Северной Евразии находятся в диапазоне, наблюдаемом в мировых популяциях проекта "1000 геномов" [18].

Все изученные rSNP полиморфны (за исключением rs2227262 гена *NDRG1*) в трех популяциях Африки (ишаны, менде, йоруба). Примечательно, что для данного rSNP характерна высокая частота ПА, при этом его минимальные значения наблюдаются среди популяций Индостана (от 77.1% у пенджабцев до 83% у индийцев). Наряду с этим наименьшая вариабельность частоты ПА в 30 популяционных выборках показана для трех rSNP: rs10985257 гена *CORO2A* (от 69.9% у цезов до 93.5% у китайцев), rs1671215 гена *RDH13* (от 58.9% у хакасов до 83.7% у японцев) и rs72959687 гена *INHA* (от 68.9% у хакасов до 94.2% у гамбийцев).

Наибольшая вариабельность частот ПА выявлена у шести rSNP: rs10423795, rs2167270, rs34845949, rs3802252, rs56153523 и rs8109071. Так, максимальная частота ПА полиморфного варианта rs10423795 гена *LHB* обнаружена у киргизов (74.7%) и хакасов (76.7%), тогда как минимальная – в популяциях финнов (38.4%), цезов (31.6%), русских (31.8%) и перуанцев (31.8%). Наибольшие значения частоты ПА rs2167270 гена *LEP* отмечены в популяциях калмыков (83.7%), бурятов (82%), китайцев (87.1%) и японцев (81.7%), минимальная частота показана у цезов (37%) и перуанцев (48.8%). Высокая частота ПА второго полиморфного варианта гена *NDRG1* – rs3802252, наблюдается в некоторых популяциях Северной Евразии (87.2% у цезов, 80.1% у удмуртов, 88.7% у калмыков, 83.5% у хакасов, 94% у нивхов), при этом его наименьшая частота характерна для популяций Индостана (от 32.6% у бенгальцев до 36.3% у индийцев телугу), Восточной Азии (34.3% у китайцев и 35.6% у японцев) и Южной Америки (20.6% у перуанцев). Максимальная частота ПА среди представителей негроидной расы отмечается у двух rSNP: rs34845949 гена *SASH1* (от 90.4% у лухья до 96% у гамбийцев) и rs56153523 гена *SYDE1* (от 87.9% у лухья до 99.5% у ишанов). Наряду с популяциями Африки высокая частота ПА наблюдается среди популяций: Кавказа (86.5% у цезов), Индостана (от 86% у бенгальцев до 93.2% у индийцев) и Южной Америки (88.8% у перуанцев) для rs34845949; Западной Европы (81.3% у британцев, 85.5% у иберийцев, 84.1% у тосканцев), Кавказа (92.7% у цезов) для rs56153523. Низкая частота ПА показана в популяциях Восточной Азии (от 59.6% у вьетов до 65% у китайцев) и популяциях Сибири (63.5% у якутов, 60.9% у бурятов), а также в популяциях Сибири (41.7% у хантов, 53.7% у якутов) и Америки (55.3% у перуанцев) для rs34845949 и rs56153523 соответственно. Кроме того, высокая частота ПА полиморфного варианта rs8109071 гена *SYDE* отмечена в популяциях Африки (от 67.7% у лухья до 79.6% у йоруба), Кавказа (87.2% у цезов) и Западной Европы (от 69.7% у финнов до 80.4% у тосканцев), тогда как минимальная частота встречается среди популяций Сибири (41.7% у хантов и 47.9% у якутов).

Генетическая дифференциация исследуемых популяций и их взаимоотношения

Характеристика степени генетической дифференциации (F_{ST}) суммарной выборки из 30 популяций по каждому из 10 rSNP представлена на рис. 1. Все изученные rSNP показали статистически значимую дифференциацию. Согласно полученным результатам, наибольший вклад в формирование межпопуляционного разнообразия вносит различие по частотам аллелей rs3802252 гена *NDRG1* (0.157), тогда как наименьшая степень генной дифференциации популяций характерна для: rs10985257 гена *CORO2A* (0.0257), rs1671215 гена *RDH13* (0.0273) и rs72959687 гена *INHA* (0.0297). Общий коэффициент генетической дифференциации суммарной выборки по изученным rSNP составил 0.0697 ($p < 0.001$).

Анализ межпопуляционных генетических взаимоотношений 10 популяций Северной Евразии, 20 мировых популяций проекта "1000 геномов" и четырех выборок русских и якутских женщин, разделенных на группу контроля и группу больных ПЭ, показал, что две первые главные компоненты объясняют 55% вариабельности частот аллелей исследуемых 10 rSNP (рис. 2). Наблюдается распределение изученных популяций по регионам: Африка (слева в области отрицательного значения первого и положительного значения второго факторов), Кавказ (слева в области отрицательных значений первого и второго факторов), Европа (слева в области отрицательных зна-

Таблица 2. Характеристика частот ПА (%) 10 rSNP в изученных популяциях

Регион	Этнос	rSNP (ген), ассоциированный с ПЭ*									
		rs10423795 (*LHB*)	rs10985257 (*CORO2A*)	rs1671215 (*RDH13*)	rs2167270 (*LEP*)	rs2227262 (*NDRG1*)	rs34845949 (*SASH1*)	rs3802252 (*NDRG1*)	rs56153523 (*SYDE1*)	rs72959687 (*INHA*)	rs8109071 (*SYDE1*)
		C	**A**	**A**	**G**	**C**	**T**	**T**	**C**	**A**	**C**
Африка	ESN	60.6	79.8	60.6	55.6	100	94.9	70.2	99.5	92.9	74.7
	GWD	53.5	80.1	59.3	57.1	98.2	96.0	64.2	91.6	94.2	77.0
	LWK	47.0	70.2	65.7	50.0	99.0	90.4	76.3	87.9	91.9	67.7
	MSL	54.7	75.3	63.5	53.5	100	93.5	72.9	94.7	94.1	74.7
	YRI	53.2	79.2	63.0	53.2	100	95.4	69.4	98.1	90.3	79.6
Западная Европа	FIN	38.4	72.2	77.8	60.1	85.4	74.7	42.9	70.7	79.3	69.7
	GBR	42.9	75.3	70.3	61.0	80.8	69.8	44.5	81.3	80.8	79.7
	IBS	40.7	79.0	69.2	64.5	90.7	71.0	47.7	85.5	82.2	78.5
	TSI	43.9	70.6	62.1	66.4	84.6	70.6	40.7	84.1	80.8	80.4
Кавказ	DAG	31.6	69.9	80.5	37.0	85.8	86.5	87.2	92.7	78.9	87.2
Восточная Европа	UDB	41.5	78.8	80.2	57.7	90.7	79.4	80.1	62.2	84.4	58.3
	RUS	31.8	81.1	79.2	63.5	86.5	68.8	50.0	75.5	82.3	74.0
	RUSCON	41.0	92.0	74.0	69.1	84.0	70.0	45.0	59.0	82.0	75.0
	RUSPE	49.0	83.0	79.0	64.9	86.0	68.0	44.0	71.0	76.0	60.0
Индостан	GIH	46.1	87.4	61.7	68.9	83.0	93.2	35.4	60.2	94.2	51.0
	ITU	48.5	80.4	64.2	70.6	80.4	88.7	36.3	61.8	91.2	53.4
	PJL	47.9	81.8	65.6	77.6	77.1	87.0	32.8	69.8	92.7	59.9
	STU	41.7	85.3	60.8	73.0	78.9	89.2	34.3	60.8	92.2	52.0
	BEB	56.4	89.5	65.7	72.7	82.0	86.0	32.6	63.4	88.4	56.4
Центральная Азия	KAL	55.5	88.0	70.3	83.7	93.1	66.3	88.7	67.4	83.7	58.9
Средняя Азия	KGS	74.7	87.7	71.9	72.9	86.3	67.7	70.3	70.9	83	61.1
Сибирь	BUR	44.7	85.8	61.7	82.8	89.9	60.9	50.0	61.5	79.7	54.7
	KHA	76.7	89.5	58.9	76.6	84.4	72.9	83.5	69.8	68.9	62.6
	HAR	58.9	76.6	77.1	67.7	82.8	76.0	76.1	41.7	91.7	41.7
	YAK	64.4	76.4	70.8	71.4	90.4	63.5	58.0	53.7	93.2	47.9
	YAKCON	59.0	96.0	67.0	73.8	84.0	78.0	52.0	48.0	88.0	41.0
	YAKPE	60.0	92.0	71.0	78.2	89.0	75.0	60.0	44.0	88.0	41.0
Восточная Азия	CDX	69.9	93.5	80.6	87.1	94.6	61.8	47.3	72.6	83.9	64.5
	CHB	64.6	88.8	81.6	78.6	87.9	65.0	41.3	80.6	80.1	66.5
	CHS	66.2	84.3	82.4	78.1	89.0	61.4	34.3	63.3	78.1	48.1
	JPT	65.4	90.4	83.7	81.7	84.1	58.2	35.6	63.0	83.2	49.0
	KHV	66.7	88.9	75.8	76.3	91.4	59.6	44.9	65.7	82.8	49.5
Дальний Восток	NIN	69.0	81.0	64.9	68.1	87.2	77.4	94.0	76.3	86.6	61.4
Америка	PEL	31.8	91.8	59.4	48.8	94.7	88.8	20.6	55.3	74.7	51.2

*Согласно данным, полученным нами ранее [17, 19–22].

Примечание. Полужирным выделены ПА. ESN – ишаны; GWD – гамбийцы; LWK – лухья; MSL – менде; YRI – йоруба; FIN – финны; GBR – британцы; IBS – иберийцы; TSI – тосканцы; DAG – цезы; UDB – удмурты; RUS – русские (CON – контрольная группа, PE – группа больных ПЭ); GIH – индийцы; ITU – индийцы телугу; PJL – пенджабцы; STU – ланкийские тамилы; BEB – бенгальцы; KAL – калмыки; KGS – киргизы; BUR – буряты; KHA – хакасы; HAR – ханты; YAK – якуты (CON – контрольная группа, PE – группа больных ПЭ); CDX, CHB, CHS – китайцы; JPT – японцы; KHV – вьеты; NIN – нивхи; PEL – перуанцы.

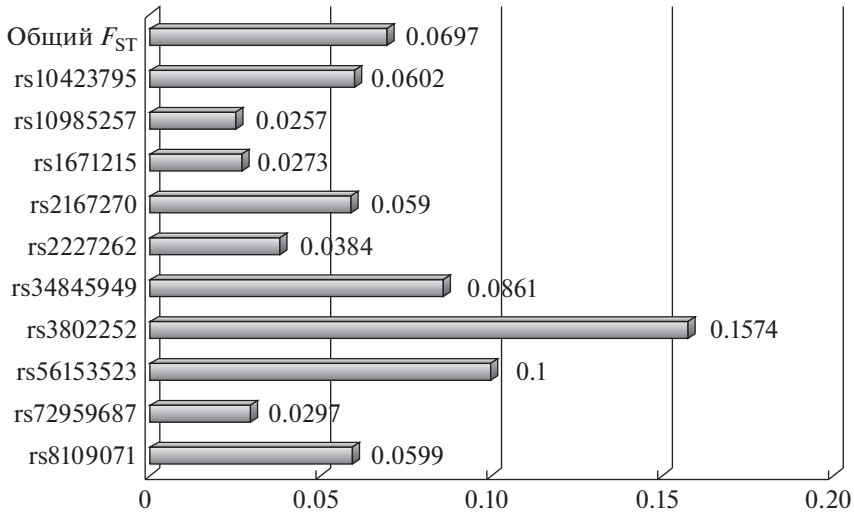


Рис. 1. Генетическая дифференциация суммарной выборки 30 исследуемых популяций по 10 rSNP, ассоциированным с развитием ПЭ.

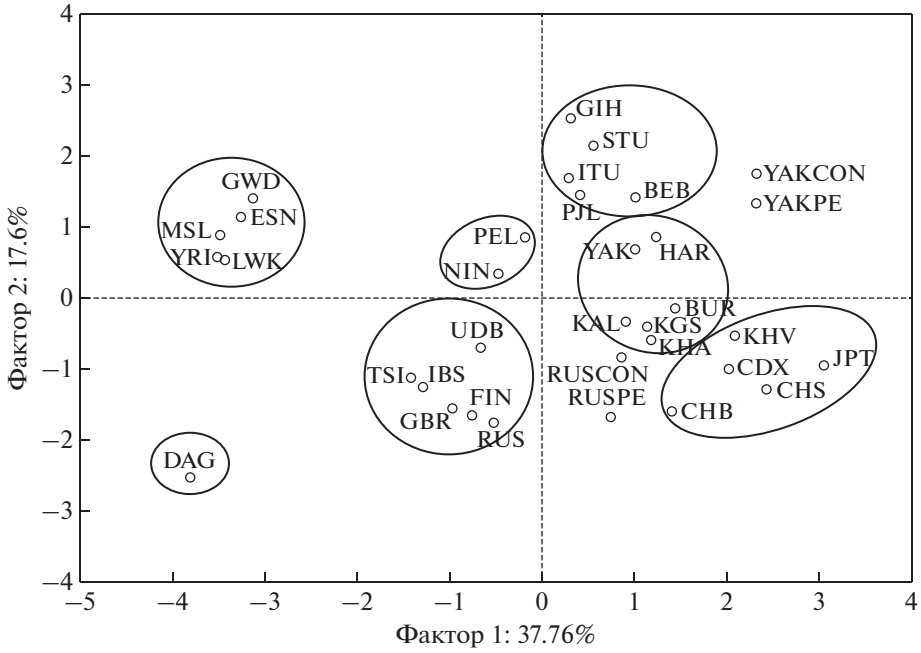


Рис. 2. Пространство главных компонент 34 популяционных выборок по частотам аллелей 10 rSNP, ассоциированных с развитием ПЭ. ESN – ишаны; GWD – гамбийцы; LWK – лухья; MSL – менде; YRI – йоруба; FIN – финны; GBR – британцы; IBS – иберийцы; TSI – тосканцы; DAG – цезы; UDB – удмурты; RUS – русские (CON – контрольная группа, PE – группа больных ПЭ); GIH – индийцы; ITU – индийцы телугу; PJL – пенджабцы; STU – ланкийские тамилы; BEB – бенгальцы; KAL – калмыки; KGS – киргизы; BUR – буряты; KHA – хакасы; HAR – ханты; YAK – якуты (CON – контрольная группа, PE – группа больных ПЭ); CDX, CHB, CHS – китайцы; JPT – японцы; KHV – вьеты; NIN – нивхи; PEL – перуанцы.

чений первого и второго факторов), Индостан (справа в области положительных значений первого и второго факторов). Отмечается выделение отдельного кластера монголоидов (справа, преимущественно в области отрицательных значений первого и второго факторов), при этом данный кластер подразделяется согласно территориальному расположению на популяции Сибири, Средней и Центральной Азии и популяции Восточной Азии. Примечательно, что выборки нивхов и перуанцев могут быть объединены в отдельный кластер (слева, в области отрицательных

значений первого и положительных значений второго факторов), что согласуется с результатами исследований, в которых показана значимая роль популяции нивхов и популяций Восточной Азии в происхождении популяций Америки [27]. Наряду с кластеризацией исследуемых популяций наблюдается кластеризация группы больных ПЭ и группы контроля у русских (справа в области положительных значений первого и отрицательных значений второго факторов) и якутов (справа в области положительных значений первого и второго факторов), что может указывать на популяционную специфичность подверженности к ПЭ.

Полученная в пространстве главных компонент картина не отражает географическое расположение данных популяций, что отличается от ожиданий нейтральной эволюции генетического разнообразия за счет миграций и генетического дрейфа в ходе расселения современного человека из Африки. Можно предположить, что такие результаты выявляют участие естественного отбора в ходе адаптации популяций к новым средовым условиям в процессе заселения новых территорий за пределами Африки.

Вклад естественного отбора в формирование генетического разнообразия популяций по изученным маркерам ПЭ

Анализ селективной нейтральности 10 rSNP по 20 мировым популяциям из проекта “1000 геномов” и 10 популяциям Северной Евразии проводили с помощью теста Юинса–Ваттерсона (табл. 3). Отклонение от селективной нейтральности выявлено у пяти rSNP: rs10423795 гена *LHB*, rs2167270 гена *LEP*, rs3802252 гена *NDRG1*, rs56153523 и rs8109071 гена *SYDE1*. Важно отметить систематическое отклонение от нейтральности rs10423795 и rs8109071 в большинстве исследуемых популяций. Кроме того, в популяциях перуанцев и бурятов показано отклонение от гипотезы селективной нейтральности максимального числа rSNP: rs2167270, rs56153523, rs8109071 и rs10423795, rs3802252, rs8109071 соответственно.

Отклонение от селективной нейтральности свидетельствует о действии направленного отбора в случае статистически значимого увеличения наблюдаемой гомозиготности (*F*o) по отношению к ожидаемой (*F*e), тогда как значимое снижение *F*o относительно *F*e характерно для балансирующего отбора [26]. Таким образом, регуляторный полиморфный вариант rs10423795 гена *LHB* находится под действием направленного отбора в 10 популяциях (гамбийцы, лухья, менде, британцы, тосканцы, индийцы, индийцы телугу, пенджабцы, бенгальцы, калмыки), тогда как сигналы балансирующего отбора выявлены только в двух популяциях (йоруба, буряты). Действие естественного отбора характерно для rs2167270 гена *LEP* в популяциях Африки (направленный отбор у ишанов, лухья, менде; балансирующий отбор у йоруба) и Америки (балансирующий отбор у перуанцев). В случае гена *NDRG1* действие естественного отбора выявлено только для rs3802252. Так, в популяциях британцев, иберийцев, бурятов и вьетов обнаружено действие направленного отбора, тогда как у финнов, русских и китайцев показано действие балансирующего отбора. Под действием направленного отбора также находятся два rSNP гена *SYDE1*: rs56153523 у якутов, перуанцев и rs8109071 у индийцев, индийцев телугу, бенгальцев, японцев, вьетов. Примечательно, что действие балансирующего отбора наблюдается только для rs8109071 у ланкийских тамилов, бурятов, якутов, китайцев и перуанцев.

Оценку роли естественного отбора в формировании уровня генетического разнообразия популяций, разделенных согласно расовой принадлежности на группы негроидов, европеоидов и монголоидов, проводили с использованием тестов нейтральности Таджимы и Фу (табл. 4) [24, 25]. Для трех исследуемых групп положительные и отрицательные значения критерия *D* Таджимы статистически значимо не отличались. Значения критерия *F*s теста Фу показали статистически значимые отличия для пяти rSNP: rs72959687 гена *INHA*, rs2227262 гена *NDRG1*, rs56153523 и rs8109071 гена *SYDE1* в группе негроидов и rs10423795 гена *LHB* в группе европеоидов. Все значения критерия *F*s имеют отрицательное значение, что может свидетельствовать как о действии очищающего отбора, так и о популяционной экспансии и миграции.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами ранее результаты [17, 19–22] свидетельствуют о важной роли 10 rSNP восьми ДЭГ в формировании наследственной подверженности к развитию ПЭ у русских и якутов. В рамках настоящей работы по данным маркерам проведен поиск сигналов естественного отбора на микроэволюционном уровне, который выявил значимый вклад адаптивной эволюции в генетическую архитектуру ПЭ по системе семи rSNP пяти ДЭГ (рис. 3). Так, действие очищающего отбора выявлено с помощью теста нейтральности Фу для rs2227262 гена *NDRG1* и rs72959687 гена *INHA*. При использовании теста Юинса–Ваттерсона отклонение от селективной нейтральности показали два rSNP: rs2167270 гена *LEP* и rs3802252 гена *NDRG1*. Кроме того, по совокупности результатов тестов Фу и Юинса–Ваттерсона действие естественного отбора обнаружено для rs10423795 гена *LHB* и rs56153523, rs8109071 гена *SYDE1*.

Таблица 3. Анализ селективной нейтральности 10 rSNP, ассоциированных с развитием преэклампсии

Регион	Популяции	Значение *Fo*/*Fe*									
		rs10423795 (*LHB*)	rs10985257 (*CORO2A*)	rs1671215 (*RDH13*)	rs2167270 (*LEP*)	rs2227262 (*NDRG1*)	rs34845949 (*SASH1*)	rs3802252 (*NDRG1*)	rs56153523 (*SYDE1*)	rs72959687 (*INHA*)	rs8109071 (*SYDE1*)
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
Африка	ESN	0.57/0.83	0.91/0.83	0.68/0.83	0.99/0.83	–	0.91/0.83	0.79/0.83	0.58/0.83	0.99/0.83	0.54/0.83
	GWD	0.99/0.83	0.74/0.83	0.9/0.83	0.84/0.83	0.94/0.83	0.71/0.84	0.91/0.84	0.88/0.83	0.94/0.83	0.99/0.83
	LWK	0.99/0.83	0.63/0.83	0.92/0.83	0.97/0.83	0.99/0.83	0.72/0.83	0.91/0.83	0.98/0.83	0.54/0.83	0.98/0.83
	MSL	0.99/0.83	0.99/0.83	0.99/0.83	0.98/0.83	–	0.7/0.83	0.93/0.82	0.91/0.83	0.83/0.83	0.98/0.82
	YRI	0.78/0.83	0.9/0.83	0.99/0.84	0.69/0.84	–	0.51/0.83	0.92/0.83	0.94/0.83	0.98/0.83	0.66/0.83
Западная Европа	FIN	0.51/0.83	0.97/0.83	0.99/0.83	0.93/0.83	0.99/0.83	0.99/0.83	0.64/0.83	0.99/0.83	0.99/0.83	0.74/0.83
	GBR	0.99/0.83	0.99/0.82	0.54/0.83	0.67/0.83	0.99/0.83	0.99/0.83	0.94/0.83	0.99/0.83	0.85/0.83	0.73/0.83
	IBS	0.51/0.83	0.98/0.83	0.81/0.83	0.91/0.83	0.71/0.83	0.5/0.83	0.95/0.83	0.54/0.83	0.52/0.83	0.98/0.83
	TSI	0.99/0.84	0.9/0.83	0.99/0.83	0.98/0.83	0.52/0.83	0.53/0.83	0.99/0.83	0.61/0.83	0.99/0.83	0.55/0.83
Кавказ	DAG	0.62/0.83	0.87/0.82	0.96/0.83	0.99/0.83	0.63/0.83	0.54/0.83	0.76/0.82	0.98/0.83	0.64/0.83	0.95/0.83
Восточная Европа	RUS	0.87/0.83	0.5/0.82	0.63/0.83	0.92/0.83	0.99/0.83	0.85/0.83	0.81/0.83	0.54/0.83	0.57/0.83	0.96/0.83
	UDB	0.97/0.83	0.99/0.82	0.99/0.83	0.9/0.83	0.56/0.83	0.98/0.83	0.99/0.82	0.94/0.82	0.82/0.83	0.69/0.83
Индостан	BEB	0.99/0.82	0.71/0.83	0.91/0.83	0.98/0.83	0.77/0.83	0.6/0.83	0.57/0.82	0.85/0.83	0.99/0.83	0.94/0.83
	GIH	0.99/0.83	0.72/0.83	0.6/0.83	0.85/0.83	0.81/0.83	0.53/0.83	0.68/0.83	0.51/0.83	0.55/0.83	0.99/0.83
	ITU	0.89/0.83	0.94/0.83	0.99/0.83	0.99/0.83	0.96/0.83	0.67/0.83	0.67/0.83	0.74/0.83	0.83/0.83	0.99/0.83
	PJL	0.98/0.83	0.55/0.83	0.99/0.83	0.96/0.83	0.99/0.83	0.69/0.83	0.97/0.83	0.98/0.83	0.84/0.83	0.61/0.83
	STU	0.99/0.83	0.77/0.83	0.77/0.83	0.93/0.83	0.9/0.83	0.94/0.83	0.96/0.83	0.76/0.83	0.99/0.83	0.82/0.83

Таблица 3. Окончание

Регион	Популяции	Значение *Fo*/*Fe*									
		rs10423795 (*LHB*)	rs10985257 (*CORO2A*)	rs1671215 (*RDH13*)	rs2167270 (*LEP*)	rs2227262 (*NDRG1*)	rs34845949 (*SASH1*)	rs3802252 (*NDRG1*)	rs56153523 (*SYDE1*)	rs72959687 (*INHA*)	rs8109071 (*SYDE1*)
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*10*	*11*	*12*
Центральная Азия	KGS	0.65/0.83	0.87/0.82	0.97/0.83	0.77/0.83	0.79/0.83	0.52/0.83	0.88/0.83	0.85/0.83	0.8/0.83	0.9/0.82
Сибирь	HAR	0.92/0.83	0.94/0.83	0.99/0.83	0.98/0.83	0.75/0.83	0.98/0.83	0.98/0.83	0.61/0.83	0.99/0.83	0.95/0.83
	YAB	0.77/0.83	0.98/0.83	0.99/0.83	0.92/0.83	0.93/0.83	0.99/0.83	0.75/0.82	0.99/0.83	0.99/0.83	0.81/0.83
	BUR	0.75/0.83	0.87/0.83	0.61/0.83	0.96/0.83	0.79/0.83	0.98/0.83	0.98/0.83	0.78/0.83	0.86/0.83	0.78/0.83
	KHA	0.99/0.83	0.53/0.82	0.97/0.83	0.98/0.83	0.81/0.83	0.84/0.83	0.96/0.82	0.59/0.83	0.6/0.83	0.99/0.83
Средняя Азия	KAL	0.83/0.83	0.98/0.83	0.64/0.83	0.76/0.83	0.99/0.83	0.94/0.83	0.59/0.82	0.82/0.83	0.99/0.83	0.52/0.83
Восточная Азия	CDX	0.99/0.83	0.77/0.83	0.96/0.83	0.87/0.83	0.96/0.83	0.57/0.83	0.5/0.83	0.93/0.83	0.77/0.83	0.99/0.83
	CHB	0.97/0.83	0.62/0.83	0.97/0.83	0.52/0.83	0.99/0.83	0.98/0.83	0.99/0.84	0.93/0.83	0.95/0.83	0.97/0.83
	CHS	0.99/0.83	0.55/0.83	0.99/0.83	0.99/0.83	0.51/0.83	0.94/0.83	0.93/0.83	0.72/0.83	0.99/0.83	0.65/0.83
	JPT	0.99/0.83	0.85/0.83	0.82/0.83	0.92/0.83	0.75/0.83	0.61/0.83	0.97/0.83	0.73/0.83	0.93/0.83	0.97/0.83
	KHV	0.87/0.83	0.98/0.83	0.5/0.83	0.99/0.83	0.93/0.83	0.77/0.83	0.89/0.83	0.55/0.83	0.97/0.83	0.87/0.83
Дальний Восток	NIN	0.51/0.83	0.94/0.82	0.93/0.83	0.99/0.83	0.98/0.83	0.54/0.83	0.55/0.83	0.53/0.83	0.88/0.83	0.52/0.83
Америка	PEL	0.72/0.82	0.63/0.83	0.83/0.82	0.66/0.83	0.74/0.83	0.55/0.83	0.92/0.83	0.95/0.82	0.5/0.82	0.52/0.83

Примечание. *Fo* – наблюдаемая гомозиготность, *Fe* – ожидаемая гомозиготность. Серым выделены значения *Fo*/*Fe*, для которых показано статистически значимое отклонение от селективной нейтральности ($p < 0.05$). Темно-серым отмечены значения, свидетельствующие о действии направленного отбора (при *Fo* > *Fe*), тогда как светло-серым цветом показано возможное действие балансирующего отбора (при *Fo* < *Fe*). ESN – ишаны; GWD – гамбийцы; LWK – лухья; MSL – менде; YRI – йоруба; FIN – финны; GBR – британцы; IBS – иберийцы; TSI – тосканцы; DAG – цезы; UDB – удмурты; RUS – русские (CON – контрольная группа, PE – группа больных ПЭ); GIH – индийцы; ITU – индийцы телугу; PJL – пенджабцы; STU – ланкийские тамилы; BEB – бенгальцы; KAL – калмыки; KGS – киргизы; BUR – буряты; KHA – хакасы; HAR – ханты; YAK – якуты (CON – контрольная группа, PE – группа больных ПЭ); CDX, CHB, CHS – китайцы; JPT – японцы; KHV – вьеты; NIN – нивхи; PEL – перуанцы.

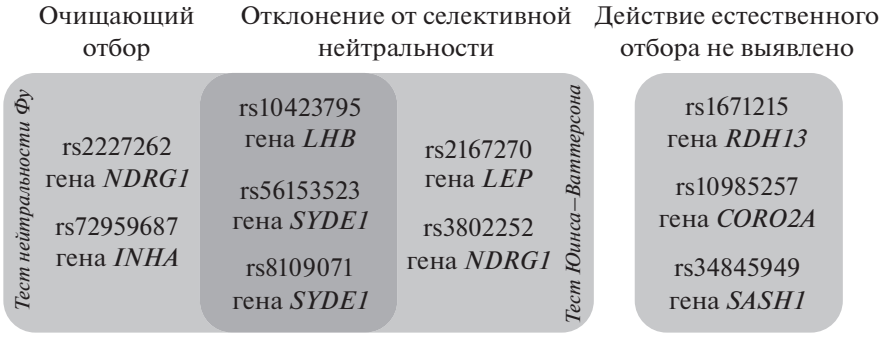


Рис. 3. Вклад естественного отбора на микроэволюционном уровне в формирование наследственной подверженности к преэклампсии (ПЭ).

Продукты ДЭГ, биологические процессы и белок-белковые взаимодействия с их участием. Предполагаемая роль выявленных факторов транскрипции в этиопатогенезе ПЭ

Гены, rSNP которых находятся под действием естественного отбора, это новые гены-кандидаты ПЭ, выявленные благодаря анализу транскриптома плацентарной ткани [28–35]. Несмотря на то что функции большинства ДЭГ изучены недостаточно, результаты ряда исследований позволяют сделать выводы об их возможном вкладе в развитие ПЭ, основанные на характеристике молекулярных механизмов и функций продуктов данных генов (табл. 5).

Функциональная аннотация пяти ДЭГ проведена с помощью онлайн ресурса “WebGestalt”. Выявлено 10 категорий Gene Ontology (включающих различные биологические процессы и молекулярные функции), в которые вовлечены два и более исследуемых ДЭГ. Гены *INHA* и *LEP* представлены в шести категориях биологических процессов, связанных с секрецией фолликулостимулирующего гормона (ФСГ, GO:0046884, 1.3×10^{-6}), регуляцией секреции ФСГ (GO:0046880, 9×10^{-7}), положительной регуляцией секреции ФСГ (GO:0046881, 9×10^{-7}), секрецией гонадотропинов (GO:0032274, 6.3×10^{-6}), регуляцией секреции гонадотропинов (GO:0032276, 3.3×10^{-6}), положительной регуляцией секреции гонадотропинов (GO:0032278, 1.3×10^{-6}). Для трех ДЭГ (*INHA*, *LEP*, *LHB*) выявлены три категории биологических процессов, связанных с дифференциацией пола (GO:0007548, 3×10^{-5}), развитием первичных половых признаков (GO:0045137, 1.7×10^{-5}), развитием гонад (GO:0008406, 1.6×10^{-5}), и одна категория молекулярных функций, связанная с

Таблица 4. Значение тестов нейтральности Таджимы и Фу

rSNP	Тест Таджимы			Тест Фу		
	Критерий *D* (rank score)			Критерий *F*s (rank score)		
	YRI	CEU	CHB	YRI	CEU	CHB
rs10423795	0.2 (0.1)	1.2 (0.1)	0.7 (0.1)	–149.4 (1.0)	–130.0 (**1.4**)	–124.2 (1.1)
rs10985257	–0.2 (0.2)	0.3 (0.3)	1.3 (0.3)	–159.9 (1.1)	–111.2 (1.2)	–93.6 (0.9)
rs1671215	0.1 (0.1)	0.8 (0.1)	0.7 (0.1)	–114.8 (0.6)	–62.3 (0.7)	–79.1 (0.7)
rs2167270	–0.8 (0.6)	–0.5 (0.6)	–0.5 (0.6)	–107.8 (0.6)	–45.4 (0.5)	–23.1 (0.2)
rs2227262	–0.7 (0.5)	0.6 (0.2)	0.2 (0.2)	–207.6 (**2.2**)	–113.4 (1.2)	–104.6 (0.9)
rs34845949	–0.1 (0.1)	1.0 (0.1)	0.9 (0.1)	–69.8 (0.3)	–60.6 (0.7)	–59.2 (0.6)
rs3802252	–0.5 (0.3)	–0.2 (0.5)	1.1 (0.5)	–143.7 (0.9)	–54.9 (0.6)	–62.6 (0.6)
rs56153523	–0.4 (0.3)	0.6 (0.2)	1.2 (0.2)	–188.2 (**1.7**)	–84.1 (0.9)	–113.8 (1.0)
rs72959687	–0.9 (0.7)	0.5 (0.2)	1.0 (0.2)	–176.5 (**1.4**)	–76.7 (0.8)	–123.5 (1.1)
rs8109071	–0.3 (0.2)	1.5 (0.0)	1.9 (0.0)	–180.8 (**1.5**)	–86.1 (0.9)	–97.7 (0.9)

Примечание. Изученные группы разделены согласно расовой принадлежности, где CEU – европеоиды, CHB – монголоиды, YRI – негроиды. Критерий rank score – ранговое значение, равное –lg(p), где p – уровень значимости. Статистически значимые отличия выявлены при значении критерия rank score > 1.3 (выделены полужирным), что соответствует уровню значимости $p < 0.05$.

гормональной активностью (GO:0005179, 2.5 × × 10^{-6}). Наряду с этим, два ДЭГ (*NDRG1*, *SYDE1*) не обладают статистически значимой общностью биологических функций.

Взаимоотношения продуктов пяти ДЭГ охарактеризованы с помощью онлайн ресурса “STRING” [45]. Транскрипционные факторы (ТФ), взаимодействующие с семью rSNP, ассоциированными с развитием ПЭ, идентифицировали с использованием ресурса “RegulomeDB” [46]. Согласно полученным данным, семь rSNP пяти ДЭГ располагаются в сайтах связывания с 87 ТФ, из которых 21 ТФ общий для двух и более изученных генов. В дальнейший анализ включены семь общих наиболее значимых ТФ: MYC, SP1, POLR2A, CEBPB, CEBPG, RAD21, BHLHE40. В качестве критериев выбора использовали: количество исследуемых rSNP, локализованных в сайтах связывания с каждым ТФ; функциональную значимость выявленных ТФ; степень и эффекты взаимодействия ТФ с продуктами пяти ДЭГ и между собой. На рис. 4 представлена характеристика белок-белковых взаимодействий пяти ДЭГ и семи ТФ.

Согласно полученным данным, включенные в исследование ТФ могут играть значимую роль в этиопатогенезе ПЭ. Так, модулятор окислительного стресса CEBPB (CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta) участвует в пролиферации и дифференцировке клеток, иммунных и воспалительных ответах [47, 48]. ТФ CEBPB контролирует процесс децидуализации у мышей, тогда как у человека он играет значимую роль в имплантации эмбриона и поддержании беременности [48, 49]. Показано, что сверхэкспрессия CEBPB, которая возникает в условиях гипоксии, приводит к нарушению инвазии вневорсинчатого трофобласта, поверхностной плацентации и развитию ПЭ [50, 51]. В сайтах связывания с данным ТФ расположены rs2167270 гена *LEP* и rs8109071 гена *SYDE1*. Поскольку эти гены участвуют в продукции провоспалительных медиаторов, способствуют клеточной миграции и формированию воспалительного ответа [44, 52, 53], можно предположить, что посредством ТФ

Таблица 5. Характеристика ДЭГ, rSNP которых находятся под действием естественного отбора на микроэволюционном уровне

Ген (продукт гена)	Основные функции и их возможная роль в этиопатогенезе ПЭ	Ссылка
INHA (α-субъединица белковых комплексов ингибина A и B)	Ингибины являются факторами роста и дифференцировки. При ПЭ наблюдается увеличение уровня ингибина A в плаценте и сыворотке, происходящее преимущественно за счет клеток трофобласта. Высокий уровень ингибина A может играть компенсаторную роль в восстановлении функций плаценты	[31–34, 36, 37]
LEP (лептин)	Лептин обладает провоспалительными свойствами, в высоких концентрациях вызывает развитие гипертонии. Экспрессия плацентарного лептина поддерживает имплантацию, рост плаценты, защищает клетки от апоптоза. При ПЭ наблюдается гиперлептинемия и сверхэкспрессия данного гена в плаценте	[29–35, 38–41]
LHB (β-полипептид лютеинизирующего гормона)	Способствует сперматогенезу и овуляции, стимулируя семенники и яичники к синтезу стероидов. При ПЭ наблюдается повышение β-полипептида лютеинизирующего гормона в плаценте и сыворотке, что может быть следствием изменений в физиологии трофобласта	[28, 32, 35]
NDRG1 (цитоплазматический белок суперсемейства гидролаз)	Белок NDRG1 обладает цитопротективными свойствами. Сверхкспрессия гена *NDRG1* в условиях гипоксии обеспечивает дифференцировку и уменьшение степени повреждения клеток трофобласта. Для ПЭ характерно повышение уровня экспрессии данного гена	[30–32, 42, 43]
SYDE1 (белок, активирующий GTPазу, гомолог 1)	Белок SYDE1 участвует в клеточной миграции, инвазии и ремоделировании цитоскелета, способен стимулировать миграцию клеток трофобласта. Ген *SYDE1* сверхэкспрессируется в плаценте при ПЭ	[30, 44]

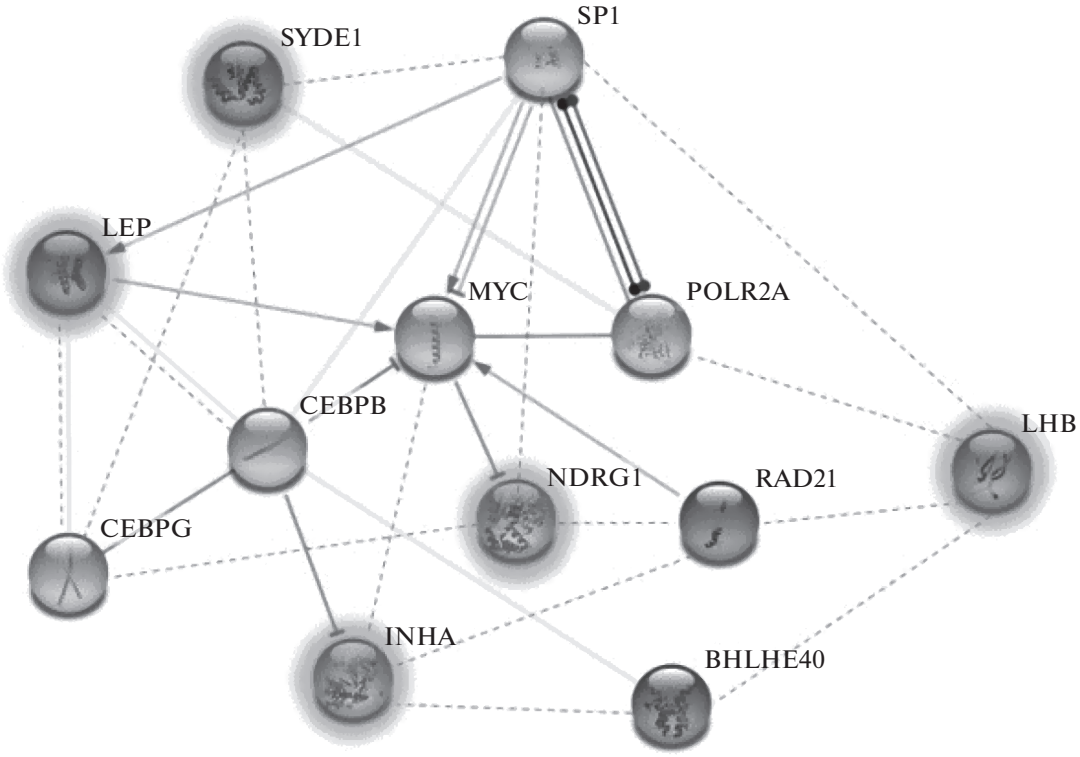


Рис. 4. Характеристика белок-белковых взаимодействий продуктов пяти ДЭГ и семи ТФ. Белки изображены в виде кругов, подсвечиванием выделены продукты исследуемых пяти ДЭГ. Толщина прямых линий отражает степень доказательности функциональной связи между белками. Знаки на концах линий характеризуют эффекты белок-белковых взаимодействий: стрелка – положительный, перпендикулярная линия – негативный, круг – неспецифичный. Пунктирной линией соединены ТФ и белки, rSNP в генах которых расположены в сайтах связывания с данными ТФ.

CEBPB они могут вносить существенный вклад в этиопатогенез ПЭ на стадии формирования плаценты.

Еще одна важная функция ТФ CEBPB заключается в подавлении транскрипции гена *INHA*, кодирующего α-субъединицу белковых комплексов ингибина A и B (рис. 4). Показано, что ингибины принадлежат к суперсемейству TGF-β и являются факторами роста и дифференцировки, участвуют в регуляции апоптоза, иммунного ответа и секреции гормонов. Следует отметить, что исследуемый в данной работе rs72959687 гена *INHA* находится в сайтах связывания с ТФ MYC (MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor). Примечательно, что ТФ CEBPB проявляет репрессорную активность в отношении ТФ MYC [54] (рис. 4). Такое взаимодействие приводит к смещению дифференцировки Т-клеток в сторону Т-хелперов второго типа, которые играют важную роль в успешном протекании беременности путем регулирования иммунного ответа на плод [3]. На сегодняшний день известно, что ТФ MYC контролирует клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз [55], способен ингибировать транскрипцию гена *NDRG1* (рис. 4), продукт которого обладает цитопротективными свойствами [42, 43, 56]. Кроме того, в клетках цитотрофобласта наблюдается повышение уровня экспрессии ТФ MYC, который участвует в пролиферации данных клеток [57]. Также отмечено, что сверхэкспрессия ТФ MYC в цитотрофобласте препятствует его дифференцировке в синцитиотрофобласт [57, 58]. Интересно, что цитостатическую активность ТФ CEBPB ингибирует образование гетеродимера с ТФ CEBPG (CCAAT/Enhancer Binding Protein Gamma), который способствует пролиферации клеток [59] (рис. 4). ТФ CEBPG экспрессируется во всех клетках млекопитающих, однако его регуляторные функции не были охарактеризованы. Показано, что в сайтах связывания с данным ТФ расположены три rSNP: rs2167270 гена *LEP*, rs3802252 гена *NDRG1*, rs8109071 гена *SYDE1*.

Следующий выявленный ТФ BHLHE40 (Basic Helix-Loop-Helix Family Member E40) – белок E40 с основным доменом спираль–петля–спираль, модулирующий хондрогенез в рамках cAMP-сигнального пути. Этот ТФ обладает репрессорной активностью, участвует в различных биологических процессах, в том числе в контроле циркадного ритма и клеточной дифференцировке. Повышение его экспрессии регулируется многочисленными стимулами, включая ретиноевую

кислоту, TGFβ, cAMP, цитокины, инсулин и гипоксию [60]. Важно отметить, что в плацентарной ткани при ПЭ наблюдается сверхэкспрессия ТФ BHLHE40 [30–32, 60], в сайтах связывания которого располагаются rs10423795 гена *LHB* и rs72959687 гена *INHA*.

ТФ RAD21 (RAD21 Cohesin Complex Component) участвует в когезии сестринских хроматид, правильной сегрегации хромосом, репликативной репарации ДНК. Примечательно, что в интерфазе когезины могут контролировать экспрессию генов. Кроме того, ТФ RAD21 может влиять на риск развития ПЭ посредством регуляции клеточного цикла [61]. Согласно полученным данным, в сайтах связывания с ТФ находятся четыре rSNP (rs10423795 гена *LHB*, rs72959687 гена *INHA*, rs2227262 и rs3802252 гена *NDRG1*), также показана функциональная связь между ТФ RAD21 и ТФ MYC (рис. 4).

Интерес представляет ТФ SP1 (Specificity Protein 1), который может активировать или подавлять транскрипцию большого количества генов в ответ на физиологические и патологические стимулы [57]. Данный ТФ активируется в условиях гипоксии, участвует в воспалительном ответе и различных биологических процессах, таких как ангиогенез, рост и дифференцировка клеток [62, 63]. В плаценте ТФ SP1 участвует в дифференцировке цитотрофобласта и регуляции экспрессии нескольких белков [64], а также может играть важную роль в дифференцировке и развитии клеток эмбриона, децидуализации эндометрия [63]. Для ПЭ характерен низкий уровень экспрессии SP1 в плацентарной ткани [63, 65, 66]. Примечательно, что в сайтах связывания ТФ SP1 расположены rs10423795 гена *LHB*, rs2227262 и rs3802252 гена *NDRG1*, rs8109071 гена *SYDE1*. Кроме того, выявлены белок-белковые взаимодействия ТФ SP1 и MYC, а также образование связи между SP1 и ТФ POLR2A (рис. 4).

Последний общий ТФ – POLR2A (RNA Polymerase II Subunit A), крупнейший каталитический компонент РНК-полимеразы II, который взаимодействует с тремя rSNP: rs10423795 гена *LHB*, rs2227262 и rs3802252 гена *NDRG1*. Можно предположить, что такое взаимодействие приводит к активации транскрипции генов *LHB* и *NDRG1*, необходимой для защиты клеток трофобласта в условиях гипоксии [43, 67], тогда как недостаточный уровень их экспрессии способствует развитию патологического процесса.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о важной роли пяти ДЭГ, rSNP которых находятся под действием естественного отбора, в развитии ПЭ на ранних этапах формирования плаценты. Кроме того, семь исследованных rSNP располагаются в сайтах связывания общих ТФ, что, вероятно, указывает на их вовлеченность в общие молекулярно-генетические механизмы этиопатогенеза ПЭ.

Соответствие полученных результатов эволюционным гипотезам, объясняющим происхождение ПЭ

Сформулировано большое количество эволюционных гипотез, объясняющих причины возникновения ПЭ [11, 13–15, 68–74]. Однако до настоящего времени ни одна из гипотез не была подтверждена, поскольку существовали лишь косвенные свидетельства возможного вклада естественного отбора в формирование данной патологии [4, 75–79]. Результаты нашего предыдущего исследования впервые показали значимую роль слабого очищающего отбора на макроэволюционном уровне в ряду представителей эволюционной линии парвотряда Catarrhini (макак-резус, орангутан, шимпанзе, человек) в формировании наследственной предрасположенности к ПЭ по четырем rSNP: rs2227262 гена *NDRG1* [17, 20], rs10985257 гена *CORO2A* [17, 21], rs72959687 гена *INHA* и rs34845949 гена *SASH1* [17]. Следует отметить, что полученные результаты согласуются с гипотезой M.G. Elliot о “случайном закреплении” неблагоприятного фенотипа для rs2227262 гена *NDRG1* [68] и гипотезой “генетического конфликта интересов” D. Haig [69] для rs10985257 гена *CORO2A*, rs72959687 гена *INHA* и rs34845949 гена *SASH1*.

В настоящей работе впервые выявлен вклад естественного отбора на микроэволюционном уровне в формирование генетической архитектуры ПЭ по семи rSNP пяти ДЭГ (рис. 3 и 5). Примечательно, что с развитием ПЭ у русских (rs10423795 гена *LHB*, rs56153523 гена *SYDE1*) и якутов (rs2227262 и rs3802252 гена *NDRG1*) ассоциирован ПА (рис. 5*б*), что, вероятно, соответствует гипотезе “предковой предрасположенности” [80]. Согласно этой гипотезе, адаптивные для древних популяций человека ПА могут оказывать вредное воздействие в случае изменения условий окружающей среды и образа жизни, которые происходили с момента расселения современного человека из Африки. Важное значение также имеют ассоциации производных аллелей трех rSNP (rs2167270 гена *LEP*, rs72959687 гена *INHA*, rs8109071 гена *SYDE1*) с ПЭ у русских (рис. 5*в*), поскольку такие результаты можно рассматривать с точки зрения гипотезы “генетического конфликта интересов” [69]. Основной причиной возникновения ПЭ может быть действие отбора как на гены плода, которые повышают поступление питательных веществ, так и на гены матери, направленные на сохранение общих ресурсов организма посредством ограничения потребностей плода. Следует отметить, что гипотеза “генетического конфликта интересов” является частным случаем гипотезы “Черной королевы”

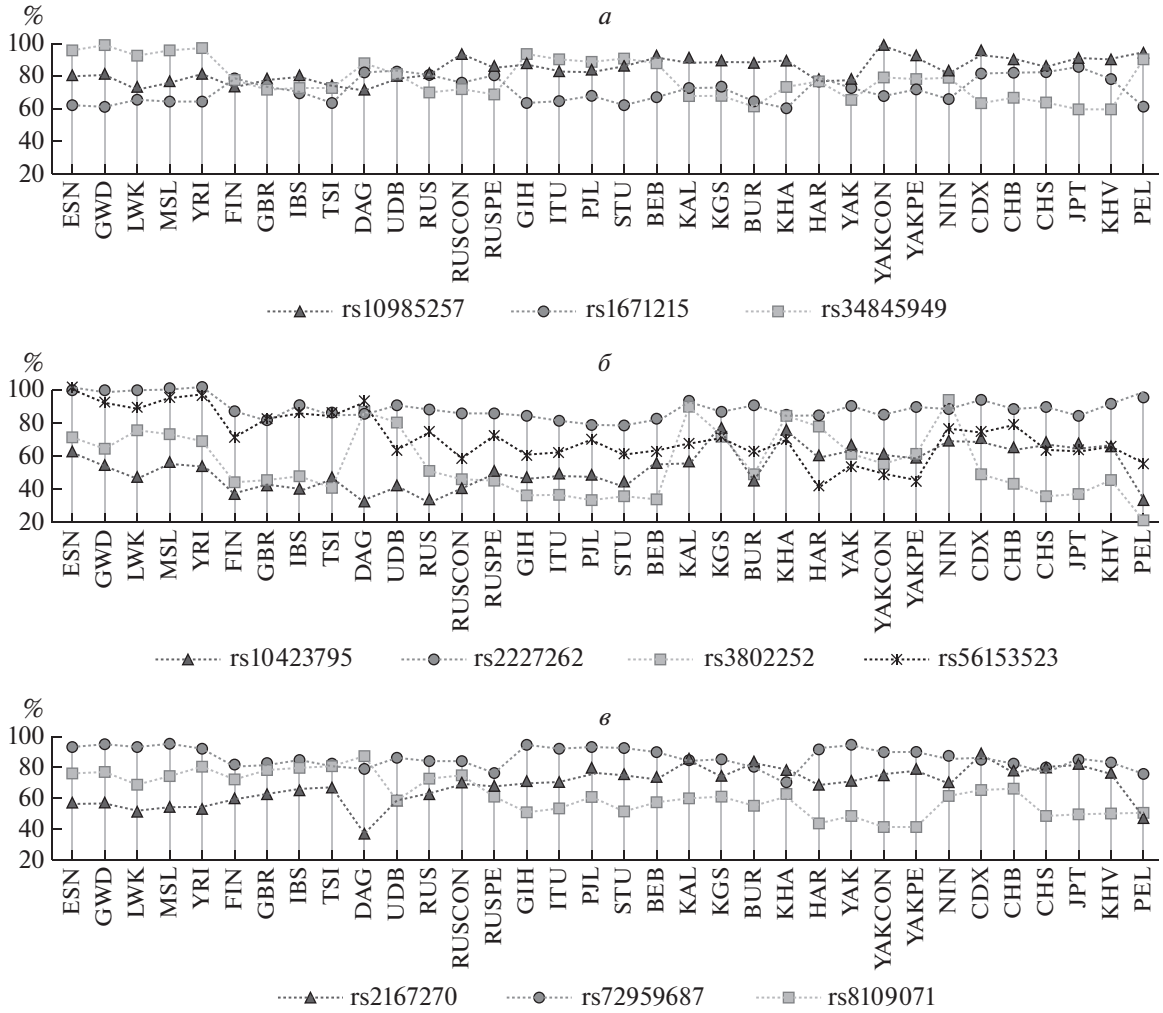


Рис. 5. Частоты предковых аллелей (ПА) 10 rSNP в изученных популяциях. Частоты ПА трех rSNP, действие естественного отбора на которые не выявлено (*а*). Частоты ПА четырех rSNP, находящихся под действием естественного отбора, с развитием ПЭ ассоциирован ПА (*б*). Частоты ПА трех rSNP, находящихся под действием естественного отбора, с развитием ПЭ ассоциирован производный аллель (*в*).

