

СОДЕРЖАНИЕ

Том 56, номер 3, 2022

ОБЗОРЫ

- Эффект положения гена: роль локального окружения в регуляции активности генов
Л. В. Болдырева, Е. Н. Андреева, А. В. Пиндюрин 355
- Гетерогенность популяции митохондрий в клетках растений и других организмов
Т. А. Тарасенко, М. В. Кулинченко 391
- МикроРНК miR-375 как многофункциональный регулятор сердечно-сосудистой системы
Н. А. Матвеева, Н. М. Баулина, И. С. Киселев, Б. В. Титов, О. О. Фаворова 418
- Выбор донорной молекулы в экспериментах по геномному редактированию в клетках животных
О. В. Володина, С. А. Смирнихина 428
- НЕМК-подобные метилтрансферазы в регуляции клеточных процессов
Н. С. Бизяев, А. В. Шувалов, Е. З. Алкалаева 439
- Динамика структуры мРНК эукариот в ходе трансляции
Н. С. Бизяев, Т. В. Егорова, Е. З. Алкалаева 451
-

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

- Картирование регуляторных элементов в 5'- и 3'-нетранслируемых областях мРНК SIGLEC-15 с помощью репортерного анализа
L. Wang, R. Li, X. Lai, X. Zhang, H. Chen, W. Zhao 465
- Полногеномное профилирование метилирования ДНК CD4+ Т-лимфоцитов больных первично-прогрессирующим рассеянным склерозом свидетельствует о вовлеченности этого эпигенетического процесса в иммунопатогенез заболевания
И. С. Киселев, О. Г. Кулакова, Л. В. Данилова, О. А. Батурина, М. Р. Кабилов, Е. В. Попова, А. Н. Бойко, О. О. Фаворова 468
- Распространенность, разнообразие и эволюция ДНК-транспозонов *L18* (DD37E) в геномах стрекающих (Cnidaria)
М. В. Пузаков, Л. В. Пузакова 476
-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

- Изменение уровней мРНК генов ДНК-метилтрансфераз в эндотелиальных клетках, обработанных митомицином
М. Ю. Синицкий, А. В. Синицкая, Д. К. Шишкова, А. Г. Кутихин, В. И. Минина, А. В. Понасенко 491
- Суперэнхансер *KLF6* регулирует пролиферацию клеток гепатомы человека, рекрутируя *GATA2* и *SOX10*
Kum Chol Ri, Myong Ryong Ri, Kwang Hun Kim, SunIl Choe, Ju Hua Ri, Ji Hyon Kim, Jong Ho Ri 498

Мультимодальная магнитно-резонансная и флуоресцентная визуализация трансплантации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в мозг <i>Y. C. Zhang, J. W. Wang, Y. Wu, Q. Tao, F. F. Wang, N. Wang, X. R. Ji, Y. G. Li, S. Yu, J. Z. Zhang</i>	500
---	-----

Экспрессия белка LAMP1 человека повышает продукцию вирусов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 в трансгенных клеточных линиях на основе Vero <i>А. А. Дольский, И. В. Грищенко, С. А. Боднев, А. А. Назаренко, А. М. Смирнова, А. К. Матвеева, Л. Е. Бульчев, А. С. Овчинникова, Т. В. Трегубчак, А. В. Зайковская, И. Р. Имамдинов, О. В. Пьянков, Е. В. Гаврилова, Р. А. Максютков, Д. В. Юдкин</i>	503
--	-----

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

Новые аналоги уридина как возможные противовирусные агенты, специфичные к SARS-CoV-2 <i>А. А. Маслова, Е. С. Матюгина, Е. Ю. Шустова, В. П. Волок, Л. И. Козловская, С. Н. Кочетков, А. Л. Хандажинская</i>	510
--	-----

БИОИНФОРМАТИКА

MiR-485-3p и miR-4728-5p как супрессоры опухолевого роста в патогенезе колоректального рака <i>T. Gurer, A. Aytekin, E. Caki, S. Gezici</i>	516
--	-----

МЕТОДЫ

Новый метод оценки влияния модифицированных трифосфатов дезоксинуклеозидов на изменение состава комбинаторных библиотек для проведения SELEX <i>С. А. Лапа, О. С. Антипова, А. В. Чудинов</i>	521
--	-----

НЕКРОЛОГ

Памяти Вернаты Викторовны Гречко (06.02.1930–06.12.2021 гг.)	528
--	-----

УДК 575.1/2:577.21

ЭФФЕКТ ПОЛОЖЕНИЯ ГЕНА: РОЛЬ ЛОКАЛЬНОГО ОКРУЖЕНИЯ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ¹

© 2022 г. Л. В. Болдырева^а, *, Е. Н. Андреева^а, А. В. Пиндюрин^а^аИнститут молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: asd@mcb.nsc.ru

Поступила в редакцию 14.07.2021 г.