среди представителей одного вида [70]. Так, ПЭ могла сформироваться в процессе непрерывной "гонки вооружений" между матерью и плодом, наследующим материнские и отцовские гены, как побочный результат адаптивной эволюции [70].

Существование расовых и этнических различий в частотах развития ПЭ в современных популяциях человека представляет большой интерес для исследователей, поскольку такие отличия могут быть результатом адаптивных изменений, возникающих на протяжении формирования генофондов данных популяций [2, 6, 10, 11]. Примечательно, что из 10 включенных в исследование rSNP восьми ДЭГ с развитием ПЭ в этнической выборке русских ассоциированы семь rSNP шести ДЭГ (rs10985257 гена *CORO2A*, rs72959687 гена *INHA*; rs2167270 гена *LEP*; rs10423795 гена *LHB*; rs1671215 гена *RDH13*; rs56153523 и rs8109071 гена *SYDE1*), тогда как у якутов показана ассоциация трех rSNP двух ДЭГ (rs34845949 гена *SASH1*, rs2227262 и rs3802252 гена *NDRG1*). Согласно результатам анализа генетической дифференциации, различие по частотам аллелей rs3802252 гена *NDRG1*, ассоциированного с развитием ПЭ у якутов, вносит наибольший вклад в формирование межпопуляционного разнообразия (F_{ST} = 0.157) (рис. 1 и 5, табл. 3). В то же время наименьшая степень генной дифференциации исследованных популяций наблюдается по трем rSNP, ассоциированным с развитием ПЭ у русских: rs10985257 гена *CORO2A* (F_{ST} = 0.0257), rs1671215 гена *RDH13* (F_{ST} = 0.0273) и rs72959687 гена *INHA* (F_{ST} = 0.0297), что может свидетельствовать о популяционно-специфичном характере наследственной подверженности к ПЭ (рис. 1 и 5, табл. 3).

Таким образом, результаты настоящего исследования выявили значимый вклад естественного отбора на микроэволюционном уровне в формирование генетической подверженности и популяционной специфичности к развитию ПЭ. Биоинформатический анализ позволил установить важную роль пяти ДЭГ, rSNP которых находятся под действием естественного отбора, в развитии данной патологии на ранних этапах формирования плаценты. Наряду с этим обнаружены общие ТФ, показывающие вовлеченность семи исследованных rSNP в общие молекулярно-генетические механизмы этиопатогенеза ПЭ. Кроме того, полученные результаты соответствуют представлениям гипотезы "предковой предрасположенности" (rs10423795 гена *LHB*, rs56153523 гена *SYDE1*, rs2227262 и rs3802252 гена *NDRG1*) и гипотезы "генетического конфликта интересов" (rs2167270 гена *LEP*, rs72959687 гена *INHA*, rs8109071 гена *SYDE1*), которые рассматривают причины возникновения ПЭ с точки зрения адаптивной эволюции. В целом показана применимость эволюционного подхода к анализу генетической компоненты ПЭ и возможная перспектива его дальнейшего использования для изучения данного осложнения беременности.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-13045).

Проведение исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. У всех пациентов получено письменное информированное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Phipps E.A., Thadhani R., Benzing T., Karumanchi S.A. (2019) Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. *Nat. Rev. Nephrol.* **15**(5), 275–289. https://doi.org/10.1038/s41581-019-0119-6
2. Tannetta D., Sargent I. (2013) Placental disease and the maternal syndrome of preeclampsia: missing links? *Curr. Hypertens. Rep.* **15**(6), 590–599. https://doi.org/10.1007/s11906-013-0395-7
3. Gathiram P., Moodley J. (2016) Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiolgy. *Cardiovasc. J. Afr.* **27**(2), 71–78. https://doi.org/10.5830/CVJA-2016-009
4. Robillard P.Y., Dekker G., Chaouat G., Scioscia M., Iacobelli S., Hulsey T.C. (2017) Historical evolution of ideas on eclampsia/preeclampsia: A proposed optimistic view of preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.* **123**, 72–77. https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.09.006
5. Адамян Л.В., Артымук Н.В., Башмакова Н.В., Белокринницкая Т.Е., Беломестнов С.Р., Братищев И.В., Вученович Ю.Д., Краснопольский В.И., Куликов А.В., Левит А.Л., Никитина Н.А., Петрухин В.А., Пырегов А.В., Серов В.Н., Сидорова И.С., Филиппов О.С., Ходжаева З.С., Холин А.М., Шешко Е.Л., Шифман Е.М., Шмаков Р.Г. (2016) Клинические рекомендации "Гипертензивные расстройства во время беременности, в родах и послеродовом периоде. Преэклампсия. Эклампсия". Москва, 72 с.
6. Burton G.J., Redman C.W., Roberts J.M., Moffett A. (2019) Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. *BMJ.* **366**, l2381. https://doi.org/10.1136/bmj.l2381
7. Трифонова Е.А., Сваровская М.Г., Сереброва В.Н., Куценко И.Г., Агаркова Л.А., Степанов И.А., Жилякова О.В., Габидулина Т.В., Ижойкина Е.В., Степанов В.А. (2020) Геномные и постгеномные технологии в генетике преэклампсии. *Генетика.* **56**(5), 495–513. https://doi.org/10.31857/S0016675820050136
8. Zhang G., Zhao J., Yi J., Luan Y., Wang Q. (2016) Association between gene polymorphisms on chromosome 1 and susceptibility to pre-eclampsia: an updated meta-analysis. *Med. Sci. Monit.* **22**, 2202–2214. https://doi.org/10.12659/msm.896552
9. Zhou L., Cheng L., He Y., Gu Y., Wang Y., Wang C. (2016) Association of gene polymorphisms of FV, FII, MTHFR, SERPINE1, CTLA4, IL10, and TNFalpha with pre-eclampsia in Chinese women. *Inflamm. Res.* **65**(9), 717–724. https://doi.org/10.1007/s00011-016-0953-y
10. Gong J., Savitz D.A., Stein C.R., Engel S.M. (2012) Maternal ethnicity and pre-eclampsia in New York City, 1995-2003. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* **26**(1), 45–52. https://doi.org/10.1111/j.1365-3016.2011.01222.x
11. Nakimuli A., Chazara O., Byamugisha J., Elliott A.M., Kaleebu P., Mirembe F., Moffett A. (2014) Pregnancy, parturition and preeclampsia in women of African ancestry. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **210**(6), 510–520. e1. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2013.10.879
12. Xiao J., Shen F., Xue Q., Chen G., Zeng K., Stone P., Zhao M., Chen Q. (2014) Is ethnicity a risk factor for developing preeclampsia? An analysis of the prevalence of preeclampsia in China. *J. Hum. Hypertens.* **28**(11), 694–698. https://doi.org/10.1038/jhh.2013.148
13. Brown I.J., Tzoulaki I., Candeias V., Elliott P. (2009) Salt intakes around the world: implications for public health. *Int. J. Epidemiol.* **38**(3), 791–813. https://doi.org/10.1093/ije/dyp139
14. Brown E.A., Ruvolo M., Sabeti P.C. (2013) Many ways to die, one way to arrive: how selection acts through pregnancy. *Trends. Genet.* **29**(10), 585–592. https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.03.001
15. Ahmed S., Ibrahim M.E., Khalil E. (2017) High altitude and pre-eclampsia: adaptation or protection. *Med. Hypotheses.* **104**, 128–132. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.05.007
16. Handa V.L., Lockhart M.E., Fielding J.R., Bradley C.S., Brubaker L., Cundiff G.W., Ye W., Richter H.E., Pelvic Floor Disorders Network (2008) Racial differences in pelvic anatomy by magnetic resonance imaging. *Obstet. Gynecol.* **111**(4), 914–920. https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e318169ce03

17. Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Степанов В.А. Международный конгресс “VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы”. (2019) Санкт-Петербург, Россия. Сборник тезисов. С. 673.
18. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A., Brooks L.D., Durbin R.M., Garrison E.P., Kang H.M., Korbel J.O., Marchini J.L., McCarthy S., McVean G.A., Abecasis G.R. (2015) A global reference for human genetic variation. *Nature*. **526**(7571), 68–74. https://doi.org/10.1038/nature15393
19. Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Габидулина Т.В., Бухарина И.Ю., Агаркова Т.А., Евтушенко И.Д., Максимова Н.Р., Степанов В.А. (2016) Выявление новых маркеров предрасположенности к преэклампсии путем анализа регуляторных участков генов, демонстрирующих дифференциальную экспрессию в плацентарной ткани. *Молекуляр. биология*. **50**(5), 870–879. https://doi.org/10.7868/S0026898416050165
20. Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Степанов В.А. (2018) Эволюционно-генетический анализ роли регуляторных участков гена *NDRG1* в формировании структуры наследственной предрасположенности к преэклампсии в популяциях различного этнического происхождения. *Мед. генетика*. **17**(1), 32–36.
21. Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Степанов В.А. (2018) Эволюционно-генетический анализ роли регуляторных участков гена *CORO2A* в формировании наследственной предрасположенности к преэклампсии у русских и якутов. *Научные результаты биомедицинских исследований*. **4**(3), 38–48. https://doi.org/10.18413/2313-8955-2018-4-3-0-4
22. Сереброва В.Н., Трифонова Е.А., Ворожищева А.Ю., Степанов В.А. (2019) Роль регуляторных участков гена *SYDE1* в формировании наследственной предрасположенности к преэклампсии. *Мед. генетика*. **18**(1), 35–38.
23. Watterson G.A. (1975) On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Popul. Biol.* **7**(2), 256–276. https://doi.org/10.1016/0040-5809(75)90020-9
24. Tajima F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. **123**(3), 585–595.
25. Fu Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics.* **147** (2), 915–925.
26. Хедрик Ф. (2003) *Генетика популяций*. Москва: Техносфера. 592 с.
27. Raghavan M., Steinrücken M., Harris K., Schiffels S., Rasmussen S., DeGiorgio M., Albrechtsen A., Valdiosera C., Ávila-Arcos M.C., Malaspinas A.S., Eriksson A., Moltke I., Metspalu M., Homburger J.R., Wall J., Cornejo O.E., Moreno-Mayar J.V., Korneliussen T.S., Pierre T., Rasmussen M., Campos P.F., de Barros Damgaard P., Allentoft M.E., Lindo J., Metspalu E., Rodríguez-Varela R., Mansilla J., Henrickson C., Seguin-Orlando A., Malmström H., Stafford T., Jr., Shringarpure S.S., Moreno-Estrada A., Karmin M., Tambets K., Bergström A., Xue Y., Warmuth V., Friend A.D., Singarayer J., Valdes P., Balloux F., Leboreiro I., Vera J.L., Rangel-Villalobos H., Pettener D., Luiselli D., Davis L.G., Heyer E., Zollikofer C.P.E., Ponce de León M.S., Smith C.I., Grimes V., Pike K.A., Deal M., Fuller B.T., Arriaza B., Standen V., Luz M.F., Ricaut F., Guidon N., Osipova L., Voevoda M.I., Posukh O.L., Balanovsky O., Lavryashina M., Bogunov Y., Khusnutdinova E., Gubina M., Balanovska E., Fedorova S., Litvinov S., Malyarchuk B., Derenko M., Mosher M.J., Archer D., Cybulski J., Petzelt B., Mitchell J., Worl R., Norman P.J., Parham P., Kemp B.M., Kivisild T., Tyler-Smith C., Sandhu M.S., Crawford M., Villems R., Smith D.G., Waters M.R., Goebel T., Johnson J.R., Malhi R.S., Jakobsson M., Meltzer D.J., Manica A., Durbin R., Bustamante C.D., Song Y.S., Nielsen R., Willerslev E. (2015) Population genetics. Genomic evidence for the Pleistocene and recent population history of Native Americans. *Science*. **349**(6250), aab3884. https://doi.org/10.1126/science.aab3884
28. Lapaire O., Grill S., Lalevee S., Kolla V., Hösli I., Hahn S. (2012) Microarray screening for novel preeclampsia biomarker candidates. *Fetal. Diagn. Ther.* **31**(3), 147–153. https://doi.org/10.1159/000337325
29. Meng T., Chen H., Sun M., Wang H., Zhao G., Wang X. (2012) Identification of differential gene expression profiles in placentas from preeclamptic pregnancies versus normal pregnancies by DNA microarrays. *OMICS*. **16**(6), 301–311. https://doi.org/10.1089/omi.2011.0066
30. Трифонова Е.А., Габидулина Т.В., Ершов Н.И., Сереброва В.Н., Ворожищева А.Ю., Степанов В.А. (2014) Характеристика транскриптома плацентарной ткани у женщин с физиологической беременностью и преэклампсией. *Acta Naturae*. **6**(2), 77–90.
31. Nishizawa H., Ota S., Suzuki M., Kato T., Sekiya T., Kurahashi H., Udagawa Y. (2011) Comparative gene expression profiling of placentas from patients with severe pre-eclampsia and unexplained fetal growth restriction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **9**, 107. https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-107
32. Sitras V., Paulssen R.H., Grønaas H., Leirvik J., Hanssen, T.A., Vårtun A., Acharya G. (2009) Differential placental gene expression in severe preeclampsia. *Placenta*. **30**(5), 424–433. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.01.012
33. Enquobahrie D.A., Meller M., Rice K., Psaty B.M., Siscovick, D.S., Williams M.A. (2008) Differential placental gene expression in preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **199** (5), 566.e1–566.11. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.04.020
34. Reimer T., Koczan D., Gerber B., Richter D., Thiesen H.J., Friese K. (2002) Microarray analysis of differentially expressed genes in placental tissue of pre-eclampsia: up-regulation of obesity-related genes. *Mol. Hum. Reprod.* **8** (7), 674–680. https://doi.org/10.1093/molehr/8.7.674
35. Várkonyi T., Nagy B., Füle T., Tarca A.L., Karászi K., Schönléber J., Hupuczi P., Mihalik N., Kovalszky I., Rigó J., Jr Meiri H., Papp Z., Romero R., Than N.G. (2011) Microarray profiling reveals that placental transcriptomes of early-onset HELLP syndrome and pre-

eclampsia are similar. *Placenta*. **32**. Suppl., S21–S29. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.04.014

36. Paiwattananupant K., Phupong V. (2008) Serum inhibin A level in preeclampsia and normotensive pregnancy. *Hypertens. Pregnancy*. **27**(4), 337–343. https://doi.org/10.1080/10641950802020545
37. Louwen F., Muschol-Steinmetz C., Reinhard J., Reitter A., Yuan J. (2012) A lesson for cancer research: placental microarray gene analysis in preeclampsia. *Oncotarget*. **3**(8), 759–773. https://doi.org/10.18632/oncotarget.595
38. Matarese G., Moschos S., Mantzoros C.S. (2005) Leptin in immunology. *J. Immunol*. **174**(6), 3137–3142. https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3137
39. Haram K., Mortensen J.H., Nagy B. (2014) Genetic aspects of preeclampsia and the HELLP syndrome. *J. Pregnancy*. 2014, **910751**. https://doi.org/10.1155/2014/910751
40. Taylor B.D., Ness R.B., Olsen J., Hougaard D.M., Skogstrand K., Roberts J.M., Haggerty C.L. (2015) Serum leptin measured in early pregnancy is higher in women with preeclampsia compared with normotensive pregnant women. *Hypertension*. **65**(3), 594–599. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03979
41. Kalinderis M., Papanikolaou A., Kalinderi K., Vyzantiadis T.A., Ioakimidou A., Tarlatzis B.C. (2015) Serum levels of leptin and IP-10 in preeclampsia compared to controls. *Arch. Gynecol. Obstet*. **292**(2), 343–347. https://doi.org/10.1007/s00404-015-3659-4
42. Ellen T.P., Ke Q., Zhang P., Costa M. (2008) NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states. *Carcinogenesis*. **29**(1), 2–8. https://doi.org/10.1093/carcin/bgm200
43. Chen B., Nelson D.M., Sadovsky Y. (2006) N-myc down-regulated gene 1 modulates the response of term human trophoblasts to hypoxic injury. *J. Biol. Chem*. **281**(5), 2764–2772. https://doi.org/10.1074/jbc.M507330200
44. Lo H.F., Tsai C.Y., Chen C.P., Wang L.J., Lee Y.S., Chen C.Y., Liang C.T., Cheong M.L., Chen H. (2017) Association of dysfunctional synapse defective 1 (SYDE1) with restricted fetal growth – SYDE1 regulates placental cell migration and invasion. *J. Pathol*. **241**(3), 324–336. https://doi.org/10.1002/path.4835
45. Szklarczyk D., Morris J.H., Cook H., Kuhn M, Wyder S., Simonovic M., SantosA., Doncheva N.T., Roth A., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. (2017) The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucl. Acids. Res*. **45**, D362–D368. https://doi.org/10.1093/nar/gkw937
46. Boyle A.P., Hong E.L., Hariharan M., Cheng Y., Schaub M.A., Kasowski M., Karczewski K.J., Park J., Hitz B.C., Weng S., Cherry J.M., Snyder M. (2012) Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res*. **22**(9), 1790–1797. https://doi.org/10.1101/gr.137323.112
47. Kim E.S., Cha Y., Ham M., Jung J., Kim S.G., Hwang S., Kleemann R., Moon A. (2014) Inflammatory lipid sphingosine-1-phosphate upregulates C-reactive protein via C/EBPβ and potentiates breast cancer progression. *Oncogene*. **33**(27), 3583–3593. https://doi.org/10.1038/onc.2013.319
48. Wang W., Taylor R.N., Bagchi I.C., Bagchi M.K. (2012) Regulation of human endometrial stromal proliferation and differentiation by C/EBPβ involves cyclin E-cdk2 and STAT3. *Mol. Endocrinol*. **26**(12), 2016–2030. https://doi.org/10.1210/me.2012-1169
49. Ramathal C., Wang W., Hunt E., Bagchi I.C., Bagchi M.K. (2011) Transcription factor CCAAT enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) regulates the formation of a unique extracellular matrix that controls uterine stromal differentiation and embryo implantation. *J. Biol. Chem*. **286**(22), 19860–19871. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.191759
50. Radde J., Löning T., Bamberger A.M. (2004) Expression pattern of the CCAAT/enhancer-binding protein C/EBP-beta in gestational trophoblastic disease. *Int. J. Gynecol. Pathol*. **23**(4), 373–377. https://doi.org/10.1097/01.pgp.0000139645.32997.e1
51. Zhuang B., Luo X., Rao H., Li Q., Shan N., Liu X., Qi H. (2015) Oxidative stress-induced C/EBPβ inhibits β-catenin signaling molecule involving in the pathology of preeclampsia. *Placenta*. **36**(8), 839–846. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.06.016
52. Cassano S., Pucino V., La Rocca C., Procaccini C., De Rosa V., Marone G., Matarese G. (2014) Leptin modulates autophagy in human CD4+CD25- conventional T cells. *Metabolism*. **63**(10), 1272–1279. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.06.010
53. Weedon-Fekjær M.S., Sheng Y., Sugulle M., Johnsen G.M., Herse F., Redman C.W., Lyle R., Dechend R., Staff A.C. (2014) Placental miR-1301 is dysregulated in early-onset preeclampsia and inversely correlated with maternal circulating leptin. *Placenta*. **35**(9), 709–717. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.07.002
54. Tinel M., Berson A., Elkahwaji J., Cresteil T., Beaune P., Pessayre D. (2003) Downregulation of cytochromes P450 in growth-stimulated rat hepatocytes: role of c-Myc induction and impaired C/EBP binding to DNA. *J. Hepatol*. **39**(2), 171–178. https://doi.org/10.1016/s0168-8278(03)00238-1
55. Wu K.J., Polack A., Dalla-Favera R. (1999) Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science*. **283**(5402), 676–679. https://doi.org/10.1126/science.283.5402.676
56. Shimono A., Okuda T., Kondoh H. (1999) N-myc-dependent repression of ndr1, a gene identified by direct subtraction of whole mouse embryo cDNAs between wild type and N-myc mutant. *Mech. Dev*. **83**(1–2), 39–52. https://doi.org/10.1016/s0925-4773(99)00025-8
57. Zhang M., Muralimanoharan S., Wortman A.C., Mendelson C.R. (2016) Primate-specific miR-515 family members inhibit key genes in human trophoblast differentiation and are upregulated in preeclampsia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **113**(45), E7069–E7076. https://doi.org/10.1073/pnas.1607849113
58. Kumar P., Luo Y., Tudela C., Alexander J.M., Mendelson C.R. (2013) The c-Myc-regulated microRNA-17~92 (miR-17~92) and miR-106a~363 clusters target hCYP19A1 and hGCM1 to inhibit human trophoblast

differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **33**(9), 1782–1796. https://doi.org/10.1128/MCB.01228-12

59. Huggins C.J., Malik R., Lee S., Salotti J., Thomas S., Martin N., Quiñones O.A., Alvord W.G., Olanich M.E., Keller J.R., Johnsona P.F. (2013) C/EBPγ suppresses senescence and inflammatory gene expression by heterodimerizing with C/EBPβ. *Mol. Cell. Biol.* **33**(16), 3242–3258. https://doi.org/10.1128/MCB.01674-12
60. Vaiman D., Miralles F. (2016) An integrative analysis of preeclampsia based on the construction of an extended composite network featuring protein-protein physical interactions and transcriptional relationships. *PLoS One*. **11**(11), e0165849. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165849
61. Wu Y., Fu X., Wang L. (2016) Identification of novel biomarkers for preeclampsia on the basis of differential expression network analysis. *Exp. Ther. Med.* **12**(1), 201–207. https://doi.org/10.3892/etm.2016.3261
62. Liu N., Ding D., Hao W., Yang F., Wu X., Wang M., Xu X., Ju Z., Liu J.P., Song Z., Shay J.W., Guo Y., Cong Y.S. (2016) hTERT promotes tumor angiogenesis by activating VEGF via interactions with the Sp1 transcription factor. *Nucl. Acids Res.* **44**(18), 8693–8703. https://doi.org/10.1093/nar/gkw549
63. Zhang Y, Yang J, Lv S, Zhao D.Q., Chen Z.J., Li W.P., Zhang C. (2018) Downregulation of decidual SP1 and P300 is associated with severe preeclampsia. *J. Mol. Endocrinol.* **60**(2), 133–143. https://doi.org/10.1530/JME-17-0180
64. Vaiman D., Calicchio R., Miralles F. (2013) Landscape of transcriptional deregulations in the preeclamptic placenta. *PLoS One.* **8**(6), e65498. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065498
65. He P., Chen Z., Sun Q., Li Y., Gu H., Ni X. (2014) Reduced expression of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in preeclamptic placentas is associated with decreased PPARγ but increased PPARα expression. *Endocrinology.* **155**(1), 299–309. https://doi.org/10.1210/en.2013-1350
66. Lu W., Ma Y.Y., Shao Q.Q., Liang J., Qi T.T., Huang Y., Wang Q.J. (2020) ROS/p53/miR-335-5p/Sp1 axis modulates the migration and epithelial to mesenchymal transition of JEG-3 cells. *Mol. Med. Rep.* **21**(3), 1208–1216. https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10901
67. Gormley M., Ona K., Kapidzic M., Garrido-Gomez T., Zdravkovic T., Fisher S.J. (2017) Preeclampsia: novel insights from global RNA profiling of trophoblast subpopulations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **217**(2), 200.e1–200.e17. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.03.017
68. Elliot M.G. (2016) Oxidative stress and the evolutionary origins of preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.* **114**, 75–80. https://doi.org/10.1016/j.jri.2016.02.003
69. Haig D. (1993) Genetic conflicts in human pregnancy. *Q. Rev. Biol.* **68**(4), 495–532. https://doi.org/10.1086/418300
70. Pijnenborg R., Vercruysse L., Hanssens M. (2008) Fetal-maternal conflict, trophoblast invasion, preeclampsia, and the red queen. *Hypertens. Pregnancy.* **27**(2), 183–196. https://doi.org/10.1080/10641950701826711
71. Abrams E.T., Rutherford J.N. (2011) Framing postpartum hemorrhage as a consequence of human placental biology: an evolutionary and comparative perspective. *Am. Anthropol.* **113**(3), 417–430. https://doi.org/10.1111/j.1548-1433.2011.01351.x
72. Cole L.A., Khanlian S.A., Kohorn E.I. (2008) Evolution of the human brain, chorionic gonadotropin and hemochorial implantation of the placenta: insights into origins of pregnancy failures, preeclampsia and choriocarcinoma. *J. Reprod. Med.* **53**(8), 549–557.
73. Chaline J. (2003) Increased cranial capacity in hominid evolution and preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.* **59**(2), 137–152. https://doi.org/10.1016/s0165-0378(03)00043-3
74. Robillard P.Y., Dekker G.A., Hulsey T.C. (2002) Evolutionary adaptations to pre-eclampsia/eclampsia in humans: low fecundability rate, loss of oestrus, prohibitions of incest and systematic polyandry. *Am. J. Reprod. Immunol.* **47**(2), 104–111. https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2002.1o043.x
75. Crosley E.J., Elliot M.G., Christians J.K., Crespi B.J. (2013) Placental invasion, preeclampsia risk and adaptive molecular evolution at the origin of the great apes: evidence from genome-wide analyses. *Placenta*. **34**(2), 127–132. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.12.001
76. Elliot M.G., Crespi B.J. (2015) Genetic recapitulation of human pre-eclampsia risk during convergent evolution of reduced placental invasiveness in eutherian mammals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **370**(1663), 20140069. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0069
77. Than N.G., Romero R., Xu Y., Erez O., Xu Z., Bhatti G., Leavitt R., Chung T.H., El-Azzamy H., LaJeunesse C., Wang B., Balogh A., Szalai G., Land S., Dong Z., Hassan S.S., Chaiworapongsa T., Krispin M., Kim C.J., Tarca A.L., Bohn H. (2014) Evolutionary origins of the placental expression of chromosome 19 cluster galectins and their complex dysregulation in preeclampsia. *Placenta*. **35**(11), 855–865. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.07.015
78. Zadora J., Singh M., Herse F., Przybyl L., Haase N., Golic M., Yung H.W., Huppertz B., Cartwright J.E., Whitley G., Johnsen G.M., Levi G., Isbruch A., Schulz H., Luft F.C., Müller D.N., Staff A.C., Hurst L.D., Dechend R., Izsvák Z. (2017) Disturbed placental imprinting in preeclampsia leads to altered expression of DLX5, a human-specific early trophoblast marker. *Circulation*. **136**(19), 1824–1839. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028110
79. Kaartokallio T., Wang J., Heinonen S., Kajantie E., Kivinen K., Pouta A., Gerdhem P., Jiao H., Kere J., Laivuori H. (2016) Exome sequencing in pooled DNA samples to identify maternal pre-eclampsia risk variants. *Sci. Rep.* **6**, 29085. https://doi.org/10.1038/srep29085
80. Di Rienzo A., Hudson R.R. (2005) An evolutionary framework for common diseases: the ancestral-susceptibility model. *Trends Genet.* **21**(11), 596–601. https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.08.007

NATURAL SELECTION AS A DRIVER FOR THE GENETIC COMPONENT OF PREECLAMPSIA

V. N. Serebrova[1], *, E. A. Trifonova[1], and V. A. Stepanov[1]

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

**e-mail: vika.serebrova@medgenetics.ru*

Preeclampsia is a severe hypertensive pathology that affects 2–8% of pregnancies worldwide. Poorly studied etiopathogenesis, absence of prognostic biomarkers and effective treatments for this pregnancy complication determine the high incidence of maternal and perinatal morbidity and mortality. Racial and ethnic differences in the incidence of preeclampsia are of interest, since such variability may be considered as a side effect of adaptive changes in the genetic structure of modern populations that have occurred since the dispersal of *Homo sapiens* from Africa. In this work we studied the genetic diversity of North Eurasia populations and the world populations of the 1000 Genomes Project for 10 regulatory single-nucleotide polymorphisms (rSNPs) associated with preeclampsia. We also have conducted assessment of the role of natural selection at the microevolutionary level in formation of this genetic diversity. Interpopulation genetic diversity for these variants is high, with the greatest contribution made by allele frequencies of rs3802252 in *NDRG1* gene ($F_{ST} = 0.157$). We detected signatures of natural selection for rs10423795 in *LHB* gene, rs2167270 in *LEP* gene, rs2227262 and rs3802252 in *NDRG1* gene, rs56153523 and rs8109071 in *SYDE1* gene, rs72959687 in *INHA* gene. Moreover, obtained results correspond to evolutionary hypotheses explaining the occurrence of PE, namely, the hypothesis of ancestral susceptibility and the hypothesis of genetic conflicts.

Keywords: preeclampsia, differentially expressed genes (DEGs), regulatory single-nucleotide polymorphisms (rSNPs), human populations, genetic diversity, natural selection

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 3, с. 460–467

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 577.218:57.081.23

ГИПОКСИЯ УСКОРЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ β-АКТИНА ЧЕРЕЗ АКТИВАЦИЮ ТРАНСКРИПЦИИ *ACTB* ЯДЕРНЫМ ФАКТОРОМ ДЫХАНИЯ-1[1]

© 2021 г. X. T. Wang[a], K. Cheng[a], L. Zhu[a, *]

[a] *Institute of Special Environmental Medicine, Nantong University, Nantong, 226019 China*

**e-mail: zhuli85051796@163.com*

Поступила в редакцию 05.05.2020 г.
После доработки 30.05.2020 г.
Принята к публикации 04.06.2020 г.

Белок цитоскелета β-актин в большом количестве присутствует в цитоплазме и ядре, поэтому его часто считают внутренним контролем при анализе экспрессии генов. Недавно замечено, что содержание β-актина в различных клетках изменяется после гипоксической стимуляции, но механизм этого явления не выяснен. Мы проанализировали, приводит ли индуцированное гипоксией изменение экспрессии ядерного респираторного фактора-1 (NRF-1) к изменению экспрессии β-актина, а также исследовали механизм NRF-1-опосредованной транскрипционной регуляции экспрессии β-актина. У трети пациентов с раком желудка обнаружено значительное повышение уровней NRF-1 и β-актина в опухолях и прилегающей ткани. При обработке 1%-ным O_2 линий клеток рака желудка и линии клеток желудка уровни NRF-1 и β-актина изменялись однонаправленно. Регулируя экспрессию NRF-1 посредством сверхэкспресссии или сайленсинга, мы обнаружили, что уровень β-актина изменялся синхронно. В результате анализа потенциальных сайтов связывания NRF-1 на гене β-актина (*ACTB*) идентифицировано три сайта, которые консервативны в геномах человека, мыши и крысы. Эксперименты с ChIP доказали, что NRF-1 напрямую связывается с кодирующими областями *ACTB* человека и *Actb* мыши и регулирует транскрипцию этих генов.

Ключевые слова: NRF-1, β-актин, гипоксия, регуляция транскрипции

DOI: 10.31857/S0026898421030186

ВВЕДЕНИЕ

β-Актин – важный, широко представленный в цитоплазме и ядре белок цитоскелета, который участвует в поддержании морфологии клеток, их миграции и пролиферации, ремоделировании хроматина и модификации гистонов [1, 2]. Благодаря высокому уровню экспрессии в клетках ген β-актина (*ACTB*) часто используют в качестве внутреннего референс-гена при исследовании генной экспрессии [3]. Однако в последние годы сообщается, что после гипоксической стимуляции уровень β-актина в различных клетках значительно изменяется [4]. Zhong и др. [5] сообщали, что в условиях гипоксии уровни экспрессии 28S рРНК были постоянными, независимо от содержания O_2, но уровни GAPDH, β-актина и циклофилина широко варьировали при гипоксии. Bruge и др. [6] продемонстрировали, что экспрессия *ACTB* изменяется гораздо сильнее, чем референс-генов *GAPDH* и *SDHA/TBP* в фибробластах кожи человека после лечения гипоксией. По-видимому, β-актин нестабилен при гипоксии, и это изменение более очевидно в опухолевых клетках [7]. Экспрессия β-актина всегда значительно выше в опухолевых тканях, чем в нормальных [8]. Динамические изменения β-актина инициируют миграцию опухолевых клеток и метастазирование опухолей [9, 10]. Всего несколько исследований было посвящено анализу причин увеличения уровня β-актина в опухолевой ткани. Учитывая, что гипоксия стимулирует функции опухолевых клеток, такие как пролиферация и миграция [11], мы предположили, что гипоксия инициирует экспрессию β-актина и стимулирует миграцию опухолевых клеток. Хотя в ряде исследований сообщалось об очевидном влиянии гипоксии на экспрессию β-актина, механизм этого процесса до сих пор не выяснен.

Гипоксия вызывает сильные изменения в функционировании митохондрий, которые важны для ответа клеток на гипоксию и адаптации [12]. Показано, что при гипоксии в клетках ядерный дыхательный фактор-1 (NRF-1) – важный транскрипционный фактор – индуцирует усиление митохондриального метаболизма и повыше-

[1] Статья представлена авторами на английском языке.
Сокращения: NRF-1 (Nuclear Respiratory Factor 1) – ядерный фактор дыхания-1; ChIP (chromatin immunoprecipitation) – хроматоиммунопреципитация.

ние уровня митохондриального дыхательного белка [13, 14]. Сначала было показано, что NRF-1 связывается с промоторной областью цитохрома *c* [15]. Впоследствии сообщалось, что NRF-1 может связываться с рядом генов, вовлеченных в процессы клеточного цикла и пролиферации, включая сплайсинг РНК, метаболизм, репарацию повреждений ДНК и деградацию белков убиквитинированием [16]. В дальнейшем показано, что NRF-1 широко экспрессируется в организме, регулирует ядерную транскрипцию многих генов и играет важную роль в метаболизме и дыхательной функции митохондрий [8]. Satoh и др. [17] обнаружили, что в нейрональных клетках можно найти тысячи генов-мишеней NRF-1, которые участвуют во множестве сигнальных путей, таких как функционирование митохондрий, регуляция клеточного цикла, клеточный метаболизм, нервные импульсы и т.д. Эти же авторы обнаружили, что ген β-актина может быть мишенью для NRF-1. Ранее Jayanta и др. [18] сообщали и о том, что экспрессия NRF-1 значительно повышена в некоторых опухолевых тканях, и высказывали предположение, что изменение уровня β-актина в клетках при гипоксии и в опухолевой ткани индуцировано регуляцией транскрипции гена *ACTB* фактором NRF-1.

Учитывая изложенные выше данные, мы задались целью определить, коррелирует ли экспрессия NRF-1 и β-актина в опухолевой и нормальной тканях и влияет ли изменение уровня NRF-1, вызванное гипоксией, на содержвание β-актина в клетках рака желудка. Кроме того, исследован механизм NRF-1-регуляции транскрипции гена *ACTB*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культура клеток и гипоксия. Клетки эпителия желудка человека GES-1 были любезно предоставлены клинической больницей Наньтунского университета (Affiliated Hospital of Nantong University, Китай). Клетки культивировали в среде DMEM с 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS) при 5% CO_2 и 37°C. Эпителиальные клетки карциномы желудка человека: AGS, MKN28, MKN1, SNV-719 и MKN45 – культивировали в среде RPMI-1640 с 10% FBS при 5% CO_2 и 37°C.

Для создания условий гипоксии клетки инкубировали при 1% O_2 и 5% CO_2 при 37°C в течение 48 ч. Для регуляции NRF-1 клетки GES-1 трансфицировали плазмидами с избыточной экспрессией NRF-1 или короткой интерферирующей (si) РНК к мРНК NRF-1 и инкубировали в течение 24 ч.

Иммуноблотинг. Клетки рака желудка и прилегающих тканей, полученные от пациентов, и клетки, подвергшиеся действию гипоксии, собирали и обрабатывали реагентами для экстракции белка, помещали на лед на 30 мин и центрифугировали при 15000 × *g* и 4°C в течение 30 мин. Концентрацию белка определяли методом бицинхониновой кислоты. Белки разделяли электрофорезом в SDS-PAG и переносили на PVDF-мембраны полусухим способом. Мембраны инкубировали в течение 1 ч в 5%-ном обезжиренном сухом молоке, а в течение ночи при 4°C с кроличьими антителами против NRF-1 (ab175932; “Abcam”, Великобритания), β-актина (ab8227; “Abcam”) и гистона H3 (ab1791; “Abcam”). Связывание первичных антител визуализировали с помощью вторичных антител, в качестве которых использованы конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) ослиные антитела против кроличьих (#711-035-152; “Jackson ImmunoReseach Europe Ltd.”, Велиикобритания), и системы ECL-Plus. Анализ оттенков серого проводили с использованием программы Image J (https://imagej.nih.gov/ij/).

Иммунопреципитация хроматина (ChIP). ChIP-анализ выполняли с использованием набора SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads) (#9003; “Cell Signaling Technology”, Нидерланды) в соответствии с инструкциями производителя. Для сшивания белков с ДНК клетки GES-1 фиксировали в культуральной среде, содержащей 1% формальдегида, при комнатной температуре в течение 10 мин. Клетки лизировали и собирали с последующим добавлением 0.5 мкл микрококковой нуклеазы на IP-препарат и инкубировали в течение 20 мин при 37°C для расщепления ДНК до длины приблизительно 200–500 п.о. Затем обработанный ультразвуком лизат подвергали иммунопреципитации с 2.5 мкг кроличьих антител к NRF-1 (ab34682, “Abcam”) или кроличьего IgG в качестве отрицательного контроля при 4°C в течение ночи. “Вытянутый” хроматин промывали, “расшивали” и очищали. Очищенную ДНК амплифицировали с помощью ПЦР в реальном времени с соответствующими праймерами. Режим реакции: 98°C в течение 5 мин, затем 40 трехступенчатых циклов: 30 с при 98°C, 30 с при 60°C и 30 с при 72°C. Праймеры были сконструированы следующим образом:

human *ACTB* S1: 5'-GCTCTTGCCAATGGG-GATCG-3' (прямой) и

5'-CAGTTAGCGCCTTGAGTCCC3-3' (обратный);

human *ACTB* S2: 5'-TGCCTTTTATGGTAATAAC-GCGG-3' (прямой) и

5'-AAAGGACAAGAAGCCCTGAG-3' (обратный);

human *CYTC*: 5'-CCGTACACCCTAACATGCTC-3' (прямой) и

5'-TGGCACAACGAACACTCC-3' (обратный);

mouse *Actb* S1: 5'-ACAGTATTGGGAACCAGACG-3' (прямой) и

5'-GCAGCTAACTAGGAAGAGGG-3' (обратный);

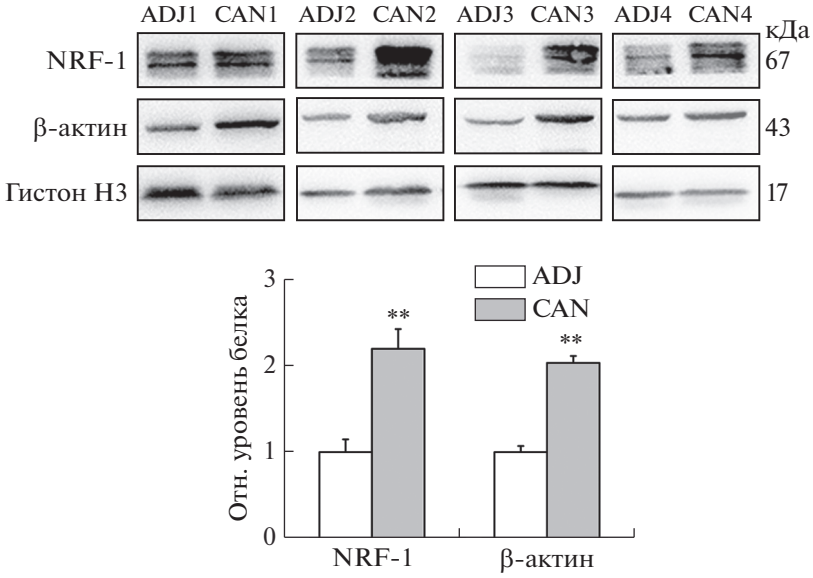


Рис. 1. Уровни NRF-1 и β-актина значительно повышены в клетках рака желудка по сравнению с прилегающими тканями. Иммуноблотинг проведен на клинических образцах, полученных от пациентов с раком желудка (n = 11). ADJ – прилегающие к опухоли ткани; CAN – раковые клетки. **p < 0.01 против ADJ.

mouse *Actb* S2: 5'-CTGCGCTTCCTTTGTC-3' (прямой) и
5'-CCCATTCCCACCATCA-3' (обратный).

Статистическая обработка результатов. Все данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD). Средние значения двух выборок сравнивали с использованием непарного t-критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$. Для анализа данных использовано статистическое программное обеспечение SPSS 17.0 (https://www.ibm.com/analytics/us/en/technology/spss/).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уровни как NRF-1, так и β-актина в раковых клетках выше, чем в прилегающих тканях пациентов с раком желудка

В связи с тем, что опухоль всегда находится в гипоксическом микроокружении, мы сначала проанализировали уровни белков NRF-1 и β-актина в клетках рака желудка и прилегающих тканях, взятых у пациентов. Обнаружено, что у 33% пациентов содержание этих двух белков в опухолевых клетках было значительно выше, чем в прилегающих тканях (рис. 1).

Сходные изменения уровней NRF-1 и β-актина в эпителиальных клетках карциномы желудка после гипоксии

Для выявления изменений в экспрессии NRF-1 и β-актина в условиях гипоксии линию эпителиальных клеток желудка GES-1 и эпителиальные клетки карциномы линий AGS, MKN28, SNU-719, MKN1 и MKN45 выдерживали в среде с 1% O_2 в течение 48 ч. Как видно на рис. 2*а* и 2*в*, уровни как мРНК, так и белка NRF-1 в клетках AGS, MKN28 и SNU-719 были значительно снижены. Уровень белка β-актина тоже снижался в соответствии с NRF-1, в то время как для мРНК снижение уровня не всегда было статистически значимым, в том числе в клетках AGS и MKN28. На рис. 2*б* и 2*г* видно, что уровень мРНК и белка как NRF-1, так и β-актина в клетках MKN1, MKN45 и GES-1 повышался, за исключением белка β-актина в GES-1. На основании приведенных результатов можно говорить о том, что уровни NRF-1 и β-актина изменяются однонаправленно в эпителиальных клетках карциномы желудка.

По результатам иммуноблотинга и ПЦР в реальном времени гипоксия индуцировала синхронные изменения в уровнях NRF-1 и β-актина: они снижались в клетках AGS, MKN28 и SNU-719 и повышались в клетках MKN1, MKN45 и GES-1 (рис. 2).

Транскрипционная активность гена ACTB регулируется связыванием NRF-1 с кодирующей областью

С целью идентифицировать взаимосвязь между NRF-1 и β-актином мы сконструировали плазмиды со сверхэкспрессией NRF-1 или siРНК, нацеленной на ген *NRF1*, и трансфицировали ими клетки GES-1. Как показано на рис. 3*а* и 3*б*,

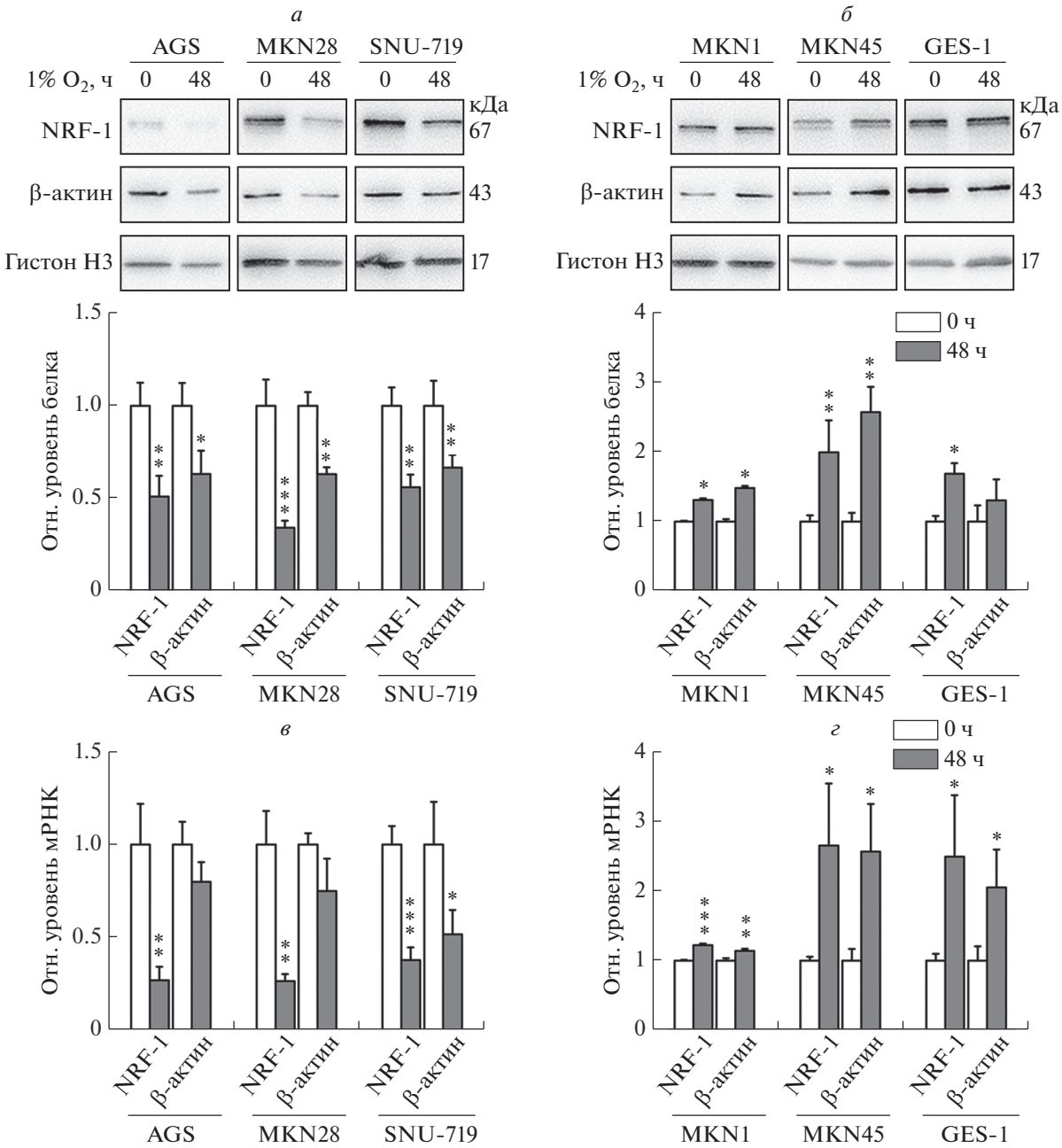


Рис. 2. Уровни NRF-1 и β-актина изменяются синхронно в клетках карциномы желудка и в клеточных линиях желудка после гипоксии. Клетки AGS, MKN28, SNU-719, MKN1, MKN45 и GES-1 выдерживали в течение 48 ч при 1% O_2. Уровни экспрессии NRF-1 и β-актина анализировали методом иммуноблотинга (*а* и *б*) и ПЦР в реальном времени(*в* и *г*) ($n = 3$). *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$ по сравнению с 0 ч.

трансфекция NRF-1-экспрессирующих плазмид индуцировала значительное повышение уровней как белка, так и мРНК NRF-1 по сравнению с контрольным пустым вектором, в то время как siРНК к *NRF1* сильно снижала количество NRF-1 по сравнению с контрольной siРНК. В соответствии с NRF-1 уровни как белка, так и мРНК β-актина были повышены в клетках со свехэкспрессией NRF-1 и подавлены в клетках с РНК-интерференцией *NRF1.*

Кроме того, мы обрабатывали клетки актиномицином D в течение указанного периода времени для блокирования транскрипции и проверки стабильности мРНК β-актина с помощью ПЦР [19]. Как видно на рис. 3*в*, не зарегистрировано значимых различий между этими уровнями в клетках с контрольной siРНК и siРНК *NRF1*, из чего можно сделать вывод, что интерференция *NRF1* не влияет на стабильность мРНК β-актина. Все данные указывали на то, что NRF-1 инициирует транскрип-

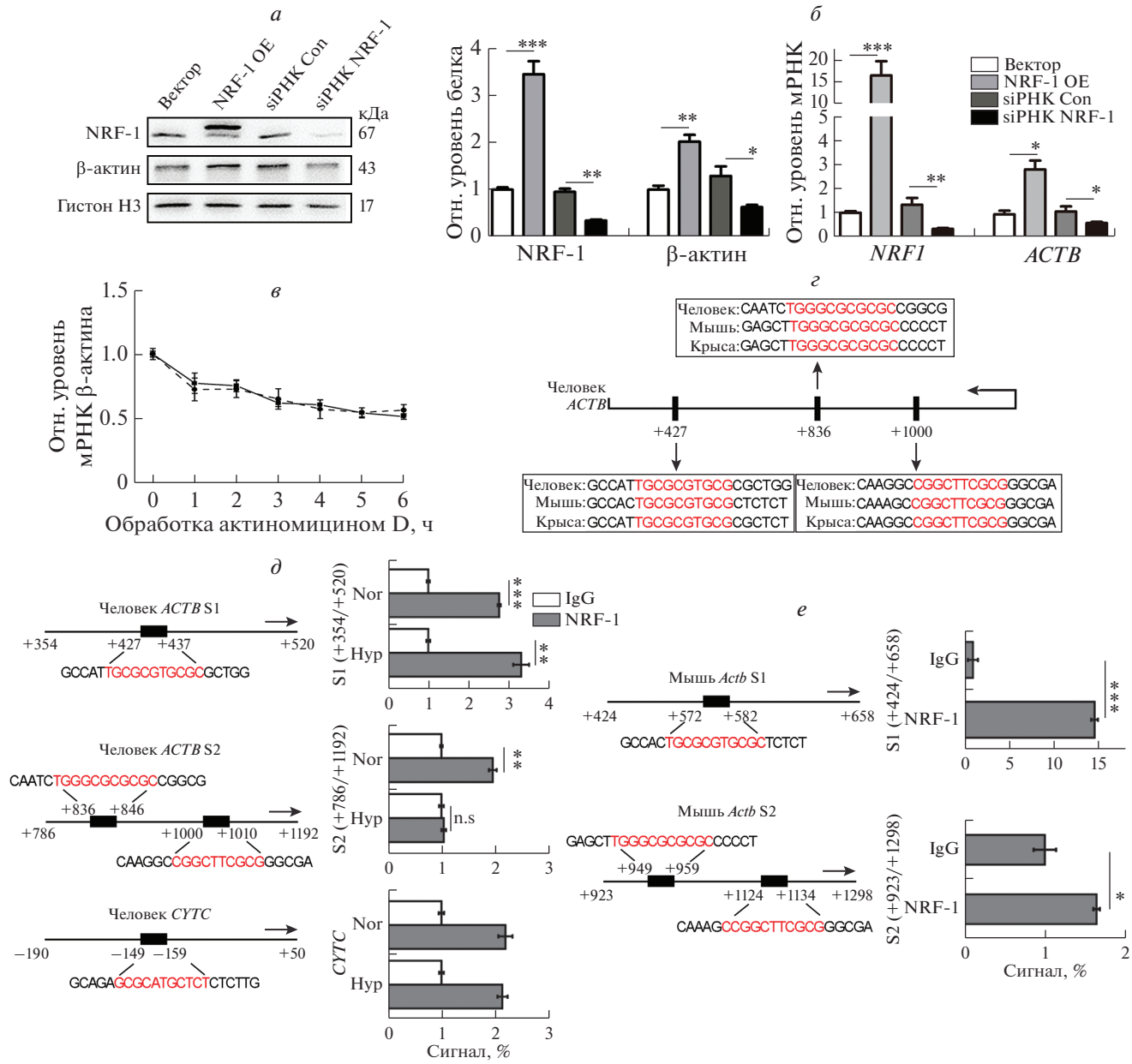


Рис. 3. NRF-1 связывается с геном *ACTB* и регулирует его экспрессию. *а* – Клетки GES-1 трансфицировали плазмидой со сверхэкспрессией NRF-1 (NRF-1 OE) или с siPHK к *NRF1* (siPHK NRF-1) или контрольной (siPHK Con), помещали в условия гипоксии (1% O_2) на 24 ч. Изменения в экспрессии NRF-1 и β-актина анализировали методом иммуноблотинга (*а*) и ПЦР в реальном времени (*б*). *в* – Клетки GES-1 обрабатывали актиномицином D (5 мкг/мл) в течение указанного времени. Уровни мРНК β-актина анализировали ОТ-ПЦР в реальном времени. Полученные данные нормализовали по уровню 18S рРНК ($n = 3$). *г* – Потенциальные сайты связывания NRF-1 в составе генов *ACTB* человека и *Actb* мыши и крысы. *д*, *е* – ChIP-анализ обогащения генов *ACTB* человека и *Actb* мыши по NRF-1. Группы IgG использовали в качестве отрицательного контроля для групп NRF-1. Продукты ChIP анализировали методом ПЦР в реальном времени. Цифрами указаны позиции от сайта начала транскрипции. Ген *CYTC* использован в качестве положительного контроля в ChIP-анализе. Эффект обогащения в ChIP-анализе рассчитывали в сравнении с IgG ($n = 3$). Nor – условия нормоксии, Hyp – условия гипоксии. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

цию *ACTB*, тем самым активируя экспрессию β-актина.

Вполне логичным было проверить, активирует ли NRF-1 транскрипцию *ACTB*. С помощью программного обеспечения JASPAR (http://jaspar.genereg.net/) мы обнаружили, что в кодирующих областях *ACTB* человека есть три потенциальных сайта связывания NRF-1, которые высококонсервативны в гомологах мыши и крысы (рис. 3*г*). С целью проверить, взаимодействуют ли напря-

мую NRF-1 с кодирующей областью *ACTB* человека, мы провели ChIP-анализ. Показано, что кодирующая область +354/+520 *ACTB* человека и область промотора −190/+50 *CYTC* человека обогащены NRF-1, особенно при гипоксии, в то время как только при нормоксии кодирующая область +786/+1192 *ACTB* обогащена NRF-1 (рис. 3*д*). С целью выснить, происходит ли связывание NRF-1 с такой же областью в гомологах *ACTB*, то есть консервативно среди видов, мы провели ChIP-анализ с соответствующим регионом *Actb* мыши. Как показано на рис. 3*е*, в условиях нормоксии NRF-1 связывался с кодирующими областями +424/+658 и +923/+1298 *Actb* мыши. Таким образом, транскрипционная активация *ACTB* фактором NRF-1 не была видоспецифичной.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В этой работе впервые обнаружены различия в уровнях NRF-1 и β-актина в клетках рака желудка и прилегающих тканях. Уровни экспрессии NRF-1 и β-актина были значительно повышены в некоторых тканях рака желудка, что согласуется с данными Shafqat и др., показавшим что содержание β-актина в опухолевой ткани возрастет [20]. Гипоксия микроокружения – важная особенность сóлидных опухолей, а также одно из важных различий между опухолевыми тканями и прилегающими тканями. Мы предположили, что гипоксия микроокружения вызывает изменения в экспрессии NRF-1 и β-актина. Для этого линии клеток рака желудка и линию клеток нормальной ткани желудка выдерживали в условиях 1% O_2 и оценивали экспрессию NRF-1 и β-актина. Выявлены аналогичные тенденции изменений уровней NRF-1 и β-актина. Однако количество этих белков снижалось в клетках AGS, MKN28 и SNU-719, что было противоположно их изменениям в опухолевых тканях и в других клетках рака желудка. Повидимому, эти различия не связаны со степенью дифференцировки клеток, так как и ASG, и MKN45 были низкодифференцированными клетками, тогда как MKN28 умеренно дифференцированной, а SNU-719 высокодифференцированной линией. В этой работе мы не исследовали причин этих различий, хотя и раньше замечали разные направления в изменениях уровней NRF-1 в различных клеточных линиях из других опухолевых источников в условиях гипоксии. Между тем сообщалось, что гипоксия индуцирует различные изменения даже в нормальных тканях [21], из чего следует, что опосредованное гипоксией изменение экспрессии NRF-1 имеет сложный характер.

С целью понять, вызвано ли изменение экспрессии β-актина изменением NRF-1, мы модифицировали экспрессию NRF-1 в клетках GES-1. Для дифференциации эндогенного и экзогенного NRF-1 на С-конце NRF-1, встроенного в плазмиду и сверхэкспрессируемого ею, был добавлен тег FLAG. Выявлено, что уровень β-актина изменялся синхронно с NRF-1. Учитывая, что NRF-1 – важный транскрипционный фактор, мы предположили, что NRF-1 регулирует экспрессию β-актина на транскрипционном уровне. Проанализировав область промотора и интронов гена *ACTB*, мы не обнаружили сайтов связывания NRF-1, тогда как в кодирующей области *ACTB* идентифицировали 3 потенциальных сайта связывания; причем они оказались высококонсервативными у млекопитающих. В результате проведенного ChIP-анализа также показано, что NRF-1 связывается с кодирующей областью *ACTB*. Это отличается от нашего привычного понимания регуляции транскрипции, хотя ранее Stergachis и соавт. [22], используя технологию высокопроизводительного секвенирования, обнаружили, что связывание транскрипционных факторов с кодирующей областью гена – достаточно общее явление и может играть роль в регуляции эпигенетических изменений. Нами показано, что изменение экспрессии NRF-1 во время гипоксии приводит к значительному изменению уровня β-актина, подтверждая нестабильность экспрессии β-актина в условиях гипоксии. Эти результаты согласуются с данными Turkoglu и Kockar [23], которые еще в 2012 году указывали на то, что ген β-актина не подходит в качестве гена внутреннего стандарта для ПЦР, что обусловлено нестабильностью его экспрессии в условиях гипоксии. Сообщалось также, что и другие известные гены, экспрессия которых считается стабильной, включая *GAPDH* и тубулин, не подходят в качестве внутренних референс-генов [24].

В результате проведенного исследования еще раз подтверждено, что NRF-1 играет важную роль для клетки в целом. Sant и соат. [25] сообщали, что нокаутирование по *NRF1* было летальным событием для животных. Нами также обнаружено, что клетки с нокаутом по *NRF1* были нежизнеспособными (*неопубликованные данные*). На основании этого мы предполагаем, что аномалии в экспрессии NRF-1 вызывают не только митохондриальную дисфункцию, но и нарушения цитоскелета. Цитоскелет играет очень важную роль в поддержании клеточной структуры, транспорта и метаболизма. Нарушенния в структуре цитоскелета приводят к дисфункции клеток, а затем к их апоптозу или аномальной пролиферации [26]. В опухолевых тканях изменение уровня β-актина служит триггером миграции клеток, что связано с гипоксией в микроокружении [27]. Нами показано, что изменение уровня NRF-1, индуцированное гипоксией в микроокружении, может быть основной причиной миграции клеток опухоли. Из-за множества эффектов NRF-1 в клетке встает много вопросов, на которые предстоит ответить в будущем. Например, могут ли индуцированные гипоксией изменения в уровне NRF-1 вызывать

ответы различных клеточных систем, каков механизм этих изменений при адаптации к условиям гипоксии и как это влияет на судьбу клетки. Кроме того, взаимосвязь между изменениями дыхательной функции клеток, β-актином и другими компонентами цитоскелета также заслуживает внимания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что NRF-1 активирует транскрипцию гена *ACTB*, связываясь со следующими участками в кодирующей области: +427…+437, +836…+846 и +1000…+1010. В условиях гипоксии в раковых клетках изменения в уровнях NRF-1 приводят к изменениям в экспрессии β-актина. Из этого следует, что в экспериментах, выполняемых в условиях меняющихся концентраций кислорода, ген *ACTB* не пригоден для использования в качестве внутреннего контроля.

Авторы благодарят д-ра Dan Wang, д-ра Yapeng Lu, д-ра Zhangji Dong и д-ра Xiaomei Wu за их полезные советы в ходе исследования.

Исследование поддержано Национальным фондом естественных наук Китая (the National Natural Science Foundation of China; Progects 31500965, 31471141, 31671206), Академической программой приоритетного развития высшего учебного заведения Цзянсу (the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institution, PAPD) и Цзянсунской Программой приглашенных зарубежных ученых для выдающихся университетских преподавателей и руководителей молодого и среднего возраста (Jiangsu Overseas Visiting Scholar Program for University Prominent Young & Middle-aged Teachers and Presidents).

Исследование было одобрено Комитетом по этике исследований на людях Клинической больницы Наньтунского университета (the Human Research Ethics Committee of the Affiliated Hospital of Nantong University; 2017-K036). От пациентов было получено письменное информированное согласие на публикацию этого исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sturzenbaum S.R., Kille P. (2001) Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comp. Biochem. Phys. B.* **130**, 281–289.
2. Farrants A.K.O. (2008) Chromatin remodelling and actin organisation. *FEBS Lett.* **582**, 2041–2050.
3. Rohn G., Koch A., Krischek B., Stavrinou P., Goldbrunner R., Timmer M. (2018) *ACTB* and *SDHA* are suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human astrocytomas using quantitative RT-PCR. *Technol. Cancer Res. Treat.* **17**, 1533033818802318.
4. Yang Y., Ma L., Ge R., Fan W., Zhu L., Zhao T., Wu Y., Fan M. (2008) Effects of hypoxia on mRNA expression of housekeeping genes in rat brain tissue and primary cultured neural cells. *Front. Med. China.* **2**, 239–243. https://doi.org/10.1007/s11684-008-0045-7
5. Zhong H., Simons J.W. (1999) Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**, 523–526.
6. Bruge F., Venditti E., Tiano L., Littarru G.P., Damiani E. (2011) Reference gene validation for qPCR on normoxia- and hypoxia-cultured human dermal fibroblasts exposed to UVA: is beta-actin a reliable normalizer for photoaging studies? *J. Biotechnol.* **156**, 153–162.
7. Glass J.J., Phillips P.A., Gunning P.W., Stehn J.R. (2015) Hypoxia alters the recruitment of tropomyosins into the actin stress fibres of neuroblastoma cells. *BMC Cancer.* **15**, 712.
8. Haghparast S.M.A., Kihara T., Shimizu Y., Yuba S., Miyake J. (2013) Actin-based biomechanical features of suspended normal and cancer cells. *J. Biosci. Bioeng.* **116**, 380–385.
9. Al Absi A., Wurzer H., Guerin C., Hoffmann C., Moreau F., Mao X.Q., Brown-Clay J., Petrolli R., Casellas C.P., Dieterle M., Thiery J.P., Chouaib S., Berchem G., Janji B., Thomas C. (2018) Actin cytoskeleton remodeling drives breast cancer cell escape from natural killer-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* **78**, 5631–5643.
10. Tseng R.C., Chang J.W., Mao J.S., Tsai C.D., Wu P.C., Lin C.J., Lu Y.L., Liao S.Y., Cheng H.C., Hsu H.S., Wang Y.C. (2015) Growth-arrest-specific 7C protein inhibits tumor metastasis via the N-WASP/FAK/F-actin and hnRNP U/beta-TrCP/beta-catenin pathways in lung cancer. *Oncotarget.* **6**, 44207–44221.
11. Liu Y., Wang Z.Y., Huang D., Wu C., Li H.H., Zhang X., Meng B., Li Z.J., Zhu T.H., Yang S., Sun W. (2017) LMO2 promotes tumor cell invasion and metastasis in basal-type breast cancer by altering actin cytoskeleton remodeling. *Oncotarget.* **8**, 9513–9524.
12. Dai Q.S., Shah A.A., Garde R.V., Yonish B.A., Zhang L., Medvitz N.A., Miller S.E., Hansen E.L., Dunn C.N., Price T.M. (2013) A truncated progesterone receptor (PR-M) localizes to the mitochondrion and controls cellular respiration. *Mol. Endocrinol.* **27**, 741–753.
13. Hoppeler H., Vogt M., Weibel E.R., Fluck M. (2003) Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Exp. Physiol.* **88**, 109–119.
14. Yuan X.M., Chen C.Z., Wang L., He X. (2017) Inhibition of microRNA-182 reduces hypoxia/re-oxygenation-induced HL-1 cardiomyocyte apoptosis by targeting the nuclear respiratory factor-1/mitochondrial transcription factor A (NRF-1/mtTFA) pathway. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **10**, 5162–5170.
15. Evans M.J., Scarpulla R.C. (1989) Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome *c* promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J. Biol. Chem.* **264**, 14361–14368.
16. Virbasius C.A., Virbasius J.V., Scarpulla R.C. (1993) NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain con-

served in a family of developmental regulators. *Genes Dev.* **7**, 2431–2445.

17. Satoh J., Kawana N., Yamamoto Y. (2013) Pathway analysis of ChIP-Seq-based NRF1 target genes suggests a logical hypothesis of their involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Gene Regul. Syst. Bio.* **7**, 139–152.
18. Jayanta K.D., Quentin F., Robert P., Robert M.J., Deodutta R. (2018) Nuclear respiratory factor 1 acting as an oncoprotein drives estrogen-induced breast carcinogenesis. *Cells.* **7**, 234.
19. Wang D., Zhang J., Lu Y.P., Luo Q.Q., Zhu L. (2016) Nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) regulated hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) under hypoxia in HEK-293T. *IUBMB Life.* **68**, 748–755.
20. Shafqat A.K., Monica T., Ajit K.S., Savio G.B., Bhawna S., Mukta R., Shailesh V.S., Sanjay G. (2014) Cell-type specificity of β-actin expression and its clinicopathological correlation in gastric adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* **20**, 12202–12211.
21. Biswas M., Chan J.Y. (2010) Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond. *Toxicol. Appl. Pharm.* **244**, 16–20.
22. Stergachis A.B., Haugen E., Shafer A., Fu W.Q., Vernot B., Reynolds A., Raubitschek A., Ziegler S., LeProust E.M., Akey J.M., Stamatoyannopoulos J.A. (2013) Exonic transcription factor binding directs codon choice and affects protein evolution. *Science.* **342**, 1367–1372.
23. Turkoglu S.A., Kockar F. (2012) Expression of Gapdh, B-actin and B-2-microglobulin genes under chemically induced hypoxic conditions in Hep3b and Pc3 cells. *J. Appl. Biol. Sci.* **6**(3), 1–6.
24. Mori R., Wang Q.C., Danenberg K.D., Pinski J.K., Danenberg P.V. (2008) Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. *Prostate.* **68**, 1555–1560.
25. Sant K.E., Hansen J.M., Williams L.M., Tran N.L., Goldstone J.V., Stegeman J.J., Hahn M.E., Timme-Laragy A. (2017) The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of glutathione and redox dynamics in the developing zebrafish embryo. *Redox Biol.* **13**, 207–218.
26. Veselska R., Zitterbart K., Jelinkova S., Neradil J., Svoboda A. (2003) Specific cytoskeleton changes during apoptosis accompanying induced differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Oncol. Rep.* **10**, 1049–1058.
27. Vogler M., Vogel S., Krull S., Farhat K., Leisering P., Lutz S., Wuertz C.M., Katschinski D.M., Zieseniss A. (2013) Hypoxia modulates fibroblastic architecture, adhesion and migration: a role for HIF-1alpha in cofilin regulation and cytoplasmic actin distribution. *PLoS One.* **8**, e69128.

HYPOXIA ACCELERATE β-ACTIN EXPRESSION THROUGH TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF *ACTB* BY NUCLEAR RESPIRATORY FACTOR-1

X. T. Wang[1], K. Cheng[1], and L. Zhu[1, *]

[1]*Institute of Special Environmental Medicine, Nantong University, Nantong, 226019 China*

**e-mail: zhuli85051796@163.com*

Cytoskeletal protein β-actin is abundant both in the cytoplasm and the nucleus, its mRNA is commonly utilized an internal control for gene expression analysis. Recent reports demostrated that hypoxia influences the levels of β-actin in a variety of cells. The mechanism underlying this change are not yet elucidated. In this work, we show that the changes in the levels of hypoxia-induced Nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) lead to the change in expression of β-actin. We compared the protein levels of NRF-1 and β-actin in gastric cancer and adjacent tissues and found their significantly upregulation in cancer (33% patitents). When gastric cancer cells and normal gastric cells were treated with 1% O_2 for 48 h, the trends in expression levels of NRF-1 and β-actin were similar. When NRF-1 expression was modified by its overexpressing or silencing, the levels of β-actin changed accordingly. In β-actin gene (*ACTB*), three binding sites for NRF-1 were found. These sites are conserved in human, mouse and rat genomes. In ChIP experiments, we showed that NRF-1 directly binds to human *ACTB* and mouse *Actb* coding regions. Its seems that the transcription of β-actin encoding gene is NRF-1 dependent.

Keywords: nuclear respiratory factor 1, β-actin, hypoxia, transcription regulation

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 3, с. 468–477

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 616-006.3.04:57.084.1;57.042.2

ЯД ЗМЕИ *Macrovipera lebetina obtusa* КАК ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ МОДУЛЯТОР В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ САРКОМЫ S-180[1]

© 2021 г.
N. Ghazaryan[a, b, *], N. Movsisyan[b, c], J. C. Macedo[d], S. Vaz[d], N. Ayvazyan[a], L. Pardo[b], E. Logarinho[d]

[a] *Laboratory of Toxinology and Molecular Systematics, Institute of Physiology, Yerevan, 0028 Armenia*
[b] *Oncophysiology Group, Max Planck Institute for Experimental Medicine, Göttingen, 37075 Germany*
[c] *Göttingen Graduate School for Neurosciences, Biophysics, and Molecular Biosciences, Göttingen, 37075 Germany*
[d] *Aging and Aneuploidy Laboratory, Instituto de Biologia Molecular e Celular, Instituto de Investigação e Inovação em Saúde — i3S, Universidade do Porto, Porto, 4200-135 Portugal*
**e-mail: naringhazaryan@gmail.com*

Поступила в редакцию 11.06.2020 г.
После доработки 14.08.2020 г.
Принята к публикации 17.08.2020 г.

Macrovipera lebetina obtusa (MLO) – ядовитая змея, эндемичная для Ближнего Востока. В исследовании описан терапевтический потенциал яда змеи MLO. На модели мышей с саркомой S-180 показано, что яд MLO ингибирует рост опухоли на 50%. Обработка эндотелиальных клеток микрососудов кожи человека (HMVEC-D) ядом MLO приводила к повышению экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), в то время как уровень каспазы-8 не изменялся. В клетках HMVEC-D яд MLO индуцировал некроптоз, а не апоптоз. Обработка хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона (CAM) ядом MLO вызывала ингибирование FGF2-индуцируемого ангиогенеза на 22%. В целом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что яд MLO обладает сильной цитотоксической активностью. Регулируемый путь некроптической гибели клеток, в который вовлечен яд змеи MLO, может стать новой мишенью в противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: яд змеи, саркома, ангиогенез, некроптоз

DOI: 10.31857/S0026898421030071

ВВЕДЕНИЕ

Саркома мягких тканей – это редкий тип опухоли, развивающейся в тканях, соединяющих, поддерживающих и окружающих другие органы тела [1–3]. К этим тканям относятся мышцы, жир, кровеносные сосуды, нервы, сухожилия и выстилка суставов. Описано более 50 подтипов саркомы мягких тканей. Некоторые типы чаще поражают детей, а другие – в основном взрослых. Эти опухоли часто трудно диагностировать, так как их можно принять за другие типы новообразований [2].

Опухоль может распространяться на соседние или отдаленные органы, создавая опасное для жизни состояние. Опухолевые клетки метастазируют: проникая в кровеносные или лимфатические сосуды, они циркулируют по внутренним сосудам, а затем делятся в другом месте [4–12]. Рост сосудистой сети важен для метастатического распространения раковой ткани. Процесс формирования новых кровеносных сосудов – ангиогенез – играет важную роль в формировании новой сосудистой сети для доставки питательных веществ, кислорода и иммунных клеток, а также для удаления продуктов жизнедеятельности [4]. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) – мощный ангиогенный агент, присутствующий не только в неопластических, но и в нормальных тканях. Под влиянием определенных цитокинов и других факторов роста семейство белков VEGF появляется в раковой ткани и прилегающей строме и играет важную роль в неоваскуляризации [13, 14].

На сегодняшний день разработано множество антиангиогенных препаратов, но их терапевтическая эффективность ограничена и часто связана с токсичным побочным действием. Обтустатин, известный как KTS (Lys-Thr-Ser), представляет

[1] Статья представлена авторами на английском языке.
Принятые сокращения: CAM (chick embryo chorioallantoic membrane) – хориоаллантоисная мембрана куриного эмбриона; HMVEC-D (human dermal microvascular endothelial cells) – эндотелиальные клетки микрососудов кожи человека; MLO – *Macrovipera lebetina obtusa*.

собой мономерный дезинтегрин, обнаруженный в яде змеи *Macrovipera lebetina obtusa* (MLO) [15–19]. Этот небольшой пептид оказывает сильное терапевтическое действие на прогрессирующую меланому и, как показано нами недавно, ингибирует рост саркомы S-180 в мышиной модели [20–22]. Онкостатический эффект KTS связан с подавлением процесса ангиогенеза, что, возможно, обусловлено ингибированием интегрина-$\alpha 1\beta 1$ в эндотелиальных клетках [20]. Однако, учитывая результаты наших предыдущих исследований [22] и всей истории использования змеиного яда в медицинских целях, следует сказать, что во многих случаях терапевтический эффект сырого змеиного яда оказывается сильнее, чем его отдельных компонентов.

Яд змеи MLO содержит 38 белков, которые принадлежат к нескольким основным семействам, включая ферменты и белки без ферментативной активности. Насколько нам известно, с биохимической точки зрения змеиный яд представляет собой сложную смесь фармакологически активных белков и полипептидов. Все эти компоненты действуют согласованно. Синергетическое действие белков змеиного яда может усиливать их активность или способствовать распространению токсинов. Синергизм особенно важен для яда змей рода *Vipera*, потому что в нем нет настоящих токсинов (таких как трехпальцевые токсины Elapidae или цитотоксины гадюк). Почти все ферменты *Vipera* представляют собой паралоги ферментов млекопитающих. В большинстве случаев ферменты змеиного яда действуют как мономеры; в таком виде они проявляют оптимальные фармакологические свойства и вносят свой вклад в токсичность. Но в случае яда змей рода *Vipera* они образуют комплексы с другими неферментными белками для достижения более высокой эффективности за счет синергии. Так, известно, что очищенные компоненты яда змеи MLO проявляют менее 1% токсичности "полного многокомпонентного яда" [19].

Нами проанализировано влияние сырого яда змеи MLO на экспрессию белка VEGF и нескольких каспаз в мышиной модели саркомы S-180. Кроме того, исследован антиангиогенный эффект зметного яда в хориоаллантоисной мембране куриного эмбриона (CAM) *in vivo*, а также в эндотелиальных клетках микрососудов кожи человека (HMVEC-D) *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использован яд змеи MLO ("Tocris Bioscince", Великобритания). Первичные эндотелиальные клетки микрососудов кожи взрослого человека (HMVEC-D) получены из Американской коллекции клеточных культур (ATCC, США), их культивирование проводили в полной базовой среде-131 для эндотелиальных клеток с добавкой стимуляторов роста микрососудов, содержащей 15% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS) (все препараты компании "Invitrogen", США). Во всех экспериментах использовали клетки HMVEC-D ранних пассажей (3–6).

Рекомбинантный белок VEGF человека (hrVEGF), использованный для индукции пролиферации клеток HMVEC-D *in vitro*, и коллаген IV были приобретены у компании "Sigma" (США); фактор роста фибробластов (bFGF), использованный для стимуляции ангиогенеза в CAM-анализе *in vivo*, – у "Immuno Tools" (Германия).

Лизис тканей. Ткани опухолей (50 мкг) лизировали в 2 мл буфера, содержащего 0.5% Triton X-100, 25 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 75 мМ NaCl, 2.5 мМ EDTA, 0.5 мМ PMSF, 0.5 мМ DTT, 5 мМ NaF, смесь ингибиторов протеаз ("Roche", Швейцария). Для эффективной гомогенизации ткани и высокого выхода белка в буфер для лизиса добавляли стеклянные шарики. Образцы энергично встряхивали с частотой 30 ударов в секунду в течение 3 мин при комнатной температуре. В случае неполной гомогенизации (кусочки ткани все еще были видны в образцах) этап гомогенизации повторяли. Гомогенизированные образцы центрифугировали при 13545 × *g* в течение 30 мин при комнатной температуре. При необходимости этап центрифугирования повторяли и собирали супернатант.

Определение концентрации и молекулярной массы белка. Процедуры разделения и анализа белков подробно описаны нами ранее [21], далее дано их краткое описание.

Электрофорез в SDS-ПААГ и иммуноблотинг. Концентрацию белков в лизатах тканей определяли с помощью набора Pierce ™ BCA Protein Assay kit ("Thermo Fisher Scientific", США). Белки разделяли электрофорезом в ПААГ в денатурирующих условиях (SDS-ПААГ). После разделения белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Novex, 0.2 мкм, с использованием прибора Pierce Power Blot Station и кассеты для блотинга ("Thermo Fisher Scientific") при напряжении 25 В и силе тока 3 А в течение 13 мин. После электропереноса мембрану промывали деионизированной водой и инкубировали в течение 1.5 ч в блокирующем буфере, содержащем 0.1% казеина ("Roche") в TBST (0.02 М Трис-HCl, pH 7.5, 0.15 М NaCl, 0.1% Tween 20).

Белки VEGF и каспазы детектировали, используя в качестве первичных моноклональные мышиные антитела против VEGF (sc-7269; "Santa Cruz Biotechnology, Inc.", США) и каспазы-8 (sc-16696, "Santa Cruz Biotechnology, Inc.") в разведении 1 : 1000, прокаспазы-9 и (sc-133109; "Santa Cruz Biotechnology, Inc.") в разведении 1 : 500,

расщепленной каспазы-3 (# 9661S; “Cell Signaling Technology”, США) в разведении 1 : 1000, каспазы-5 (sc-393346; “Santa Cruz Biotechnology, Inc.”) в разведении 1 : 500 в блокирующем буфере. Инкубацию проводили при осторожном перемешивании в течение ночи при 4°C. После пятикратной промывки деионизованной водой и 5-минутной отмывки в TBST мембраны в течение 1 ч инкубировали с конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) бараньими антителами против IgG мыши (NA931, “GE Healthcare”, США), разведенными в соотношении 1 : 8000 в блокирующем буфере. После промывки на мембрану наносили хемилюминесцентный субстрат HRP (“Thermo Fisher Scientific”) и через 5 мин детектировали сигнал с помощью системы ChemiDoc XRS (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, США). Изображения получали с использованием программного обеспечения Quantity One 1-D Analysis v4.6.9 (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”). Обработку и анализ изображений проводили в программе ImageLab 4.0 (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”).

Денситометрический анализ. Изменения содержания целевого белка оценивали по результатам денситометрического анализа сигнала хемилюминесценции, проведенного с помощью программного обеспечения Image Lab 4.0. Измеряли общую интенсивность каждого сигнала иммуноблотинга после выбора соответствующей полосы с помощью функции “Lane and Bands” (“дорожка и полосы”) и корректировки выбранной области с помощью функции “Lane profile” (“профиль дорожки”). Фоновый сигнал вычитали из значения сигнала в образце по методу “катящегося диска” (размер диска 8 мм). Молекулярную массу белка определяли с помощью функции “MW”. Нормализованную общую интенсивность каждого сигнала рассчитывали путем деления измеренной общей интенсивности сигнала целевого белка на соответствующее значение сигнала для актина.

Мышиная модель саркомы S-180 и введение препаратов. Клетки саркомы S-180 трансплантировали подкожно в правую подмышечную впадину каждой мыши. Когда опухоль вырастала до объема 100–300 мм^3, мышей случайным образом делили на 2 группы (по 5 мышей в каждой): контрольную и опытную (обработанную ядом змеи MLO). В контрольной группе мышам вводили PBS, в опытной группе каждое животное получало небольшие дозы яда MLO (10 мкг/мышь). Растворы яда готовили в PBS и ежедневно вводили внутрь опухолей (50 мкл) в течение 5 суток; через 24 ч после последнего введения всех животных взвешивали и умерщвляли.

Все процедуры выполнены в соответствии с “Правилами по уходу за животными” Института физиологии (Institute of Physiology, Армения) и этическими принципами IACUC по обезглавливанию неанестезированных мышей и крыс (http://www.utsouthwestern.edu/utsw/cda/dept238828/files/469088.html).

Определение противоопухолевой активности яда MLO *in vivo*. Противоопухолевую активность яда MLO выражали как степень ингибирования (%) роста опухоли и рассчитывали по формуле:

$$[(A - B)/A] \times 100\%, \quad (1)$$

где A и B – средняя масса опухоли в контрольной и опытной группах мышей соответственно.

Анализ хориоаллантоисной мембраны куриного эмбриона (CAM-анализ). CAM-анализ проводили для оценки антиангиогенной активности обтустатина. Оплодотворенные куриные яйца (*Gallus gallus*) инкубировали в горизонтальном положении при 37.8°C в увлажненной атмосфере и обозначали как эмбриональные (E). На третьи сутки инкубации (E3) в оболочке делали квадратное окно и удаляли 2–2.5 мл белка, чтобы дать развивающейся CAM отслоиться. Окно заклеивали прозрачной липкой лентой, и яйца возвращали в инкубатор. На 10 сутки инкубации (E10) в стерильных условиях на поверхность CAM помещали силиконовое кольцо диаметром 3 мм, вводили в него раствор, содержащий в качестве индуктора ангиогенеза bFGF в концентрации 400 нг/яйцо (контрольная группа; $N = 13$), или тот же раствор с 3.5 мкг/яйцо яда MLO (опытная группа; $N = 18$). Яйца герметично закрывали и возвращали в инкубатор еще на 72 ч. Проводили три независимых эксперимента. После удаления кольца CAM вырезали из эмбрионов и фотографировали *ex ovo* под стереоскопом Olympus, SZX16 в сочетании с камерой DP71 (“Olympus”, Япония) при 20-кратном увеличении. Число новых сосудов (диаметр < 15 мкм), растущих в радиальном направлении к области кольца, определяли вслепую.

Детекция мертвых клеток с помощью зеленого флуоресцентного красителя IncuCyte Cytotox. Реагент IncuCyte Cytotox green (“Sartorius”, США) использовали в соответствии с инструкциями производителя для количественного определения мертвых клеток после 24-часовой обработки ядом змеи MLO (3.5 мкг/мкл). Эксперименты проводили в трех повторах. Яд змеи MLO разводили в PBS. Пролиферацию клеток HMVEC-D индуцировали обработкой hrVEGF в концентрации 50 нг/мл.

Анализ жизнеспособности клеток и апоптоза. Жизнеспособность клеток и апоптоз определяли количественно с использованием мультиплексного анализа ApoLive-Glo (“Promega”, США) в соответствии с инструкциями производителя после 24-часовой обработки ядом змеи MLO (1 мкг/мкл). Мультиплексный анализ ApoLive-Glo™ используют для выяснения механизма гибели клеток, так как с его помощью можно в одной лунке измерить как количество жизнеспособных клеток (маркер

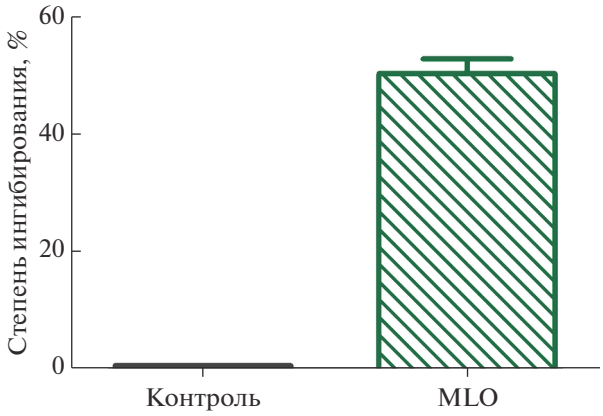


Рис. 1. Яд MLO ингибирует рост саркомы S-180 у мышей. Животным опытной группы каждый день в течение 5 суток вводили внутрь опухоли по 10 мкг яда MLO, растворенного в 50 мкл PBS. Мышам контрольной группы вводили PBS в том же режиме. Через 24 ч после последнего введения животных взвешивали и умерщвляли путем смещения шейных позвонков. Противоопухолевую активность выражали как степень ингибирования (%) и рассчитывали по формуле (1). Результаты представлены как среднее ± ± стандартная ошибка (SEM) на основании двух независимых экспериментов (непарный *t*-критерий, $p < 0.05$).

цитотоксичности), так и активацию каспаз (маркеры апоптоза).

В первой части анализа измеряют активность протеазного маркера жизнеспособности клеток. Активность протеазы живых клеток ограничена интактными жизнеспособными клетками и измеряется с использованием флуорогенного, проницаемого для клеток пептидного субстрата глицил-фенилаланил-аминофторкумарина (GF-AFC). Субстрат проникает в интактные клетки, где он расщепляется под действием протеазы, генерируя флуоресцентный сигнал, пропорциональный количеству живых клеток. Эта протеаза живых клеток теряет активность при нарушении целостности клеточной мембраны и попадании в окружающую культуральную среду.

Вторая часть анализа построена на технологии Caspase-Glo® Assay и предназначена на измерение активности каспаз – ключевого биомаркера апоптоза. В анализе Caspase-Glo® использован люминогенный субстрат каспазы-3/7 – DEVD-аминолюциферин – в реагенте, оптимизированном для активности каспазы и лизиса клеток. Добавление реагента Caspase-Glo® 3/7 приводит к лизису клеток с последующим расщеплением субстрата каспазой и генерацией люминесцентного сигнала, величина которого пропорциональна каспазной активности.

Эксперименты выполняли в трех повторах, и данные представляли в виде графика как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Яд MLO разводили в PBS. Пролиферацию клеток HMVEC-D индуцировали обработкой hrVEGF в концентрации 50 нг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Яд змеи MLO подавляет рост саркомы S-180 у мышей, усиливает экспрессию VEGF, но не каспаз-8 и -9

По результатам экспериментов *in vivo* яд MLO подавлял рост саркомы S-180 у мышей на 50% (рис. 1); при этом не наблюдали значительной потери веса у животных этой группы, то есть лечение не вызывало заметного побочного эффекта (*данные не представлены*).

Известно, что VEGF играет важную роль в ангиогенезе, поэтому мы исследовали влияние яда на экспрессию VEGF у мышей с саркомой S-180. Согласно полученным результатам (рис. 2), обработка опухоли ядом змеи MLO приводила к повышению экспрессия белка VEGF (рис. 2).

Ранее мы сообщали, что яд змеи MLO вызывает некроз клеток саркомы S-180 *in vivo*, но не исследовали детально механизм их гибели [22]. Теперь мы проанализировали влияние яда на экспрессию некоторых каспаз. После обработки опухолей ядом не зарегистрировано никаких изменений в уровнях каспазы-8 и прокаспазы-9, тогда как для каспазы-3 и каспазы-5 выявлена тенденция к усилению экспрессии. Отсутствие изменений в содержания каспаз-8 и -9 свидетельствует о том, что яд MLO не вызывает апоптоза раковых клеток, в то же время его действие не приводит и к некрозу, так как изменяются уровни каспаз-3 и -5 (рис. 2). В течение последнего десятилетия широко обсуждается путь программируемой гибели клеток, называемый некроптозом, особенно при онкологических и воспалительных заболеваниях [23]. Уже известно, что при этих патологиях некроптический способ разрушения клеток может сопровождаться повышением активности эффекторных каспаз. Этот механизм заключается в том, что каспаза-3 запускает неспецифический ответ, так называемый ответ “наблюдателя” (bystander response), модулируя передачу сигнала внутри клеток и/или стимулируя пролиферацию соседних клеток [24–26].

Антиангиогенный эффект яда змеи MLO

Антиангиогенный эффект яда MLO оценивали в CAM-анализе *in vivo*. С целью имитировать патологическое состояние, при котором усиливается ангиогенез, 10-дневные куриные эмбрионы обрабатывали только bFGF или в сочетании с ядом MLO (3.5 мкг/яйцо). Через 72 ч после обработки CAM вырезали из эмбрионов, фотографировали *ex ovo* под стереоскопом и определяли чис-

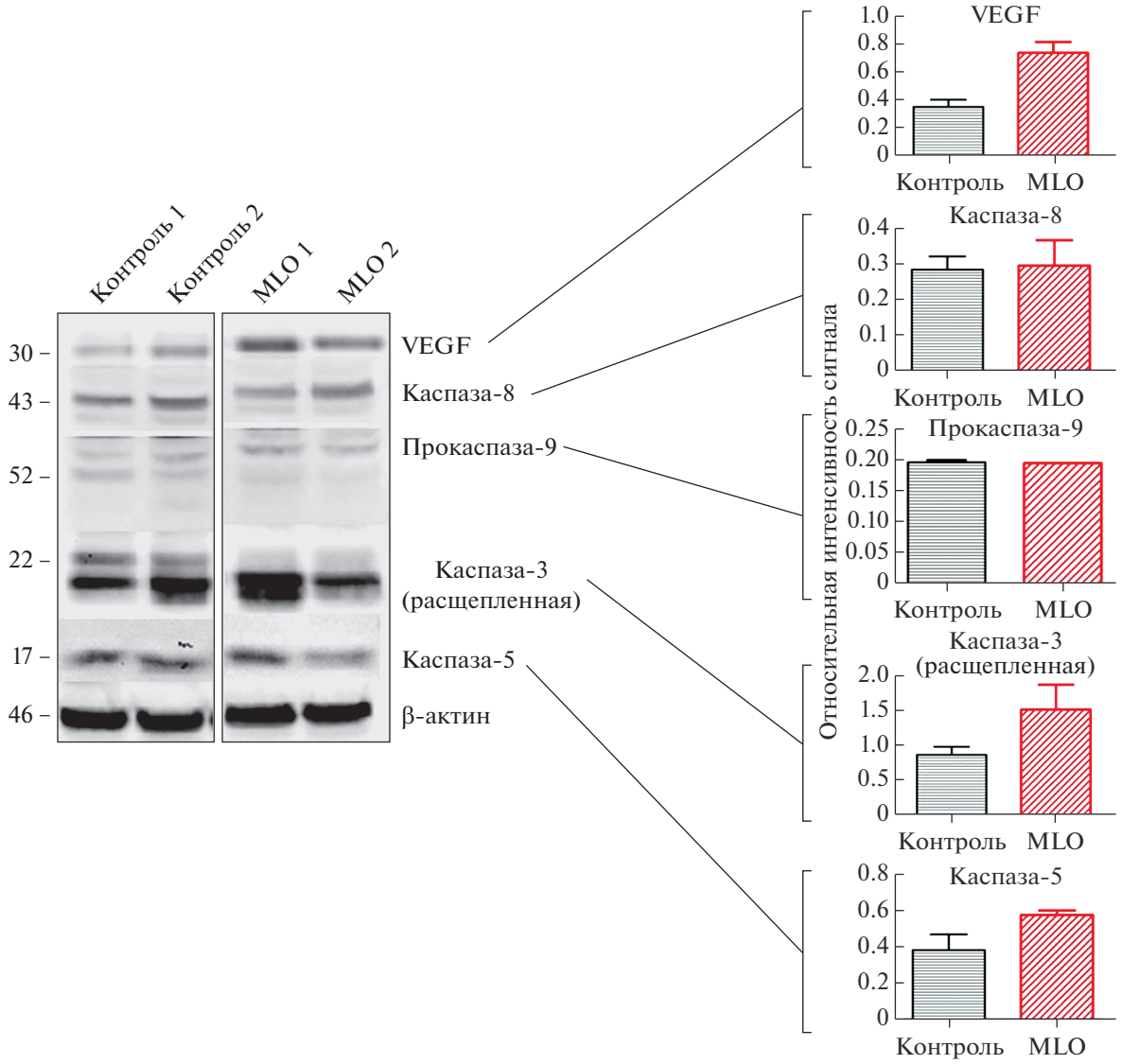


Рис. 2. Влияние яда MLO на экспрессию белков VEGF, каспазы-8, прокаспазы-9, каспазы-3 и каспазы-5 в опухолях саркомы S-180 у мышей. Белки экстрагировали из опухолей, изолированных от мышей, и использовали для вестерн-блот-анализа. Представлены результаты двух независимых экспериментов (обозначены цифрами 1 и 2), проведенных с антителами против VEGF, каспазы-8, прокаспазы-9, каспазы-3 и каспазы-5. β-actin использовали в качестве контроля загрузки. Денситометрический анализ выполнен с помощью программного обеспечения ImageLab 4.0 (“Bio-Rad”). Результаты представлены как среднее ± SEM на основании двух независимых экспериментов, проведенных в трех повторах (непарный *t*-критерий, $p < 0.05$).

ло вновь образовавшихся сосудов (диаметр менее 15 мкм) (рис. 3). По сравнению с куриными эмбрионами, обработанными только bFGF, в CAM эмбрионов, содержащих яд MLO, появилось значительно меньшее сосудов (рис. 3*а*).

Влияние яда MLO на жизнеспособность и апоптоз клеток HMVEC-D in vitro

При изучении влияния яда MLO на жизнеспособность клеток HMVEC-D *in vitro* использован реагент IncuCyte® Cytotox green. Краситель специфично связывается с ДНК мертвых клеток из-за потери целостности их мембран. Клетки HMVEC-D выращивали в присутствии hrVEGF на планшетах, покрытых коллагеном IV. Клетки обрабатывали ядом MLO в течение 24 ч и анализировали поля изображения с помощью IncuCyte. Согласно полученным результатам (рис. 4), обработка ядом змеи MLO приводит к гибели практически всей популяции клеток.

С целью дополнительной проверки полученных результатов мы использовали мультиплексный анализ ApoLive-Glo. Этот эксперимент поз-

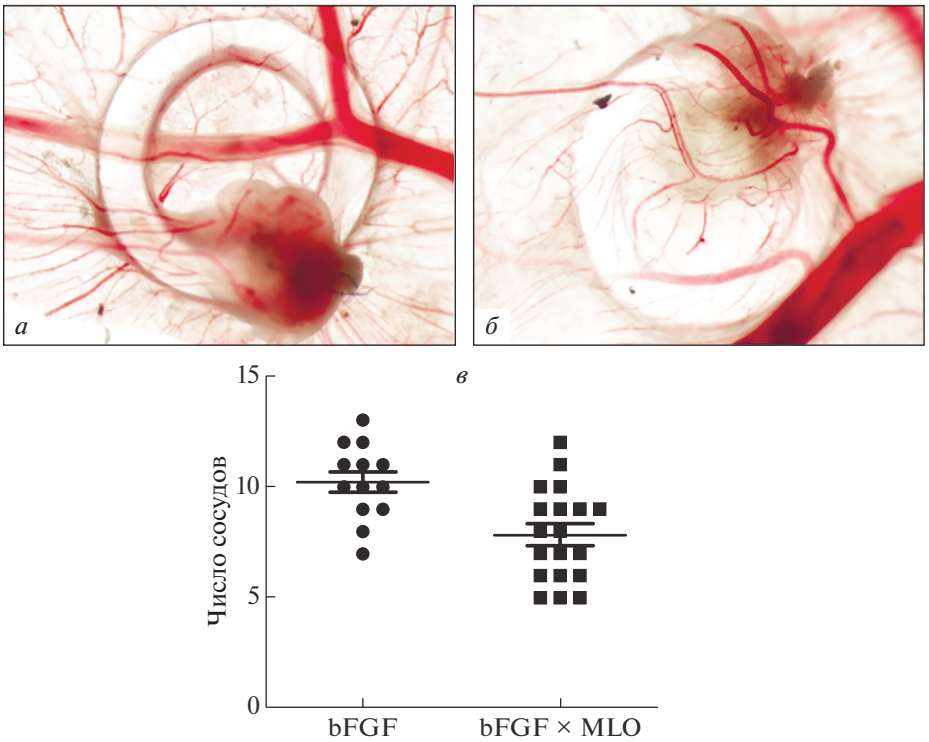


Рис. 3. САМ-анализ *in vivo* антиангиогенного действия яда змеи MLO. На 10 сутки инкубации на поверхность САМ помещали силиконовое кольцо диаметром 3 мм и добавляли в него растворы: *а* – bFGF (400 нг/яйцо; $N = 13$); *б* – bFGF (400 нг/яйцо) и яд змеи MLO (3.5 мкг/мкл; $N = 18$). Представлены характерные изображения состояния мембраны в каждом эксперименте после 72 ч обработки. *в* – Число новых сосудов (диаметр < 15 мкм), растущих в радиальном направлении к области кольца, подсчитано вслепую в трех независимых экспериментах. Результаты представлены как среднее ± SEM (непарный *t*-критерий, $p < 0.05$).

воляет, в первую очередь, определить активность протеазного маркера жизнеспособности клеток, которая характерна только для интактных жизнеспособных клеток. Небольшой пептид GF-AFC используется в качестве субстрата для определения протеазной активности живых клеток, генерируя флуоресцентный сигнал, пропорциональный количеству живых клеток. Обнаружено, что низкие концентрации сырого яда MLO сильно снижают жизнеспособность клеток (рис. 5*а*). Активность биомаркера апоптоза каспазы-3/7 не увеличивалась в клетках HMVEC-D, обработанных ядом MLO (рис. 5*б*), что подтверждает данные о неапоптотическом пути их гибели. Следует сказать, что уровень апоптоза был даже несколько выше (хотя и незначительно) в контрольных клетках, чем в обработанных ядом, что, вероятно, связано с их более высокой скоростью пролиферации и конкуренцией за питательные вещества.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение последних пяти лет в проведенных нами экспериментах установлено, что один из компонентов змеиного яда MLO – обтустатин – ингибирует рост саркомы S-180 у мышей, не вызывая при этом потери веса животных, что, по-видимому, можно расценивать как отсутствие побочного действия препарата [21, 22]. Теперь мы исследовали потенциальное терапевтическое действие неочищенного змеиного яда MLO на модели саркомы S-180 у мышей.

Впервые исследованы функции и механизмы действия яда MLO при ангиогенезе саркомы. В экспериментах *in vivo* показано, что яд змеи MLO подавляет рост опухоли на 50%. Используя ту же модель саркомы S-180 у мышей, мы проанализировали экспрессию белка VEGF – одного из наиболее специфичных и важных регуляторов сигнального каскада ангиогенеза [8–12] – до и после обработки ядом MLO. Показано, что экспрессия VEGF усиливается в клетках опухоли, обработанных змеиным ядом. Этот феномен можно объяснить способностью яда MLO ингибировать ангиогенез, что может вызывать гипоксию в опухолевой ткани. В условиях гипоксии активируется индуцируемый гипоксией фактор-1α (HIF-1α), усиливая HIF-1α-зависимую транскрипционную активацию гена *VEGFA* [27–30]. Эту гипотезу еще предстоит проверить, проанализировав экспрессию HIF-1α в контрольной и обработанной ядом MLO группах мышей.