После доработки 25.08.2021 г.

Принята к публикации 25.08.2021 г.

При перемещении гена в результате хромосомных перестроек или при встраивании идентичных генетических конструкций в разные районы генома наблюдается так называемый **эффект положения гена** — явление, при котором уровень экспрессии одного и того же гена существенно зависит от его положения в геноме. Геном эукариот имеет доменную организацию, а активность генов в пределах таких доменов определяется не столько нуклеотидной последовательностью гена, сколько структурой окружающего хроматина, т.е. **эпигенетически**. Хроматин представляет собой сложный комплекс ДНК, РНК и ассоциированных с ними структурных и регуляторных белков. Эпигенетический статус хроматина определяется целым рядом факторов: временем репликации данного участка генома, регуляторными мотивами ДНК, контактами с внутренней ядерной оболочкой (ламиной) и другими районами хромосом (топологически ассоциированные домены). Эффект положения гена заключается в изменении его эпигенетического состояния и является уникальным инструментом для исследования молекулярных и биохимических процессов. Понимание молекулярных механизмов эффекта положения гена у человека имеет важное значение в клинической сфере, в частности, для выявления и лечения ретровирусных инфекций, поскольку локальный состав хроматина может определять, например, переход в латентное/активное состояние такой инфекции, как ВИЧ. Кроме того, большое число нейродегенеративных заболеваний человека обусловлено эпигенетической инактивацией генов в результате экспансии коротких повторов. Наконец, для полноценного применения методов геномной терапии важно владеть знаниями и подходами, которые с достаточной точностью могут обеспечивать необходимый уровень экспрессии внедряемых трансгенов.

Ключевые слова: эффект положения гена, модификаторы эффекта положения, эпигенетический статус хроматина, гистоновый код, регуляторные элементы генома, дрозофила, млекопитающие, заболевания человека

DOI: 10.31857/S0026898422030041

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ЭФФЕКТА ПОЛОЖЕНИЯ, ЕГО ТИПЫ

Феномен **эффекта положения** (ЭП) гена был описан у дрозофилы уже вскоре после того, как генетики пришли к определению понятия гена как дискретной единицы наследственной информации, расположенной и функционирующей в определенном участке хромосомы. Наблюдения феномена ЭП свидетельствовали об обратимом измене-

нии проявления признака в результате изменения только лишь положения гена, определяющего этот признак, в геноме. Сегодня термин ЭП охватывает все случаи изменения экспрессии гена за счет каких-либо отклонений от его нормального хромосомного окружения (контекста), но не связанного с мутациями или делециями самого гена.

Еще в 1925 году А. Стертевант показал, что фенотипическое проявление двух (и более) копий

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898422030041 для авторизованных пользователей.

Сокращения: ЭП — эффект положения; ГХ — гетерохроматин; ВИЧ — вирус иммунодефицита человека; ЛАД — ламина-ассоциированные домены; ТАД — топологически ассоциированные домены; АРТ — антиретровирусная терапия; 3D-FISH — объемная флуоресцентная *in situ* гибридизация; ASD — расстройства аутистического спектра; ВСА — сбалансированные хромосомные аномалии; CpG — CG-динуклеотиды, формирующие CpG-островки; *E(var)* — ген-энхансер эффекта положения; GFP — зеленый флуоресцентный белок; LTR — длинный концевой повтор; HUSH — комплекс модификаторов ЭП у человека; MottmD — комплекс модификаторов ЭП у мыши; ORC — комплекс инициации репликации; SNP — однонуклеотидная замена (полиморфизм); *Su(var)* — ген-супрессор эффекта положения.