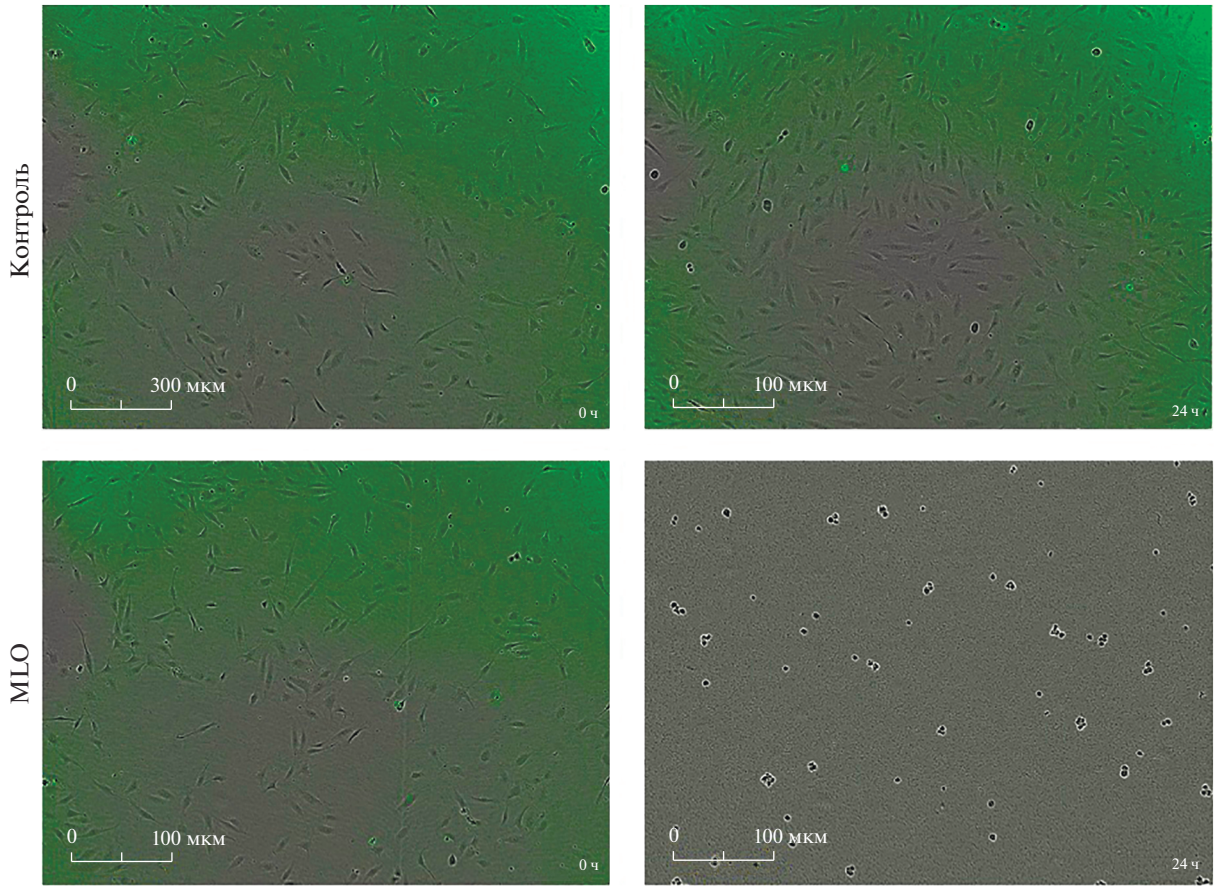


Рис. 4. Анализ гибели клеток HMVEC-D, вызванной ядом змеи MLO, с помощью IncuCyte ZOOM®. Клетки HMVEC-D выращивали на планшетах, покрытых коллагеном IV (50 мкг/мл), в присутствии hrVEGF (50 нг/мл). IncuCyte® Cytotox green (0.25 мкМ) добавляли после 24-часовой обработки ядом MLO (3.5 мкг/мкл). Характерные изображения полей получали с помощью IncuCyte ZOOM®. Масштаб 300 мкм.

На основании накопленных к настоящему времени данных можно сделать вывод, что несколько выделенных или рекомбинантных токсинов змеиного яда оказывают противораковое действие на доклинических моделях злокачественных опухолей *in vitro* и *in vivo*, вызывая гибель клеток по пути апоптоза, внутриклеточно активируемого митохондриями, или по пути некроза [31–33]. В ранее проведенных нами экспериментах на мышиной модели саркомы S-180 *in vivo* показано, что при лечении животных обтустатином не происходит апоптотической гибели раковых клеток [21]. Такой вывод был сделан на основании анализа экспрессии каспазы-8 как индикатора внеклеточной активации пути апоптоза (ранее описана как маркер опосредованной интегринами смерти [34]), а также прокаспазы-9, каспазы-3 и каспазы-5.

Теперь нами исследовано влияние змеиного яда MLO на клетки саркомы S-180. Никаких признаков апоптоза раковых клеток мы не зарегистрировали, но получили некоторые “намеки” на некроптоз, а не на некроз. Хорошо известно, что для некоторых типов злокачественных опухолей характерны многочисленные мутации в каспазах, что нарушает функциональную активность этих ферментов и приводит к подавлению апоптоза в опухолевых тканях; причем эти данные в основном касаются каспазы-8 [35]. Что касается каспазы-3, то она известна как очень мощный эффектор апоптоза, причем как по внутриклеточному, так и внеклеточному пути. У каспазы-3 обнаружены и другие, неапоптотические, функции в физиологических процессах, не вызывающих гибели клеток, – это развитие центральной нервной системы и дифференцировка [36]. Более того, недавно показано, что каспаза-3 стимулирует репопуляцию опухолей при онкотерапии [37] и инициирует дестабилизвцию генома и онкогенез.

В этом исследовании мы оценили антиангиогенный потенциал сырого змеиного яда MLO с помощью CAM-анализа *in vivo*. bFGF использовали для стимуляции роста сосудов, имитируя патологический сценарий, наблюдаемый в со́лидных опухолях. Мы рассмотрели 3 параметра для количественной оценки сосудов: диаметр сосуда, организацию сосудов и направление относитель-

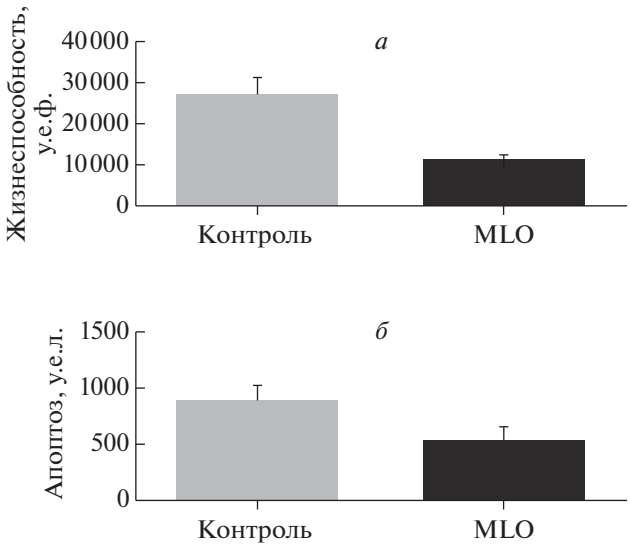


Рис. 5. Мультиплексный анализ ApoLive-Glo на жизнеспособность клеток HMVEC-D (*а*) и апоптоз (*б*). Клетки HMVEC-D, стимулированные к пролиферации в присутствии 50 нг/мл hrVEGF, обрабатывали ядом MLO (1 мкг/мкл) в течение 24 ч. Обозначения: у.е.ф. – условные единицы флуоресценции; у.е.л. – условные единицы люминесценции. Результаты представлены как среднее ± SEM по результатам трех повторов (непарный *t*-критерий, $p < 0.05$).

но сайта инокуляции. Ранее нами обнаружено [21], что 90 мкМ обтустатин ингибирует ангиогенез, индуцированный bFGF, на 17%. Несмотря на то, что неочищенный яд MLO содержит в 300000 раз меньшую концентрацию обтустатина (концентрация обтустатина в неочищенном яде MLO составляла 0.3 нМ), он подавляет ангиогенез более эффективно (~22%).

Результаты экспериментов *in vivo* подтвердили данные *in vitro*. Обнаружено, что яд змеи MLO убивает клетки HMVEC-D и ингибирует ангиогенез гораздо эффективнее чистого обтустатина (в пересчете на его концентрацию), причем гибель эндотелиальных клеток не связана с апоптозом.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что неочищенный яд змеи MLO или его компоненты следует рассматривать как новые потенциально эффективные средства для лечения сарком.

Работа выполнена при финансовой поддержке базирующегося в Нью-Йорке Армянского национального фонда науки и образования (the Armenian National Science and Education Fund (ANSEF) based in New York; грант # NS-biochem-2218) и Государственного комитета по науке Министерства образования, науки, культуры и спорта Республики Армения (State Committee of Science from Ministry of Education, Science, Culture and Sport of the Republic of Armenia; грант # 19YR-1F012).

При выполнении работы соблюдены все международные, национальные и/или институциональные инструкции по уходу и использованию животных.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. (2002) World Health Organisation classification of tumours. Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone. Eds Fletcher C.D.M., Uni K.K., Mertens F. Lyon: IARC Press, 427 p.
2. Cormier J. N., Pollock R.E. (2004) Soft tissue sarcomas. *CA Cancer J. Clin*. **54**, 94–109.
3. Dean B.J.F., Whitwell D. (2009) Epidemiology of bone and soft-tissue sarcomas. *Orthop. Trauma*. **23**, 223–230.
4. Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis theraperutic implications. *N. Engl. J. Med*. **285**, 1182–1186.
5. Carmeliet P., Jain R.K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. **407**, 249–257.
6. Hashizume H., Baluk P., Morikawa S., McLean J.W., Thurston G., Roberge S., Jain R.K., McDonald D.M. (2000) Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.* **156**, 1363–1380.
7. Senger D.R., Perruzzi C.A., Streit M., Koteliansky V.E., De Fougerolles A.R., Detmar M. (2002) The α1β1 and α2β1 integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **160**,195–204.
8. Ferrara N. (2002) VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer*. **2**, 795–803.
9. Folkman J. (2003) Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr. Mol. Med.* **3**, 643–651.
10. Naldini A., Carraro F. (2005) Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* **4**, 3–8.
11. Lijnen H. R. (2008) Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc. Res.* **78**, 286–293.
12. Carmeliet P., Jain R K. (2011) Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 417–427.
13. Benassi M.S., Gamberi G., Magagnoli G., Molendini L., Ragazzini P., Merli M., Chiesa F., Balladelli A., Manfrini M., Bertoni F. (2001) Metalloproteinase expression and prognosis in soft tissue sarcomas. *Ann. Oncol.* **12**, 75–80.
14. Hedlund E.M., Hosaka K., Zhong Z., Cao R., Cao Y. (2009) Malignant cell-derived PlGF promotes normalization and remodeling of the tumor vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 17505–17510.
15. Marcinkiewicz C., Rosenthal L.A., Mosser D.M., Kunicki T.J., Niewiarowicz C. (1996) Immunological characterization of erististatin and echistatin binding sites on αIIbβ3 and αvβ3 integrins. *Biochem. J.* **317**, 817–825.
16. Marcinkiewicz C., Weinreb P.H., Calvete J.J., Kisiel D.G., Mousa S.A., Tuszynski G.P, Lobb R.R. (2003) Obtu-

statin: a potent selective inhibitor of alpha1beta1 integrin *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. *Cancer Res.* **9**, 2020–2023.

17. Marcinkewicz C. (2005) Functional characteristic of snake venom disintegrins: potential therapeutic implication. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 815–827.
18. Calvete J.J., Mureno-Murciano M.P., Theakston D.G., Kisiel D.G., Marcinkiewicz C. (2003) Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *Biochem. J.* **372**, 725–734.
19. Sanz L., Ayvazyan N., Calvete J.J. (2008) Snake venomics of the Armenian mountain vipers *Macrovipera lebetina obtusa* and *Vipera raddei*. *J. Proteomics.* **71**, 198–209.
20. Brown M.C., Staniszewska I., Del Valle L., Tuszynski G.P., Marcinkiewicz C. (2008) Angiostatic activity of obtustatin as alpha1beta1 integrin inhibitor in experimental melanoma growth. *Int. J. Cancer.* **123**, 2195–2203.
21. Ghazaryan N., Movsisyan N., Macedo J., Vaz S., Ayvazyan N., Pardo L., Logarinho E. (2019) The antitumor efficacy of monomeric disintegrin obtustatin in S-180 sarcoma mouse model. *Invest. New Drugs.* **37**, 1044–1051.
22. Ghazaryan N.A., Ghulikyan L., Kishmiryan A., Kirakosyan G., Nazaryan O., Ghevondyan T., Zakaryan N., Ayvazyan N.M. (2015) Anti-tumor effect investigation of obtustatin and crude *Macrovipera lebetina obtusa* venom in S-180 sarcoma bearing mice. *Eur. J. Pharmacol.* **11**, 340–345.
23. Najafov A., Chen H., Yuan J. (2017) Necroptosis and cancer. *Trends Cancer.* **3**, 294–301.
24. Huang Q., Li F., Liu X., Li W., Shi W., Liu F.F., O'Sullivan B., He Z., Peng Y., Tan A.C. (2011) Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat. Med.* **17**, 860–866.
25. Liu X., He Y., Li F., Huang Q., Kato T.A., Hall R.P., Li C.Y. (2015) Caspase-3 promotes genetic instability and carcinogenesis. *Mol. Cell.* **58**, 284–296.
26. Mirzayans R., Andrais B., Kumar P., Murray D. (2016) The growing complexity of cancer cell response to DNA-damaging agents: caspase 3 mediates cell death or survival? *Int. J. Mol. Sci.* **17**(5), 708.
27. Wang G.L., Semenza G.L. (1993) Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **268**, 21513–21518.
28. Pugh C.W., Ratcliffe P.J. (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* **9**, 677–684.
29. Hirota K., Semenza G.L. (2006) Regulation of angiogenesis by hypoxiainducible factor 1. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **59**, 15–26.
30. Liang H., Xiao J., Zhou Z., Wu J., Ge F., Li Z., Zhang H., Sun J., Li F., Liu R., Chen C. (2018) Hypoxia induces miR-153 through the IRE1α-XBP1 pathway to fine tune the HIF1α/VEGFA axis in breast cancer angiogenesis. *Oncogene.* **37**, 1961–1975.
31. Aranda-Souza M., Rossato F., Costa R., Figueira T., Castilho R., Guarniere M., Nunes E., Coelho L., Correia M., Vercesi A.A. (2014) Lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. *Toxicon.* **2**, 97–103.
32. Ebrahim, K., Shirazi F., Mirakabadi A., Vatanpour H. (2015) Cobra venom cytotoxins; apoptotic or necrotic agents? *Toxicon.* **108**, 134–140.
33. Prinholato da Silva C., Costa T.R, Paiva R.M.A., Cintra A.C.O., Menaldo D.L., Antunes L.M.G., Sampaio S.V. (2015) Antitumor potential of the myotoxin BthTX-I from *Bothrops jararacussu* snake venom: evaluation of cell cycle alterations and death mechanisms induced in tumor cell lines. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **21**, 44.
34. Stupack D.G., Cheresh D.A. (2002) Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Sci.* **115**, 3729–3738.
35. Mcllwain D., Berger Th., Mak T. (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a008656.
36. D'Amelio M., Cavallucci V., Cecconi F. (2010) Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ.* **17**, 1104–1114.
37. Porter A., Jaènicke R. (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 99–104.

Macrovipera lebetina obtusa SNAKE VENOM AS A MODULATOR OF ANTITUMOR EFFECT IN S-180 SARCOMA MOUSE MODEL

N. Ghazaryan[1, 2, *], N. Movsisyan[2, 3], J. C. Macedo[4], S. Vaz[4], N. Ayvazyan[1], L. Pardo [2], and E. Logarinho[4]

[1]*Laboratory of Toxinology and Molecular Systematics, Institute of Physiology, Yerevan, 0028 Armenia*
[2]*Oncophysiology Group, Max Planck Institute for Experimental Medicine, Göttingen, 37075 Germany*
[3]*Göttingen Graduate School for Neurosciences, Biophysics, and Molecular Biosciences, Göttingen, 37075 Germany*
[4]*Aging and Aneuploidy Laboratory, Instituto de Biologia Molecular e Celular, Instituto de Investigação e Inovação em Saúde – i3S, Universidade do Porto, Porto, 4200-135 Portugal*
**e-mail: naringhazaryan@gmail.com*

Macrovipera lebetina obtusa (MLO) is a venomous snake endemic to Middle East. Here we describe the therapeutic potential of the MLO snake venom. In S-180 sarcoma-bearing mouse model, we showed that the

MLO snake venom inhibits tumour growth by 50%. In human dermal microvascular endothelial cells (HMVEC-D), treatment with the MLO snake venom lead to an increase of expression levels of the vascular endothelial growth factor (VEGF), while the level of the expression of caspase 8 did not change. In HMVEC-D cells MLO snake venom induces necroptosis, rather than apoptosis. In the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay, exposure to MLO snake venom inhibited FGF2-induced angiogenesis by 22%. Taken together, these results indicate that the MLO snake venom has a potent cytotoxic activity. Regulated necroptic cell death pathway, which is engaged by MLO snake venom, may become a promising novel target for antitumor therapies.

Keywords: snake venom, sarcoma, angiogenesis, necroptosis

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 3, с. 478–490

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 578.282

ПРОФИЛАКТИЧЕСКАЯ ВАКЦИНАЦИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ЗАЩИЩАЕТ МЫШЕЙ ОТ ЛЕТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 1 ТИПА

© 2021 г. Р. Р. Климова[a], *, Н. А. Демидова[a], О. В. Масалова[a], А. А. Кущ[a]

[a] *Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, 123098 Россия*

**e-mail: regi.k@mail.ru*

Поступила в редакцию 13.08.2020 г.
После доработки 10.09.2020 г.
Принята к публикации 10.09.2020 г.

Вирусы простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ-1 и ВПГ-2) поражают практически все органы и ткани, вызывают генитальный герпес – самое распространенное заболевание, передающиеся половым путем, – нарушения ЦНС, приводят к тяжелым осложнениям у детей. Несмотря на имеющиеся лекарственные препараты, заболеваемость, вызванная ВПГ-1/2, продолжает расти. Ни одна из профилактических кандидатных вакцин не проявила защитное действие при испытаниях и не получила разрешения на использование в клинической практике. Нами исследованы защитные свойства мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделенных из костного мозга мышей. Проведен сравнительный анализ протективного ответа на введение первичных и модифицированных МСК (мМСК); плазмиды, содержащей ген ВПГ, и инактивированного вируса на модели летальной ВПГ-1-инфекции у мышей. мМСК получали путем трансфекции гена *Us6*, кодирующего гликопротеин D (gD) ВПГ; плазмида содержала тот же ген. После двукратной иммунизации первичными МСК в периферической крови мышей наблюдали образование антител, взаимодействующих с вирусным антигеном (по данным иммуноферментного анализа) и нейтрализующих инфекционную активность ВПГ-1 в реакции биологической нейтрализации. Кроме того, введение первичных МСК индуцировало продукцию интерферона гамма (ИНФ-γ), детектируемого в периферической крови мышей. После заражения ВПГ-1 у иммунизированных мышей значительно повышались титры вирусспецифических антител, уровень ИФН-γ и они были полностью защищены от летальной ВПГ-1-инфекции. Защитный эффект трех других иммуногенов был ниже и не превышал 50–65%. Учитывая широкую доступность МСК, доказанную безопасность при внутривенном введении и впервые полученные в работе результаты о способности индуцировать врожденный, адаптивный и протективный иммунитет к ВПГ-1, можно считать МСК перспективной основой для создания новых клеточных вакцин для профилактики герпесвирусных и других вирусных инфекций.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, трансфекция, генетически модифицированные мезенхимальные стволовые клетки, рекомбинантная ДНК, ДНК-иммунизация, вирус простого герпеса 1 типа, протективная активность

DOI: 10.31857/S0026898421030101

Вирусы простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ-1 и ВПГ-2) – повсеместно распространенные патогены человека: 3.7 млрд инфицировано ВПГ-1 и 417 млн – ВПГ-2 [1–3]. Согласно данным ВОЗ [4], генитальный герпес признан самой распространенной инфекцией, передающейся половым путем; доказано, что ВПГ-инфекция повышает риск заражения ВИЧ [5]. Оба вируса вызывают неонатальный герпес [6]. ВПГ-1 – ведущий этиологический агент инфекционной слепоты, в мире ежегодно регистрируют 1 млн новых случаев и 9 млн повторяющихся эпизодов ВПГ-инфекции глаз [7]. В настоящее время множество лекарственных препаратов доступно для лечения герпетической инфекции, однако заболеваемость, вызванная ВПГ, продолжает расти [8]. В связи с этим разработка эффективной профилактической вакцины против ВПГ-1/2 признана ВОЗ

Сокращения: ВПГ-1 – вирус простого герпеса 1 типа; иВПГ – инактивированный цельный ВПГ-1; ДНКgD – рекомбинантная ДНК, содержащая ген белка gD ВПГ; ИСП – индекс стимуляции пролиферации; $ЛД_{50}$ – 50%-ная летальная доза; МСК – мезенхимальные стволовые клетки, мМСК – генетически модифицированные МСК; МСКgD – мМСК, стабильно продуцирующие белок gD ВПГ; РБТ – реакция бласттрансформации.

приоритетным направлением здравоохранения (http://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/GVAP_doc_2011_2020/en/) [9, 10].

В настоящее время разработан целый ряд вакцин против герпесвирусных инфекций, основанных на рекомбинантных ДНК и белках ВПГ, пептидах, живых аттенуированных вирусах и инактивированных цельновирионных препаратах [11–13]. Однако для большинства кандидатных вакцин не выявлено протективного действия при клинических испытаниях [14], и пока ни одна из профилактических вакцин не получила разрешения на использование в медицине.

Очевидно, что необходимы новые подходы к созданию герпетических вакцин, один из которых изучен в представленной работе. Он основан на использовании мезенхимальных стволовых клеток (МСК), успешно применяемых в разных областях регенеративной медицины. Разрабатываются подходы для получения генетически модифицированных МСК (мМСК), которые экспрессируют целевые гены и могут быть использованы для клеточной терапии раковых, аутоиммунных, нейродегенеративных и инфекционных заболеваний [15–20]. На основании этих данных можно сделать вывод о пластичности иммуномодуляции МСК, которые могут оказывать как супрессивное, так и иммуностимулирующее действие. Появились первые работы, в которых показана принципиальная возможность использования МСК и мМСК в качестве не традиционных, а инновационных вакцин, усиливающих иммунные реакции против ВИЧ [21] и вируса гепатита С [22].

Цель работы состояла в сравнительном анализе протективного иммунного ответа на введение профилактических кандидатных вакцин на основе МСК, ДНК-плазмиды и инактивированного вируса в отношении летальной ВПГ-1-инфекции мышей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. Мышей линии DBA/2J (H-2^d) (самки, 6–8 недель) получали из Центрального питомника лабораторных животных “Столбовая” (Московская область).

Культуры клеток. Первичную культуру МСК получали из красного костного мозга мышей, как описано ранее [23]. Нами было показано [22, 23], что по адгезивной способности, поверхностным маркерам и дифференцировочному потенциалу эти клетки соответствуют критериям определения МСК Международного общества клеточной терапии (The International Society for Cellular Therapy) [24].

Культивирование МСК проводили в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; “Gibco”, США), 10 мкг/мл инсулина, 5.5 мкг/мл трансферрина, 6.7 нг/мл селенита, 10 нг/мл фактора роста фибробластов, 2 мМ L-глутамина, 50 мкг/мл гентамицина, в атмосфере 5% CO_2 при 37°С.

Культуру клеток почечного эпителия зеленой мартышки (Vero) получили из коллекции клеточных культур ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России и культивировали в аналогичных условиях, используя среду Игла МЕМ с добавлением 10% ЭТС (“Biosera”, Франция), 2 мМ L-глутамина, 50 мкг/мл гентамицина. Культуральные среды, сыворотки и компоненты для культивирования клеточных культур, если не указано другое, были приобретены в НПП “ПанЭко” (Россия).

Вирус. ВПГ-1, штамм УС, полученный из Государственной коллекции вирусов ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России, размножали в клетках Vero, используя стандартные методы культивирования. Множественность инфекции вируса определяли модифицированным методом бляшек *in vitro*. Готовили серии разведений образцов вируса и вносили в 96-луночные планшеты с монослоем клеток, инкубировали при 37°С в течение 7 сут в присутствии 5% CO_2. Очаги инфицированных клеток (бляшки) выявляли и подсчитывали с использованием инвертированного микроскопа Primovert (“Zeiss”, Германия). Титр вируса определяли по формуле: $A = ab/V$, где A – число бляшкообразующих единиц на 1 клетку (БОЕ/кл); a – среднее число бляшек на одну лунку; b – разведение вируса; V – объем внесенного вируссодержащего материала.

Определение 50%-ной летальной дозы ($ЛД_{50}$) ВПГ-1 *in vivo* проводили путем заражения животных последовательными 10-кратными разведениями вируса внутрибрюшинно. Гибель животных регистрировали в течение 14 сут после заражения. Расчет летальной дозы ВПГ-1 проводили по формуле: $ЛД_{50} = 1 \times 10^{X+[(C1-50)/(C1-C2)]}$, где X – обратная величина разведения вируса, при которой наблюдали 50%-ную гибель мышей; C1 – доля мышей (%), павших при максимальном разведении, давшем летальность выше 50%; C2 – доля мышей (%), павших при минимальном разведении, давшем летальность ниже 50%.

Получение инактивированного препарата ВПГ-1. Клетки Vero высаживали в культуральные флаконы 175 $см^2$ и по достижении монослоя заражали ВПГ-1. После проявления максимального вирусспецифического цитопатического действия (ЦПД) проводили 1 цикл замораживания–оттаивания. Вируссодержащую культуральную жидкость центрифугировали (“Jouane”, Франция) при 10000 об/мин в течение 10 мин для удаления клеточного дебриса и из полученного супернатанта осаждали вирус ультрацентрифугированием при 30000 об/мин в течение 1 ч при 4°С (ротор SW32;

"Beckman", США). Осадок ресуспендировали в 1 мл 10 мМ Трис-HCl, pH 7.4, и оставляли на ночь при комнатной температуре. В центрифужный флакон наслаивали 2 мл 60%-ной сахарозы, затем 10 мл 15%-ной сахарозы и вируссодержащую суспензию. Ультрацентрифугирование проводили в условиях, описанных выше. Очищенный ВПГ-1 инактивировали при 56°C в течение 30 мин. Инактивированный вирус (иВПГ) использовали для иммунизации животных и в качестве антигена для иммуноферментного анализа (ИФА).

Плазмида. Использовали ДНК-конструкцию pcDNAgD (ДНКgD), полученную на основе коммерческой плазмиды pcDNA-3.1(+) ("Invitrogen", США), в которую был встроен ген *Us6*, кодирующий белок gD ВПГ, и маркерный ген *neo* (неомицин-фосфотрансферазы). Для наработки конструкции использовали клетки *Escherichia coli* штамм JM109, которые выращивали в питательной среде (LB-бульон, LB-агар и SOB-бульон), состоящей из бактотриптона, дрожжевого экстракта и бактоагара ("Difco", США). Плазмиду выделяли с использованием коммерческого набора QIAGEN Plasmid Purification Maxi Kit ("QIAGEN", США) согласно методике фирмы-производителя.

Трансфекция культуры МСК. Для получения генетически модифицированных МСК (мМСК), экспрессирующих ген *Us6* ВПГ, использовали первичную культуру МСК на четвертом пассаже. Клетки трансфицировали с помощью Lipofectamine 3000 ("Thermo Fisher Scientific", США) в соответствии с рекомендациями производителя. МСК высаживали в 24-луночный планшет в концентрации 2×10^4 клеток/мл в ростовой среде DMEM без антибиотиков. Через 24 ч в клетки вносили комплекс ДНКgD и Lipofectamine 3000 в соотношении 1 : 2. Селекцию трансформантов проводили в культуральной среде, содержащей генетицин G-418 ("Invitrogene"). Через 5 и 14 суток в клетках, полученных в результате селекции, анализировали экспрессию гена *Us6*. Клетки фиксировали охлажденным метанолом, обрабатывали моноклональными антителами против белка gD ВПГ (ab6507; "Abcam", Великобритания) в течение 1 ч при 37°C. Несвязавшиеся антитела отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS), наслаивали анти-мышинные антитела, коньюгированные с пероксидазой хрена (anti-mouse PX, PO260; "Dako", Дания), и инкубировали 30 мин при 37°C. Клетки промывали PBS и наносили раствор 3,3'-диаминобензидина в концентрации 0.05 мг/мл в буфере 0.05 М Трис-HCl (pH 7.4) с добавлением 3% пероксида водорода. Реакцию останавливали через 10 мин внесением в лунки дистиллированной воды. Результаты оценивали с использованием микроскопа AxioScopeA1 ("Zeiss", Германия). Подсчитывали число окрашенных клеток, содержавших белок gD ВПГ, и представляли в процентах от общего числа клеток в популяции.

Для изучения продукции цитокинов, секретируемых мМСК, в течение 14 сут селекции МСК отбирали культуральную жидкость и определяли в ней концентрацию цитокинов, как описано ниже.

Иммунизация. Животным, разделенным на 5 групп, вводили первичные МСК в концентрации 5×10^5 клеток/мышь внутривенно (МСК; группа 1, $n = 15$); мМСК (модифицированные МСК, экспрессирующие ген *Us6* ВПГ) в концентрации $5 \times \times 10^5$ клеток/мышь внутривенно (МСКgD; группа 2, $n = 10$); рекомбинантную ДНК, содержащую ген *Us6* ВПГ, в концентрации 100 мкг/мышь внутримышечно (ДНКgD; группа 3, $n = 20$); инактивированный вирус в концентрации 100 мкг/мышь внутривенно (иВПГ; группа 4, $n = 10$). В качестве контроля использовали группу 5 ($n = 20$), где мышам вводили внутривенно физиологический раствор. Иммунизацию проводили дважды с интервалом 14 сут.

Заражение. Мышей групп 1–5 заражали ВПГ-1 (15 $ЛД_{50}$ внутрибрюшинно) через 14 суток после последней иммунизации. Наблюдение за животными вели ежедневно в течение 14 сут. Выживаемость животных рассчитывали в процентах (%).

Анализ иммунного ответа. Изучение активности противовирусных и вируснейтрализующих антител, количественное определение уровней провоспалительных цитокинов в культуральной жидкости от мМСК и в сыворотках животных, а также забор спленоцитов проводили до и после заражения ВПГ-1: через 14 сут после последней иммунизации и через 10 сут после заражения.

Определение антител к ВПГ-1. Титры вирусспецифических антител к ВПГ-1 определяли в сыворотках крови мышей методом ИФА, как описано ранее [23]. Для определения ВПГ-специфических иммуноглобулинов субклассов IgG1 и IgG2a 96-луночные планшеты сенсибилизировали иВПГ в объеме 100 мкл/лунка с концентрацией 50 мкг/мл в течение ночи при комнатной температуре. Затем вносили сыворотки животных в разведении 1 : 100 и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Изотип иммуноглобулинов, связавшихся с ВПГ-1, определяли с использованием овечьих анти-мышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (115-035-205 и 115-035-206 соответственно; "Jackson Immuno Research Lab", США).

Реакция биологической нейтрализации. Нейтрализующую активность – способность антител подавлять репликацию ВПГ-1 – определяли на культуре клеток Vero. Сыворотки крови мышей в различных разведениях инкубировали с ВПГ-1 (множественность инфекции = 0.01 БОЕ/клетка) в течение 2 ч при 37°C. Затем реакционную смесь наносили на монослой клеток Vero. Результаты

регистрировали через 48 ч, когда в инфицированной культуре, не обработанной сыворотками, детектировали максимальную величину ЦПД. За активность вируснейтрализующих антител принимали обратные величины максимальных разведений сывороток, при которых наблюдали 50%-ное подавление вирусспецифического ЦПД.

Реакция бласттрансформации (РБТ). О стимуляции пролиферации Т-лимфоцитов судили по изменению морфологии клеток в РБТ *in vitro* – по образованию бластов. Спленоциты мышей каждой группы пулировали и помещали в 24-луночные планшеты по 10^5 клеток в лунку. Культивировали в ростовой среде (Рс) RPMI-1640, содержащей 20% ЭТС (“Invitrogene”), 4.5 мг/мл глюкозы, 2 мМ глутамин, 0.2 ед./мл инсулина, 50 мкг/мл гентамицина. В лунки вносили иВПГ, который использовали в качестве специфического стимулятора, в конечной концентрации 50 мкг/мл, а для оценки спонтанной пролиферации вносили Рс без стимуляторов. Митоген конкавалин А (ConA, 5 мкг/мл; “Sigma”, США) использовали как положительный контроль. Клетки инкубировали 5 сут при 37°С в атмосфере 5% CO_2, после чего подсчитывали число бластов в каждой лунке (по 3 лунки на вариант) и рассчитывали средние значения. Результаты представляли как индекс стимуляции пролиферации (ИСП), который рассчитывали по формуле ИСП = a/b, где a – число антигенспецифичных бластов, b – число неспецифичных (спонтанных) бластов.

Количественный анализ цитокинов. Интерлейкины 2 и 6 (ИЛ-2 и ИЛ-6 соответственно), интерферон-γ (ИНФ-γ) и фактор некроза опухолей-α (ФНО-α) определяли в культуральных жидкостях от первичных МСК и мМСК в динамике, используя метод ИФА. Секрецию ИЛ-6, ИНФ-γ и ФНО-α в сыворотках крови мышей оценивали через 14 сут после последней иммунизации и через 14 сут после заражения ВПГ-1. Использовали тест-системы Mouse IL-2 ELISA development kit (HRP), Mouse IL-6 ELISA development kit (HRP), Mouse IFN-γ ELISA development kit (HRP) и Mouse TNF-α ELISA development kit (HRP) (“Mabtech”, Швеция). Чувствительность анализа составила 20 пг/мл для ИЛ-6, 6 пг/мл для ФНО-α и 4 пг/мл для ИФН-γ и ИЛ-2. Концентрации цитокинов рассчитывали по соответствующим калибровочным кривым согласно инструкциям производителя.

Статистическая обработка результатов. Для статистической обработки результатов использовали программу GraphPadPrism 5.1 и Statistica 6.0. Для сравнения параметрических количественных данных использовали t-тест (критерий Стьюдента), непараметрических – U-тест (критерий Манна–Уитни). Межгрупповые различия относительных показателей анализировали с помощью критерия χ^2 (хи-квадрат). Различия показателей считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Для оценки гипотезы о связи двух переменных проводили корреляционный анализ и рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена (r). Значение $r > 0.7$ рассматривали как свидетельство высокой связи.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессию гена *Us6* ВПГ определяли иммуноцитохимически с использованием моноклональных антител к белку gD через 5 и 14 сут после трансфекции первичных МСК плазмидой ДНКgD и селекции в присутствии генетицина G-418. В результате подсчета окрашенных клеток показано, что через 5 сут 75 ± 5% клеток содержали вирусный белок (рис. 1*а*, 1*б*), а через 14 сут все клетки продуцировали белок gD ВПГ. Полученные мМСК, стабильно продуцирующие белок gD

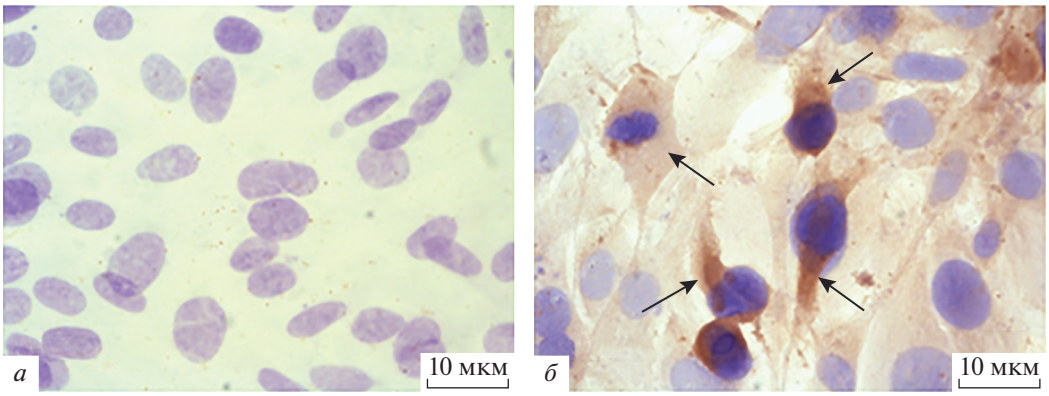


Рис. 1. Иммунноцитохимическая детекция белка gD ВПГ в генетически модифицированной культуре МСК, трансфицированной плазмидой ДНКgD. *а* – Первичная культура МСК; *б* – модифицированные МСК. Стрелками указано накопление белка gD в цитоплазме трансфицированных клеток (коричневое окрашивание). Ядра окрашены гематоксилином (синее окрашивание). Увеличение 400×.

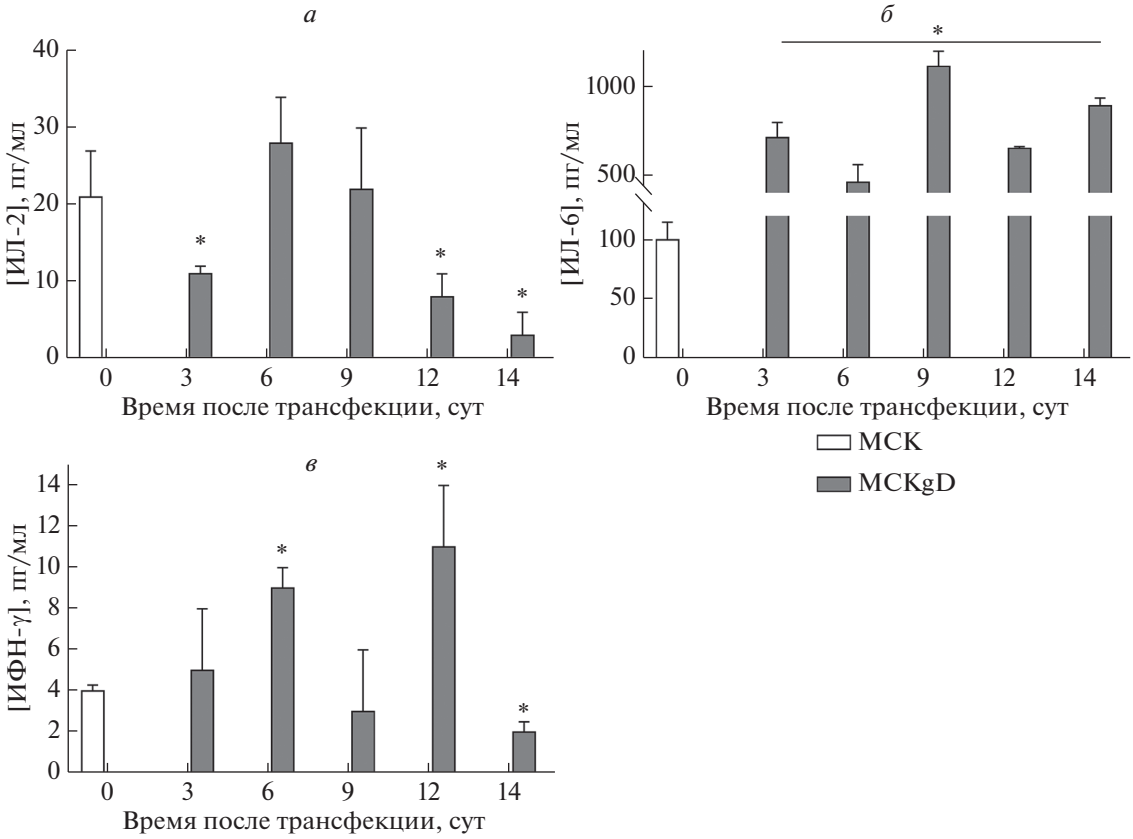


Рис. 2. Уровни цитокинов, секретируемых первичными и генетически модифицированными МСК *in vitro:* ИЛ-2 (*а*), ИЛ-6 (*б*) и ИФН-γ (*в*). Результаты представлены как среднее ± SD, рассчитанные по трем повторам. *$p < 0.05$ по сравнению с МСК (*t*-тест).

ВПГ (МСКgD), использовали для иммунизации животных.

Концентрацию цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6, ИНФ-γ и ФНО-α, секретируемых МСК в динамике после трансфекции и селекции *in vitro*, определяли в культуральных жидкостях, начиная с 3 сут после трансфекции и заканчивая 14 сут – перед введением мМСК мышам. Уровень ИЛ-2 на третьи сутки после трансфекции снижался, затем на 6–9 сут повышался, но к 14 суткам снова сильно снижался – приблизительно в 10 раз по сравнению с уровнем первичных МСК ($p < 0.05$) (рис. 2*а*). Секреция ИЛ-6, напротив, увеличивалась уже на 3 сутки после трансфекции и оставалась на высоком уровне, превышая к 14 суткам уровень в первичных МСК в 9 раз ($p < 0.05$) (рис. 2*б*). Концентрация ИФН-γ значительно увеличивалась на 6 и 12 сутки после трансфекции, затем к 14 сут снижалась и была ниже значения для первичных МСК ($p = 0.02$) (рис. 2*в*). ФНО-α не выявлен в культуральной жидкости от первичных МСК и мМСК.

Гуморальный ответ на иммунизацию различными иммуногенами изучали через 14 сут после второй иммунизации, а также через 10 сут после заражения ВПГ-1. В результате двукратной иммунизации (рис. 3*а*) титр антител к ВПГ-1 в группе 1 (МСК) был относительно невысоким (1 : 200), их максимальная продукция выявлена у мышей группы 4, которых иммунизировали иВПГ (титр 1 : 14080). У мышей группы 2 (МСКgD) содержание антител было статистически значимо выше, чем в группе 3 (ДНКgD): титры 1 : 6400 против 1 : 1600 ($p < 0.001$). После иммунизации в группах 1 (МСК) и 4 (иВПГ) преобладали антитела субкласса IgG1 (рис. 3*б*), тогда как в группах 2 и 3, иммунизированных ДНК или мМСК, соотношение антител субклассов IgG2a к IgG1 было значительно выше. После заражения у животных, иммунизированных иВПГ, титры антител снизились, а в остальных группах, особенно в группе 1, значительно возросли.

Что касается нейтрализующей активности противовирусных антител, вырабатываемых двукратно иммунизированными животными, их титры в группах 1 и 2 (МСК и мМСК соответственно) были невысокими, но статистически значимо выше, чем в других группах ($p < 0.05$). Такую же тенденцию, но при гораздо более высоких титрах антител, выявили в сыворотках крови зараженных животных.

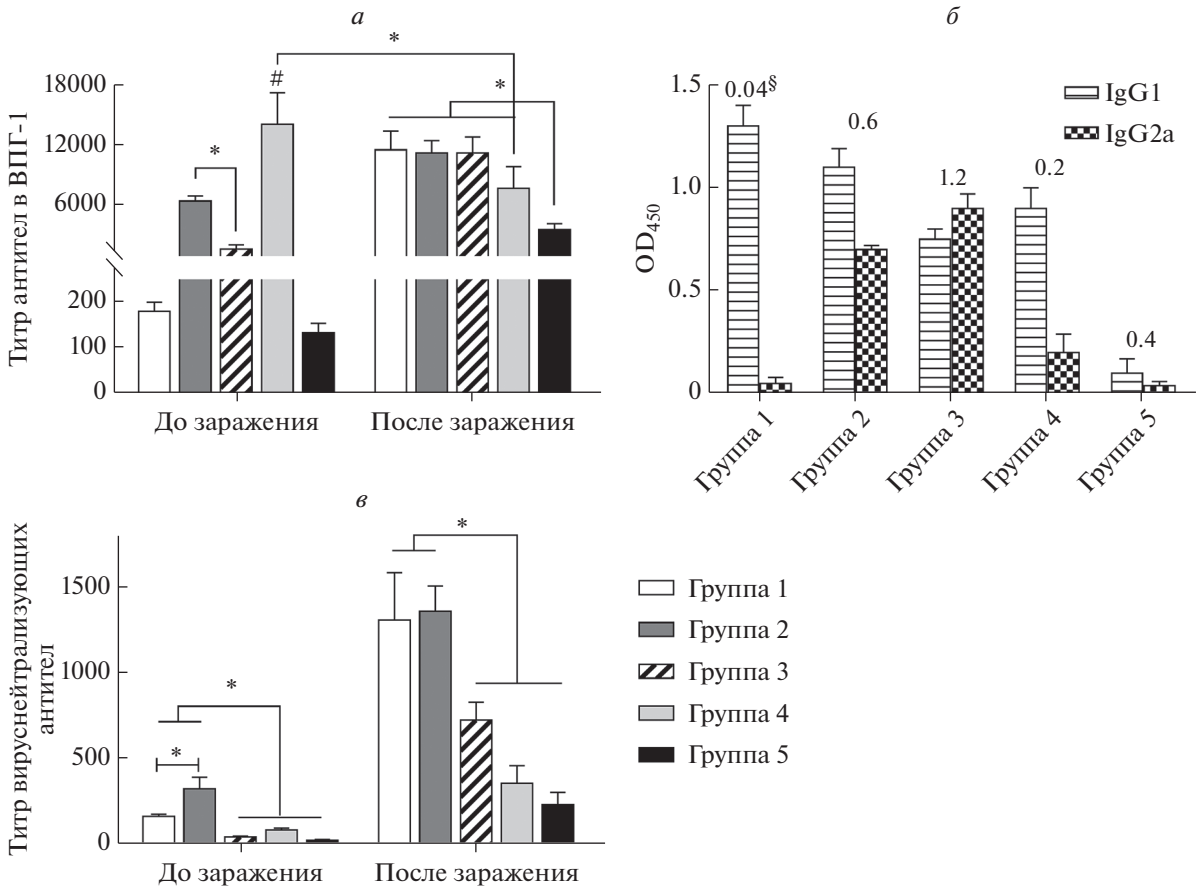


Рис. 3. Гуморальный иммунный ответ на иммунизацию до и после заражения мышей летальными дозами ВПГ-1. *а* – Титры противовирусных антител (ИФА); *б* – относительные уровни ВПГ-1-специфичных антител субклассов IgG у иммунизированных животных: группа 1 (МСК), группа 2 (МСКgD), группа 3 (ДНКgD), группа 4 (иВПГ) и группа 5 (контроль). Результаты ИФА представлены как значения оптической плотности при 450 нм (OD_{450}). §Соотношение IgG2a/IgG1. *в* – Титры вируснейтрализующих антител (метод биологической нейтрализации); $^{*}p < 0.05$ между группами (*t*-test); $^{\#}p < 0.05$ по сравнению со всеми группами (*t*-тест).

Клеточный ответ изучали в реакции бласттрансформации лимфоцитов *in vitro*. Для этого спленоциты, выделенные из селезенок мышей, обрабатывали иВПГ для стимуляции специфического ответа, ConA использовали как положительный контроль; ростовую среду, в которой культивировали спленоциты без стимуляторов, – для оценки спонтанной (неспецифической) пролиферации. Установлено (табл. 1), что число ВПГ-1-специфических бластов было статистически значимо выше во всех иммунизированных группах по сравнению с контролем (группа 5, $p < 0.05$), при этом максимальное количество бластов стимулировала ДНК-иммунизация (группа 3). Значения ИСП (рис. 4) для этой группы: 6.6 до заражения и 4.9 после заражения – значимо отличались от ИСП в других группах ($p < 0.05$). Следует отметить, что уровень спонтанной пролиферации спленоцитов у животных, иммунизированных первичными МСК (группа 1), как до заражения, так и после, был статистически значимо выше по сравнению с остальными изученными группами ($p < 0.05$) (табл. 1).

Цитокины ИЛ-6, ИФН-γ и ФНО-α определяли в сыворотках иммунизированных мышей в группах 1, 2, 3 и 5 до и после заражения ВПГ-1. Как видно из данных, представленных в табл. 2, после иммунизации уровень ИФН-γ был значительно выше в группе 1 (МСК) по сравнению с остальными группами ($p < 0.05$), а в группе 2 (мМСК) превышал таковые для групп 3 (ДНКgD) и 5 (контроль) ($p < 0.05$). После заражения уровень ИФН-γ в группе 1 оставался максимальным, хотя в группе 3 его концентрация возросла в 23 раза, а в контроле (группа 5) в 12 раз. Мы не исследовали уровни цитокинов у животных группы 4, так как согласно литературным данным иммунизация иВПГ без адъювантов не стимулирует значимого повышения уровня ИФН-γ или количества Т-клеток, продуцирующих этот цитокин [24, 25].

Уровень ФНО-α до заражения был статистически значимо меньше в группе 5 (контроль) по

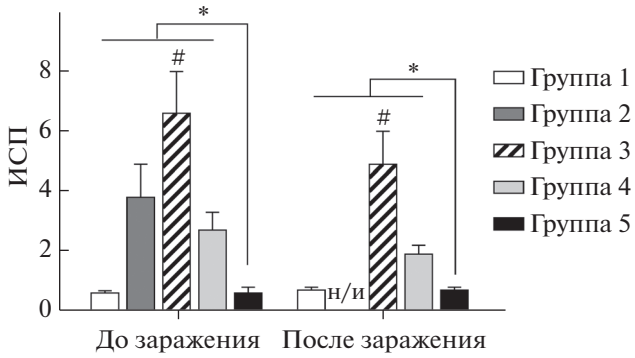


Рис. 4. Индекс стимуляции пролиферации спленоцитов до и после заражения мышей летальными дозами ВПГ-1. Результаты представлены как среднее ± SD, рассчитанные по трем повторам у иммунизированных животных: группа 1 (МСК), группа 2 (МСКgD), группа 3 (ДНКgD), группа 4 (иВПГ) и группа 5 (контроль); н/и – не исследовано. $^{*}p < 0.05$ между группами (*t*-test); $^{\#}p < 0.05$ по сравнению со всеми группами (*t*-тест).

сравнению с опытными группами ($p < 0.05$), у иммунизированных животных концентрации этого цитокина статистически значимо не различались ($p > 0.05$). После заражение у мышей группы 3 наблюдали снижение уровня ФНО-α почти в 2 раза, однако различия не были статистически значимыми ($p > 0.05$). Следует отменить, что концентрация цитокина в этой группе исходно была значительно ниже, чем в других группах ($p < 0.05$).

До заражения уровни ИЛ-6 были низкими в группах 1 и 2 и недетектируемыми в группах 3 и 5. У мышей группы 3 ИЛ-6 в сыворотках крови практически отсутствовал как до, так и после заражения.

Протективный эффект, индуцируемый различными иммуногенами, изучали в течение 14 суток после заражения ВПГ-1 иммунизированных мышей на модели генерализованной инфекции. В контрольной группе характерные признаки герпетической инфекции с поражением центральной нервной системы: вялость, взъерошенность шерсти, парезы задних конечностей, судороги – наблюдали с пятых суток после заражения, а к 10 суткам все животные погибли (рис. 5). Выживаемость всех иммунизированных групп была статистически значимо выше по сравнению с этим показателем в контроле ($p < 0.05$). В группе 1 (МСК) у двух мышей на 6 сут после заражения появились неврологические симптомы, однако к 14 суткам все животные выжили (100%-ная выживаемость). При введении мМСК (группа 2) выжило 60% мышей, при ДНК-иммунизации (группа 3) – 65% (13/20), при иммунизации иВПГ (группа 4) – 50%. В результате проведенного статистического анализа показано, что выживаемость животных в группе 1 была значимо выше, чем в других группах ($p < 0.05$), и напрямую коррелировала с высокой концентрацией ИФН-γ (табл. 2) и титром вирусонейтрализующих антител (рис. 3) ($r = 0.93/0.79$ соответственно). Таким образом, можно заключить, что двукратная внутривенная инъекция первичных МСК защищает 100% животных от заражения 15 летальными дозами ВПГ-1.

Таблица 1. Пролиферативная активность спленоцитов в ответ на введенные иммуногены до и после заражения животных летальными дозами ВПГ-1

Группа	Число бластов[a]					
	до заражения			после заражения		
	стимуляторы					
	ConA	иВПГ	Pc[b]	ConA	иВПГ	Pc
1 (МСК)	135 ± 6	32 ± 12	50 ± 17[c]	271 ± 76	92 ± 18	138 ± 28[c]
2 (МСКgD)	132 ± 6	54 ± 5	14 ± 2	н/и[d]		
3 (ДНКgD)	122 ± 12	58 ± 4	9 ± 2	252 ± 41	130 ± 24	27 ± 8
4 (иВПГ)	118 ± 8	31 ± 4	12 ± 3	238 ± 36	67 ± 20	35 ± 19
5 (контроль)	125 ± 19	9 ± 2[c]	8 ± 3	212 ± 52	22 ± 7[c]	25 ± 9

[a] Число бластов, выявленных в РБТ *in vitro*. Результаты представлены как среднее ± SD (данные трех повторов); [b] ростовая среда без стимуляторов; [c] $p < 0.05$ по сравнению с другими группами в каждом столбце (*t*-test); [d] не исследовали.

Таблица 2. Уровни провоспалительных цитокинов в сыворотках иммунизированных мышей до и после заражения ВПГ-1

Группа	Концентрация цитокина, медиана [минимум; максимум], пг/мл					
	до заражения			после заражения ВПГ-1		
	ИЛ-6	ИФН-γ	ФНО-α	ИЛ-6	ИФН-γ	ФНО-α
1 (МСК)	11 [4; 68]	209[a] [98; 396]	24 [4; 93]	13 [4; 55]	236[a] [103; 468]	38 [12; 120]
2 (МСКgD)	20 [4; 83]	63[b] [35; 132]	11 [4, 20]	н/и[c]	н/и	н/и
4 (иВПГ)	н/и[c]					
3 (ДНКgD)	<4[a]	4 [1, 18]	19 [10;55]	<4[a]	93 [36;129]	10[a] [8, 25]
5 (контроль)	<4[a]	2 [1, 6]	5[a] [1, 11]	14 [4; 67]	48 [1; 98]	28 [1; 102]

[a] $p < 0.05$ по сравнению со всеми группами в каждом столбце (*U*-test); [b] $p < 0.05$ по сравнению с группами 3 и 5 (*U*-test); [c] не исследовали.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Широкое распространение герпесвирусных инфекций на фоне использования вирусспецифической терапии означает, что для контроля этих заболеваний необходимо применять вакцины. Однако 60-летние исследования в этой области пока не увенчались успехом. Из этого следует, что необходимо внедрение новых стратегий для решения проблем, связанных с заболеваниями герпесвирусной этиологии. Нами исследована возможность использования МСК в качестве кандидатной профилактической вакцины против ВПГ-инфекции. МСК – гетерогенная популяция стволовых стромальных клеток, которая может быть получена в большом количестве из разных доступных источников: костного мозга, жировой ткани, пупочного канальца, зубной пульпы, менструальной крови и даже из кожи. Мультипотентность, иммунорегуляторные и регенеративные свойства МСК, а также отсутствие иммуногенности – эти характеристики инициировали исследования по использованию МСК в терапии заболеваний разной этиологии. Доказана безопасность терапии МСК при их внутривенном введении [27]. Такие международные организации, как Европейское агентство по лекарственным средствам (EMA) и Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (FDA), одобрили использование некоторых продуктов на основе МСК для лечения болезни Крона и

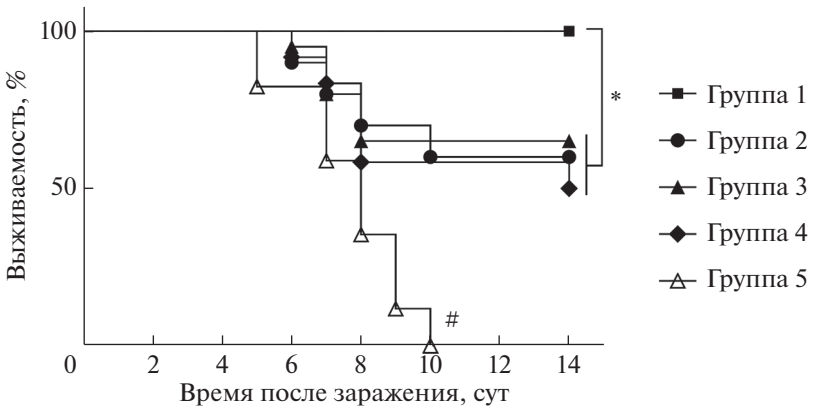


Рис. 5. Протективный ответ при экспериментальной генерализованной ВПГ-1-инфекции у мышей, иммунизированных МСК (группа 1), мМСК (группа 2), ДНКgD (группа 3) или иВПГ (группа 4), и в контрольной группе (группа 5). $^{*}p < 0.05$, $^{\#}p < 0.05$ выживаемость в контроле по сравнению с иммунизированными группами (критерий Каплана–Мейера).

посттрансплантационных осложнений типа “трансплантат против хозяина” [28, 29].

В работах, направленных на создание вакцин против герпеса, с использованием моделей ВПГ-инфекции был сделан вывод, что между “иммунитетом и защитой” нет прямой корреляции [30], имея в виду, что высокий иммунный ответ не может быть гарантией протективного действия. Учитывая эти выводы, мы иммунизировали мышей выбранными иммуногенами и оценивали профилактический эффект *in vivo* – после заражения животных летальными дозами ВПГ-1. Для сравнения использовали: 1) первичные (нативные) МСК; 2) МСК, трансфицированные плазмидой, содержащей ген *Us6,* кодирующий белок gD ВПГ; 3) рекомбинантную ДНК, содержащую ген *Us6* ВПГ, и 4) цельновирионный инактивированный ВПГ-1. Следует отметить, что два последних иммуногена входят в состав кандидатных вакцин, проходящих испытания в настоящее время: ДНК-вакцина, стимулирующая клеточный ответ [31]; инактивированная вирусная вакцина, предотвращающая инфицирование ВПГ-2 и заболевание морских свинок [32]. В результате проведенных экспериментов нами показано, что полную защиту от летальной ВПГ-1-инфекции обеспечивает двукратное введение первичных МСК, все другие иммуногены оказались менее эффективными – защищали от гибели 50–65% животных (рис. 5).

Представляло интерес сравнить параметры иммунного ответа животных. В результате иммунизации (до заражения) иВПГ (группа 4) стимулировал антительный ответ к ВПГ-1 и слабый клеточный ответ, тогда как ДНКgD (группа 3) – слабый гуморальный и сильный Т-клеточный ответ. Эти данные согласуются с результатами других авторов, полученными ранее на разных экспериментальных моделях при сравнении профилактического действия субъединичных/вирусных и ДНК-вакцин (см. обзор [33]). Первичные МСК после двукратного введения индуцировали продукцию ВПГ-1-специфических антител, правда в невысоких титрах, и стимулировали врожденный иммунитет, судя по высокому уровню ИФН-γ. мМСК, экспрессирующие ген *Us6* ВПГ, индуцировали как антительный ответ на вирусный антиген, так и клеточный иммунный ответ. В то же время при иммунизации мМСК титр антител был ниже, чем при иммунизации иВПГ, и уровень пролиферации лимфоцитов (ИСП) был ниже, чем при ДНК-иммунизации (ДНКgD). После заражения антительный ответ возрос у всех животных, кроме группы 4, иммунизированной иВПГ, в которой уровень антител снизился. Важно, что у животных, иммунизированных МСК и мМСК, титры вируснейтрализующих антител были значительно выше, чем в других группах. Самые большие различия между группами обнаружены в концентрации ИФН-γ, которая оказалась максимальной в крови животных, иммунизированных первичными МСК. Следует обратить внимание на тот факт, что после иммунизации первичными МСК отсутствовал статистически значимый пролиферативный ответ Т-клеток на ВПГ-1 на фоне повышенного уровня спонтанного (неспецифического) ответа – как до, так и после заражения ВПГ-1. В то же время в обоих случаях зарегистрирован высокий уровень продукции ИФН-γ (табл. 1 и 2). Неспецифический ответ Т-клеток после двукратного введения МСК, возможно, связан с функциональными особенностями этих клеток, генерацию и пролиферацию которых индуцируют цитокины окружающей среды, причем независимо от чужеродного антигена [34]. Эти клетки имеют фенотип Т-клеток памяти или подобных им – “memory-like”. Показано, что ИФНы I типа (ИФН-α/β), продуцируемые при гомеостатических условиях или при инфекции, способствуют пролиферации и функционированию “memory-like” Т-клеток $CD8^+$ [35]. Т-клетки с более широкой специфичностью – с неспецифическими, но полезными эффектами – могут значительно улучшить иммунный ответ, что следует учитываться при создании вакцин – как составляющих гетерологичного иммунного ответа [34].

Следует отметить, что антитела, обнаруженные после иммунизации первичными МСК (группа 1), были в основном IgG1-субтипа (маркер Th2-ответа) и соотношение противовирусных антител субтипов IgG2a (маркер Th1-ответа)/IgG1 в этой группе было минимальным. Согласно сложившимся представлениям, это означает, что иммунный ответ смещен в сторону Th2-клеток и направлен на синтез противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10 и др.). В результате проведенных экспериментов нами выявлены высокие концентрации провоспалительных цитокинов, особенно ИФН-γ, продуцируемого главным образом клетками Th1-фенотипа. Можно предположить, что это “противоречие” объясняется тем, что МСК секретируют большой набор как про-, так и противовоспалительных цитокинов [36], которые способны активировать широкий спектр иммунных клеток. Кроме того, индуцируемые МСК иммунные клетки могут модифицировать тип ответа: “гуморальный” Th2 на “клеточный” Th1 и стимулировать продукцию ИФН-γ [37]. По-видимому, благодаря перечисленным свойствам МСК, после заражения животных, ими иммунизированных, активизируется как Т-клеточный, так и В-клеточный ответ к ВПГ-1, а также формируется защита от летальной инфекции. Более мощный защитный эффект первичных МСК по сравнению с мМСК может быть обусловлен тем, что в результате трансфекции и последующего отбора клеток, экспрессирующих введенный ген *Us6* ВПГ, в мМСК изменя-

ется *in vitro* секреция провоспалительных цитокинов: значительно снижается продукция ИФН-γ и ИЛ-2 и существенно повышается уровень ИЛ-6 (рис. 2). Введение селектированных мМСК приводило к изменению концентрации цитокинов также и в крови иммунизированы мышей: приблизительно в 2 раза снижалась концентрация ИФН-γ и в 2 раза возрастала концентрация ИЛ-6. Повышение уровня ИЛ-6 регистрируют при различных воспалительных заболеваниях и рассматривают как маркер развития утяжеленных форм заболеваний, в том числе герпесвирусной этиологии [38] и при COVID-19 [39]. По-видимому, такие изменения в цитокиновом паттерне вносят вклад в снижение протективной активности мМСК-иммуногена по сравнению с МСК на экспериментальной модели ВПГ-1-инфекции, так как при вакцинации первичными МСК, индуцирующими 100%-ную выживаемость мышей, концентрация ИЛ-6 не изменялась, а ИФН-γ возрастала.

В большинстве опубликованных работ описаны иммуносупрессорные свойства МСК (см. обзор [37]), благодаря которым они подавляют избыточные воспалительные реакции, цитокиновый шторм, отторжение трансплантата. В других исследованиях показано, что МСК обладают скорее иммунорегуляторными, чем иммуносупрессорными свойствами и могут не только подавлять, но и стимулировать иммунные реакции [40]. В организме МСК присутствуют практически во всех тканях, экспрессируют множество типов рецепторов, поэтому различия в направленности выполняемых ими регуляторных функций можно объяснить различиями в их микроокружении [41]. В условиях воспаления, при высоких уровнях провоспалительных цитокинов ИФН-γ и ФНО-α, МСК активируются и приобретают иммуносупрессорный фенотип – МСК2. При отсутствии в микроокружении признаков воспаления (низкие уровни ФНО-α и ИФН-γ) МСК приобретают провоспалительный, МСК1, фенотип и усиливают Т-клеточный ответ. Активацию МСК изучали в динамике – после добавления poly(I:C) как аналога двухцепоцечной вирусной РНК [42]. Авторы установили, что свойства МСК в ходе активации могут изменяться с провоспалительных на противовоспалительные, и определили это как зависимость поляризации от времени действия МСК – “time-dependent MSC polarization”. В проведенных нами экспериментах МСК вводили здоровым животным, и это было одно микроокружение, а после заражения вирусом микроокружение МСК изменилось, что привело к стимуляции В-клеточного ответа и, особенно важно, к значительному повышению уровня вируснейтрализующих антител. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными Glenn & Whartenby [43] при изучении действия МСК на В-клетки *in vitro*. В условиях, имитирующих вирусную инфекцию, в присутствии МСК повышались выживаемость В-клеток, их дифференцировка и уровни продуцируемых ими антител.

Заражение мышей ВПГ-1 после иммунизации МСК, по-видимому, запускает множество механизмов, включая как антигензависимые, так и антигеннезависимые. Молекулярные и клеточные механизмы, которые в этих условиях обеспечивают противовирусное действие, активно изучают [44–46] и, можно надеется, будут раскрыты в дальнейших исследованиях.

Согласно последним данным, успешное терапевтическое действие МСК может быть длительным [47], что предполагает индукцию Т-клеток памяти, необходимых для протективного действия вакцины [48]. Можно предположить, что после двукратной иммунизации МСК в организме мышей сформировались клетки памяти, функционирование которых способствовало полной защите животных от последующей летальной вирусной инфекции.

Таким образом, благодаря уникальной способности МСК индуцировать врожденный, адаптивный и протективный иммунитет, а также их доступности и безопасности, эти клетки в перспективе можно рассматривать в качестве главных компонентов вакцин нового поколения (на основе клеточных технологий) против герпетических и других инфекций.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-04-01218).

Все исследования выполняли согласно “Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приказ № 266 Минздрава России от 19.06.2003).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Looker K.J., Magaret A.S., May M.T., Turner K.M., Vickerman P., Gottlieb S.L. (2015) Global and regional estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 1 infections in 2012. *PLoS One*. **10**(10), e0140765.
2. Looker, K. J., Magaret A.S., Turner K.M., Vickerman P., Newman L.M. (2015) Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. *PLoS One*. **10**, e114989.
3. Burn Aschner C., Knipe D.M., Herold B.C. (2020) Model of vaccine efficacy against HSV-2 superinfection of HSV-1 seropositive mice demonstrates protection by antibodies mediating cellular cytotoxicity. *NPJ. Vaccines*. **5**, 35.
4. Gottlieb S.L., Giersing B., Boily M.C., Chesson H., Looker K.J., Schiffer J., Spicknall I., Hutubessy R., Broutet N.; WHO HSV Vaccine Impact Modelling Meeting Working Group. (2019) Modelling efforts

needed to advance herpes simplex virus (HSV) vaccine development: key findings from the World Health Organization consultation on HSV vaccine impact modelling. *Vaccine*. **37**(50), 7336–7345.

5. Looker K.J., Welton N.J., Sabin K.M., Dalal S., Vickerman. P, Turner K.M.E., Boily M.C., Gottlieb S.L. (2020) Global and regional estimates of the contribution of herpes simplex virus type 2 infection to HIV incidence: a population attributable fraction analysis using published epidemiological data. *Lancet Infect. Dis*. **20**(2), 240–249.
6. James SH, Kimberlin DW. (2015) Neonatal herpes simplex virus infection: epidemiology and treatment. *Clin. Perinatol.* **42**, 47–59.
7. Tsatsos M., MacGregor C., Athanasiadis I., Moschos M.M., Hossain P., Anderson D. (2016) Herpes simplex virus keratitis: an update of the pathogenesis and current treatment with oral and topical antiviral agents. *Clin. Exp. Ophthalmol*. **44**, 824–837.
8. Whitley R., Baines J. (2018) Clinical management of herpes simplex virus infections: past, present, and future. *F1000Res.* **7**, F1000 Faculty Rev-1726. https://doi.org/10.12688/f1000research.16157.1
9. Gottlieb S.L., Giersing B.K., Hickling J., Jones R., Deal C., Kaslow D.C. (2019) Meeting report: initial World Health Organization consultation on herpes simplex virus (HSV) vaccine preferred product characteristics, March 2017. *Vaccine.* **37**(50), 7408–7418.
10. Looker K.J., Johnston C., Welton N.J., James. C, Vickerman P., Turner K.M.E., Boily M.C., Gottlieb S.L. (2020) The global and regional burden of genital ulcer disease due to herpes simplex virus: a natural history modelling study. *BMJ Glob. Health*. **5**(3), e001875.
11. Johnston C., Gottlieb S.L., Wald A. (2016) Status of vaccine research and development of vaccines for herpes simplex virus. *Vaccine.* **34**(26), 2948–2952.
12. Ghaffarifar F. (2018) Plasmid DNA vaccines: where are we now? *Drugs Today* (*Barc*.). **54**(5), 315–333.
13. Ike A.C., Onu C.J., Ononugbo C.M., Reward E.E., Muo S.O. (2020) Immune response to herpes simplex virus infection and vaccine development. *Vaccines* (*Basel*). **8**(2), 302.
14. Egan K., Hook L.M., Latourette P., Desmond A., Awasthi S., Friedman H.M. (2020) Vaccines to prevent genital herpes. *Transl. Res*. **220**, 138–152.
15. Spees J.L., Lee R.H., Gregory C.A. (2016) Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res. Ther.* **7**(1), 125.
16. Han J., Liu Y., Liu H., Li Y. (2019) Genetically modified mesenchymal stem cell therapy for acute respiratory distress syndrome. *Stem Cell Res. Ther.* **10**(1), 386.
17. Fu X., Chen Y., Xie F.N., Dong P., Liu W.B., Cao Y., Zhang W.J., Xiao R. (2015) Comparison of immunological characteristics of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells and bone marrow. *Tissue Eng. Part A*. **21**(3–4), 616–626.
18. Cagliani J., Grande D., Molmenti E.P., Miller E.J., Rilo H.L.R. (2017) Immunomodulation by mesenchymal stromal cells and their clinical applications. *J. Stem Cell Regen. Biol.* **3**(2), . https://doi.org/10.15436/2471-0598.17.022
19. Sage E.K., Thakrar R.M., Janes S.M. (2016) Genetically modified mesenchymal stromal cells in cancer therapy. *Cytotherapy.* **18**(11), 1435–1445.
20. Jibin Han, Yuxiang Liu, Hong Liu, Yuanyuan Li. (2019) Genetically modified mesenchymal stem cell therapy for acute respiratory distress syndrome. *Stem Cell Res. Ther.* **10**(1), 386.
21. Tomchuck S.L., Norton E.B., Garry R.F., Bunnell B.A., Morris C.A., Freytag L.C., Clements J.D. (2012) Mesenchymal stem cells as a novel vaccine platform. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. **2**, 140.
22. Masalova O.V., Lesnova E.I., Klimova R.R., Momotyuk E.D., Kozlov V.V., Ivanova A.M., Payushina O.V., Butorina N.N., Zakirova N.F., Narovlyansky A.N., Pronin A.V., Ivanov A.V., Kushch A.A. (2020) Genetically modified mouse mesenchymal stem cells expressing non-structural proteins of hepatitis C virus induce effective immune response. *Vaccines* (*Basel*). **8**(1), 62.
23. Климова Р.Р., Момотюк Е.Д., Демидова Н.А., Ярыгина Е.И., Кущ А.А. (2018) Мезенхимальные стволовые клетки: усиление иммунного ответа и защита мышей от летальной герпесвирусной инфекции. *Вопросы вирусологии*. **63**(6), 261–267.
24. Roizman B., Knipe D.M., Whitley R.J. (2007) Herpes simplex viruses. In: *Fields Virology*, 5th edition. Eds Knipe D.M., Howley P.M. Lippincott Philadelphia: Williams & Wilkins, 2501–2601.
25. Morello C.S., Kraynyak K.A., Levinson M.S., Chen Z., Lee K.-F., Spector D.H. (2012) Inactivated HSV-2 in MPL/alum adjuvant provides nearly complete protection against genital infection and shedding following long term challenge and rechallenge. *Vaccine*. **30**(46), 6541–6550.
26. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. **8**(4), 315–317.
27. Thompson M., Mei S.H.J., Wolfe D., Champagne J., Fergusson D., Stewart D.J. (2020) Cell therapy with intravascular administration of mesenchymal stromal cells continues to appear safe: an updated systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*. **19**, 100249. https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2019.100249
28. Romano B., Elangovan S., Erreni M., Sala E., Petti L., Kunderfranco P. (2019) TNF-stimulated gene-6 is a key regulator in switching stemness and biological properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. **37**(7), 973–987.
29. Saldanha-Araujo F., Garcez E.M., Silva-Carvalho A.E., Carvalho J.L. (2020) Mesenchymal stem cells: a new piece in the puzzle of COVID-19 treatment. *Front. Immunol.* **11**, 1563.
30. Khodai T., Chappell D., Christy C., Cockle P., Eyles J., Hammond D., Gore K., McCluskie M.J., Evans D.M., Lang S., Loudon P.T., Townend T., Wright P., West K., Bright H. (2011) Single and combination herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccines adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotides or monophosphoryl lipid A exhibit differential immunity that is not correlated to

protection in animal models. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**(10), 1702–1709.

31. Dutton J.L., Woo W.P., Chandra J., Xu Y., Li B., Finlayson N., Griffin P., Frazer I.H. (2016) An escalating dose study to assess the safety, tolerability and immunogenicity of a herpes simplex virus DNA vaccine COR-1. *Hum. Vaccin. Immunother.* **12**, 3079–3088.
32. Hensel M.T., Marshall J.D., Dorwart M.R., Heeke D.S., Rao E., Tummala P., Yu L., Cohen G.H., Eisenberg R.J., Sloan D.D. (2017) Prophylactic herpes simplex virus 2 (HSV-2) vaccines adjuvanted with stable emulsion and Toll-like receptor 9 agonist induce a robust HSV-2-specific cell-mediated immune response, protect against symptomatic disease, and reduce the latent viral reservoir. *J. Virol.* **91**(9), e02257-16.
33. Ike A.I., Onu C.J., Ononugbo C.M., Reward E.E., Muo S.O. (2020) Immune response to herpess virus infection and vaccine development. *Vaccines* (*Basel*). **8**(2), 302.
34. Lauvau G., Goriely S. (2016) Memory CD8$^+$ T cells: orchestrators and key players of innate immunity? *PLoS Pathog.* **12**(9), e1005722.
35. Martinet V., Tonon S., Torres D., Azouz A., Nguyen M., Kohler A. (2015) Type I interferons regulate eomesodermin expression and the development of unconventional memory CD8(+) T cells. *Nat. Commun.* **6**, 7089.
36. Tomchuck S.L., Zwezdaryk K.J., Coffelt S.B., Waterman R.S., Danka E.S., Scandurro A.B. (2008) Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells.* **26**(1), 99–107.
37. Shammaa R., El-Kadiry A.E., Abusarah J., Rafei M. (2020) Mesenchymal stem cells beyond regenerative medicine. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 72.
38. Khazan M., Nasiri S., Riahi S.M., Robati R.M., Hedayati M. (2020) Measurement of melatonin, indoledioxygenase, IL-6, IL-18, ferritin, CRP, and total homocysteine levels during herpes zoster. *J. Med. Virol.* **92**(8), 1253–1259.
39. Henry B.M., Santos de Oliveira M.C., Benoit S., Plebani M., Lippi G. (2020) Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin. Chem. Lab. Med.* **58**(7), 1021–1028.
40. Najar M., Raicevic G., Fayyad-Kazan H., Bron D., Toungouz M., Lagneaux L. (2016) Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: a gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy.* **18**(2), 160–171.
41. Waterman R.S, Tomchuck S.L., Henkle S.L., Betancourt A.M. (2010) A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One.* **5**, e10088.
42. Petri R.M., Hackel A., Hahnel K., Dumitru C.A., Bruderek K., Flohe S.B., Paschen A., Lang S., Brandau S. (2017) Activated tissue-resident mesenchymal stromal cells regulate natural killer cell immune and tissue-regenerative function. *Stem Cell Reports.* **9**(3), 985–998.
43. Glenn J.D., Whartenby K.A. (2014) Mesenchymal stem cells: emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J. Stem Cells.* **6**(5), 526–539.
44. Rasmussen S.B., Sørensen L.N., Malmgaard L., Ank N., Baines J.D., Chen Z.J., Paludan S.R. (2007) Type I interferon production during herpes simplex virus infection is controlled by cell-type-specific viral recognition through Toll-like receptor 9, the mitochondrial antiviral signaling protein pathway, and novel recognition systems. *J. Virol.* **81**(24), 13315–13324.
45. Suarez-Ramirez J.E., Tarrio M.L., Kim K., Demers D.A., Biron C.A. (2014) CD8 T cells in innate immune responses: using STAT4-dependent but antigen-independent pathways to gamma interferon during viral infection. *mBio.* **5**(5), e01978-14.
46. Welch W. J., Mizzen L. A. (1988) Characterization of the thermotolerant cell. II. Effects on the intracellular distribution of heat-shock protein 70, intermediate filaments, and small nuclear ribonucleoprotein complexes. *J. Cell Biol.* **106**(4), 1117–1130.
47. Lopez-Santalla M., Hervas-Salcedo R., Fernandez-Garcia M., Bueren J.A., Garin M.I. (2020) Cell therapy with mesenchymal stem cells induces an innate immune memory response that attenuates experimental colitis in the long-term. *J. Crohns Colitis.* **14**(10), 1424–1435.
48. Shin H., Iwasaki A. (2012) A vaccine strategy that protects against genital herpes by establishing local memory T cells. *Nature.* **491**(7424), 463–467.

PREVENTIVE VACCINATION WITH MESENCHYMAL STEM CELLS PROTECTS MICE AGAINST LETHAL HERPES SIMPLEX VIRUS 1 INFECTION

R. R. Klimova[1, *], N. A. Demidova[1], O. V. Masalova[1], and A. A. Kushch[1]

[1]*Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia*

**e-mail: regi.k@mail.ru*

Type 1 and 2 herpes simplex viruses (HSV-1 and HSV-2) may affect many human organs and tissues. They induce genital herpes, a widespread sexually transmitted disease, cause damage to CNS and provoke severe complications in newborns. Irrespective of antiviral medications, the incidence of HSV-infections is increasing. Many infection-preventing candidate vaccines failed in trials due to lack of protection. In this study, we examined protective activity of a cellular vaccine based on mesenchymal stem cells (MSC) isolated from murine bone marrow. In a mouse model of lethal HSV-1 infection, immune responses to primary and to modi-

fied MSCs, as well as to the control plasmid and to the inactivated virus were compared. Modified MSCs were prepared by *Us6* HSV-1 gene transfection; the control plasmid had an insert encoding same gene. After double immunization with primary MSCs, in the peripheral blood of mice, the formation of antibodies interacting in ELISA with the viral antigen and neutralizing the infectious activity of HSV in the biological neutralization test was observed. In addition, the administration of primary MSCs induced the production of INF-γ found in the peripheral blood of mice. After infection of the immunized mice, a significant increase in the activity of antibodies against HSV-1, a high level of IFN-γ, and complete protection against lethal HSV-1 infection were observed. Protective effects of three other immunogens were lower, at 50–65%. Considering that MSC are readily available, their proved safety upon intravenous injection and our findings that they contribute to innate, adaptive and protective immunity, we should propose injectable MSC as a basis for the development of the protective cell vaccines for the prevention of herpesvirus and other viral infections.

Keywords: mesenchymal stem cells, transfection, genetically modified mesenchymal stem cells, recombinant DNA, herpes simplex virus type 1, protection

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 3, с. 491–499

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 577.21:579.23:575.826

N-ДОМЕН АНТИРЕСТРИКЦИОННЫХ БЕЛКОВ ArdA ИНГИБИРУЕТ РЕПРЕССОРНУЮ АКТИВНОСТЬ ГИСТОНОПОДОБНОГО БЕЛКА H-NS

© 2021 г. О. Е. Мелькина[a], Г. Б. Завильгельский[a], *

[a] Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра "Курчатовский институт", Москва, 117545 Россия

*e-mail: zavilgel@genetika.ru

Поступила в редакцию 03.09.2020 г.
После доработки 03.09.2020 г.
Принята к публикации 01.10.2020 г.

ДНК-мимикрирующие антирестрикционные белки ArdA специфически ингибируют рестрикционную и модификационную активности систем рестрикции–модификации типа I. В пространственной структуре мономера ArdA фиксируются три домена: N-домен, центральный домен и C-домен. Анализ аминокислотных последовательностей большой группы белков ArdA, кодируемых хромосомными генами грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также генами, локализованными в конъюгативных плазмидах и транспозонах, выявил в N-домене консервативный мотив из 20 аминокислотных остатков. Показано, что N-домены белков ArdA бактерий *Arthrobacter* sp., *Bifidobacterium longum* и *Pseudomonas plecoglossicida* ингибируют репрессорную активность глобального регулятора – белка H-NS, в клетках *Escherichia coli*. Наличие в структуре ArdA N-домена как ингибитора H-NS дает возможность мобильным элементам (конъюгативным плазмидам и транспозонам) не только преодолевать в процессе горизонтального переноса генов межклеточные рестрикционнные барьеры, но и быстрее адаптироваться к условиям нового генома бактерии-реципиента.

Ключевые слова: антирестрикция, ArdA, H-NS-репрессия

DOI: 10.31857/S0026898421030125

Белки семейства ArdA эффективно ингибируют рестрикционную и модификационную активности ферментов рестрикции–модификации типа I, что позволяет мобильным элементам – конъюгативным плазмидам и транспозонам, преодолевать межклеточные рестрикционные барьеры [1–4]. По данным рентгеноструктурного анализа в пространственной структуре белка-мономера ArdA (ORF18 Tn916) (165 а.к.) выделяются три домена: 1) N-домен размером (3–61 а.к.), 2) центральный домен (62–103 а.к.) и 3) C-концевой домен (104–165 а.к.) [5]. В настоящей работе рассмотрены центральный и C-концевой домены, объединенные в единый домен, далее C-домен, так как по своей структуре он подобен B-форме дцДНК (ДНК-мимикрия) и содержит консервативный участок размером 14 а.к., так называемый антирестрикционный мотив [6], определяющий контакт между мономерами [5]. Пространственная структура N-домена значительно отличается от структуры C-домена: он содержит β-структуру из трех расположенных антипараллельно отрезков и одной короткой α-спирали, связанных петлей из 10 и более остатков [5]. Расположение структурных элементов в N-домене сходно с их расположением в B-домене биотинкарбоксилазы [7]. Ранее было показано, что высокий уровень антирестрикционной активности, примерно равный активности цельного ArdA, в белке ArdA ColIb-P9 (166 а.к.) проявляет C-концевой фрагмент, состоящий из 76 а.к. (90–166). [2, 8]. О роли N-домена в функционировании белков ArdA в настоящее время ничего не известно. Естественно предположить, что N-домен помогает решать белку ArdA (помимо ингибирования систем рестрикции–модификации типа I) другие, возможно, не менее важные, задачи, возникающие у трансмиссивных плазмид и транспозонов при переходе из клетки-донора в клетку-реципиент. Иначе трудно объяснить сохранение этого домена в составе ArdA, участвующего в процессе горизонтального переноса генов. Например, ДНК-мимикрирующий белок Ocr вирулентного бактериофага T7 ингибирует клеточные системы рестрикции–модификации типа I значительно эффективнее, чем белки ArdA [9]. При этом Ocr не содержит элемента, подобного N-домену ArdA [10].

Сокращения. а.к. – аминокислотный остаток (при числе).

Нами показано, что белки ArdA ингибируют не только ферменты рестрикции–модификации типа I, но и репрессорную активность гистоноподобного белка H-NS [11]. Поэтому мы решили проверить, способны ли N-домены белков ArdA снижать репрессорную активность H-NS.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы и плазмиды. Бактериальные штаммы и плазмиды, используемые в настоящей работе, представлены в табл. 1.

Бактериофаг λ_{vir} (далее λ) любезно предоставлен Р. Деворе (R. Devoret, Франция). Немодифицированные фаги, выращенные на штамме *E. coli* TG-1, у которого отсутствует система рестрикции–модификации типа I, обозначены как λ.0.

Для измерения эффективности ингибирования репрессорной активности белка H-NS мы использовали N- и C-домены белков ArdA грамположительных бактерий *Arthrobacter* sp. и *Bifidobacterium longum,* а также грамотрицательной бактерии *Pseudomonas plecoglossicida*. На рис. 1 представлены аминокислотные последовательности белков ArdA, обозначенных далее 655, 553 и 613.

Белок ArdA 613 – ген *ardA* расположен в транспозоне, встроенном в хромосому грамотрицательных аэробов *P. plecoglossicida* (ВКПМ B-13282).

Фрагменты, содержащие гены *ardA* 655, *ardA* 553 и *ardA* 613, амплифицировали с использованием в качестве матриц хромосомных ДНК соответствующих бактерий и следующих праймеров:

655EcoRI_NdeI_dir 5'–CGCGAATTCCATATGCGGAGGAGACCCGCCATGACCACAC–3'
655PstI_rev 5'–GGCCTGCAGCTCAGCGCTCATGTTCGCTCTCGTCAC-3'
553EcoRI_NdeI_dir 5'–GGCGAATTCCATATGAGGAGCATCATCATGGCCGGATTG–3'
553PstI_rev 5'–GATCTGCAGGCTCACCCATGGTTCACGGCGGTC–3'
613EcoRI_NdeI dir 5'–CGCGAATTCCATATGACGAAGGAGCGAAAGCCATGAGC–3'
613PstI rev 5'–GGGCTGCAGCGGTGCCTTCTGCTGGTTTAGCGAT–3'.

N-домены выделяли с использованием следующих праймеров:
655Nd_rev 5'–GAACTGCAGTCAGATGTTCTCGTGGTCCATGACC–3'
553Nd_rev 5'–GAACTGCAGTCA TTC CCC GCC CTC GTA GTC GT–3'
613Nd_rev 5'–GAACTGCAGTCAACCCTCGAAGTCGTGGATG–3'.

C-домены выделяли с использованием следующих праймеров:
655Cd _dir 5'–CGCCATATGCCCACCGCGGGCGAGATG–3'
553Cd _dir 5'–CGCCATATGGGACTGCTCGCCACCGTG–3'
613Cd _dir 5'–CGCCATATGTTCGGCGGCTACCGTCTC–3'.

Фрагменты ДНК, содержащие гены *ardA* 655 (617 п.н.), *ardA* 553 (509 п.н.) и *ardA* 613 (571 п.н.), а также кодирующие N- и C-домены, были встроены в вектор p15ara под контроль арабинозного промотора (*araBAD*), используя сайты рестрикции NdeI и PstI. В вектор pUC18 данные фрагменты встроены под *lac*-промотор по сайтам рестрикции EcoRI и PstI.

Среды и условия культивирования бактерий. LB-среда: 1% триптона, 0.5% дрожжевого экстракта и 0.5% NaCl; для верхнего и нижнего слоев чашек Петри использовали 1.8 и 0.7%-ный LB-агар. Бактерии растили в LB-среде, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, 25 мкг/мл хлорамфеникола при 30 или 37°C. Ночные культуры использовали для инокуляции жидкой среды LB с последующим ростом с аэрацией при 30°C до ранней экспоненциальной фазы. После добавления при необходимости 20 мМ *L*-арабинозы инкубацию продолжали при той же температуре. Оптическую плотность клеточной суспензии измеряли при 600 нм на колориметре КФК-2МР.

Реактивы, ферменты, эндонуклеазное расщепление, лигирование, трансформация. Эндонуклеазное расщепление, лигирование фрагментов ДНК, электрофорез в агарозном геле, выделение фрагментов ДНК из геля проводили согласно [16]. В реакциях расщепления и лигирования использовали ферменты фирмы “Promega” (США). Трансформацию клеток проводили кальциевым методом.

Измерение антирестрикции. Антирестрикционную активность белков ArdA измеряли в штамме *E. coli* K-12 AB1157 с активной системой рестрикции–модификации типа I EcoKI. Методика измерения антирестрикционной активности белков семейства Ard описана в [2].

Измерение ингибирования H-NS-репрессии. Ингибирование H-NS-репрессии измеряли, используя промотор гена *luxC Aliivibrio fischeri*, транскрипция которого сильно репрессирована белком H-NS [11, 13, 14]. Клетки штамма *E. coli* MG655 трансформировали плазмидой pDWluxC, сконструированной на основе беспромоторного вектора pDEW201 [15]. Эта плазмида содержит

Таблица 1. Бактериальные штаммы и плазмиды

Штамм/плазмида	Характеристика	Источник/ ссылка
	Штамм	
MG1655	*F⁻ilvG rfb-50 rph-1*	Национальный биоресурсный центр, Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ)
AB1157	*F⁻ thr-1 leu-6 proA2 his-4 thi-1 argE3 LacY1 galK2 ara14 xyl-5 mtl-1tsx-33 rpsL31 supE44 r+m+*	ВКПМ
TG-1	*thi-1 supE44 hadD5 D(lac-ProAB) [F'traD36 proAB+ lacIq lacZDM15]*	То же
Ac-1227	*Arthrobacter* sp. *(655)*	–
Ac-1636	*Bifidobacterium longum (553)*	–
B-13282	*Pseudomonas plecoglossicida (613)*	–
	Плазмида	
pUC18	Вектор, Ap^r	"Fermentas", Литва
p15ara	В вектор pACYC184 по сайту HindIII встроен арабинозный промотор *ParaB* из плазмиды pBADHisB, Cm^r	[12]
pDEW201	*ori* репликации pBR322, в вектор встроена беспромоторная кассета *luxCDABE P. luminescens*; Ap^r	[15]
pDWluxC	В вектор pDEW201 встроен фрагмент ДНК *A. fischeri* размером 124 п.н, который в *lux*-опероне расположен между генами *luxI* и *luxC*; фрагмент расположен перед кассетой *luxICDABEG P. luminescens*; Ap^r	[11]
p15ara:ardA655	Содержит в векторе p15ara ген *ardA Arthrobacter* sp. под арабинозным промотором; Cm^r	Настоящая работа
p15ara:ardA553	Содержит в векторе p15ara ген *ardA B. longum* под арабинозным промотором; Cm^r	То же
p15ara:ardA613	Содержит в векторе p15ara ген *ardA P. plecoglossicida* под арабинозным промотором; Cm^r	–
p15ara:N655	Содержит в векторе p15ara N-домен (66 а.к.) гена *ardA Arthrobacter* sp. под арабинозным промотором; Cm^r	–
p15ara:N553	Содержит в векторе p15ara N-домен (64 а.к.) гена *ardA B. longum* под арабинозным промотором; Cm^r	–
p15ara:N613	Содержит в векторе p15ara N-домен (60 а.к.) гена *ardA P. plecoglossicida* под арабинозным промотором; Cm^r	–
p15ara:C655	Содержит в векторе p15ara C-домен (118 а.к.) гена *ardA Arthrobacter* sp. под арабинозным промотором; Cm^r	–
p15ara:C553	Содержит в векторе p15ara C-домен (92 а.к.) гена *ardA B. longum* под арабинозным промотором; Cm^r	–
p15ara:C613	Содержит в векторе p15ara C-домен (110 а.к.) гена *ardA P. plecoglossicida* под арабинозным промотором; Cm^r	–
pardA655	Содержит в векторе pUC18 ген *ardA Arthrobacter* sp. под *lac*-промотором; Ap^r	–
pardA553	Содержит в векторе pUC18 ген *ardA B. longum* под *lac*-промотором; Ap^r	–
pardA613	Содержит в векторе pUC18 ген *ardA P. plecoglossicida* под промотором *lac*; Ap^r	–

Таблица 1. Окончание

Штамм/плазмида	Характеристика	Источник/ ссылка
pN655	Содержит в векторе pUC18 N-домен (66 а.к.) гена *ardA* *Arthrobacter* sp. под *lac*-промотором; Ap^r	–
pN553	Содержит в векторе pUC18 N-домен (64 а.к.) гена *ardA* *B. longum* под *lac*-промотором; Ap^r	–
pN613	Содержит в векторе pUC18 N-домен (60 а.к.) гена *ardA* *P. plecoglossicida* под *lac*-промотором; Ap^r	–
pC655	Содержит в векторе pUC18 C-домен (118 а.к.) гена *ardA* *Arthrobacter* sp. под *lac*-промотором; Ap^r	–
pC553	Содержит в векторе pUC18 C-домен (92 а.к.) гена *ardA* *B. longum* под *lac*-промотором; Ap^r	–
pC613	Содержит в векторе pUC18 C-домен (110 а.к.) гена *ardA* *P. plecoglossicida* под *lac*-промотором; Ap^r	–

Белок ArdA 655 – ген *ardA* расположен в хромосоме грамположительных неспорообразующих палочек *Arthrobacter* sp. (ВКПМ Ас-1227):

10 20 30 40 50 60 70 80 90
Mttrtntditpr*awigclacynnarlvgewfd*aetadevtlvdvhggahrvrpgceelwvmdheniptagemspseaaewarvllavpeh
→ N-домен ← → C-домен
184
qrdalcawtasgsyvaegtgdlpsvpdfeerfcgtwgsfryyaetlaeeiglipqdapeelvryfnwdawtrdlehnytvvradaisvyvfd
C-домен ←

Белок ArdA 553 – ген *ardA* расположен в хромосоме грамположительных неспорообразующих палочек *B. longum* (ВКПМ Ас-1636):

10 20 30 40 50 60 70 80 90
Maglkdyqis*yyvanlgkyvegvlqgawit*lpmpaerlqdtlktevglggryeeyaihdyeggegllatvanpgeyesltdlnlmcrafe
→ N-домен ← → C-домен
156
aredddpdvyekvrtvrddldaaprtplqyanlalnsdeipyhsydapssaeskeakyawtavnhg
C-домен ←

Белок ArdA 613 – ген *ardA* расположен в транспозоне, встроенном в хромосому грамотрицательных аэробов *P. plecoglossicida* (ВКПМ В-13282):

10 20 30 40 50 60 70 80 90
Mseeir*iyvanlaaynaghlhgvwin*atlelddiqaqvsamlaaspvegseeyaihdfegfggyrlgeyeglerahevacfieeypefgga
→ N-домен ←→ C-домен
170
llthfndleqtrkaaeedycgcyssladyaqelteettripqhlamyidyramardmeysgdvftletgseqvhvfwnr
C-домен ←

Рис. 1. Аминокислотные последовательности ArdA 655, ArdA 553 и ArdA 613. N-домены белков подчеркнуты, курсивом отмечена консервативная последовательность (20 а.к.) в N-доменах.

	номер ВКПМ	
613 *Pseudomonas plecoglossicida*	B-13282	Mseeiriyvanlaaynaghlhgvwinatlelddiqaqvsa
553 *Bifidobacterium longum*	Ac-1636	Maglkdyqisvyvanlgkyvegvlqgawitlpmpaerlqdtlkt
655 *Arthrobacter* sp.	Ac-1227	Mttrtntditprawigclacynnarlvgewfdaetadevtlvdvhg
	GenBank:	
Arthrobacter sp. 31Y	(WP_024816951.1)	Mseykvwvgclpcynngdlvgdwfdagdspqseeefnea
Arthrobacter sp. Bz4	(PVE17435.1)	Mnh(...)paiyvasladyndgrllgtwidatigadaiyeqiha
Bacillus amyloliquefaciens	(ASF27918.1)	Memqvyianlgkynegelagawftppidmedvkerigl
Bifidobacterium bifidum	(KAB7468234.1)	Maglkdyqisvyvanlgkyvegvlqgawitlpmpaerlqdtlkt
Bifidobacterium longum BG7	(ALE36320.1)	Mdglkdyqisvyvanlgkyvegvlqgawitlpmpaerlqdtlkt
Clostridium difficile 630 CD0376	(CAJ67198.1)	Middmavyianlgkynegylvgawftfpideedvkekigl
Clostridium tepidum	(OOO67642.1)	Mddmqvyianlgkynegelvgawftfpidfeevkekigl
Clostridium sp. DL-VIII	(EHJ02265.1)	Memhvyianlgkynegelvgawftppidiedmkekigl
Enterococcus faecalis ORF18	(AAB60015.1)	Mddmqvyianlgkynegelvgawftfpidfeevkekigl
Enterococcus faecalis EF_2335	(AAO82060.1)	Meqmrvyianlgkynegelvgawftppvdfdevkerigl
Enterococcus faecium DO	(AFK59441.1)	Meqirvyianlgkynegelvgawftppvdfdevkerigl
Lactococcus lactis subsp. *lactis*	(SBW31727.1)	Metpkifvvnlnsynngrtrgkwyelpvdftriqsdlll
Listeria monocytogenes	(EAD5208469.1)	Memqvyianlgkynegelvgdwftppidfdivkeqigl
Pseudomonas aeruginosa	(AVZ32959.1)	Msehiriyvadlaaynaghlhgvwidatlelddiqaqvsam
Pseudomonas plecoglossicida	(AXM98039.1)	Mttepriyvadlaaynsgylhgvwidatldvsdiqdqins
Pseudomonas toyotomiensis	(PIA73054.1)	Mseeiriyvadlaaynaghlngvwidatlelddiqaqvda
Streptococcus pneumonia	(VQP07277.1)	Mddmqvyianlgkynegelvgawftfpidfeevkekigl
Staphylococcus aureus MU50 SAV0405	(BAB56 56 7.1)	Memkvyvanlgrynegelvgawftppideeemaerigl
Xanthomonas	(WP_078517685.1)	Mstpriyvaclasynsgvlhgrwieldgadldevrgeia

Рис. 2. Аминокислотные последовательности начальной части N-доменов белков ArdA, кодируемых генами грамположительных и грамотрицательных бактерий. Квадратом выделен консервативный участок размером 20 а.к. Особо выделены четыре аминокислотных остатка (l, y, g, w), найденные во всех представленных белках.

промотор перед геном *luxC A. fischeri*, встроенный перед кассетой *luxCDABE P. luminescens* (гены-репортеры, кодирующие люциферазу) [11]. Бактерии росли в среде LB при температуре 30°C. Интенсивность биолюминесценции клеточной суспензии и ее оптическую плотность измеряли через определенные промежутки времени.

Интенсивность биолюминесценции суспензии клеток (200 мкл) измеряли с помощью люминометра LM-01A (“Beckman”) при комнатной температуре.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Консервативный участок N-домена ArdA

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей гомологов ArdA выявил в области N-домена четко выраженный консервативный участок размером 20 а.к. Этот участок особенно консервативен в белках ArdA, кодируемых хромосомными генами грамположительных бактерий.

На рис. 2 представлены аминокислотные последовательности консервативного участка из 20 а.к. (в квадрате) в N-домене белков ArdA.

Ингибирование рестрикционной активности фермента EcoKI

Антирестрикционную активность белков ArdA измеряли с использованием фаговой техники [2]: фаг λ.0 (содержащий немодифицированную ДНК) титровали на штамме *E. coli* K12 AB1157 в качестве хозяина с активной системой рестрикции–модификации EcoKI. В табл. 2 представлены результаты измерения антирестрикционной активности. Белки ArdA 655 и 613 эффективно ингибируют фермент EcoKI, снижая его рестрикционную активность примерно на четыре порядка. Белок ArdA 553 лишь частично ингибирует фермент EcoKI, понижая его рестрикционную активность в 10 раз. N-домены 655, 553 и 613 не обладают антирестрикционной активностью.

Ингибирование репрессорной активности белка H-NS

На рис. 3–5 представлены результаты эксперимента, в котором определяли способность белков-гомологов ArdA ингибировать H-NS-зависимую репрессию транскрипции бактериальных генов. С этой целью бактерии *E. coli* MG1655 трансформировали двумя совместимыми плазмидами: 1) pDWluxC, содержащей репрессируемый H-NS промотор перед геном *luxC* (выделен из генома морских бактерий *A. fischeri*) и кассету *luxCDABE Photorhabdus luminescens* (гены-репортеры, кодируют люциферазу), и 2) p15ara-613, 655, 553 с генами *ardA* под арабинозным промотором. Бактерии росли в среде LB с антибиотиками при температуре 30°C. Через определенные промежутки времени измеряли интенсивность биолюминесценции клеточной суспензии и ее оптическую плотность. Стрелкой указан момент добавления в среду 20 мМ *L*-арабинозы.

Как видим, ArdA 655 эффективно ингибирует репрессор H-NS практически независимо от при-

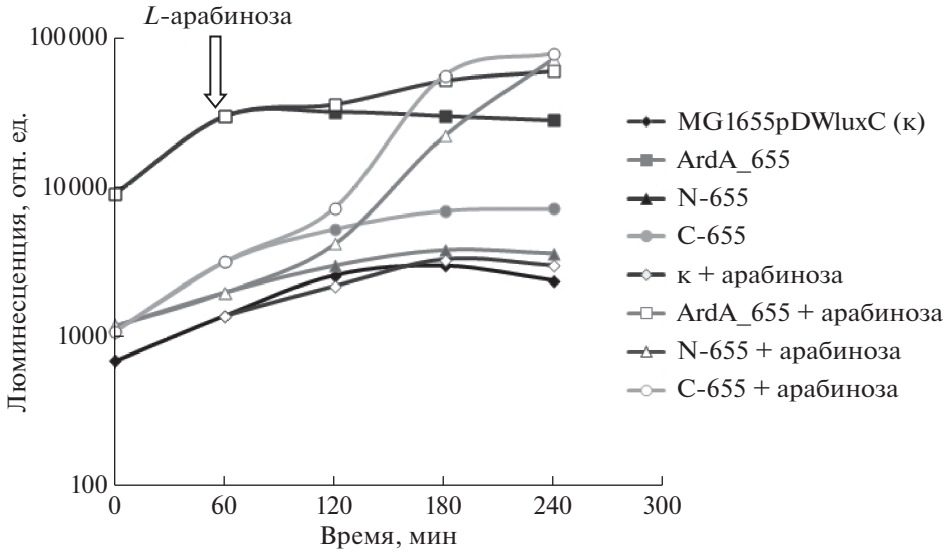


Рис. 3. Влияние цельного белка ArdA 655, его N- и C-доменов на транскрипцию с промотора перед геном *luxC A. fischeri*. По оси ординат отложена интенсивность биолюминесценции бактерий *E. coli* MG1655, содержащих плазмиду pDWluxC, в зависимости от времени инкубации в среде LB при 30°C. Бактериальные клетки росли в присутствии 20 мМ *L*-арабинозы (светлые символы) или в отсутствие *L*-арабинозы (темные символы). Стрелкой указан момент добавления в среду 20 мМ *L*-арабинозы. Эксперименты, результаты которых представлены на рис. 3–5, проведены не менее 6 раз, причем с использованием в каждом опыте нескольких независимо полученных колоний.

сутствия *L*-арабинозы в клетке (рис. 3). Однако N- и C-домены ArdA 655 эффективно ингибируют белок H-NS лишь при добавлении в среду индуктора арабинозного промотора – *L*-арабинозы.

ArdA 553 ингибирует H-NS также практически независимо от присутствия *L*-арабинозы в среде (рис. 4). Высокие ингибирующие активности N- и C-доменов 553, достигающие уровня активности полного белка ArdA, проявляются также лишь в присутствии индуктора *L*-арабинозы, причем при более высоких внутриклеточных концентрациях доменов по сравнению с цельным белком ArdA.

В отличие от ArdA 655 и ArdA553 белок ArdA613 ингибирует репрессорную активность H-NS прак-

Таблица 2. Антирестрикционная активность белков ArdA и их N-доменов

Плазмида	Разведение исходного титра фага λ.0			Ослабление рестрикции***
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-6}	
pUC18 (вектор)	140**		–	1
pArdA 655*	–	–	1260	8.100
pArdA 553	–	152	–	10.1
pN655	136	–	–	1
pN553	128	–	–	1
pArdA613	–	–	1148	8.053
pN613	142	–	–	1

* Фрагменты с генами *ardA* 655, *ardA* 553 *ardA* 613 и фрагменты, кодирующие N-домены белков ArdA 655, 553 и 613, встроены в вектор pUC18 под *lac*-промотор. Вектор pUC18 и плазмиды с генами *ardA* (pArdA 655, pArdA 553, pArdA 613) и с фрагментами, кодирующими N-домены 655, 553 и 613 (pN-домены), трансформировали в бактерии *E. coli* K12 AB1157 с активной системой рестрикции–модификации типа I EcoKI.

** Количество негативных колоний фага λ.0, образующихся на газоне с бактериями AB1157, содержащими плазмиды pArdA 655, pArdA 553, pArdA 613 или pN-домены 655, 553 и 613, а также вектор pUC18 в качестве контроля.

*** Ослабление EcoKI-рестрикции определяется как эффективность посева λ.0 на штаммах, содержащих плазмиды, отнесенная к эффективности на штамме, содержащем вектор pUC18. Представлены усредненные результаты пяти независимых опытов.

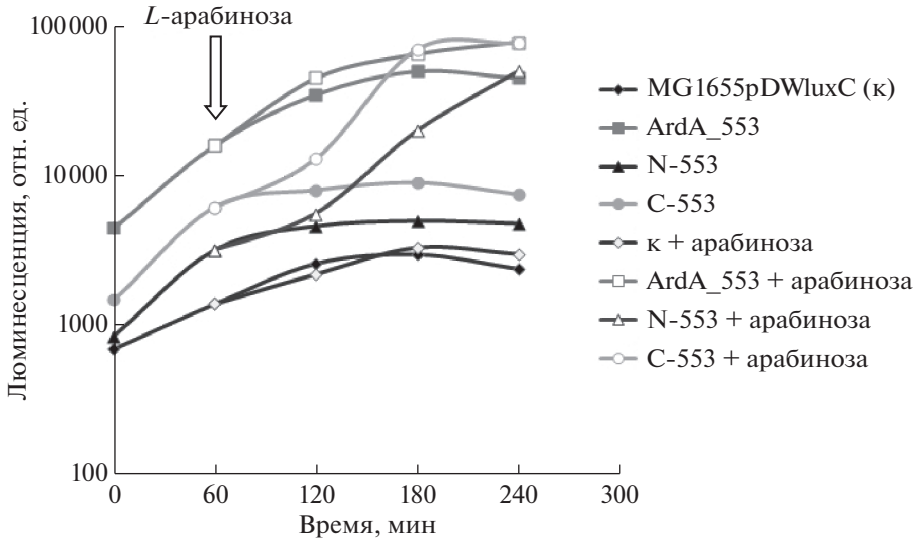


Рис. 4. Влияние полного белка ArdA 553, его N- и C-доменов на транскрипцию с промотора перед геном *luxC A. fischeri*. По оси ординат отложена интенсивность биолюминесценции бактерий *E. coli* MG1655, содержащих плазмиду pDWluxC, в зависимости от времени инкубации в среде LB при 30°C. Бактериальные клетки росли в присутствии 20 мМ *L*-арабинозы (светлые символы) или в отсутствие *L*-арабинозы (темные символы). Стрелкой указан момент добавления в среду 20 мМ *L*-арабинозы.

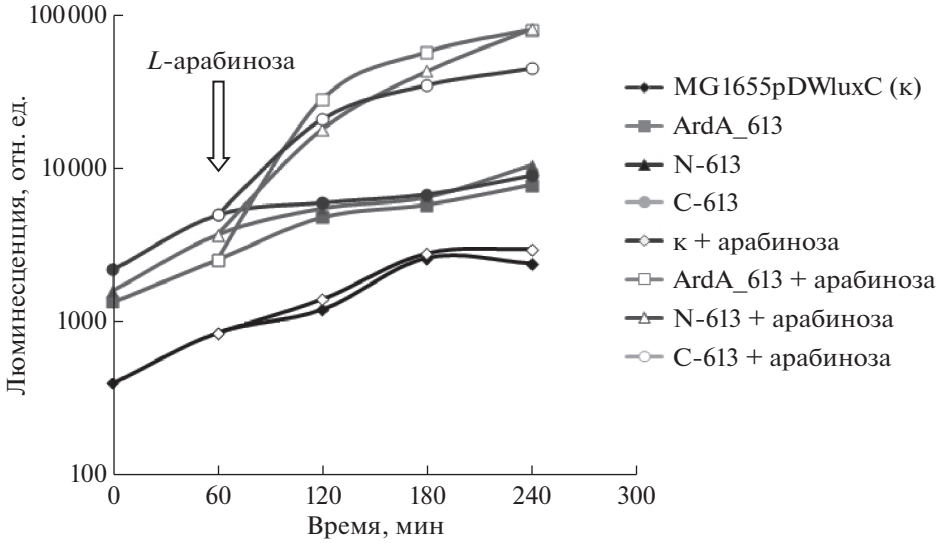


Рис. 5. Влияние цельного белка ArdA 613, его N- и C-доменов на транскрипцию с промотора перед геном *luxC A. fischeri*. По оси ординат отложена интенсивность биолюминесценции бактерий *E. coli* MG1655, содержащих плазмиду pDWluxC, в зависимости от времени инкубации в LB при 30°C. Бактериальные клетки росли в присутствии 20 мМ *L*-арабинозы (светлые символы) или в отсутствие *L*-арабинозы (темные символы). Стрелкой указан момент добавления в среду 20 мМ *L*-арабинозы.

тически с такой же эффективностью, как и N-, и C-домены (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

N-домен белков ArdA обладает собственной активностью – способностью ингибировать белок H-NS, один из основных регуляторных белков, который участвует в компактизации бактериальной хромосомы. На примере белков ArdA 655 и ArdA 553 можно видеть, что присутствие N-домена в составе белка значительно усиливает способность C-домена ингибировать H-NS. Однако антирестрикционной активностью N-домен не обладает.

Ранее было показано, что белок 5.5 бактериофага T7, ингибирует H-NS-репрессию [17]. Уста-

новлено, что белок 5.5 образует комплекс с центральным доменом 2, участвующим в образовании димера H-NS, и ингибирует процесс олигомеризации белков H-NS [18]. Согласно данным, представленным в GenBank CAA6800530, белок 5.5 бактериофага T7 (99 а.к.) содержит β-структуру с двумя расположенными антипараллельно отрезками, связанную петлями с короткими α-спиралями [19], что в определенной степени сходно с пространственной структурой N-домена ArdA. Однако, как показано [20], белок 5.5 T7 на первой стадии формирует комплекс с бактериальной тРНК, и лишь на второй стадии происходит дополнительное присоединение H-NS и образование тройного комплекса "белок 5.5:тРНК:H-NS". Роль белка 5.5 при инфицировании клетки бактериофагом T7 состоит в отвлечении клеточного белка H-NS от фаговой ДНК, так как иначе большое количество H-NS образует с ней прочный комплекс, блокирующий репликацию и, соответственно, размножение фага. В случае с белком ArdA, гены которого в основном расположены в мобильных элементах – конъюгативных плазмидах и транспозонах, ингибирование H-NS помогает мобильным элементам открывать транскрипцию собственных генов, особенно тех, у которых регуляторные области содержат много АТ-пар, и которые эффективно репрессируются белком H-NS.

Белок H-NS большинства грамотрицательных бактерий является глобальным репрессором (silencer), например, блокирует транскрипцию около 15% генов в геномах *E. coli* и *Salmonella enterica*, а также всех богатых АТ-парами генов, которые попадают в бактерии в составе мобильных элементов при горизонтальном переносе [21, 22]. На основании данных, представленных в настоящей работе, можно предположить, что присутствие в структуре антирестрикционных белков ArdA N-домена, дополнительно к основному ДНК-мимикрирующему С-домену, дает возможность трансмиссивным элементам в процессе конъюгативного горизонтального переноса генов не только преодолевать межклеточный рестрикционнный барьер, но и быстрее адаптироваться к условиям нового генома бактерии-реципиента, например, повышая транскрипционную активность переносимых генов.

Авторы выражают благодарность сотрудникам НИЦ Курчатовский институт Сергею Расторгуеву и Алексею Коженкову за помощь в полногеномном секвенировании бактерий и поиск нуклеотидных последовательностей генов *ardA*.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант 19-04-00495).

Работа не содержит исследований с участием людей или животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Belogurov A.A., Yussifov T.N., Kotova V.Yu., Zavilgelsky G.B. (1985) The novel gene(s) (*ard*) of plasmid pKM101: alleviation of EcoKI restriction. *Mol. Gen. Genet.* **198**, 509–513.
2. Delver E.P., Kotova V.Yu., Zavilgelsky G.B., Belogurov A.A. (1991) Nucleotide sequence of the gene (*ard*) encoding the antirestriction protein of plasmid ColIb-P9. *J. Bacteriol.* **173** (18), 5887–5892.
3. Chilley P.M., Wilkins B.M. (1995) Distribution of the *ardA* family of antirestriction genes on conjugative plasmids. *Microbiology*. **141**, 2157–2164.
4. Serfiotis-Mitsa D., Roberts G.A., Cooper L.P., White J.H., Nutley M., Cooper A., Blakely G.W., Dryden D.T.F. (2008) The *Orf18* gene product from conjugative transposon Tn916 is an ArdA antirestriction protein that inhibits type I DNA restriction-modification systems. *J. Mol. Biol.* **383**, 970–981.
5. McMahon S.A., Roberts G.A., Johnson K.A., Cooper L.P., Liu H., White J.H., Carter L.G., Sanghvi B., Oke M., Walkinshaw M.D., Blakely G.W., Naismith J.H., Dryden D.T.F. (2009) Extensive DNA mimicry by the ArdA anti-restriction protein and its role in the spread of antibiotic resistance. *Nucl. Acids Res.* **37**, 4887–4897.
6. Belogurov A.A., Delver E.P. (1995) A motif conserved among the type I restriction-modification enzymes and antirestriction proteins: a possible basis for mechanism of action of plasmid-encoded anti-restriction functions. *Nucl. Acids Res.* **23**, 785–787.
7. Shen Y., Volrath S.L., Weatherly S.C., Elich T.D., Tong L. (2004) A mechanism for the potent inhibition of eukaryotic acetyl-coenzyme A carboxylase by soraphen A, a macrocyclic polyketide natural product. *Mol. Cell.* **16**, 881–891.
8. Nekrasov S.V., Agafonova O.V., Belogurova N.G., Delver E.P., Belogurov A.A. (2007) Plasmid-encoded antirestriction protein ArdA can discriminate between type I methyltransferase and complete restriction-modification system. *J. Mol. Biol.* **365**, 281–297.
9. Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Расторгуев С.М. (2008) Сравнительный анализ антирестрикционной активности белков ArdA (ColIb-P9) и Ocr (T7). *Биохимия*. **73**, 1124–1130.
10. Walkinshaw M.D., Tylor P., Sturrock S.S., Atanasiu C., Berge T., Henderson R.M., Edwardson J.M., Dryden D.T.F. (2002) Structure of Ocr from bacteriophage T7, a protein that mimics B-form of DNA. *Mol. Cell.* **9**, 187–194.
11. Melkina O.E., Goryanin I.I., Zavilgelsky G.B. (2016) The DNA-mimic antirestriction proteins ArdA ColIb-P9, Arn T4, and Ocr T7 as activators of H-NS-dependent gene transcription. *Microbiol. Res.* **192**, 283–291.
12. Robin S., Togashi D., Ryder A.G., Wall J.G. (2009) Trigger factor from psychrophilic bacterium *Psychrobacter frigidicola* is a monomeric chaperone. *J. Bacteriol.* **191**, 1162–1169.
13. Ulitzur S., Matin A., Fraley C., Meighen E.(1997) H-NS protein represses transcription of the *lux* systems of *Vibrio fischeri* and other luminous bacteria cloned into *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* **35**, 336–342.

14. Ulitzur S. (1998) H-NS controls the transcription of three promoters of *Vibrio fischeri lux* cloned in *Escherichia coli*. *J. Biolumin. Chemilumin*. **13**, 185–188.
15. Van Dyk T., Rosson R.A. (1998) *Photorhabdus luminescens luxCDABE* promoter probe vectors. In: *Methods in Molecular Biology*. Ed LaRossa R.A. Totowa, New York: Humana Press Inc., 102, 85–95.
16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory Manual,* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press.
17. Liu Q., Richardson C.C. (1993) Gene *5.5* protein of bacteriophage T7 inhibits the nucleoid protein H-NS of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 1761–1765.
18. Ali S.S., Beckett E., Bac S.J., Nawarre W.W. (2011) The 5.5 protein of phage T7 inhibits H-NS through interactions with the central oligomerization domain. *J. Bacteriol*. **193**, 4881–4892.
19. Redgwell R.T., Michniewski S., Harrison D.C., Millard A. (2020) GenBank CAA6800530. University of Warwick, Coventry, United Kingdom.
20. Zhu B., Lee S.-J., Tan M., Wang E.-D., Richardson C.C. (2012) Gene *5.5* of bacteriophage T7 in complex with *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS and transfer RNA masks transfer RNA priming in T7 replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**, 8050–8059.
21. Dorman C.J. (2007) H-NS, the genome sentinel. *Nat. Rev. Microbiol*. **5**, 157–161.
22. Dillon S.C., Dorman C.J. (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol*. **8**, 185–195.

N-DOMAIN OF THE ANTIRESTRICTION PROTEINS ArdA INHIBITS THE REPRESSION ACTIVITY OF THE HISTONE-LIKE H-NS PROTEIN

O. E. Melkina[1] and G. B. Zavilgelsky[1, *]

[1]*State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 117545 Russia*

**e-mail: zavilgel@genetika.ru*

DNA mimicking anti-restriction proteins ArdA specifically inhibit restriction (endonuclease) activity of restriction-modification (RM) type I system. ArdA monomer is comprised of three α-β domains (N domain, Central domain, C domain), each with a different fold. Here we describe an alignment of the amino acid (aa) sequences of the ArdA with conserved 20-aa motif in the N domain. N domains of ArdA proteins of Gram-positive bacteria *Arthrobacter sp.* and *Bifidobacterium longum,* and Gram-negative bacteria *Pseudomonas plecoglossicida* are capable of inhibiting the repressive activity of the H-NS global silencer protein in *Escherichia coli* cells. The presence of the H-NS inhibiting N domain in the ArdA structure enables horizontal gene transfer by mobile elements, including conjugative plasmids and transposons. Specifically, it aids in overcoming intercellular restriction barriers, allowing faster adaption to the genome context of the recipient bacterium.

Keywords: antirestriction, ArdA, H-NS-repression

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 3, с. 500–509

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 577.216.4

ДЕУБИКВИТИНИРУЮЩИЙ (DUB) МОДУЛЬ SAGA УЧАСТВУЕТ В POL III-ЗАВИСИМОЙ ТРАНСКРИПЦИИ

© 2021 г. Ю. В. Николенко[a], Ю. А. Вдовина[a], Е. И. Фефелова[a], А. А. Глухова[a], Е. Н. Набирочкина[a], Д. В. Копытова[a, *]

[a] Институт биологии гена Российской академии наук, Москва 119334 Россия

*e-mail: d_dmitrieva@mail.ru

Поступила в редакцию 23.09.2020 г.
После доработки 16.10.2020 г.
Принята к публикации 21.10.2020 г.

Мультибелковый комплекс SAGA, отвечающий за ацетилирование N-концевых последовательностей гистонов и участвующий в активации транскрипции широкого спектра генов эукариот, содержит также белковый модуль, отвечающий за деубиквитинирование гистона H2B (DUB-модуль). Свойства и механизм работы DUB-модуля изучены недостаточно. В настоящей работе нами показано, что DUB-модуль может существовать в клетке независимо от SAGA. С промоторами генов, транскрибируемых РНК-полимеразой III (Pol III), в отличие от генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II (Pol II), DUB-модуль взаимодействует независимо от SAGA. DUB-модуль необходим для привлечения транскрипционного фактора Brf1 (субъединицы комплекса TFIIIB), отвечающего за взаимодействие Pol III с промоторами Pol III-зависимых генов. DUB-модуль взаимодействует с Pol III *in vivo*. Он участвует в привлечении в промоторную область Pol III-зависимых генов типа III не только комплекса TFIIIB, но также комплекса PBP.

Ключевые слова: DUB-модуль, комплекс SAGA, транскрипция, РНК-полимераза III

DOI: 10.31857/S0026898421030137

ВВЕДЕНИЕ

Доступность ДНК-матрицы для транскрипционных факторов контролируется уровнем компактизации хроматина, который в свою очередь регулируется АТР-зависимым ремоделированием нуклеосом и внесением или снятием ковалентных модификаций гистонов. Эти изменения хроматина приводят к формированию структуры молекулы ДНК, с которой связываются транскрипционные факторы. За эти процессы отвечают коактиваторные комплексы – эволюционно консервативные мультибелковые комплексы, участвующие в активации транскрипции.

Коактиваторные комплексы чаще всего имеют несколько ферментативных активностей, которые также регулируются другими белками. Фактически, большие коактиваторные комплексы состоят из нескольких модулей, которые играют определенную функциональную роль. SAGA – эволюционно консервативный эукариотический комплекс, способный ацетилировать N-концевые последовательности гистонов, участвует в активации транскрипции широкого спектра генов. В состав комплекса SAGA входят 18–20 субъединиц [1]. Генетические и биохимические исследования показали, что SAGA состоит из нескольких функциональных модулей: структурного основания, гистон-ацетилтрансферазного модуля (HAT), деубиквитинирующего модуля (DUB) и модуля связывания с активатором [2, 3]. SAGA многоклеточных организмов содержит также модуль сплайсинга.

В состав ацетил трансферазного модуля входит фермент ацетил-трансфераза Gcn5. Этот модуль активирует транскрипцию за счет ацетилирования остатков лизина в молекулах гистонов. Ацетилирование активирует экспрессию генов, создавая открытую структуру хроматина, что позволяет связаться с хроматином и ДНК другим транскрипционным факторам [4–6].

DUB-модуль SAGA деубиквитинирует гистон H2B [7–11]. В состав DUB-модуля у *Drosophila melanogaster* и *Saccharomyces cerevisiae* входят бел-

Сокращения: Pol II – РНК-полимераза II; Pol III – РНК-полимераза III; DUB-модуль – деубиквитинирующий модуль; HAT-модуль – ацетилтрансферазный модуль; мяРНК – малая ядерная РНК; PSE – проксимальный элемент (proximal sequence element); DSE – дистальный элемент (distal sequence element); PBP-комплекс – комплекс, связывающий проксимальный элемент (PSE-binding protein complex).

ки: Nonstop (yUbp8), Sgf11, ENY2 (ySus1) и ATXN7 (ySgf73) (табл. 1) [12, 13].

Изучение структуры DUB-модуля дрожжей показало, что он соединяется с остальным комплексом SAGA с помощью С-концевого участка белка Sgf73 (dATXN7) [14, 15]. Белок yUbp8 (dNonstop) является каталитической субъединицей, а Sgf11 необходим для взаимодействия yUbp8 с субстратом и поддержания его активной конформации [12, 13, 16].

Ранее мы показали, что белок Sgf11 участвует в формировании и экспорте мРНП-частицы независимо от DUB-модуля [17].

Недавно обнаружили, что SAGA участвует в транскрипции генов малых ядерных РНК (мяРНК) как Pol II-, так и Pol III-зависимых [18]. Pol III транскрибирует набор некодирующих РНК, включая тРНК, 5S РНК и U6 мяРНК [19]. Важную роль в Pol III-зависимой транскрипции играет транскрипционный фактор IIIB (TFIIIB). Этот фактор состоит из трех субъединиц и отвечает за рекрутирование Pol III на промоторы ее генов-мишеней. Каждая из субъединиц комплекса TFIIIB, (TBP (TATA-связывающий белок), BDP1 – большой SANT-доменсодержащий белок и родственные TFIIB факторы: BRF1 или BRF2), необходима для его правильного функционирования [20, 21].

Большинство транскрибируемых Pol III генов, таких как гены тРНК, имеют внутренние промоторы, содержащие два блока промоторных последовательностей (A и B), расположенных внутри области транскрипции. С этими блоками связывается транскрипционный фактор IIIC (TFIIIC) [22], который рекрутирует TFIIIB. Меньшая часть Pol III-транскрибируемых генов (гены мяРНК), имеют промотор, расположенный “выше” сайта старта транскрипции. Эти промоторы содержат TATA-box, который взаимодействует с TBP, PSE-элемент, связывающий фактор PBP, необходимый для привлечения TFIIIB, и DSE – элемент ДНК, обладающий свойствами энхансера [19, 23].

В транскрипции генов человека с промоторным элементом, расположенным внутри области транскрипции, участвует TFIIIB, содержащий белок BRF1, а в транскрипции с внешних промоторов – BRF2. У дрозофилы известен только Brf1, поэтому этот белок участвует в транскрипции и с внешних, и с внутренних промоторов.

С DSE взаимодействуют такие транскрипционные факторы, как Oct1, Sp1, NF1, Staf [23, 24]. Показано, что в генах U1, U2, 7SK и U6 мяРНК между элементами DSE и PSE находится нуклеосома, которая сближает эти две области в пространстве и облегчает взаимодействие между Oct1 и PBP [25–28]. Описано вовлечение в регуляцию Pol III-зависимой транскрипции фактора c-Myc, который рекрутирует кофакторы TRRAP и GCN5 к генам тРНК и 5S рРНК и стимулирует ацетилирование гистона H3 в этих локусах [29].

Хотя влияние SAGA на транскрипцию генов изучено достаточно хорошо, нерешенным остается ряд вопросов, касающихся DUB-модуля SAGA. В частности, не ясно, существует ли DUB-модуль в клетке независимо от остального комплекса и как он взаимодействует с другими транскрипционными факторами. Мы показываем, что DUB-модуль может существовать в клетке независимо от SAGA, исследуем взаимодействие DUB-модуля с транскрипционным аппаратом Pol III, а также показываем, что механизмы взаимодействия DUB-модуля с транскрипционным аппаратом Pol II- и Pol III-зависимых генов различаются между собой.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линии *D. melanogaster*. В работе использованы следующие линии *D. melanogaster* (табл. 2).

Антитела. В работе использованы поликлональные антитела к белкам: Sgf11, ENY2, Gcn5,

Таблица 1. Ортологи субъединиц DUB-модуля комплекса SAGA и TFIIIB у различных организмов

Комплекс	Ортологи субъединиц DUB-модуля комплекса SAGA и TFIIIB		
	D. melanogaster	*H. sapiens*	*S. cerevisiae*
DUB	Nonstop, dNonstop	USP22, hUSP22	Ubp8, yUbp8
	Sgf11, dSgf11	ATXN7L3, hATXN7L3	Sgf11, ySgf11
	ENY2, dENY2	ENY2, hENY2	Sus1, ySus1
	ATXN7, dATXN7	ATXN7, hATXN7	Sgf73, ySgf73
TFIIIB	TBP, dTBP	TBP, hTBP	TBP, yTBP
	Bdp1, dBdp1	BDP1, hBDP1	BDP1, Brf1, yBrf1
	Brf1, dBrf1	BRF1, hBRF1	BRF1, Brf1, yBrf1

Таблица 2. Линии *D. melanogaster*, использованные для генетического анализа и в экспериментах по иммунопреципитации хроматина

Мутация в гене, кодирующем белок	Генотип	Источник
ENY2	*y[2]w [1]e(y)2[u1]/FM4*	Получена ранее, [30]
Sgf11	*w[1118]; PBac{RB} [10]Sgf11[e01308]/TM6B,Tb [1]*	BDSC, Stock # 7941
Nonstop	*P{ry[+t7.2] = PZ}not[02069] ry[506]/TM6B, ry[CB] Tb[+]*	BDSC, Stock # 11553
Rpc2	*y[1] w[*]; Mi{y[+mDint2] = MIC}RpIII128[MI15114]/SM6a*	BDSC, Stock # 59742
Rpc31	*w[1118]; PBac{w[+mC] = PB}CG33051[c02392]*	BDSC, Stock # 10908
Rpc82	*w[1118]; PBac{w[+mC] = WH}CG12267[f05999]/TM6B, Tb [1]*	BDSC, Stock # 18929
Rpc53	*y[1] w[67c23]; P{w[+mC] y[+mDint2] = = EPgy2}CG5147[EY22749]/TM3, Sb [1] Ser [1]*	BDSC, Stock # 22580
Rpc37	*y[1] w[*]; P{w[+mC] = EP}Sin[G5366]/TM3, Sb [1] Ser [1]*	BDSC, Stock # 27952
Brf1	*w[1118]; PBac{w[+mC] = PB}Brf[c07161]/TM6B, Tb [1]*	BDSC, Stock # 17804
	w[*]; TM3, Sb [1] Ser [1]/TM6B, Tb [1]	BDSC, Stock # 2537

Примечание. BDSC – эти линии получены из коллекции центра Bloomington Stock Center (http://flystocks.bio.indiana.edu/). Самцы и самки с генотипом *TM6B,Tb [1]/+* (в тексте обозначены "*TM6B/+*"), использованные в качестве контроля в опытах по иммунопреципитации хроматина, получены путем скрещивания линий *w[*]; TM3, Sb [1] Ser [1]/TM6B, Tb [1]* и *y[1]w [1]*. Самцы с генотипом *y[2]w [1]e(y)2[u1]* (в тексте обозначены "*e*(*y*)*2;+*"), использованные в качестве контроля в анализе генетических взаимодействий, получены путем скрещивания линий *y[2]w [1]e(y)2[u1]/FM4* и *y[1]w [1]*.

Brf1, Pbp45, полученные ранее в нашей лаборатории [17, 18, 30, 31].

Фракционирование Sgf11-содержащего комплекса из экстракта ядер эмбрионов дрозофилы. Экстракт из ядер эмбрионов получен согласно процедуре, описанной ранее [30], из 0–12-часовых эмбрионов. Детальная схема фракционирования показана на рис. 1*а*. Колонки были уравновешены в HEMG-буфере (25 мМ HEPES-KOH, pH 7.6, 12.5 мМ $MgCl_2$, 0.1 мМ EDTA, 10% глицерина, 1 мМ дитиотреитол), содержащем 150 мМ NaCl. Иммуноаффинную очистку выполняли на колонке с иммобилизованными антителами к Sgf11, сшитыми с протеин-А-сефарозой. Не связавшиеся белки отмывали буфером HEMG 500, содержащим 0.1% NP-40. Детали процедуры очистки и MALDI-TOF MS описаны ранее [32, 33].

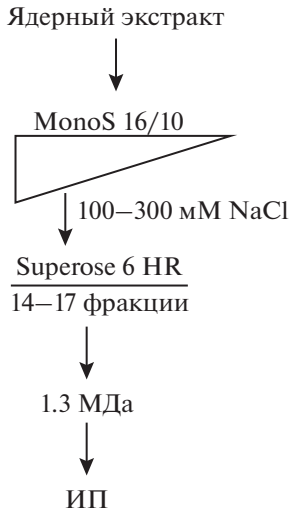
Культура клеток S2 дрозофилы и эксперименты по нокдауну белков в S2-клетках. Клетки S2 культивировали при 25°C в среде Schneider's insect medium ("Sigma", США), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота ("HyClone", США). Нокдаун белков проводили с помощью РНК-интерференции согласно протоколу [34]. В эксперименте использовали 5–7 мкг дцРНК на 1×10^6 клеток. дцРНК синтезировали с помощью TranscriptAid T7 HighYield TranscriptionKit ("ThermoScientific", США). Уровень экспрессии генов-мишеней измеряли с использованием количественной ПЦР и Вестерн-блот-анализа. дцРНК, соответствующую фрагменту GFP, использовали в качестве отрицательного контроля. дцРНК синтезировали с использованием следующих праймеров: ATXN7 – 5'-CGACTCACTATAGGGAGATCCATGCTGGAGCAGAAGGT-3'

и 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCAGTTCATTCAAACGCTTGGC-3';

GPF – 5'-CGACTCACTATAGGGAGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGC-3'

и 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGATGCCGTTCTTCTGCTTGTCG-3'.

а



б

Идентификационный номер белка	Белок	Молекулярная масса	Величина уровня достоверности, $-10\lg P$	Количество пептидов
sp|Q9VQB6|Q9VQB6_DROME	Ataxin 7 isoform A OS=Atxn7	104206	209.78	8
sp|Q9WRI|NOT_DROME	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase nonstop=not	56441	232.83	16
sp|Q9WR6|SGF11_DROME	SAGA-associated factor 11 homolog OS=Sgf11	21322	235.05	9
sp|Q9VYXI|ENY2_DROME	Enhancer of yellow 2 transcription factor =e(y)2	11474	48.65	2

Рис. 1. Очистка DUB-модуля комплекса SAGA из экстракта ядер эмбрионов. *а* – Схема очистки комплекса. ИП – иммунопреципитация антителами к Sgf11, сшитыми с носителем. *б* – Белки DUB-модуля комплекса SAGA, выявленные в ходе MALDI-TOF MS. Указаны ID белков, их названия, молекулярная масса, score –достоверность определения, количество выявленных пептидов.

Иммунопреципитация хроматина (ChIP). В одной реакции иммунопреципитации использовали хроматин, выделенный из 3 × 10^6 клеток S2 или из 50 имаго дрозофилы. “Сшивку” проводили, добавляя в реакционную среду формальдегид до концентрации 0.5% и инкубируя в течение 10 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 2.5 М глицина до концентрации 0.125 М (1/20 от общего объема). После отмывки тремя объемами холодного раствора 1× PBS, хроматин ресуспендировали в SDS-содержащем буфере (50 мМ HEPES KOH, pH 7.9, 140 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1% тритона X-100, 0.1% дезоксихолата Na, 0.1% SDS, 1× PIC (protease inhibitors cocktail (“Roche”, Швейцария)) и дробили до фрагментов размером ~500 нуклеотидов с помощью ультразвука. Обработанный ультразвуком хроматин центрифугировали дважды при 16000 *g* в течение 20 мин, а затем использовали в экспериментах по иммунопреципитации. В один эксперимент брали около 10 мкг антител и 15 мкл протеин-А-сефарозы (“Sigma”). В реакцию добавляли также ДНК спермы лосося и бычий сывороточный альбумин до конечной концентрации 1 мг/мл. Осажденный хроматин последовательно отмывали SDS-содержащим буфером, SDS-содержащим буфером с 0.5 М NaCl, LiCl-содержащим буфером (20 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 1 мМ EDTA, 250 мМ LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% дезоксихолат Na) и TE (20 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 1 мМ EDTA). Комплексы хроматина инкубировали в буфере для элюции (50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 1 мМ EDTA, 1% SDS) в течение 30 мин при комнатной температуре. В раствор добавляли 5 М NaCl (16 мкл на 500 мкл раствора) и инкубировали при 65°C в течение 16 ч в термошейкере для “расшивки” хроматина. Затем хроматин обрабатывали протеазой (3 мкл протеиназы K, 5 мкл 0.5 М EDTA на 500 мкл раствора) в течение 4 ч при 55°C в термошейкере. ДНК экстрагировали смесью фенол–хлороформ и осаждали изопропанолом. Преципитат растворяли в буфере TE. Выделенную ДНК анализировали с помощью количественной ПЦР. Результаты иммунопреципитации оценивали по соотношению (%) осажденной/исходной фракции. Каждое измерение выполняли как минимум в трех повторах и вычисляли среднее значение.

Статистический анализ. Сравнение экспериментальных групп проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Все данные представлены в ви-

де среднего значения ± стандартное отклонение (шкала ошибок), по крайней мере, по трем независимым экспериментам. Звездочки указывают на статистическую значимость: данных $*P < 0.05$ или $**P < 0.01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Очистка деубиквитинирующего (DUB) модуля SAGA из экстракта ядер эмбрионов

Ранее из белкового экстракта ядер эмбрионов дрозофилы мы выделили и очистили Sgf11-содержащий комплекс массой 100 кДа, включающий CAP-связывающий белок (Cbp80), необходимый для формирования и экспорта мРНП-частицы [17].

В данной работе поставлена задача выделить DUB-модуль комплекса SAGA. Экстракт из ядер эмбрионов дрозофилы пошагово фракционировали с помощью ионообменной хроматографии и гель-фильтрации (рис. 1*а*). Содержание Sgf11 во фракциях после фракционирования детектировали с помощью Вестерн-блот-анализа. Фракции с максимальным содержанием Sgf11 собирали и использовали в дальнейшей работе.

При последнем фракционировании на гель-фильтрационной колонке Superose 6 HR Sgf11 мигрировал несколькими пиками. В дальнейшей работе использовали Sgf11-содержащие фракции, в которых по результатам Вестерн-блот-анализа выявлены и другие компоненты комплекса SAGA (масса ~1.3 МДа). Эти фракции содержали и другие компоненты DUB-модуля.

Фракции инкубировали с антителами к Sgf11, сшитыми с протеин-А-сефарозой, Связавшийся материал анализировали с помощью MALDI-TOF MS. В результате выявили белки DUB-модуля: Sgf11, ENY2, Nonstop (рис. 1*б*). С DUB-модулем соосаждались также (в гораздо меньшем количестве) более 100 белков, участвующих в транскрипции и формировании мРНП-частицы. Однако компонентов SAGA-комплекса среди них, несмотря на мягкие условия очистки, не обнаружено. Интересно, что в более жестких условиях (при включении дополнительных стадий очистки) выделены только три белка: Sgf11, Nonstop и убиквитин. Таким образом, наши данные показывают, что DUB-модуль может существовать в ядре как отдельный структурный компонент, не связанный с SAGA.

Анализ влияния белков комплекса SAGA на привлечение DUB-модуля в промоторную область SAGA-зависимых генов

Поскольку полученные данные показывают, что DUB-модуль может существовать в клетке независимо от SAGA, мы исследовали необходимость комплекса SAGA для привлечения DUB-модуля на промоторы генов. Присутствие DUB-модуля на промоторе изучено методом иммунопреципитации хроматина. Анализировали влияние нокдауна субъединицы ATXN7 комплекса SAGA, через которую, как показано ранее, DUB-модуль взаимодействует с SAGA. Нокдаун ATXN7 должен был показать, влияет ли SAGA на привлечение DUB-модуля на промотор.

Хроматин выделяли из клеток S2, в которых при помощи РНК-интерференции был проведен нокдаун ATXN7. В качестве контроля использовали клетки S2, инкубированные с дцРНК, соответствующей фрагменту GFP. В реакциях иммунопреципитации хроматина использовали антитела к Sgf11, ENY2 и Gcn5, имеющиеся в нашей лаборатории. Поскольку ранее было показано, что SAGA и DUB-модуль присутствуют на промоторах как Pol II-, так и Pol III-зависимых генов, мы оценили присутствие факторов на промоторе гена *hsp70* (Pol II-зависимый ген) при тепловом шоке и на мишенях Pol III, присутствие SAGA на которых показано ранее [18, 35].

Нокдаун ATXN7 привел к уменьшению связывания субъединиц DUB-модуля Sgf11 и ENY2 с промотором *hsp70*, но не повлиял на их привлечение на гены, транскрибируемые Pol III (рис. 2). В качестве контроля изучено влияние нокдауна ATXN7 на уровень основной ацетилтрансферазной каталитической субъединицы SAGA, Gcn5. Как и ожидалось, нокдаун ATXN7 не повлиял существенно на связывание с промоторами *Gcn5*, так как ATXN7 не участвует во взаимодействии SAGA с промотором. Эти данные показывают, что механизм привлечения DUB-модуля на некоторые промоторы может быть SAGA-независимым и отличается на промоторах Pol II- и Pol III-зависимых генов.

Взаимодействие DUB-модуля с аппаратом транскрипции Pol III in vivo

Далее изучали роль DUB-модуля в регуляции транскрипции Pol III-зависимых генов. На первом этапе взаимодействие DUB-модуля и компонентов аппарата транскрипции Pol III изучали генетическими методами на уровне целого организма. Из компонентов DUB-модуля для генетического анализа наиболее удобен ENY2, поскольку он кодируется геном *e(y)2*, который расположен на Х-хромосоме, что позволяет исследовать его в гемизиготном состоянии у самцов. В нашем распоряжении была линия *D. melanogaster* с мутацией *e(y)2[u1]* – слабой гипоморфной мутацией, очень удобной для анализа, так как она обладает плейотропным эффектом, а ее фенотип подробно охарактеризован ранее [30, 36]. Одно из проявлений мутации *e(y)2[u1]* – фенотип “широко расставленные крылья”, наблюдается у ~5% гемизиготных самцов.

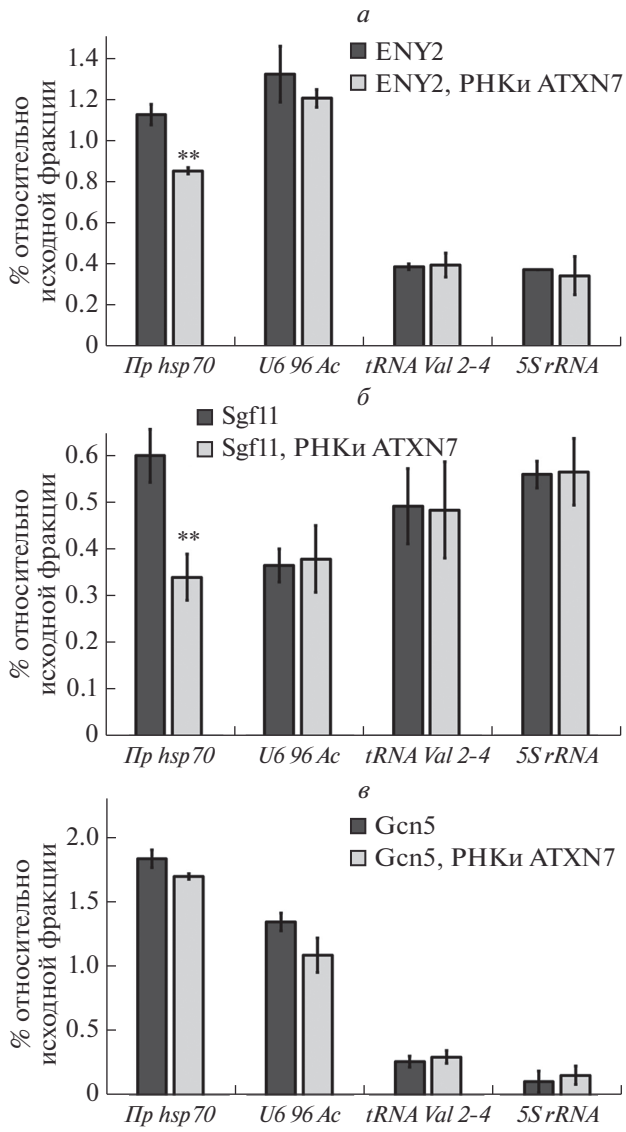


Рис. 2. Анализ влияния нокдауна ATXN7 на привлечение DUB-модуля на промоторы SAGA-зависимых генов. *а*, *б*, *в* – Анализ влияния нокдауна ATXN7 на привлечение ENY2, Sgf11 и Gcn5 в промоторную область генов. Влияние нокдауна ATXN7 на привлечение обозначенных белков на промоторы: *hsp70* при тепловом шоке, *U6 96 Ac*, *tRNA Val 2-4*, *5S rRNA* изучено в реакциях иммунопреципитации хроматина (ChIP). Результаты представлены в процентах от исходной фракции.

Линии дрозофилы с мутациями, затрагивающими компоненты аппарата транскрипции Pol III, получены из банка мутаций в Блумингтоне. Все эти мутации локализованы на аутосомах, летальны в гомозиготном состоянии, а их фенотипические проявления в гетерозиготном состоянии не описаны. Поэтому мы анализировали влияние этих мутаций на фенотипические проявления мутации *e(y)2[u1]*. С этой целью в результате скрещивания получили самцов, гемизиготных по мутации

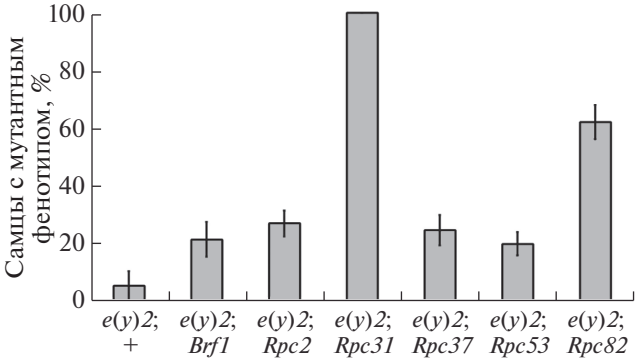


Рис. 3. Взаимодействие DUB-модуля и аппарата транскрипции Pol III *in vivo*. Частота проявления фенотипа “широко расставленные крылья” у самцов с мутацией в гене, кодирующем ENY2 (обозначена как *e(y)2;+*), значительно возрастает на фоне мутаций в генах *Brf1*, *Rpc2*, *Rpc31*, *Rpc37*, *Rpc53*, *Rpc82*. Проанализировано не менее 200 самцов каждого генотипа.

e(y)2[u1] и гетерозиготных по мутациям в генах компонентов аппарата транскрипции Pol III. Частота проявления (пенетрантность) мутантного фенотипа *e(y)2[u1]* у таких самцов значительно возрастала по сравнению с исходной линией *e(y)2[u1]* и с контрольным скрещиванием (рис. 3). Таким образом мы показали, что DUB-модуль и аппарат транскрипции Pol III взаимодействуют *in vivo*.

Участие DUB-модуля в привлечении аппарата транскрипции Pol III на промоторы Pol III-зависимых генов мяРНК

Влияние DUB-модуля на экспрессию генов, транскрибируемых Pol III, изучали на линиях дрозофилы с мутациями по субъединицам DUB-модуля Sgf11 и Nonstop, полученным из банка мутаций. Поскольку эти мутации летальны в гомозиготном состоянии, мы использовали гетерозиготных особей *Sgf11[e01308]/TM6B* и *not[02069]/TM6B*, у которых уровень экспрессии генов *Sgf11* и *Nonstop* был значительно ниже, чем у мух дикого типа [18]. В качестве контроля использовали особей *TM6B/+*.

Влияние DUB-модуля на Pol III-зависимые гены изучали с помощью реакции иммунопреципитации хроматина, полученного из дрозофил с мутацией *Sgf11[e01308],* антителами к Brf1.

Присутствие компонентов транскрипционного аппарата Pol III определено на трех типах Pol III-зависимых промоторов, описанных выше и представленных на рис. 4*а*. Оказалось, что наибольшее влияние мутации субъединиц модуля DUB оказывают на привлечение Brf1 в промоторную область TATA-box-содержащих Pol III-зависимых генов (рис. 4*а*, *б*). Мы предположили, что это происходит за счет влияния DUB-модуля на

привлечение комплекса PBP, который, в свою очередь, необходим для привлечения TFIIIB. И на фоне нокдауна субъединиц DUB-модуля PBP-комплекс хуже взаимодействует с последовательностью PSE.

Для подтверждения этой гипотезы изучено влияние мутации *Nonstop* (деубиквитиназы DUB-модуля) на привлечение в промоторную область мяРНК белка Pbp45, субъединицы комплекса PBP. Из дрозофил с мутацией *not[0206]* был экстрагирован хроматин и проведены реакции иммунопреципитации хроматина с использованием антител к белку Pbp45 (рис. 4*в*). Оказалось, что мутация *Nonstop* вызывает более чем двукратное уменьшение присутствия Pbp45 на промоторе.

Таким образом, нокдаун субъединиц DUB-модуля приводит к уменьшению связывания PBP-комплекса с последовательностью PSE и менее эффективному привлечению фактора TFIIIB на промоторы TATA-box-содержащих Pol III-зависимых генов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы очистили деубиквитинирующий (DUB) модуль SAGA из экстракта ядер эмбрионов дрозофилы и проанализировали его возможное участие в транскрипции независимо от остальных компонентов комплекса SAGA. Модульная структура комплекса SAGA установлена давно, однако способность отдельных модулей SAGA действовать независимо от других не исследована.

Ранее было показано, что белок ATXN7 в составе DUB-модуля необходим для его взаимодействия с остальным комплексом SAGA [14, 15]. Нокдаун ATXN7 должен был привести к отделению остального SAGA от DUB-модуля и нарушить таким образом привлечение DUB-модуля на SAGA-зависимые гены. Однако при нокдауне ATXN7 привлечение Sgf11 и ENY2, компонентов DUB-модуля, уменьшалось только на промоторе Pol II-зависимого гена *hsp70* при тепловом шоке. Количество Sgf11 и ENY2 на Pol III-зависимых промоторах не менялось. Таким образом, мы показали, что структура комплекса SAGA на промоторах Pol II- и Pol III-зависимых генов может отличаться или привлечение модулей происходит по-разному.

Для привлечения Pol III на гены-мишени необходим фактор TFIIIB. Как показано ранее, мутации и компонентов DUB-модуля, и HAT-модуля приводят к уменьшению привлечения Brf1, одного из основных белков TFIIIB, на промоторы генов мяРНК [18]. Поскольку в нашей работе показано, что DUB-модуль может существовать независимо, и его привлечение на Pol III-зависимые промоторы происходит независимо от других модулей SAGA, далее мы изучили участие DUB-модуля в транскрипции Pol III-зависимых генов. Это исследование выполнено *in vivo* на уровне целого организма. Анализ взаимного вли-

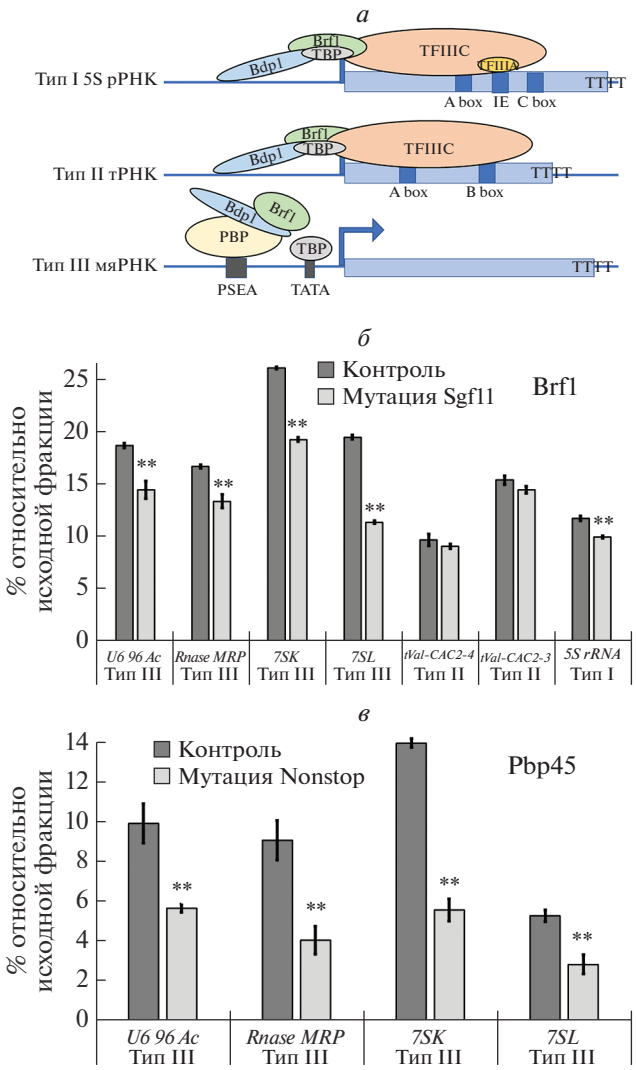


Рис. 4. Анализ участия DUB-модуля в привлечении аппарата транскрипции Pol III на промоторы Pol III-зависимых генов мяРНК. *а* – Три типа промоторов Pol III-зависимых генов. На схеме указаны ДНК-элементы и белковые факторы. Стрелка показывает начало транскрипции и направление. TTTT – последовательность терминации транскрипции Pol III. Белки Brf1, Bdp1, TBP образуют комплекс TFIIIB. Позиции Brf1 и Bdp1 показаны согласно результатам ChIP-seq в клетках человека. Белок-белковые взаимодействия между TFIIIC, TFIIIA и TFIIIB также показаны на схеме [37]. *б* – Влияние снижения количества Sgf11 в мутантной линии *Sgf11[e01308]/TM6B* на привлечение Brf1 в промоторную область Pol III-зависимых генов. *в* – Влияние снижения количества Nonstop в мутантной линии *not[02069]/TM6B* на привлечение Pbp45 в промоторную область Pol III-зависимых генов мяРНК. Результаты получены методом иммунопреципитации хроматина (ChIP) и представлены в процентах относительно исходной фракции. В качестве контроля использовали мух с генотипом *TM6B/+*.

яния мутаций показал, что ENY2, субъединица DUB-модуля, взаимодействует не только с Brf1, но также с субъединицами Pol III.

Фактор TFIIIB, необходимый для транскрипции Pol III, состоит из трех белков (BDP1, TBP и BRF1 или BRF2). Состав этого фактора у человека и дрозофилы несколько отличается. У человека в состав TFIIIB, участвующего в транскрипции генов с внутренними промоторами (типы I и II), входит BRF2, а BRF1 присутствует на промоторах типа III [20, 21]. У дрозофилы один и тот же белок Brf1 входит в TFIIIB на промоторах всех трех типов. Мы оценили влияние нокдауна Sgf11 на привлечение Brf1 на все типы промоторов Pol III-зависимых генов дрозофилы. Влияние Sgf11 на привлечение Brf1 оказалось значительным только на промоторах типа III, включающих TATA-box и последовательность PSE. Мы предположили, что DUB-модуль необходим для привлечения на последовательность PSE PBP-комплекса, который отвечает за привлечение TFIIIB на промоторы генов мяРНК. Для проверки этой гипотезы мы исследовали как привлекается Pbp45, компонент PBP-комплекса, на PSE при нокдауне деубиквитиназы DUB-модуля Nonstop. При нокдауне Nonstop количество Pbp45 на промоторах типа III уменьшалось более чем в 2 раза. Мы предполагаем, что столь значительное влияние на привлечение PBP связано с убиквитинированием нуклеосомы, находящейся между PSE и DSE, выполняющим энхансерную функцию. Эта нуклеосома физически сближает PSE и DSE и дает возможность стабилизировать привлечение PBP-комплекса, необходимого для привлечения TFIIIB [25–28]. Ранее мы показали, что DUB-модуль участвует в активации транскрипции Pol III-зависимых генов типа III [18]. В совокупности полученные данные указывают на то, что основным комплексом, осуществляющим деубиквитинирование в этом процессе, может быть DUB-модуль комплекса SAGA.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБГ РАН. Авторы благодарны Зиганшину Р.Х. за проведение MALDI-TOF MS-анализа, выполненного на оборудовании Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-04-00514 А, Д.К., Е.Н., А.Г) и Российского научного фонда (№ 20-14-00269, Ю.Н., Ю.В.).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spedale G., Timmers H., Pijnappel W. (2012) ATAC-king the complexity of SAGA during evolution. *Genes Dev*. **26**, 527–541.
2. Lee K.K., Sardiu M.E., Swanson S.K., Gilmore J.M., Torok M., Grant P.A., Florens L., Workman J.L., Washburn M.P. (2011) Combinatorial depletion analysis to assemble the network architecture of the SAGA and ADA chromatin remodeling complexes. *Mol. Systems Biol*. **7**, 503.
3. Helmlinger D., Marguerat S., Villén J., Swaney D.L., Gygi S.P., Bähler J., Winston F. (2011) Tra1 has specific regulatory roles, rather than global functions, within the SAGA co-activator complex. *EMBO J*. **30**, 2843–2852.
4. Nagy Z., Tora L. (2007) Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene*. **26**, 5341–5357.
5. Hong L., Schroth G.P., Matthews H.R., Yau P., Bradbury E.M. (1993) Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 'tail' to DNA. *J. Biol. Chem*. **268**, 305–314.
6. Kouzarides T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*. **128**, 693–705.
7. Henry K.W., Wyce A., Lo W.-S., Duggan L.J., Emre N.C.T., Kao C.-F., Pillus L., Shilatifard A., Osley M.A., Berger S.L. (2003) Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev*. **17**, 2648–2663.
8. Köhler A., Pascual-García P., Llopis A., Zapater M., Posas F., Hurt E., Rodríguez-Navarro S. (2006) The mRNA export factor Sus1 is involved in Spt/Ada/Gcn5 acetyltransferase-mediated H2B deubiquitinylation through its interaction with Ubp8 and Sgf11. *Mol. Biol. Cell*. **17**, 4228–4236.
9. Zhang X.-Y., Varthi M., Sykes S.M., Phillips C., Warzecha C., Zhu W., Wyce A., Thorne A.W., Berger S.L., McMahon S.B. (2008) The putative cancer stem cell marker USP22 is a subunit of the human SAGA complex required for activated transcription and cell-cycle progression. *Mol. Cell*. **29**, 102–111.
10. Lang G., Bonnet J., Umlauf D., Karmodiya K., Koffler J., Stierle M., Devys D., Tora L. (2011) The tightly controlled deubiquitination activity of the human SAGA complex differentially modifies distinct gene regulatory elements. *Mol. Cell. Biol*. **31**, 3734–3744.
11. Zhao Y., Lang G., Ito S., Bonnet J., Metzger E., Sawatsubashi S., Suzuki E., Le Guezennec X., Stunnenberg H.G., Krasnov A., Georgieva S.G., Schule R., Takeyama K.-I., Kato S., Tora L., Devys D. (2008) A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol. Cell*. **29**, 92–101.

12. Kohler A., Zimmerman E., Schneider M., Hurt E., Zheng N. (2010) Structural basis for assembly and activation of the heterotetrameric SAGA histone H2B deubiquitinase module. *Cell*. **141**, 606–617.

13. Samara N.L., Datta A.B., Berndsen C.E., Zhang X., Yao T., Cohen R.E., Wolberger C. (2010) Structural insights into the assembly and function of the SAGA deubiquitinating module. *Science* (N.Y.). **328**, 1025–1029.

14. Han Y., Luo J., Ranish J., Hahn S. (2014) Architecture of the Saccharomyces cerevisiae SAGA transcription coactivator complex. *EMBO J*. **33**, 2534–2546.

15. Lee K.K., Swanson S.K., Florens L., Washburn M.P., Workman J.L. (2009) Yeast Sgf73/ataxin-7 serves to anchor the deubiquitination module into both SAGA and Slik(SALSA) HAT complexes. *Epigenet. Chromatin*. **2**, 2.

16. Morgan M.T., Haj-Yahya M., Ringel A.E., Bandi P., Brik A., Wolberger C. (2016) Structural basis for histone H2B deubiquitination by the SAGA DUB module. *Science* (N.Y.). **351**, 725–728.

17. Gurskiy D., Orlova A., Vorobyeva N., Nabirochkina E., Krasnov A., Shidlovskii Y., Georgieva S., Kopytova D. (2012) The DUBm subunit Sgf11 is required for mRNA export and interacts with Cbp80 in *Drosophila*. *Nucl. Acids Res*. **40**, 86–96.

18. Popova V.V., Orlova A.V., Kurshakova M.M., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Kopytova D.V. (2018) The role of SAGA coactivator complex in snRNA transcription. *Cell Cycle*. **17**, 1859–1870.

19. Hung K.-H., Stumph W.E. (2011) Regulation of snRNA gene expression by the *Drosophila melanogaster* small nuclear RNA activating protein complex (DmSNAPc). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. **46**, 11–26.

20. Schramm L., Hernandez N. (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev*. **16**, 2593–2620.

21. Schramm L., Pendergrast P.S., Sun Y., Hernandez N. (2000) Different human TFIIIB activities direct RNA polymerase III transcription from TATA-containing and TATA-less promoters. *Genes Dev*. **14**, 2650–2663.

22. Leśniewska E., Boguta M. (2017) Novel layers of RNA polymerase III control affecting tRNA gene transcription in eukaryotes. *Open Biol*. **7**, 2.

23. Jawdekar G.W., Henry R.W. (2008) Transcriptional regulation of human small nuclear RNA genes. *Biochim. Biophys. Acta*. **1779**, 295–305.

24. Janson L., Weller P., Pettersson U. (1989) Nuclear factor I can functionally replace transcription factor Sp1 in a U2 small nuclear RNA gene enhancer. *J. Mol. Biol*. **205**, 387–396.

25. Boyd D.C., Greger I.H., Murphy S. (2000) *In vivo* footprinting studies suggest a role for chromatin in transcription of the human *7SK* gene. *Gene*. **247**, 33–44.

26. Boyd D.C., Pombo A., Murphy S. (2003) Interaction of proteins with promoter elements of the human U2 snRNA genes *in vivo*. *Gene*. **315**, 103–112.

27. Stünkel W., Kober I., Seifart K.H. (1997) A nucleosome positioned in the distal promoter region activates transcription of the human *U6* gene. *Mol. Cell. Biol*. **17**, 4397–4405.

28. Zhao X., Pendergrast P.S., Hernandez N. (2001) A positioned nucleosome on the human U6 promoter allows recruitment of SNAPc by the Oct-1 POU domain. *Mol. Cell*. **7**, 539–549.

29. Kenneth N.S., Ramsbottom B.A., Gomez-Roman N., Marshall L., Cole P.A., White R.J. (2007) TRRAP and GCN5 are used by c-Myc to activate RNA polymerase III transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 14917–14922.

30. Georgieva S., Nabirochkina E., Dilworth F.J., Eickhoff H., Becker P., Tora L., Georgiev P., Soldatov A. (2001) The novel transcription factor e(y)2 interacts with TAF(II)40 and potentiates transcription activation on chromatin templates. *Mol. Cell. Biol*. **21**, 5223–5231.

31. Kurshakova M.M., Krasnov A.N., Kopytova D.V., Shidlovskii Y.V., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Spehner D., Schultz P., Tora L., Georgieva S.G. (2007) SAGA and a novel *Drosophila* export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC. *EMBO J*. **26**, 4956–4965.

32. Boehm A.K., Saunders A., Werner J., Lis J.T. (2003) Transcription factor and polymerase recruitment, modification, and movement on dhsp70 in vivo in the minutes following heat shock. *Mol. Cell Biol*. **23**, 7628–7637.

33. Vorobyeva N.E., Soshnikova N.V., Nikolenko J.V., Kuzmina J.L., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. (2009) Transcription coactivator SAYP combines chromatin remodeler Brahma and transcription initiation factor TFIID into a single supercomplex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 11049–11054.

34. Clemens J.C., Worby C.A., Simonson-Leff. N., Muda M., Maehama T., Hemmings B.A., Dixon J.E. (2000) Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 6499–6503.

35. Li X., Seidel C.W., Szerszen L.T., Lange J.J., Workman J.L., Abmayr S.M. (2017) Enzymatic modules of the SAGA chromatin-modifying complex play distinct roles in *Drosophila* gene expression and development. *Genes Dev*. **31**, 1588–1600.

36. Kopytova D.V., Orlova A.V., Krasnov A.N., Gurskiy D.Y., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Shidlovskii Y.V., Georgieva S.G. (2010) Multifunctional factor ENY2 is associated with the THO complex and promotes its recruitment onto nascent mRNA. *Genes Dev*. **24**, 86–96.

37. Park J.-L., Lee Y.-S., Kunkeaw N., Kim S.-Y., Kim I.-H., Lee Y.S. (2017) Epigenetic regulation of noncoding RNA transcription by mammalian RNA polymerase III. *Epigenomics*. **9**, 171–187.

THE SAGA DEUBIQUITINILATION (DUB) MODULE PARTICIPATES IN POL III-DEPENDENT TRANSCRIPTION

Yu. V. Nikolenko[1], Yu. A. Vdovina[1], E. I. Fefelova[1], A. A. Glukhova[1], E. N. Nabirochkina[1], and D. V. Kopytova[1, *]

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

**e-mail: d_dmitrieva@mail.ru*

SAGA, the multicomponent complex responsible for acetylation of N-terminal histone lysine residues, is involved in the transcription activation of a wide range of eukaryotic genes. SAGA contains a protein module DUB, which is responsible for histone deubiquitinilation. In this paper we show that DUB module may be found within a cell independently of SAGA. In absence of SAGA, DUB module may be recruited to the promoters of Pol III-transcribed genes, but not to the Pol II-dependent promoters. DUB module is required to recruit transcription factor Brf1, a subunit of Pol III-recruiting TFIIIB complex, to the promoters of Pol III-dependent genes. DUB-module interacts with Pol III *in vivo*. DUB-module is essential for bringing to the promoters of Pol III-dependent genes both TFIIIB complexes and PBP complexes.

Keywords: DUB-module, SAGA complex, transcription, RNA-polymerase III

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 3, с. 510–518

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 576.32/.36:612.014

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ СИГНАЛЬНЫМИ ПУТЯМИ ГЛУТАМАТНЫХ И ЛЕПТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

© 2021 г. А. Л. Проскура[a], *, М. Ю. Исламова[a], С. О. Вечкапова[a]

[a] *Федеральный исследовательский центр информационных и вычислительных технологий, Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия*

**e-mail: annleop@mail.ru*

Поступила в редакцию 27.07.2020 г.
После доработки 05.09.2020 г.
Принята к публикации 10.09.2020 г.

Гормон лептин, который продуцируется адипоцитами – клетками белой жировой ткани, проникает через гематоэнцефалический барьер, а его рецепторы представлены в отделах мозга, участвующих в реализации высших когнитивных функций. Лептин влияет на рециркуляцию глутаматных рецепторов (на синапсах CA3 → CA1), что сопровождается повышением уровня фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфатов, контролируемого фосфоинозитид-3-киназой. Считается, что в этом задействован участок сигнального пути другого гормона, инсулина. Однако эффекты этих гормонов различаются как на клеточном, так и на поведенческом уровне, а зачастую и противоположны. Нами проведен анализ доменной организации синаптических белков нейронов поля CA1. Предложен молекулярный механизм реализации эффектов лептина в гиппокампе через пересечение регуляторных путей его рецепторов и глутаматных рецепторов типа NMDA. Нерецепторные тирозиновые протеинкиназы подсемейства Src, в частности Fyn, входят в макрокомплексы глутаматных рецепторов и вовлечены в регуляшию эффективности синаптической передачи. Киназа Fyn, как мы предполагаем, через свой SH2-домен может взаимодействовать прямо или через другие белки с рецепторами лептина и таким образом способствовать реализации его эффектов через сигнальный путь фосфоинозитид-3-киназы. Наша гипотеза объясняет наблюдаемые в экспериментах процессы и позволяет, по крайней мере отчасти, пролить свет на тонкую настройку гормональной модуляции синаптических процессов в гиппокампе.

Ключевые слова: возбуждающие синапсы, гиппокамп, лептин, дендритный шипик, глутаматные рецепторы

DOI: 10.31857/S0026898421030150

ВВЕДЕНИЕ

Ионотропные глутаматные рецепторы (рецепторы N-метил-*D*-аспартата, NMDA, и α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты, AMPA) – ключевые компоненты возбуждающих синапсов в мозге. Они формируют макрокомплексы, которые обеспечивают регуляцию белок-белковых сетей в протеоме постсинаптической части синапсов (дендритные шипики) пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа. В настоящее время установлено, что синапс CA3 → → CA1 (коллатерали шафера поля CA3 → пирамидные нейроны поля CA1) способен воспринимать широкий спектр сигналов помимо классических нейротрансмиттеров. На постсинаптической части синапсов гиппокампа располагается множество рецепторов различной природы, в том числе и ряда гормонов. Протеом дендритных шипиков гиппокампа представляет собой мультифункциональную и многоуровневую систему контроля глутаматергической нейротрансмиссии [1]. Это объясняет вовлеченность гиппокампа в реализацию как высших когнитивных функций, так и в модуляцию широкого спектра физиологических процессов в организме [2].

Сокращения: NMDA – N-метил-*D*-аспартат; AMPA – α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота; NMDAR – рецептор NMDA; AMPAR – рецептор AMPA; ДВП – долговременная потенциация; GluR1-, GluR2/3 – субъединицы AMPAR; ДВП – долговременная потенциация; IRS – субстрат рецептора инсулина (Insulin receptor substrate); PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; PKB – протеинкиназа B; PKC – протеинкиназа C; PI5K – фосфоинозитид-5-киназа; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; p85 и p110 – регуляторная и каталитическая субъединицы PI3K соответственно; Fyn – нерецепторная тирозиновая протеинкиназа Fyn подсемейства Src; SH3 и SH2 – домены Src-like homology 3 и 2 соответственно; PI4P – фосфатидилинозитол-4-фосфат; PI(3,4,5)P3 – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат; PI(4,5)P2 – фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат; Jak2 – Янус-киназа 2; CK2 – казеинкиназа 2; SHP2 –тирозинфосфатаза с доменом SH2; STAT3 и STAT5 – преобразователи сигнала и активаторы транскрипции 3 и 5 соответственно.

Гормон лептин (OB, или LEP, кодируется геном *LEP* у человека и *Lep* у мыши) – белок 16 кДа, который продуцируется адипоцитами белой жировой ткани и вызывает различные биологические эффекты. Лептин проникает через гемато-энцефалический барьер и, действуя через свои рецепторы в гипоталамусе, участвует в регуляции энергетического обмена организма и массы тела. Очевидно, что центральная активность лептина распространяется и на другие области мозга. Считается, что этот гормон оказывает прокогнитивное и антидепрессивное действие на центральную нервную систему. Лептин влияет на регуляцию синаптической пластичности, синаптогенез и взрослый нейрогенез, а резистентность к нему сопровождается нарушением зависимого от гиппокампа поведения и депрессивно-подобным состоянием. Прямая инъекция лептина в головной мозг мышей усиливает долговременную потенциацию (ДВП) и способствует формированию у них пространственной памяти [3–6].

Считается, что лептин может действовать через некоторые компоненты сигнального каскада инсулина, в частности, через сигнальный каскад белка IRS (субстрат рецептора инсулина (Insulin receptor substrate)): IRS/фосфоинозитид-3-киназа/протеинкиназа B (IRS/PI3K/PKB) [7–9]. Однако это предположение не представляется достаточно экспериментально обоснованным, по крайней мере для возбуждающих синапсов гиппокампа, и требует дополнительных исследований.

Цель нашей работы состояла в том, чтобы выяснить возможный молекулярный механизм реализации модулирующих эффектов лептина на изменение и поддержание эффективности синаптической передачи в поле CA1 гиппокампа после индукции ДВП, зависимой от NMDAR. Чтобы уточнить механизмы, с помощью которых лептин может способствовать накоплению фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфатов (PIP3), нами проведен поиск вероятного белка, обеспечивающего ассоциацию между рецептором лептина и сигнальным путем PI3K в интерактоме синаптических белков, представленных в базе GeneNet. Анализ опубликованных данных позволил провести реконструкцию перекрестных белок-белковых взаимодействий между сигнальными путями рецепторов глутамата и лептина.

ВТОРИЧНЫЕ ПОСРЕДНИКИ В РЕГУЛЯТОРНЫХ СЕТЯХ СИНАПСОВ ГИППОКАМПА

ДВП – общепринятая клеточная модель синаптической пластичности *in vitro*, проявляется усилением синаптической эффективности на протяжении длительного времени. Считается, что ДВП отражает процессы, протекающие в мозге при обучении и запоминании [10]. В базе данных GeneNet (РОСПАТЕНТ № 990006 от 15/02/1999) [11, 12] представлена информация об основных белках, участвующих в процессах изменения и поддержания эффективности синаптической передачи при ДВП в поле CA1 гиппокампа, на основании которой реконструированы диаграммы синаптических процессов во взрослом гиппокампе (http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/genenet/viewer) [13–15].

Вторичные посредники появляются в ответ на внеклеточные сигнальные агенты, например гормоны. Фосфоинозитиды (PI) выполняют в клетке не структурную, а регуляторную функцию. Примерно 5% PI фосфорилируется только в положении 4 (фосфатидилинозитол-4-фосфат (PI(4)P)) и в положениях 4 и 5 (фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PI(4,5)P2, или PIP2)) и менее 0.25% – в положении 3 (фосфатидилинозитол-3-фосфат (PI(3)P); фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PI(3,4,5)P3, или PIP3)) [16].

Генерация пула вторичных посредников на плазматической мембране – это ключевое событие после индукции ДВП на возбуждающих синапсах гиппокампа, которое контролируется PI-специфичными киназами и фосфатазами: переход PI(4)P → PI(4,5)P2 контролирует фосфоинозитид-5-киназа (PI5K), которая активируется после индукции ДВП [17–19]; PI(4,5)P2 → → PI(3,4,5)P3 – PI3K. PIP2 запускает процесс клатринзависимого эндоцитоза, перемещение везикул, а PIP3 инициирует локальный синтез белка, а также перестройку цитоскелета [13, 14, 19–23].

Показано, что лептин способствует накоплению PIP3, что сопряжено с активацией NMDAR. При этом блокаторы PIP3K класса I, в отличие от блокаторов MAPK-киназ, приводили к ингибированию этих эффектов лептина [5, 8]. Предынкубация с лептином способствует увеличению плотности AMPAR, в состав которых входит субъединица GluR1 [24]. После индукции ДВП эти рецепторы замещают конститутивно присутствующие на синапсах AMPAR, содержащие субъединицы GluR2/GluR3 (GluR2/3-AMPAR), которые определяют базовую нейротрансмиссию, а также индукцию ДВП [20]. При этом происходит дезактивация конститутивно активного антагониста PI3K – фосфатазы PTEN (the phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) [24], которая обеспечивает низкий уровень PIP3 [25]. Дезактивация PTEN обусловлена кооперативным фосфорилированием ее цитоплазматического домена по Ser370, Ser385 казеинкиназой 2 (CK2) и Thr366 киназой гликогенсинтазы 3β (GSK3β, Glycogen synthase kinase 3β) [26].

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ РЕЦЕПТОРА ЛЕПТИНА

Рецептор лептина (продукт гена *LEPR* человека и *Lepr* мыши) относится к рецепторам цитокинов класса I. Рецептор лептина не обладает собственной тирозинкиназной активностью в отличие от рецептора инсулина. После взаимодействия с лептином его рецептор связывается с Янус-киназой (Jak2, Janus kinases) и димеризуется. Далее Jak2 фосфорилирует остатки тирозина, расположенные на цитоплазматических участках рецептора лептина – Tyr985, Tyr1077 и Tyr1138, которые далее служат площадками для закрепления определенных белков – SHP2 (SH2 (Src-like homology 2) domain-containing protein tyrosine phosphatase), STAT5 и STAT3 – преобразователей сигнала и активаторов транскрипции 5 и 3 (signal transducer and activator of transcription 5 and 3) соответственно. Взаимодействие с белками обеспечивают SH2-домены, которые закрепляются на фосфорилированных остатках тирозина. Белки STAT фосфорилируются Jak2, после чего отсоединяются от рецептора лептина, димеризуются и транслоцируются в ядро, где обеспечивают активацию транскрипции, в частности, ранних генов. Jak2 фосфорилирует также определенный остаток тирозина в SHP2, что обеспечивает закрепление адаптерного белка Grb2 (growth factor receptor binding-2), который инициирует передачу сигнала от рецептора лептина в ядро через сигнальный каскад: рецептор лептина → SHP2 → Grb2 → → Ras/Raf/MAPK [9] (рис. 1).

Белок IRS хорошо представлен на постсинаптических мембранах гиппокампа, где он фосфорилируется активным рецептором инсулина и участвует в реализации его эффектов [27]. Предполагается, что IRS вовлечен в активацию PI3K в сигнальном пути рецептора лептина [9]. Взаимодействие регуляторной субъединицы p85 с каталитической субъединицей p110 приводит к активации PI3K [28]. Это может происходить после закрепления p85 через собственный SH2-домен на определенных цитоплазматических участках мембранных рецепторов с фосфорилированным остатком тирозина на коротких мотивах – pYXXM [29].

Действительно, большинство эффектов инсулина связано с активацией PI3K, что позволяет считать это точкой пересечения сигнальных путей инсулина и лептина. Так, например, показано, что в гипоталамусе, а также в жировой ткани, поджелудочной железе и печени лептин индуцирует сигнальный путь, включающий PI3K. Кроме того, косвенные доказательства участия каскада IRS / PI3K в реализации эффектов лептина получены на мышах с нуль-мутацией IRS2 с гиперфагией и гипометаболическим состоянием, что также сопровождается ожирением и гиперлептинемией, но не столь выраженными, как у животных db/db (см. обзор [9]). Однако мы задали вопрос: могут ли существовать другие точки пересечения сигнальных путей лептина и сети контроля глутаматергической нейротрансмиссии в протеоме дендритных шипиков? С этой целью проанализирована доменная организация представленных в базе данных GeneNet синаптических белков, гипотетически способных обеспечивать запускаемое лептином накопление PIP3 и увеличение плотности синаптических GluR1-AMPAR.

ТОЧКИ ПЕРЕСЕЧЕНИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ ГЛУТАМАТНЫХ И ЛЕПТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Нами предложена гипотеза, согласно которой в синаптическом интерактоме после зависимой от NMDAR индукции ДВП и в присутствии лептина (в эксперименте – предынкубация с лептином до индукции ДВП) фосфорилированный остаток тирозина, локализованный в цитоплазматическом участке рецептора лептина, взаимодействует с SH2-доменом/ми белка, который через свой SH3-домен способен закрепить на рецепторе лептина регуляторную субъединицу p85 PI3K.

Домен белка представляет собой достаточно стабильную и независимую субструктуру, сворачивание которой происходит независимо от других частей молекулы и опосредует специфические функции, определяя место белка в сигнальных каскадах. Структурно сходные домены обнаружены не только в родственных белках, но и в белках, выполняющих совершенно разные функции [29].

Домены SH2 и SH3 (Src homology) опосредуют белок-белковые взаимодействия в путях сигнальной трансдукции. Домены SH2 закрепляются на коротких мотивах – YXXM, в которых первый остаток тирозина (Tyr = Y) должен быть фосфорилирован (pYXXM). Взаимодействие pYXXM-SH2 запускает передачу сигнала от рецептора внутрь клетки. Домены SH3 взаимодействуют с участками, обогащенными остатками пролина (Prolin rich domain, PRD), и опосредуют пространственную стыковку в макрокомплексах белков [29].

Согласно данным базы Swiss-Prot (https://www.uniprot.org/) (P26450 (P85A_MOUSE)) содержит два SH2- и один SH3-домен, а также участок, богатый пролином (84-PPTPKPRPP-92). SH2-домены регуляторной субъединицы p85 закрепляются на каноническом YXXM мотиве, который представлен в молекуле рецептора инсулина: 1351-YTHM-1354 (P15208 (INSR_MOUSE)). IRS обладает множеством таких участков: 9 мотивов у IRS1 (P35569 (IRS1_MOUSE)): 460-YICM-463; 546-YTEM-549; 608-YMPM-611; 628-YMPM-631; 658-YMMM-661; 727-YMNM-730; 935-YMNM-938; 983-YMTM-986; 1006-YADM-1009; в молекуле IRS2

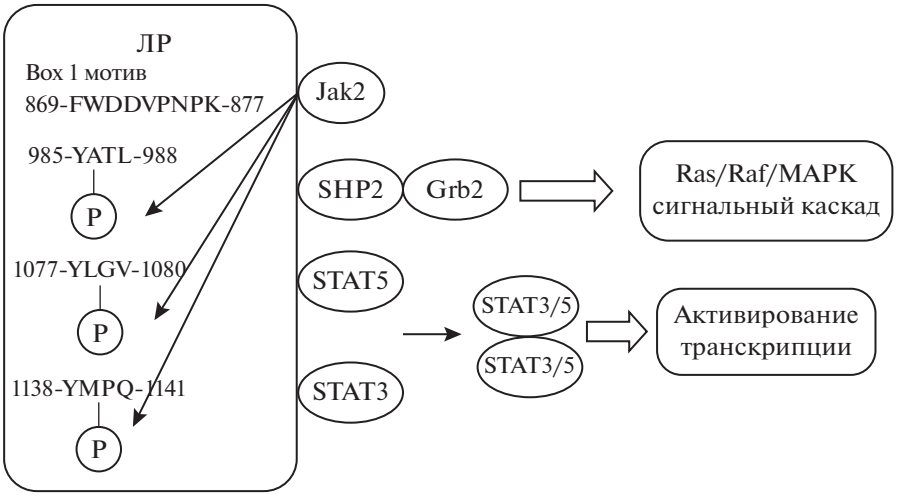


Рис. 1. Схема сигнальных путей рецептора лептина. ЛР – рецептор лептина; Jak2 – Янус-киназа 2; STAT3 и STAT5 – преобразователи сигнала и активаторы транскрипции 3 и 5 соответственно; SHP2 –тирозинфосфатаза с доменом SH2; Grb2 – белок 2, связывающий рецептор фактора роста (growth factor receptor binding-2); Ras – малая GTPаза Ras; Raf – серин-треониновая протеинкиназа Raf; MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы. Ⓟ остаток фосфорной кислоты, присоединяемый протеинкиназой Jak2 к определенным остаткам тирозина в молекуле рецептора лептина.

(P81122 (IRS2_MOUSE)) семь классических мотивов связывания с доменами SH2: 536-YGYM-539; 594-YTLM-597; 649-YMPM-652; 671-YMPM-674; 734-YMRM-737; 814-YVLM-817; 1061-YTEM-1064.

Рецептор лептина не содержит классических мотивов YXXM, на которых может закрепиться регуляторная субъединица p85. Однако показано его взаимодействие с SH2-доменами некоторых белков через остатки тирозина, фосфорилируемые Jak2 (рис. 1).

Ряд синаптических белков, депонированных в базу данных GeneNet, имеют домены обоих типов – SH2 и SH3. Особый интерес представляют нерецепторные тирозиновые протеинкиназы подсемейства Src – Abl, Src, Fyn, Lyn, Yes. Протеинкиназы этого класса вовлечены в различные пути регуляции синаптической пластичности [30]. Fyn экспрессируется в зрелых синапсах и отсутствует в раннем развитии. Показано, что мутации Fyn ослабляют синаптическую передачу у взрослых мышей и нарушают пространственное зависимое от гиппокампа обучение, хотя мутации других нерецепторных тирозинкиназ (Src, Yes и Abl) не приводят ни к нарушению индукции ДВП, ни к проблемам в ее поддержании [31]. Более того, Fyn совместно с рецептором лептина включена в макрокомплексы NMDAR, в состав которых входит субъединица NR2B [32, 33]. Fyn закрепляется на белках постсинаптического уплотнения и прямо участвует в процессах пальмитоилирования и регуляции закрепления AMPAR на синапсах [34].

Все это позволяет нам сосредоточиться на изучении вероятности взаимодействия SH2-домена Fyn с неклассическими мотивами в цитоплазматическом участке рецептора лептина, несущими остатки тирозина, которые фосфорилируются Jak2. С этой целью мы решили оценить уровень сходства аминокислотных последовательностей SH2-доменов Fyn и белков, взаимодействие которых с фосфорилированными остатками тирозина (pY) в цитоплазматическом участке рецептора лептина показано достоверно. К таким белкам относятся SHP2, STAT3, STAT5, а также белок Grb2. Grb2 служит посредником между SHP2 и сигнальным каскадом MAPK. Имеются данные, что индуцируемое лептином накопление PIP3 блокируется ингибиторами PI3K и не чувствительно к ингибиторам MAPK-киназного пути [6, 7]. Кроме того, в выборку включили Jak2, цитоплазматический домен которой содержит неканонический SH2-мотив.

В работе использовали алгоритм Смита–Уотермана (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/). Аминокислотные последовательности белков получены из базы данных Swiss-Prot.

Согласно данным Swiss-Prot сформирована выборка доменов SH2:

Mouse FYN (P39688 (FYN_MOUSE)) 149–246 SH2

WYFGKLGRKDAERQLLSFGNPRGTFLIRESETTKGAYSLSIRDWDDMKGDHVKHYKIRKLDNGGYYITTRAQFETLQQLVQHYSERAAGLCCRLVVPC

mouse STAT3 (P42227 (STAT3_MOUSE)) 580–670 SH2

WNEGYIMGFISKERERAILSTKPPGTFLLRFSESSKEGGVTFTWVEKDISGKTQIQSVEPYTKQQLNNMSFAEI-IMGYKIMDATNILVSPL

Mouse STA5 (P42230 (STA5A_MOUSE)) 589–686 SH2

WNDGAILGFVNKQQAHDLLINKPDGTFLLRFSDSEIGGITIAWKFDSPDRNLWNLKPFTTRDFSIRSLADRL-GDLNYLIYVFPDRPKDEVFAKYYTPV

Mouse Jak2 (Q62120 (JAK2_MOUSE)) 401–482 SH2; atypical

HGPISMDFAISKLKKAGNQTGLYVLRCSPKDFNKYFLTFAVERENVIEYKHCLITKNENGEYNLSGTKRNFSN-LKDLLNCYQ

Mouse SHP2 (P35235 (PTN11_MOUSE)) 6–102 SH2 (6–102)

WFHPNITGVEAENLLLTRGVDGSFLARPSKSNPGDFTLSVRRNGAVTHIKIQNTGDYYDLYGGEKFATLAELV-QYYMEHHGQLKEKNGDVIELKYPL

Mouse SHP2 (P35235 (PTN11_MOUSE)) 112–216 SH2 (112–216)

WFHGHLSGKEAEKLLTEKGKHGSFLVRESQSHPGDFVLSVRTGDDKGESNDGKSKVTHVMIRCQELKYDVG-GGERFDSLTDLVEHYKKNPMVETLGTVLQLKQPL

Mouse GRB2 (Q60631 (GRB2_MOUSE)) 60–152 SH2

WFFGKIPRAKAEEMLSKQRHDGAFLIRESESAPGDFSLSVKFGNDVQHFKVLRDGAGKYFLWVVKFNSLNEL-VDYHRSTSVSRNQQIFLRDIE

Для количественного определения сходства двух биологических последовательностей используется парное выравнивание. Показателем сходства служит параметр score, или счет выравнивания. Чем больше позиций, содержащих одинаковые или похожие остатки, и чем меньше позиций, содержащих разные остатки или разрывы, тем выше будет значение этого параметра. Таким образом, его можно считать мерой сходства последовательностей.

Проведенное нами парное выравнивание выявило высокую меру сходства, а также значительный процент идентичных и сходных по аминокислотному составу участков в последовательностях Fyn и Grb2. Домены SHP2 также показали высокий уровень сходства (табл. 1).

Таким образом, мы можем предположить, что Fyn с определенной долей вероятности может конкурировать за взаимодействие с pY-985 либо непосредственно, либо пристыковываясь к pY-SHP2. Как уже упоминалось ранее, зависимое от лептина накопление PIP3 не чувствительно к блокаторам MAPK-киназ [6, 7].

Сравнили также меры сходства SH2-доменов у некоторых представителей подсемейства нерецепторных тирозинкиназ Src (Src, Yes и Abl) (согласно [31]) (табл. 2).

Высокая мера сходства с SH2-доменами Grb2 и SHP2 выявлена и у других представителей подсемейства Src. Однако с учетом данных [31] мы предполагаем, что именно Fyn может рассматриваться как точка пересечения сигнальных путей лептина и NMDAR в зрелых синапсах. Данные, представленные в табл. 2, косвенно подтверждают, что лептин может вовлекаться в регуляцию синаптической пластичности через сигнальный путь PI3K на ранних стадиях развития или в течение нейрогенеза.

На основании анализа данных PubMed мы реконструировали белок-белковые взаимодействия между сигнальными путями рецепторов лептина и NMDAR после индукции ДВП для синапсов поля CA1 гиппокампа.

Таблица 1. Результаты парного выравнивания SH2-доменов

Белок, связывающийся с рецептором лептина посредством SH2-домена	Fyn, идентичность/сходство, %	Мера сходства
Stat3	36.1/55.7	64.0
Stat5	24.2/ 47.0	48.5
Jak2	27.4/ 46.4	65.5
SH2 (6–102) SHP2	34.9/54.7	106.5
SH2 (112–216) SHP2	37.9/53.7	135.0
Grb2	**38.6/60.2**	**141.0**

Moult и соавт. показали (на срезах взрослого гиппокампа), что лептин повышает экспрессию синаптических GluR1-AMPAR, что сопровождалось накоплением PIP3, а также инактивацией фосфатазы PTEN за счет ее кооперативного фосфорилирования протеинкиназами CK2 и GSK3b [24].

Негативная регуляция конститутивно активной GSK3β осуществляется преимущественно посредством фосфорилирования Ser9 (pS9), главным образом PKB: рецептор → p85 → p85/p110 → PIP3 → → присоединение и активация PKB → pS9-GSK3β. При этом наблюдается не полное, а скорее конкурентное ингибирование GSK3β. Полная активация GSK3β достигается за счет фосфорилирования Y216 в ее активационной петле, возможно, протеинкиназой Fyn [35]. Стоит также отметить, что GSK3β ингибирует Rab5, которая инициирует процесс сортировки AMPAR в покрытые клатрином везикулы при эндоцитозе [36].

После индукции NMDAR-опосредованной ДВП запускается целый каскад процессов, обеспечивающих повышение эффективности синаптической передачи вследствие увеличения плотности синаптических AMPAR и ее дальнейшее поддержание. Ключевым событием является выведение из синапсов GluR2-AMPAR и введение GluR1-AMPAR, что, в итоге, и формирует новую плотность AMPAR, поддерживаемую далее конститутивным кругооборотом (балансирование процессов эндоцитоза рецепторов ↔ возврата рецепторов на плазматическую мембрану) GluR2-AMPAR [20].

Эти процессы контролируются протеинкиназами и фосфатазами, которые активируются после индукции ДВП. Одна из ключевых протеинкиназ – PKC, фосфорилирует остатки серина в AMPAR – S880 в GluR2-AMPAR, что необходимо для их отсоединения от белков синапса и выведения во внесинаптическую зону, где они будут подвергаться сортировке и поступать в эндосомы для эндоцитоза. GluR1, для их корректной фиксации и активации, также фосфорилируются PKC по остатку S818 [13], а для активации PKC необходима активность NMDAR и диацилглицерина – продукта распада PI(4,5)P2.

На основании анализа опубликованных данных мы предлагаем вероятный молекулярный механизм пересечения сигнальных путей глутаматных и лептиновых рецепторов после индукции NMDAR-опосредованной ДВП:

Лептин/рецептор лептина → Jak2 → pY-SHP2 → → Fyn → Fyn/p85A → p85/p100-PI3K → [PIP2 → → PIP3].

Лептин/рецептор лептина → Jak2 → pY-SHP2 → → Fyn → pY216-GSK3b → pThr366-PTEN.

Таким образом, лептин может запускать сигнальный путь PI3K через протеинкиназу Fyn. Fyn, с одной стороны, может напрямую взаимодействовать с обогащенным остатками пролина участком p85 и запускать сигнальный путь PI3K, с другой, непосредственно активировать GSK3β. GSK3β в кооперации с CK2 ингибирует активность PTEN. Это будет способствовать накоплению PIP3. PIP3 через PKB также может способствовать индукции локального синтеза белка в дендритах – формированию пула белков, готовых к отправке к активным синапсам, в том числе AMPAR.

GSK3β, ингибируя Rab5, способствует также замедлению процесса эндоцитоза, обеспечивая дополнительно повышение плотности рецепторов. GluR1-AMPAR в зоне синаптического контакта фиксируются в том числе с помощью нитей актина [13]. PIP3 способствует активации белка PREX (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 2 protein), который запускает их полимеризацию [37].

Таким образом, эффекты лептина, который вводили до индукции ДВП (предынкубация), будут сводиться к формированию пула новых рецепторов на уровне дендритов. Синапс приходит в состояние, предподготовленное для перехода на новый уровень нейротрансмиссии. Однако PI3K запускает также процесс обратной негативной регуляции через GSK3β (PKB ингибирует GSK3β). Это обеспечивает сбалансированное состояние системы и защищает от излишнего повышения плотности синаптических AMPAR (рис. 2).

Таким образом, в протеоме дендритного шипика гормон лептин будет способствовать перегруппировке синаптических белков с формированием

Таблица 2. Результаты парного выравнивания SH2-доменов Src-киназ и белков сигнального пути лептина

	Мера сходства SH2-доменов					
Белок подсемейства тирозинкиназ Src	Grb2	Stat3	Stat5	Jak2	SHP2 (6–102)	SHP2 (112–216)
Src	151.5	59.0	65.5	52.0	104.5	121.5
Yes	387.0	47	45	77.5	116.5	137
c-Abl	159.0	53.5	51	42.5	146.5	128
Fyn	141.0	64.0	48.5	65.5	106.5	135.0

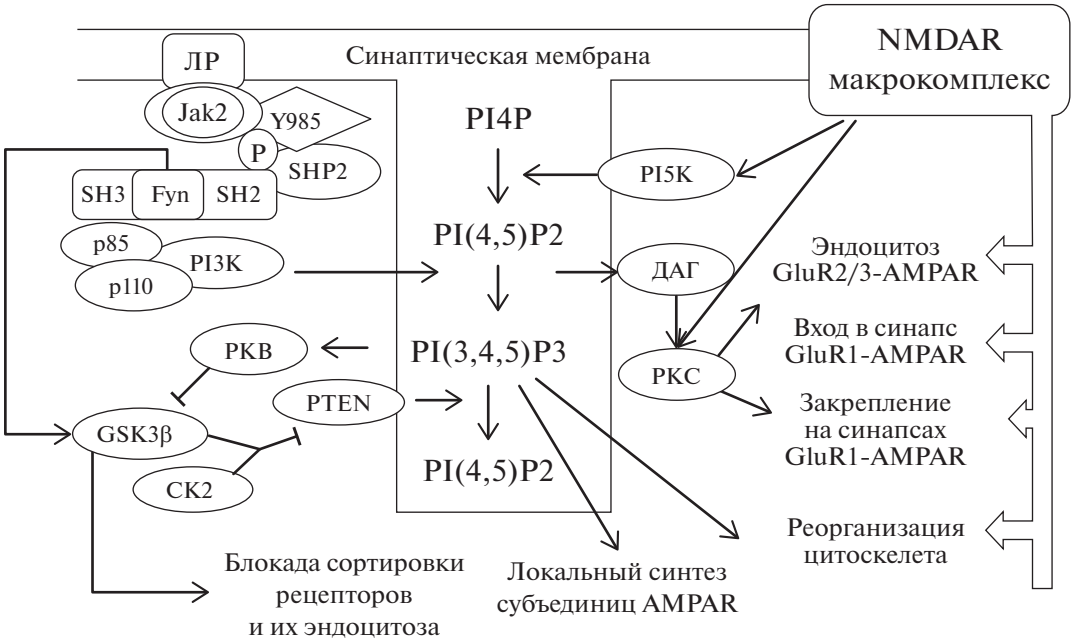


Рис. 2. Схема пересечения сигнальных путей NMDAR и рецепторов лептина. ⊣ – Блокирующее влияние; стрелки – активирующее влияние. ЛР – рецептор лептина; GluR1-, GluR2/3 – субъединицы AMPAR; PI5K – фосфоинозитид-5-киназа; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; p85 и p110 – регуляторная и каталитическая субъединицы PI3K соответственно; pY985 – фосфорилированный Tyr985 в цитоплазматическом участке ЛР; Fyn – нерецепторная тирозиновая протеинкиназа Fyn подсемейства Src; SH3 и SH2 – домены Src-like homology 3 и 2 соответственно; PKB – протеинкиназа B; PI4P – фосфатидилинозитол-4-фосфат; PI(3,4,5)P3 – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат; PI(4,5)P2 – фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат; Jak2 – Янус-киназа 2; CK2 – казеинкиназа 2; SHP2 –тирозинфосфатаза с доменом SH2; PKC – протеинкиназа C; ДАГ – диацилглицерин.

временных комплексов белков, что может лежать в основе пропотенцирующего эффекта этого гормона на ДВП в гиппокампе. Появление комплексов с новыми свойствами может быть общим механизмом гормонального контроля синаптической пластичности.

Предложенная нами гипотеза о вкладе нерецепторной протеинкиназы Fyn в пересечение сигнальных путей глутаматных и лептиновых рецепторов на синапсах CA3 → CA1 гиппокампа объясняет наблюдаемые в экспериментах эффекты лептина после индукции ДВП без привлечения сигнального пути другого гормона, а именно инсулина, – рецептор инсулина/IRS. Непродолжительное воздействие инсулина в эксперименте способствовало развитию депрессии в поле CA1 гиппокампа вследствие эндоцитоза GluR2-AMPAR, что не было связано с активностью ионотропных глутаматных рецепторов, в частности NMDAR [38]. Лептин способствует увеличению плотности AMPAR при ДВП, запускаемой NMDAR, что сопровождалось накоплением PIP3 [24]. Таким образом, полученные нами данные способствуют лучшему пониманию тонкой настройки модуляции синаптических процессов в гиппокампе двумя гормонами с привлечением схожих компонентов их сигнальных каскадов.

В работе использованы материалы, полученные при выполнении базового проекта фундаментальных исследований РАН (VI.35.2.6).

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

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Proskura A.L., Ratushnyak A.S., Vechkapova S.O., Zapara T.A. (2018) Synapse as a multi-component and multi-level information system. *Studies in Computational Intelligence*. **736**, 186–192.
2. Lathe R. (2001) Hormones and the hippocampus. *J. Endocrinol.* **169**(2), 205–231.
3. Oomura Y., Hori N., Shiraishi T., Fukunaga K., Takeda H., Tsuji M., Matsumiya T., Ishibashi M., Aou S., Li X.L., Kohno D., Uramura K., Sougawa H., Yada T., Wayner M.J., Sasaki K. (2006) Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. *Peptides*. **27**, 2738–2749.
4. Van Doorn Y.C., Macht V.A., Grillo C.A., Reagan L.P. (2017) Leptin resistance and hippocampal behavioral deficits. *Physiol. Behav*. **176**, 207–213.

5. McGregor G., Clements L., Farah A., Irving A.J., Harvey J. (2018) Age-dependent regulation of excitatory synaptic transmission at hippocampal temporoammonic-CA1 synapses by leptin. *Neurobiol. Aging*. **69**, 76–93.
6. Harvey J., Solovyova N., Irving A. (2006) Leptin and its role in hippocampal synaptic plasticity. *Prog. Lipid Res*. **45**(5), 369–378.
7. O'Malley D., Irving A.J., Harvey J. (2005) Leptin-induced dynamic alterations in the actin cytoskeleton mediate the activation and synaptic clustering of BK channels. *FASEB J*. **19**(13), 1917–1919.
8. Shanley L.J., O'Malley D., Irving A.J., Ashford M.L., Harvey J. (2002) Leptin inhibits epileptiform-like activity in rat hippocampal neurones via PI 3-kinase-driven activation of BK channels. *J. Physiol*. **545**(Pt 3), 933–944.
9. Frühbeck G. (2006) Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem. J*. **393**, 7–20.
10. Bliss T.V., Collingridge G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. **361**, 31–39.
11. Ananko E.A., Podkolodny N.L., Stepanenko I.L., Podkolodnaya O.A., Rasskazov D.A., Miginsky D.S., Likhoshvai V.A., Ratushny A.V., Podkolodnaya N.N., Kolchanov N.A. (2005) GeneNet in 2005. *Nucl. Acids Res*. **33**, 425–427.
12. Колчанов Н.А., Воевода М.И., Кузнецова Т.Н., Мордвинов В.А., Игнатьева Е.В. (2006) Генные сети липидного метаболизма. *Бюлл. СО РАМН*. **2**, 29–42.
13. Проскура А.Л., Малахин И.А., Турнаев И.И., Суслов В.В., Запара Т.А., Ратушняк А.С. (2013) Межмолекулярные взаимодействия в функциональных системах нейрона. *Вавиловский журн. генетики и селекции*. **17**, 620–628.
14. Proskura A.L., Ratushnyak A.S., Zapara T.A. (2014) The protein-protein interaction networks of dendritic spines in the early phase of long-term potentiation. *J. Comput. Sci. Syst. Biol*. **7**, 40–44.
15. Запара Т.А., Ромащенко А.В., Проскура А.Л., Ратушняк А.С. (2018) Влияние физической активности на структурную асимметрию гиппокампа мыши. *Вавиловский журн. генетики и селекции*. **22** (8), 1084–1089.
16. Rameh L.E., Cantley L.C. (1999) The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem*. **274**(13), 8347–8350.
17. Sakagami H. (2008) The EFA6 family: guanine nucleotide exchange factors for ADP ribosylation factor 6 at neuronal synapses. *Tohoku J. Exp. Med*. **214**(3), 191–198.
18. Sakagami H., Honma T., Sukegawa J., Owada Y., Yanagisawa T., Kondo H. (2007) Somatodendritic localization of EFA6A, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6, and its possible interaction with alpha-actinin in dendritic spines. *Eur. J. Neurosci*. **25**(3), 618–628.
19. Krauss M., Kinuta M., Wenk M.R., De Camilli P., Takei K., Haucke V. (2003) ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. *J. Cell. Biol*. **162**(1), 113–124.
20. Newpher T.M., Ehlers M.D. (2008) Glutamate receptor dynamics in dendritic microdomains. *Neuron*. **58**, 472–497.
21. Traub L.M. (2003) Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection. *J. Cell. Biol*. **163**(2), 203–208.
22. Fernández-Monreal M., Sánchez-Castillo C., Esteban J.A. (2016) APPL1 gates long-term potentiation through its plekstrin homology domain. *J. Cell. Sci*. **129**(14), 2793–2803.
23. Чеснокова Е.А., Колосов П.М. (2016) Локальный синтез белка в дендритных окончаниях и способы его регуляции в норме и при пластических изменениях. *Журн. высшей нервной деятельности*. **66**(2), 163–180.
24. Moult P.R., Cross A., Santos S.D., Carvalho A.L., Lindsay Y., Connolly C.N., Irving A.J., Leslie N.R., Harvey J. (2010) Leptin regulates AMPA receptor trafficking via PTEN inhibition. *J. Neurosci*. **30**, 4088–4101.
25. Maehama T., Dixon J.E. (1998) The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem*. **273**(22), 13375–13378.
26. Al-Khouri A.M., Ma Y., Togo S.H., Williams S., Mustelin T. (2005) Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta. *J. Biol. Chem*. **280**(42), 35195–35202.
27. Abbott M.A., Wells D.G., Fallon J.R. (1999) The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses. *J. Neurosci*. **19**(17), 7300–7308.
28. Yu J., Zhang Y., McIlroy J., Rordorf-Nikolic T., Orr G.A., Backer J.M. (1998) Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol. Cell. Biol*. **18**(3), 1379–1387.
29. Pawson T., Nash P. (2000) Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev*. **14**(9), 1027–1047.
30. Salter M.W. (1998) Src, N-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptors, and synaptic plasticity. *Biochem. Pharmacol*. **56**(7), 789–798.
31. Grant S.G., O'Dell T.J., Karl K.A., Stein P.L., Soriano P., Kandel E.R. (1992) Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in Fyn mutant mice, *Science*. **258**(5090), 1903–1910.
32. Brigidi G.S., Santyr B., Shimell J., Jovellar B., Bamji S.X. (2015) Activity-regulated trafficking of the palmitoyl-acyl transferase DHHC5. *Nat. Commun*. **6,** 8200.
33. Bland T., Zhu M., Dillon C., Sahin G.S., Rodriguez-Llamas J.L., Appleyard S.M., Wayman G.A. (2020) Leptin controls glutamatergic synaptogenesis and NMDA-receptor trafficking via Fyn kinase regulation of NR2B. *Endocrinology*. **161**(2), bqz030.

34. Brigidi G.S., Sun Y., Beccano-Kelly D., Pitman K., Mobasser M., Borgland S.L., Milnerwood A.J., Bamji S.X. (2014) Palmitoylation of δ-catenin by DHHC5 mediates activity-induced synapse plasticity. *Nat. Neurosci.* **17**(4), 522–532.

35. Bhat R.V., Shanley J., Correll M.P., Fieles W.E., Keith R.A., Scott C.W., Lee C.M. (2000) Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**(20), 11074–11079.

36. Wei J., Liu W., Yan Z. (2010) Regulation of AMPA receptor trafficking and function by glycogen synthase kinase 3. *J. Biol. Chem*. **285**(34), 26369–26376.

37. Donald S., Hill K., Lecureuil C., Barnouin R., Krugmann S., John Coadwell W., Andrews S.R., Walker S.A., Hawkins P.T., Stephens L.R., Welch H.C. (2004) P-Rex2, a new guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *FEBS Lett.* **572**, 172–176.

38. Huang C.C., Lee C.C., Hsu K.S. (2004) An investigation into signal transduction mechanisms involved in insulin-induced long-term depression in the CA1 region of the hippocampus. *J. Neurochem*. **89**(1), 217–231.

CROSS-TALK OF GLUTAMATE AND LEPTIN RECEPTORS PATHWAYS

A. L. Proskura[1], *, M. Yu. Islamova[1], and S. O. Vechkapova[1]

[1]*Federal Research Center for Information and Computational Technologies, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: annleop@mail.ru*

After its release by adipocytes, the hormone leptin crosses the blood-brain barrier. Leptin receptors are present in many parts of the brain, and are involved in the higher cognitive functions. In particular, leptin directly influences the glutamate receptors trafficking on CA3 → CA1 synapses. This traffic is controlled by phosphoinositide 3-kinases and is associated with elevation of phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphates levels. It is well recognized that glutamate receptors trafficking involves at least some components of another hormone signaling cascade, one of insulin. However, the effects of the leptin and the insulin hormones differ at cellular and organismal levels, and often oppose each other. Here we analyze the CA1 field neurons synaptic protein domain organization and propose a molecular mechanism underpinning the leptin effects in the hippocampus, which involve the cross-talk of the molecular pathways of leptin receptors and NMDA type glutamate receptors. Non-receptor protein kinases of the Src subfamily, in particular, kinase Fyn, are part of the glutamate receptor macro-complexes and are involved in the regulation of synaptic transmission efficiency. It seems that Fyn may associate with leptin receptors and contribute to its signaling through the phosphoinositide 3-kinases signaling pathway. Our hypothesis explains fine tuning of hippocampal synaptic processes by hormonal modulation.

Keywords: excitatory synapses, hippocampus, leptin, dendrite spine, glutamate receptors

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2021, том 55, № 3, с. 519–528

МЕТОДЫ

УДК 577.112.012

ДИСУЛЬФИДНЫЕ СВЯЗИ В БЕЛКАХ, ДЕТЕКТИРУЕМЫЕ ПРИСОЕДИНЕНИЕМ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МАЛЕИМИДА[1]

© 2021 г. Q.-W. Ding[a, *2], M. Lin[b2]

[a] Beijing Stomatological Hospital and School of Stomatology, Capital Medical University, Beijing, 100050 China

[b] Department of Stomatology, Beijing Chao-Yang Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100020 China

*e-mail: dqwonline@163.com

Поступила в редакцию 13.07.2020 г.
После доработки 12.08.2020 г.
Принята к публикации 14.08.2020 г.

Дисульфидные связи играют важную роль в поддержании структуры и функции белков. Однако для изучения дисульфидных связей требуется дорогое оборудование и высокоочищенные образцы белка, поэтому необходимы более простые методы. Представлена новая методика детекции дисульфидных связей в белках, основанная на мечении восстановленных дисульфидных мостиков высокомолекулярными производными малеимида. После необратимого блокирования свободных тиольных групп в белках новые тиолы, высвобождаемые из дисульфидных мостиков метят высокомолекулярными производными малеимида. Локализацию остатков цистеина, участвующих в образовании дисульфидных связей, определяют с помощью мутагенеза. С целью валидации метода к N-концам аквапорина 5 (AQP5) и белка 4 подсемейства V транзиторных каналов ((TRPV4) присоединяли метку FLAG (DYKDDDDK). На присутствие дисульфидных связей указывало увеличение молекулярной массы белков-мишеней, выявляемое с помощью иммуноблотинга. Не выявлено увеличения молекулярной массы AQP5, тогда как в TPRV4 обнаружены остатки цистеина в положениях 639, 645, 652, 660, 770, образующих дисульфидные мостики, что подтверждено путем мутагенеза. Эти данные свидетельствуют об эффективности предложенного метода детекции дисульфидных связей в молекулах белков.

Ключевые слова: дисульфидные связи, цистеин, AQP5, TRPV4

DOI: 10.31857/S0026898421030046

ВВЕДЕНИЕ

Дисульфидная связь, соединяющая два остатка цистеина, – посттранскрипционная модификация, помогающая поддерживать стабильность структуры белков и их функции [1, 2]. Гибкость дисульфидных связей привлекает повышенное внимание с момента их обнаружения в 1960-х в панкреатической рибонуклеазе крупного рогатого скота [3, 4]. Дисульфидные связи повышают термодинамическую стабильность белков и способствуют их правильному фолдингу. Кроме того, дисульфидные связи сильнее повышают устойчивость белков к тепловой денатурации, чем другие виды взаимодействий [5, 6]. Экспонирование высокореакционных свободных остатков цистеина после расщепления дисульфидных мостиков значительно влияет на функции белка [7, 8]. Неправильно замкнутые дисульфидные связи ведут к нарушению фолдинга и, как следствие, функции белка [9].

Для полного понимания механизмов, лежащих в основе роли дисульфидных связей в структуре и функциях белков, необходимы новые усовершенствованные методы. После определения аминокислотной последовательности с использованием метода деградации по Эрдману или масс-спектрометрии дисульфидные связей можно анализировать с помощью таких традиционных методов, как ядерный магнитный резонанс (ЯМР), кристаллографические методы, различные алгоритмы [10, 11]. Однако необходимость использования специализированного и дорогого оборудования в комбинации с недостаточной чистотой образцов часто не позволяет применять такие подходы в рутинных и фундаментальных клинических исследованиях [12].

Для изучения нестабильных тиольных групп, которые образуются в результате расщепления дисульфидных связей, требуются более эффек-

[1] Статья представлена авторами на английском языке.

[2] Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

тивные методы. Малеимид способен реагировать с тиольными группами с образованием стабильных тиоэфирных связей приблизительно в 1000 раз быстрее, чем амины при нейтральных значениях pH [13]. Эта высокоэффективная реакция широко применяется для конъюгации нагруженных цистеином пептидов и белков [14–16]. Дисульфидная ковалентная связь расщепляется специфически в ходе восстановительного метаболизма путем реакции тиол-дисульфидного обмена, ведущего к регенерации новых тиольных групп [17]. В представленной работе мы сначала блокировали тиольные группы низкомолекулярными производными малеимида с образованием тиоэфирных связей. Затем для восстановления дисульфидных мостиков и регенерации новых тиольных групп использовали Трис(2-карбоксиэтил)фосфин (TCEP) – высокоспецифичный и эффективный восстановитель при более низких значениях pH (<6.0). Регенерированные тиольные группы модифицировали затем метоксиполиэтиленгликольмалеимидом (MeO-PEG-Mal; м.м. 5000). Суммарная молекулярная масса белка при этом увеличивается в результате мечения остатков цистеина, вовлеченных в образование дисульфидных связей, что можно измерить, сравнивая миграцию меченого белка и белка дикого типа. На следующей стадии для подтверждения локализации цистеинов использовали мутагенез остатков Cys, участвующих в формировании дисульфидных связей в белках-мишенях. В качестве модельных белков в настоящем исследовании использовали аквапорин 5 (AQP5) и член 4 подсемейства V транзиторных катионных каналов с рецепторным потенциалом (TRPV4) с N-концевым тагом FLAG. Не обнаружили изменений в миграции белка AQP5, тогда как в случае TRPV4 выявили несколько полос с более высокой молекулярной массой, чем у немеченого белка дикого типа. Появление более высокомолекулярных полос белков TRPV4, по-видимому, обусловлено мечением остатков цистеина в положении 639, 645, 652, 660, 770.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы и антитела. ДНК-полимераза PrimeSTAR HS получена от фирмы"TaKaRa Biotechnology" (КНР). Использовали эндонуклеазы рестрикции DpnI, HindIII и BamHI ("Promega", КНР), липофектамин 2000/3000 и стрептавидин Alexa Fluor® 680 ("Invitrogen", КНР). Колонки для спинового обессоливания (Zeba™ Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 0.5 мл, "ThermoFisher Scientific Inc.", США). Антитела к AQP5 и TRPV4 получены от "Santa Cruz Biotechnology" (США), а антитела к FLAG – от "OriGene Technologies" (США). Метоксиполиэтиленгликольмалеимид (MeO-PEG-Mal, м.м. 750, 2000, 5000) и другие реагенты были фирмы "Sigma" (США).

Клеточные культуры и трансфекция клеток. Клетки линии 293 (HEK293) эмбриональной почки человека культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с 10% (v/v) фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед./мл пенициллина и стрептомицина при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO_2. Для трансфекции клеток HEK293 использовали липофектамин согласно рекомендациям изготовителя.

Конструирование плазмид и мутагенез. Плазмиды с геном *AQP5* человека конструировали согласно [18] (табл. 1). Плазмида с геном *TRPV4* человека (дикий тип) подарена Miguel A. Valverde (табл. 1). Фрагмент FLAG-AQP5 встраивали по сайтам HindIII (верхний) и BamHI (нижний) в pcDNA 4.0 ("Invitrogen") (табл. 1).

Мутагенез остатков цистеина проводили следующим образом: 10 нг плазмидной матрицы амплифицировали с 2 ед. ДНК-полимеразы PrimeSTAR HS в присутствии 250 нМ праймеров (табл. 2). Амплификацию проводили в следующем режиме: 1 цикл при 94°C в течение 5 мин, затем 25 циклов – 94°C, 20 с; 55°C, 20 с, и 72°C, 4 мин (AQP5) или 8 мин (TRPV4). Далее ампликоны инкубировали с 10 ед. DpnI (1 ч, 37°C) для удаления исходной метилированной ДНК, после чего 10 мкл реакционной смеси трансфицировали

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных для клонирования

Праймер	Нуклеотидная последовательность
FLAG-AQP5	5'-CCAAGCTTGGGATGGACTACAAGGACGATGATGACAAGAAGAAGGAGGT-3'
	5'-CGCGGATCCGCGTCAGCGGGTGGT-3'
AQP5-FLAG	5'-CCCAAGCTTGGGATGAAGAAG-3'
	5'-CGCGGATCCGCGTCACTTGTCATCATCGTCCTTGTAGTCGCGGGTGGT-3'
FLAG-TRPV4	5'-CCCAAGCTTGGGATGGACTACAAGGACGATGATGACAAGGCGGATTCCAG-3'
	5'-CGCGGATCCGCGCTAGAGCGGG-3'
TRPV4-FLAG	5'-CCCAAGCTTGGGATGGCGGATT-3'
	5'-CGCGGATCCGCGTCACTTGTCATCATCGTCCTTGTAGTCGAGCGGGGCG-3'

клетки DH5α и высевали на чашки со средой LB с ампициллином. Клоны дикого типа и мутантные клоны проверяли секвенированием.

Иммуноблотинг. Контрольные и обработанные клетки ресуспендировали в лизирующем буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl (pH 7.0), 150 мМ NaCl, 0.1% SDS, 0.5% дезоксихолата натрия, 5 мМ EDTA, 5 мМ EGTA, коктейль ингибиторов протеаз и 20 мг/мл MeO-PEG-Mal (м.м. 750). Суммарные белки лизата денатурировали (70°C, 10 мин) и обрабатывали согласно методике, затем реконструировали в буфере для нанесения в отсутствие восстанавливающего агента. Концентрацию белка определяли, используя метод Брэдфорда. Белки разделяли с помощью электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле (SDS-ПААГ) и переносили на поливинилидендифторидные мембраны (PVDF, “Millipore”, США). Мембраны блокировали 5%-ным обезжиренным молоком, обрабатывали первичными антителами, затем инкубировали со вторыми антителами IRDye680RD/800CW согласно инструкции производителя (LI-COR “Biosciences”, США). Иммунореактивные полосы визуализировали, используя Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR “Biosciences”).

Статистический анализ. В настоящем исследовании применили рандомизированный полноблочный дизайн (RCBD). Результаты анализировали, используя программу SPSS 22.0, и представляли как среднее значение ± стандартная ошибка. Сравнение внутри и между группами проводили, используя однофакторный метод ANOVA или тест Стьюдента. Значения $P < 0.05$ считали статистически значимымит.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение дисульфидных связей в белках-мишенях

Нами предложен подход к определению дисульфидных связей в белках (рис. 1). Свободные тиольные группы сначала блокировали малеими-

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров для мутагенеза остатков цистеина

Праймер	Нуклеотидная последовательность
Cys194Gly-F	5'-GCCATCTACGGGGAAGACCGGCCTGCCCAA-3'
Cys194Gly-R	5'-CGGTCTTCCCCGTAGATGGCTCTCGAAACT-3'
Cys250Gly-F	5'-ACATCGCCATTGAGCGTCGCGGCAAACACTA-3'
Cys250Gly-R	5'-CGCGACGCTCAATGGCGATGTGCAGGGCTG-3'
Cys294Gly-F	5'-GCCCCTGTCGCTGGCTGCCGGCACCAACCA-3'
Cys294Gly-R	5'-CGGCAGCCAGCGACAGGGGCAGCTCCCCAA-3'
Cys353Gly-F	5'-CGACCTGCTGCTGCTCAAGGGTGCCCGCCT-3'
Cys353Gly-R	5'-CCTTGAGCAGCAGCAGGTCGTACATCTTGG-3'
Cys427Gly-F	5'-ACCTCTCCTCCCTGGACACGGGTGGGGAAGA-3'
Cys427Gly-R	5'-CCGTGTCCAGGGAGGAGAGGTCATAAAGCG-3'
Cys480Gly-F	5'-CAACGTGGTCTCCTACCTGGGTGCCATGGT-3'
Cys480Gly-R	5'-CCAGGTAGGAGACCACGTTGATGTAGAAGG-3'
Cys537Gly-F	5'-AGACTTGTTCATGAAGAAAGGCCCTGGAGTG-3'
Cys537Gly-R	5'-CTTTCTTCATGAACAAGTCTTTGATGTTGG-3'
Cys639Gly-F	5'-GGTCTCCCTCCTGAACCCGGGTGCCAACATG-3'
Cys639Gly-R	5'-CCGGGTTCAGGAGGGAGACCAGGGCTGAAG-3'
Cys645Gly-F	5'-CGTGTGCCAACATGAAGGTGGGCAATGAGGA-3'
Cys645Gly-R	5'-CCACCTTCATGTTGGCACACGGGTTCAGGA-3'
Cys652Gly-F	5'-AATGAGGACCAGACCAACGGCACAGTGCC-3'
Cys652Gly-R	5'-CGTTGGTCTGGTCCTCATTGCACACCTTC-3'
Cys660Gly-F	5'-CAGTGCCCACTTACCCCTCGGGCCGTGACAG-3'
Cys660Gly-R	5'-CCGAGGGGTAAGTGGGCACTGTGCAGTTGG-3'
Cys777Gly-F	5'-GCACTCCTGACCGCAGGTGGGGCTTCAGGG-3'
Cys777Gly-R	5'-CCCACCTGCGGTCAGGAGTGCCGTCCGAGC-3'
Cys853Gly-F	5'-AGCATGGGGAACCCCCGCGGCGATGGCCA-3'
Cys853Gly-R	5'-CGCGGGGGTTCCCCATGCTGTCCAGAGGC-3'

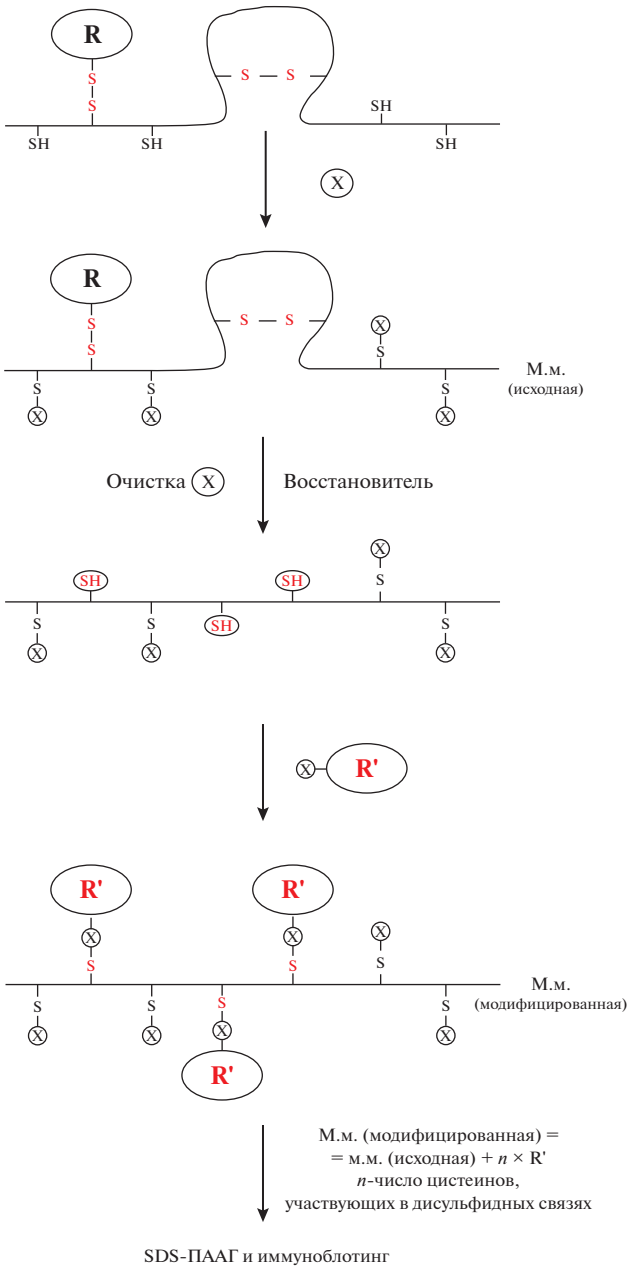


Рис. 1. Методология. Модификация дисульфидных связей в белках. X – малеимил или низкомолекулярное производное малеимида. Восстановитель: TCEP. X-R': высокомолекулярное производное малеимида (м.м. 2000, 5000 и 10000).

дом или MeO-PEG-Mal (м.м. 750) с образованием стабильных тиоэфирных связей при pH 6.5–7.5. Затем реакционную смесь наносили на колонку Zeba™ Spin Desalting Column, содержащую сорбент для эксклюзионной хроматографии, которая обеспечивает эффективное обессоливание белка и его высокий выход, центрифугировали при 1500 *g* в течение 2 мин. Затем для расщепления дисульфидных связей и регенерации новых тиольных групп использовали TCEP (50 мМ, pH 6.0) с последующей очисткой на колонке для обессоливания. Затем к регенерированным тиольным группам присоединяли. MeO-PEG-Mal (м.м. 5000) в 1 М Трис-HCl-буфере pH 7.0. Более высокая молекулярная масса указывает на большее число дисульфидных связей в исследуемом белке, и это значение вычисляется по разнице в миграции полос белка, обработанного по описанной схеме, и исходного при иммуноблотинге. Результаты иммуноблотинга подтверждали с помощью мутагенеза остатков цистеина.

Оценка метода с использованием авидина

Авидин (“Sigma”, A9275) – природный тетрамер с двумя остатками цистеина (4, 83), которые образуют внутримономерный дисульфидный мостик [19], использовали для оценки специфичности и эффективности метода. Авидин денатурировали при 70°C в течение разного времени (0, 1, 5, 10, 20 мин) для определения точки, в которой происходит максимальное превращение мономера в тетрамер. Стабильно максимальное содержание мономера авидина детектировали через 10 мин (рис. 2*а*). Обработка TCEP, малеимидом и MeO-PEG-Mal не приводила к изменению молекулярной массы мономера авидина (рис. 2*б*). Однако обработка TCEP (20 мМ, pH 7.0), а затем MeO-PEG-Mal (м.м. 5000, 10 мг) привела к появлению полосы 28 кДа. После обработки MeO-PEG-Mal (м.м. 5000) молекулярная масса мономера авидина увеличивалась на 12 кДа. Это указывает на участие двух остатков цистеина в образовании дисульфидного мостика. Максимальное мечение авидина наблюдали при его инкубации с MeO-PEG-Mal (50 мг/мл) и TCEP в течение 30–60 мин при 4°C (рис. 2*г*). MeO-PEG-Mal в дозе 50–200 мг/мл в комбинации с TCEP вызывал изменение молекулярной массы у большей части мономеров авидина (10 мг/мл) (рис. 2*в*). Удаление TCEP после восстановления привело к длительному повышению эффективности мечения MeO-PEG-Mal (10 мг/мл) по сравнению с эффективностью мечения в присутствии TCEP (рис. 2*д*).

Блокирование свободных тиольных групп в суммарном белке

Чтобы точно оценить число дисульфидных мостиков, все свободные тиольные группы в белке-мишени должны быть блокированы. Эффективность блокирования свободных тиольных групп малеимидом оценивали с использованием системы биотин-стрептавидин-680^{AF}. Биотин-малеимид (10 мкг/мл) использовали для прямого мечения свободных тиольных групп в белках в лизирующем буфере в отсутствие MeO-PEG-Mal (4°C, 1 ч, pH 7.0). Меченые белки разделяли с помощью

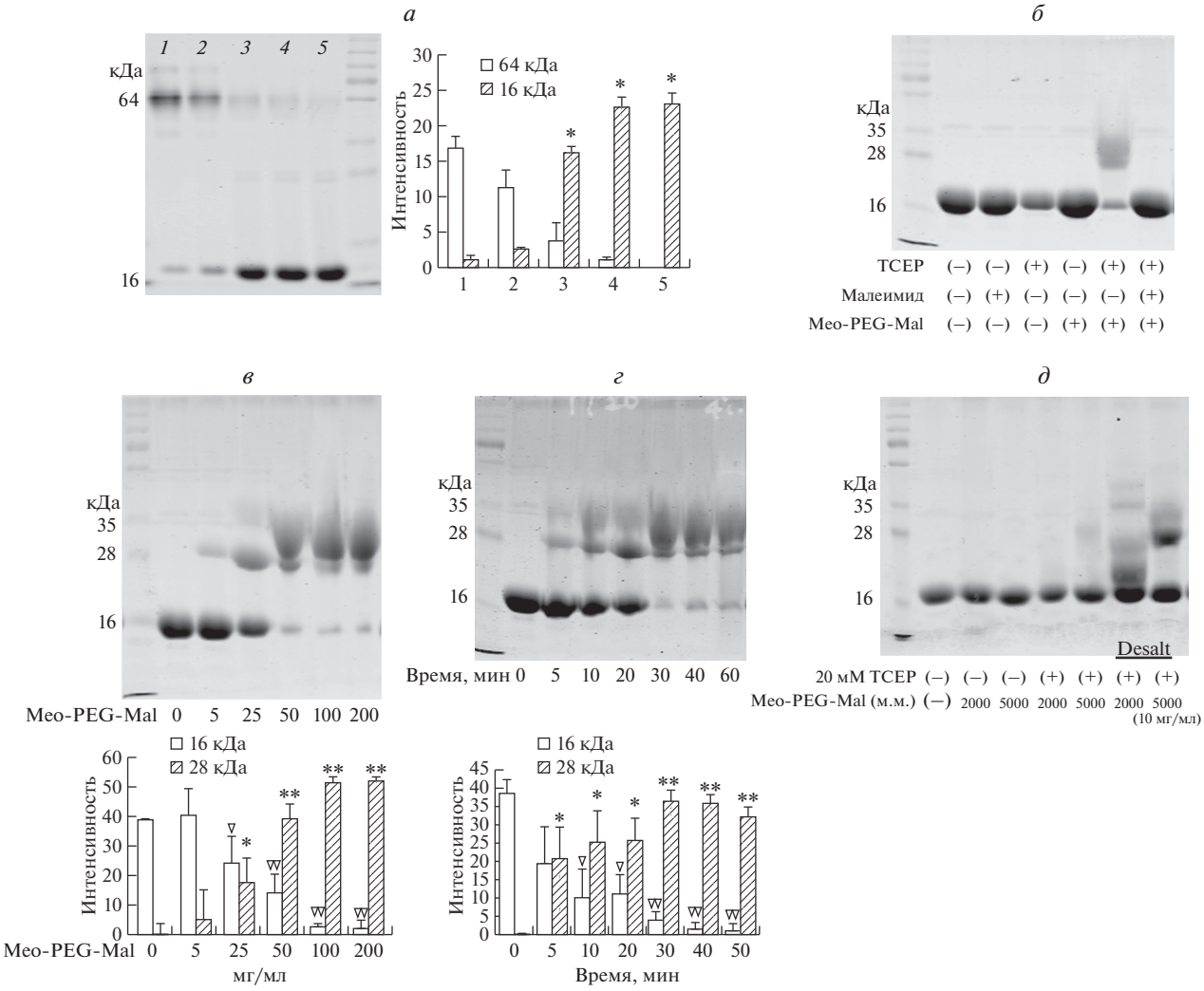


Рис. 2. Конъюгация MeO-PEG-Mal с авидином. *а* – Тепловая денатурация авидина. Слева: электрофореграмма авидина после тепловой денатурации в течение 0, 1, 5, 10, 20 мин (дорожки *1–5*). Справа: диаграмма интенсивности полос нативного (64 кДа) и денатурированного (16 кДа) авидина в дорожках *1–5*. *б* – Электрофореграмма денатурированного авидиана, обработанного малеимидом, TCEP или MeO-PEG-Mal (м.м. 5000). *в* – Обработка авидина MeO-PEG-Mal в разной концентрации. Вверху: электрофореграмма продуктов обработки авидина MeO-PEG-Mal. Внизу: диаграмма интенсивности соответствующих полос. *г* – Обработка авидина MeO-PEG-Mal и TCEP в течение разных промежутков времени. Вверху: электрофореграмма продуктов обработки. Внизу: диаграмма интенсивности соответствующих полос. *д* – Электрофореграмма продуктов обработки денатурированного авидина TCEP, MeO-PEG-Mal (м.м. 2000, 5000) с/без обессоливания. *, ▽: $P < 0.05$; **, ▽▽: $P < 0.01$.

SDS-ПААГ и переносили на PVDF-мембрану. Мембрану инкубировали со стрептавидином-680^{AF} (0.1 мкг/л, при комнатной температуре, 1 ч) для получения ярко-красного сигнала в трех независимых образцах. Блокирование денатурированных образцов (70°C, 10 мин) в лизирующем буфере с MeO-PEG-Mal (м.м. 750) в концентрации 1 и 10 мг/мл до мечения биотин-малеимидом значительно снижает интенсивность ярко-красного сигнала. Соответствующий сигнал от образцов с концентрацией MeO-PEG-Mal (м.м. 750) 10 мг/мл групп едва виден или отсутствует. Однако сигнал появляется снова, когда образцы метят биотин-малеимидом с последующей обработкой TCEP образцов, блокированных MeO-PEG-Mal (рис. 3). Эти результаты показывают, что обработка MeO-PEG-Mal (м.м. 750) в концентрации 10 мг/мл достаточна для блокирования свободных тиольных групп и выполнения необходимого предварительного условия этого метода.

Оценка метода с использованием белков-мишеней

В клетках HEK293, трансфицированных AQP5 (wt), FLAG-AQP5 или AQP5-FLAG, антитела к AQP5 детектируют полосу 27 кДа (зеленая), кото-

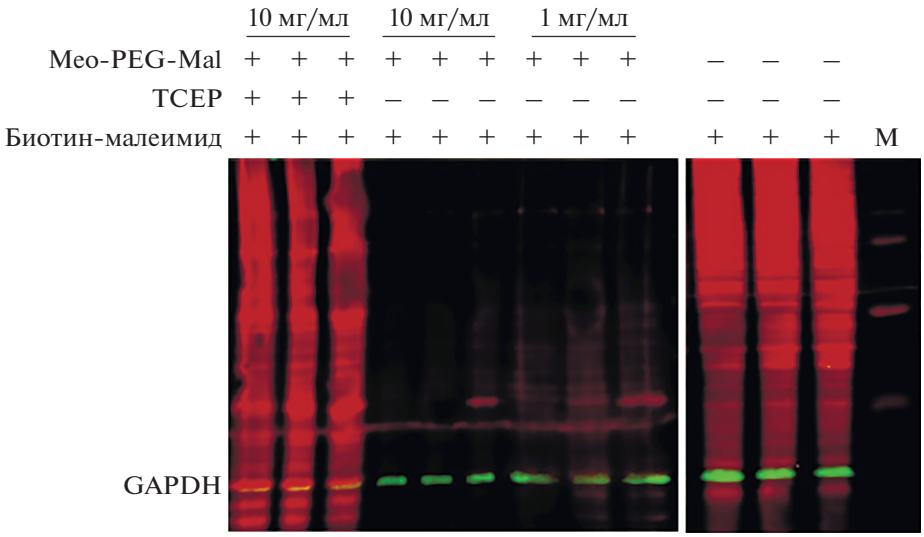


Рис. 3. Блокирование свободных тиольных групп MeO-PEG-Mal (м.м. 750). Три независимых денатурированных образца обрабатывали биотин-малеимидом, MeO-PEG-Mal + биотин-малеимид и MeO-PEG-Mal + TCEP + биотин-малеимидом. Результаты блокирования визуализировали с использованием системы биотин-стрептавидин-680^{AF}. M – маркер. Зеленые полосы – GAPDH.

рая соответствует химерному белку 1 кДа FLAG-таг + 27 кДа AQP5 (рис. 4*а*). Антитела к FLAG детектируют химерный белок (красная полоса), но не AQP5 (wt), что подтверждает их специфичность. Антитела к FLAG имеют также более высокое сродство к FLAG-AQP5, чем к AQP5-FLAG. Полоса, соответствующая мол. массе более 100 кДа (зеленая), детектируется в клетках HEK293, трансфицированных TRPV4 (wt), но не контрольным вектором (рис. 4*б*). В клетках HEK293, трансфицированных TRPV4(wt), FLAG-TRPV4 или TRPV4-FLAG, полосы, соответствуюшие молекулярной массе примерно 100 кДа (зеленые), белков TRPV4 дикого типа и химерных белков детектируются антителами к TRPV4 (рис. 4*б*, дорожки TRPV4 wt/FLAG-TRPV4/TRPV4-FLAG), а антитела к FLAG детектируют химерный белок (красный). На основе этих результатов для дальнейших опытов отобрали два слитых белка (FLAG-AQP5/FLAG-TRPV4).

Образцы выдерживали в течение 30–40 мин при 4°C, подвергали тепловой денатурации (70°C, 10 мин), а затем для удаления всех следов MeO-PEG-Mal дважды пропускали через колонки для обессоливания (рис. 5*а*, дорожки *1*, *4*, *7*, рис. 5*б*, дорожка блокированный образец). Одну порцию обессоленных образцов инкубировали с MeO-PEG-Mal (м.м. 5000, 10–50 мг, pH 7.2) при 4°C в течение 60 мин (рис. 5*а*, дорожки *2*, *5*, *8*, рис. 5*б*, дорожка негативный контроль). Другие образцы обрабатывали TCEP (50 мМ, pH 6.0) при 4°C в течение 30–40 мин с последующей инкубацией с MeO-PEG-Mal м.м. 5000, 10–50 мг) в 50 мМ буфере Трис-HCl pH 7.0 при 4°C в течение 60 мин (рис. 5*а*, *3*, *6*, *9*, рис. 5*б* (все дорожки, кроме блокированного образца и негативного контроля), рис. 5*в*).

В TRPV4 (wt) мы детектировали три более высокомолекулярные полосы (рис. 5*б*, дикий тип), но ни одной такой полосы не найдено в AQP5 (рис. 5*а*, дорожка *3*). Более высокомолекулярными были полосы мутантов TRPV4 по единичным остаткам цистеина в положениях 639, 645, 652, 660, 777, но не в 194, 250, 294, 353, 427, 480, 537, 853 (рис. 5*б*). Более того, паттерны миграции случайных мутантов по двум остаткам цистеина (639, 645, 652, 660) сходны с паттернами мутантов по этим единичным остаткам (рис. 5*в*). Число более высокомолекулярных полос снижалось с трех до одной при мутациях более чем в трех остатках цистеина одновременно. При одновременном мутировании остатков в положениях 645, 652, 660, 777 отсутствовали полосы с более высокой молекулярной массой (рис. 5*в*). Эти результаты показывают, что остатки цистеинов в положениях 639, 645, 652, 660, 777 образуют дисульфидные связи в TRPV4.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Миграция белков в SDS-ПААГ определяется размером белка. Полимеризация белков приводит к изменению скорости миграции. Таким образом, мономер и полимер можно легко дифференцировать по различию в их молекулярных массах. Однако в случае белков с внутримолекулярными дисульфидными мостиками, образованными двумя близко расположенными остат-

ками цистеина, это отличие может быть неочевидным или сложно идентифицируемым [20]. Небольшие различия в миграции белков с правильными внутрицепочечными дисульфидными мостиками и несформированными мостиками отмечены у относительно крупных белков. Чтобы лучше понять, как дисульфидные мостики влияют на фолдинг белков, нами разработан удобный метод амплификации этих небольших различий с целью их более легкой визуальной идентификации. Разработан простой подход, состоящий из блокирования свободных тиольных групп белка, восстановления дисульфидных связей с последующей модификацией вновь образованных тиольных групп и идентификацией с помощью SDS-ПААГ. Сравнивая различия в скорости миграции и числе полос в модифицированных и немодифицированных образцах с помощью иммуноблотинга, можно установить число и статус дисульфидных мостиков. В отличие от таких сложных методов, как рентгеноструктурный анализ и ЯМР, этот метод позволяет прямо визуализировать и предсказывать дисульфидные мостики в белках. В нашей работе с помощью этого подхода протестированы AQP5, бета-актин, тубулин и TRPV4, успешно и точно идентифицированы дисульфидные связи в этих белках.

Учитывая, что DTT и β-меркаптоэтанол содержат активные тиольные группы, потенциально способные взаимодействовать с малеимидными группами, в настоящей работе мы использовали TCEP, чтобы обеспечить чувствительность и специфичность нового подхода. Кроме того, TCEP сохраняет достаточно высокую активность в широком диапазоне значений pH. После обессоливания образца дисульфидные мостики можно успешно расщепить при pH 6.0, что минимизирует потенциальные взаимодействия между вновь регенерированными тиольными группами и оставшимся блокирующим агентом.

Сначала мы пытались прямо метить свободные тиольные группы MeO-PEG-Mal для определения дисульфидных мостиков в белке-мишени. Однако мечение свободных тиольных групп высокомолекулярным MeO-PEG-Mal влияет на взаимодействие между антителами и белком-мишенью. Это, вероятно, обусловлено блокированием сайтов связывания антител длинными цепями MeO-PEG-Mal, конъюгированными с тиольными группами. Таким образом, идеальные антитела должны иметь сайты связывания, удаленные от образуемых дисульфидных мостиков.

В качестве отрицательного контроля мы использовали образцы, образованные высокомолекулярными MeO-PEG-Mal в отсутствие TCEP. После восстановления TCEP образцы обрабатывали MeO-PEG-Mal в разных концентрациях (10, 20 и 50 мг) для стабильного максимального мечения дисульфидных мостиков в белке-мишени. После введения метки проводили обессоливание, направленное на снижение количества остаточного непрореагировавшего MeO-PEG-Mal (м.м. 5000), чтобы предотвратить его влияние на миграцию полос в SDS-ПААГ и результаты последующего анализа.

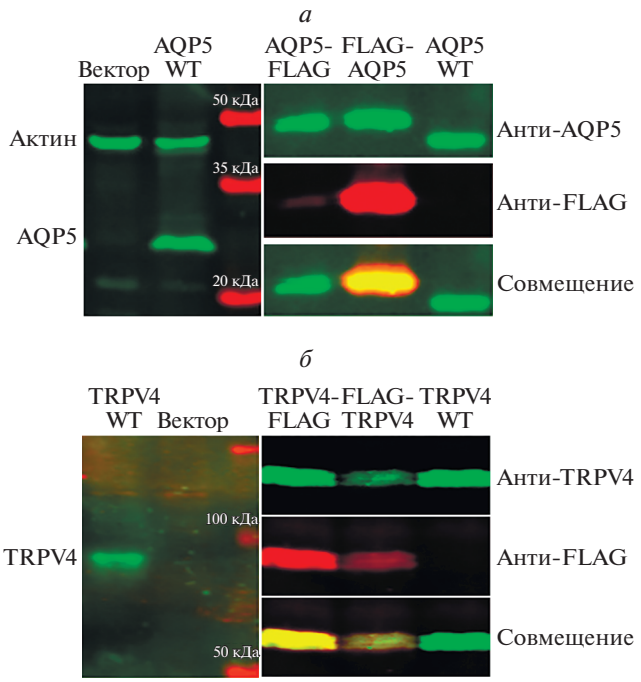


Рис. 4. Экспрессия слитых белков AQP5 TRPV4 в клетках HEK293. *а* – Антитела к AQP5 (зеленые) и FLAG (красные) использовали для подтверждения успешной трансфекции и экспрессии AQP5(wt)/FLAG-AQP5/AQP5-FLAG в клетках HEK293. *б* – Антитела к TRPV4 (зеленые) и к FLAG (красные) использовали для подтверждения успешной трансфекции и экспрессии TRPV4 (wt)/FLAG-TRPV4- /TRPV4-FLAG в клетках HEK293.

Каналы TRP выполняют разные функции в качестве сенсоров многих стимулов [21]. Все TRP-каналы представляют собой симметричные тетрамеры с центральной порой для проникновения ионов, в которых C-концевые области опосредуют прямое взаимодействие между субъединицами [22]. Нами установлено, что C-концевые остатки цистеина (639, 645, 652, 660, 777) образуют дисульфидные связи в TRPV4. Рандомные мутанты с двойными заменами остатков цистеина в положении 639, 645, 652, 660 имеют сходные профили миграции с мутантами по единичным остаткам цистеинов, что указывает на участие этих четырех цистеинов в произвольном формировании двух дисульфидных связей. Замены трех или четырех остатков цистеина (639, 645, 652, 660) нарушали внутрицепочечные дисульфидные связи и значительно изменяли паттерны миграции белковых полос (с трех до одной). Полосы высокомолеку-

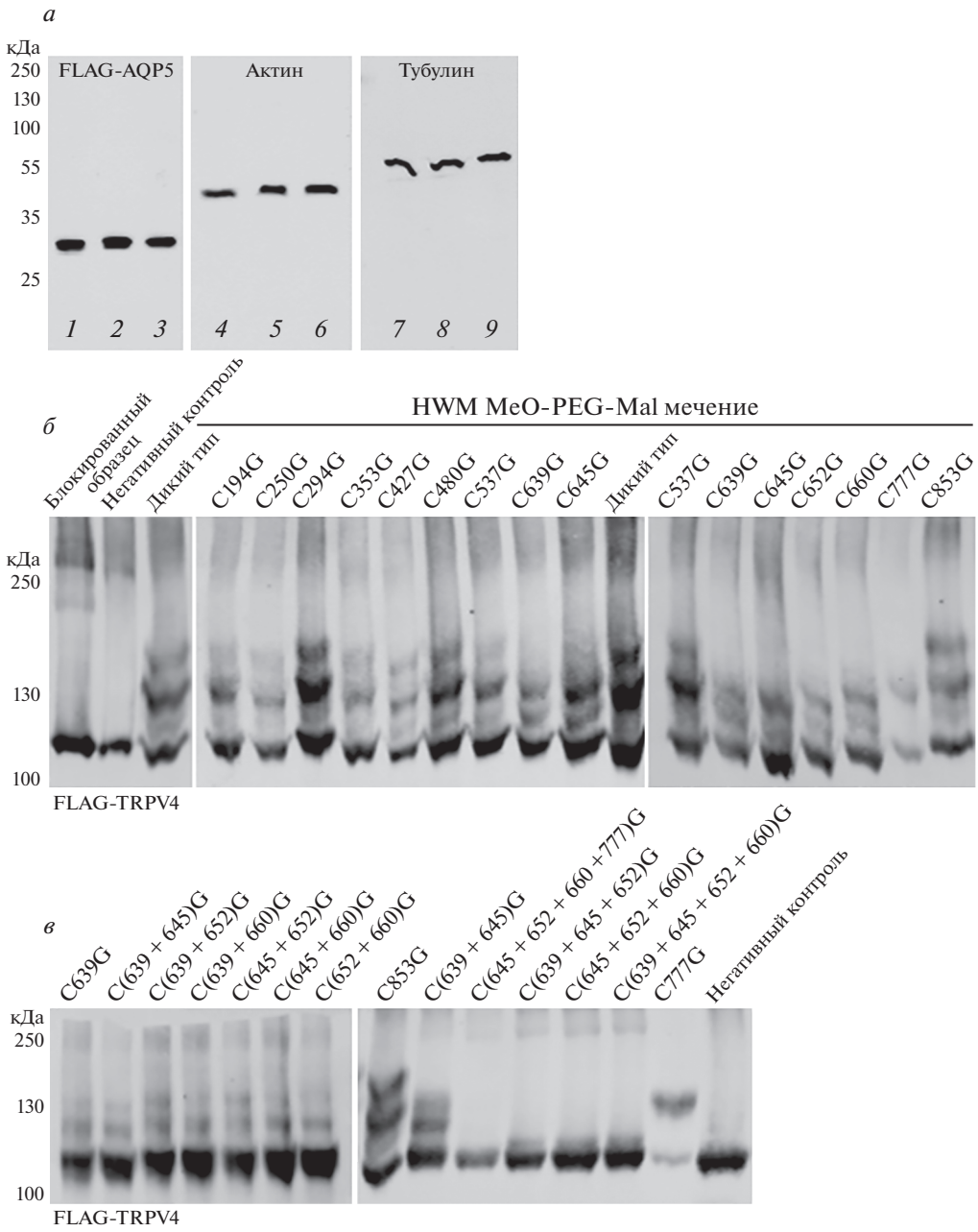


Рис. 5. Идентификация дисульфидных мостиков в AQP5 и TRPV4. *а* – Иммуноблот FLAG-AQP5. Блокированные образцы (дорожки *1*, *4*, *7*); негативный контроль: блокированные образцы, инкубированные с MeO-PEG-Mal (дорожки *2*, *5*, *8*); блокированные образцы, инкубированные с MeO-PEG-Mal после восстановления TCEP (дорожки *3*, *6*, *9*). *б* – Иммуноблот FLAG-TRPV4 дикого типа и 13 вариантов с единичными мутациями остатков цистеина. *в* – Иммуноблот мутантов FLAG-TRPV4 (мутанты с заменами одного, двух, трех и четырех остатков цистеина в положениях 639, 645, 652, 660, 777.

лярных производных отсутствовали в случае мутантов по цистеинам в положении 645, 652, 660, 777, что свидетельствует об участии цистеина-777 в образовании дисульфидной связи. Криоэлектронная микроскопия и рентгеноструктурный анализ TRPV4 *Xenopus tropicalis* показали, что остатки I^{674}, G^{675}, M^{676}, D^{678}, E^{680} образуют ионпроницаемую пору [23]. Отметим, что остатки цистеина 639, 645, 652, 660, которые образуют дисульфидные мостики в TRPV4 человека, выявленные в нашей работе, прилежат к функциональным аминокислотным остаткам, образующим ионпроницаемую пору. Учитывая участие дисульфидных мостиков, локализованных вблизи поры, в потенциальной модуляции чувствительности к экзогенным стимулам, показанное при изучении

TRPV4 мыши [24], роль новых идентифицированных дисульфидных связей и их вклад в функционирование TRPV4 можно рассматривать как область дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

Нами разработан простой и чувствительный подход, позволяющий специфически детектировать дисульфидные связи в белке-мишени. Основное преимущество этого метода – возможность идентифицировать и охарактеризовать важные дисульфидные мостики в белках более простым и экономически выгодным способом.

Мы выражаем признательность Miguel A. Valverde (Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain) за предоставленные плазмиды и Xiaomin Wang (Capital Medical University, Beijing, China) за помощь с лабораторным оборудованием.

Выполнение работы поддержано National Nature Science Foundation of China (nos. 81100765, 81570990).

В данной работе не использовали животных в качестве объектов исследования

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bulaj G. (2005) Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnol. Adv.* **23**, 87–92.
2. Cook K.M., Hogg P.J. (2013) Post-translational control of protein function by disulfide bond cleavage. *Antioxidants Redox Signaling*. **18**, 1987–2015.
3. Goldberger R.F., Epstein C.J., Anfinsen C.B. (1963) Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J. Biol. Chemistry*. **238**, 628–635.
4. Anfinsen C.B., Haber E. (1961) Studies on the reduction and re-formation of protein disulfide bonds. *J. Biol. Chemistry*. **236**, 1361–1363.
5. Bonander N., Leckner J., Guo H., Karlsson B.G., Sjolin L. (2000) Crystal structure of the disulfide bond-deficient azurin mutant C3A/C26A: how important is the S-S bond for folding and stability? *Eur. J. Biochemistry*. **267**, 4511–4519.
6. Wetzel R., Perry L.J., Baase W.A., Becktel W.J. (1988) Disulfide bonds and thermal stability in T4 lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**, 401–405.
7. Hogg P.J. (2003) Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 210–214.
8. Go Y.M., Jones D.P. (2013) Thiol/disulfide redox states in signaling and sensing. *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 173–181.
9. Tarnow P., Schoneberg T., Krude H., Gruters A., Biebermann H. (2003) Mutationally induced disulfide bond formation within the third extracellular loop causes melanocortin 4 receptor inactivation in patients with obesity. *J. Biol. Chem.* **278**, 48666–48673.
10. Singh R. (2008) A review of algorithmic techniques for disulfide-bond determination. *Brief. Funct. Genomics Proteomics*. **7**, 157–172.
11. Tsai C.H., Chan C.H., Chen B.J., Kao C.Y., Liu H.L., Hsu J.P. (2007) Bioinformatics approaches for disulfide connectivity prediction. *Curr. Prot. Peptide Sci.* **8**, 243–260.
12. Singh R., Murad W. (2013) Protein disulfide topology determination through the fusion of mass spectrometric analysis and sequence-based prediction using Dempster–Shafer theory. *BMC Bioinform.* **14**(Suppl. 2), S20.
13. Planey S.L. (2012) Discovery of selective and potent inhibitors of palmitoylation. *Intech*. **9**, 251–288.
14. Fontaine S.D., Reid R., Robinson L., Ashley G.W., Santi D.V. (2015) Long-term stabilization of maleimide-thiol conjugates. *Bioconjugate Chem.* **26,** 145–152.
15. Ravi S., Krishnamurthy V.R., Caves J.M., Haller C.A., Chaikof E.L. (2012) Maleimide-thiol coupling of a bioactive peptide to an elastin-like protein polymer. *Acta Biomaterialia*. **8**, 627–635.
16. Ghosh S.S., Kao P.M., McCue A.W., Chappelle H.L. (1990) Use of maleimide-thiol coupling chemistry for efficient syntheses of oligonucleotide-enzyme conjugate hybridization probes. *Bioconjugate Chem.* **1**, 71–76.
17. Singh R., Whitesides G.M. (1994) Reagents for rapid reduction of native disulfide bonds in proteins. *Bioorg. Chem*. **22**, 109–115.
18. Ding Q.W., Zhang Y., Wang Y., Wang Y.N., Zhang L., Ding C., Wu L.L., Yu G.Y. (2010) Functional vanilloid receptor-1 in human submandibular glands. *J. Dental Res.* **89**, 711–716.
19. Nordlund H.R., Laitinen O.H., Uotila S.T., Nyholm T., Hytonen V.P., Slotte J.P., Kulomaa M.S. (2003) Enhancing the thermal stability of avidin. Introduction of disulfide bridges between subunit interfaces. *J. Biol. Chem.* **278**, 2479–2483.
20. Carugo O., Cemazar M., Zahariev S., Hudaky I., Gaspari Z., Perczel A., Pongor S. (2003) Vicinal disulfide turns. *Protein Engin*. **16**, 637–639.
21. Caterina M.J. (2007) Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**, R64–76.
22. Wang S., Chuang H.H. (2011) C-terminal dimerization activates the nociceptive transduction channel transient receptor potential vanilloid 1. *J. Biol. Chem.* **286**, 40601–4067.
23. Deng Z., Paknejad N., Maksaev G., Sala-Rabanal M., Nichols C.G., Hite R.K., Yuan P. (2018) Cryo-EM and X-ray structures of TRPV4 reveal insight into ion permeation and gating mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 252–260.
24. Duan J., Li J., Zeng B., Chen G.L., Peng X., Zhang Y., Wang J., Clapham D.E., Li Z., Zhang J. (2018). Structure of the mouse TRPC4 ion channel. *Nat. Commun.* **9**, 3102.

PROTEIN DISULFIDE BONDS DETECTED BY TAGGING WITH HIGH MOLECULAR WEIGHT MALEIMIDE DERIVATIVE

Q.-W. Ding[1, *] and M. Lin[2]

[1]*Beijing Stomatological Hospital and School of Stomatology, Capital Medical University, Beijing, 100050 China*
[2]*Department of Stomatology, Beijing Chao-Yang Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100020 China*
**e-mail: dqwonline@163.com*

Disulfide bridges are essential for maintaining the structure and function of proteins. Traditionally, studies of the disulfide bonds require expensive equipment and high purity of the protein sample, therefore, the development of simpler techniques is warranted. Here, were present a novel protocol for the detection of disulfide bonds in proteins, which is based on the labeling reduced disulfide bridges with a high molecular weight (HMW) maleimide derivative. After irreversible blocking of free thiol groups of proteins, the labeling of new thiols released from disulfide bridges with a high-molecular-weight (HMW) maleimide derivative is performed. To confirm localization of cysteines involved in the formation of disulfide bonds, cysteine mutagenesis was conducted. For validation, aquaporin 5 (AQP5) and transient receptor potential cation channel subfamily V member 4 (TRPV4) proteins were tagged with FLAG (DYKDDDDK) on N-termini. Increase in MW of the target proteins from immunoblot indicated the presence of disulfide bonds. No bands with increased MW were detected in AQP5, while TPRV4 cysteines at disulfide bridges-constituting positions 639, 645, 652, 660, 770 were detected and confirmed by cysteine mutagenesis. These data indicate that the proposed technique is feasible and effective for the detection of protein disulfide bonds.

Keywords: disulfide bonds, cysteines, AQP5, TRPV4