гена *Bar* у дрозофилы существенно различается, когда они находятся в одной хромосоме или в разных гомологичных хромосомах [1] (рис. 1а). Явление, обнаруженное А. Стертевантом, отличается от других типов эффекта положения: мутантный фенотип устанавливается стабильно, поэтому позже Э. Льюис назвал этот феномен **стабильным эффектом положения** [2]. В 1930 году Г. Дж. Меллер обнаружил еще одно удивительное явление — мозаичное проявление фенотипа гена *white* у дрозофилы, обусловленное хромосомными перестройками, переносщими этот ген в непосредственную близость к прицентромерному **гетерохроматину (ГХ)** [3], представляющему собой неактивную часть генома (подробнее см. раздел “Состояния хроматина, эпигенетические метки и гистоновый код”). При этом ген инактивируется лишь в части клеток (рис. 1б). Такой вариант ЭП, названный **эффектом положения мозаичного типа**, дополнительно свидетельствовал о том, что сам ген остается неизменным, а инактивация происходит в результате некоего изменения его состояния [2, 4–6]. Эксперименты по реверсии хромосомных перестроек показали восстановление нормального уровня активности гена, кроме тех случаев, когда рядом с ним оставался обширный блок ГХ [7–9]. Из этих наблюдений родилось понятие спрединга, или **гетерохроматинизации** — распространения свойств ГХ на прилежащие гены [10]. Показано, что степень инактивации гена, подверженного ЭП, напрямую зависит от расстояния до границы с ГХ [2, 11]. Более поздние исследования, выполненные также на дрозофиле, показали, что для индукции ЭП важна внутренняя организация блока ГХ. В частности, внутренняя перестройка ГХ без изменения его количества может приводить к релаксации ЭП [12, 13]. Изучение ЭП, возникающего в результате гетерохроматинизации тандемных вставок трансгенов, созданных на основе Р-элемента (ДНК-транспозона дрозофилы) также подтвердило важность внутренней организации ГХ блока для ЭП [14]. Однако до сих пор не вполне ясно, что играет главную роль в процессе гетерохроматинизации при ЭП — количество ГХ или именно присутствие, количество и расположение неких инактивирующих элементов. Например, в случае вставки Р-элемента вблизи прицентромерного ГХ хромосомы 2 не обнаружено корреляции между степенью инактивации гена *white* в транспозоне и размером и организацией прилежащего ГХ блока [15]. С другой стороны, при инверсии *In(1LR)pn2a* в хромосоме X дрозофилы степень инактивации генов постепенно снижается при уменьшении количества прилежащего ГХ [13]. Вместе эти факты могут объясняться сложностью общей организации ГХ доменов, и значением для ЭП как комбинации каких-то инактивирующих мотивов ДНК, так и общего размера ГХ блока. Явление гетерохроматинизации на-

глядно показано и изучено также в политенных хромосомах слюнных желез личинок дрозофилы, в которых с помощью световой микроскопии можно видеть домены репрессированного и активного хроматина, выявляемые как диски и междиски соответственно [16–18]. Цитогенетические исследования политенных хромосом в разных случаях ЭП дали возможность детально изучить морфологию хроматина, в частности выявить как непрерывную, так и прерывистую гетерохроматинизацию в результате ЭП [19, 20].

Помимо инактивации генов в результате гетерохроматинизации, у дрозофилы описан и реципрокный эффект: ген *cubitus interruptus*, в норме расположенный в окружении ГХ хромосомы 4, инактивировался при его перемещении в активную часть генома — эухроматин. Это явление, названное **эффектом Дубинина**, впоследствии наблюдали и у других генов ГХ [21–25]. Был сделан вывод, что, по всей вероятности, **любой ген может быть подвержен ЭП — изменению уровня экспрессии вследствие влияния локального окружения хроматина. При этом далеко не любой локальный контекст способен приводить к ЭП гена** [26].

В 1980-е годы благодаря разработке метода встраивания ДНК-конструкций в геном (Р-элемент опосредованная трансформация) [27, 28] стали находить многочисленные примеры существенных различий в активности генов *rosy* и *white*, маркирующих трансген по окраске глаз дрозофилы, в зависимости от района встройки в геном в составе искусственных Р-элементов, в том числе и случаи ЭП [29, 30] (рис. 1в). Несколько масштабных скрининговых исследований активности вставок Р-элемента в случайные локусы генома, показали, что вызывать ЭП способны районы прицентромерного ГХ всех хромосом дрозофилы. При этом был обнаружен ЭП трансгенов, встроенных в теломерные районы хромосом, так называемый **теломерный ЭП**. Самыми удивительными стали примеры инактивации трансгенов, картированных в некоторых участках эухроматиновой части хромосом, до этого момента считавшейся полностью активной частью генома [31–33]. В этот период сформировалось понятие **интеркалярного ГХ** — локальных участков генома, имеющих репрессированный статус (по множеству черт сходный с прицентромерным ГХ), диффузно разбросанных во всей эухроматиновой части генома [31, 34–36]. Для ЭП вставок Р-элемента, как и для реверсий хромосомных перестроек, показано восстановление экспрессии репортерного гена при перемещении трансгена из инактивирующего хромосомного контекста [31, 32, 37]. При помощи просвечивающей электронной микроскопии ультратонких срезов политенных хромосом дрозофилы обнаружили, что Р-элементные вставки активного или неактивного генетического материала создают соответствующие морфологические ультраструктуры [38, 39]

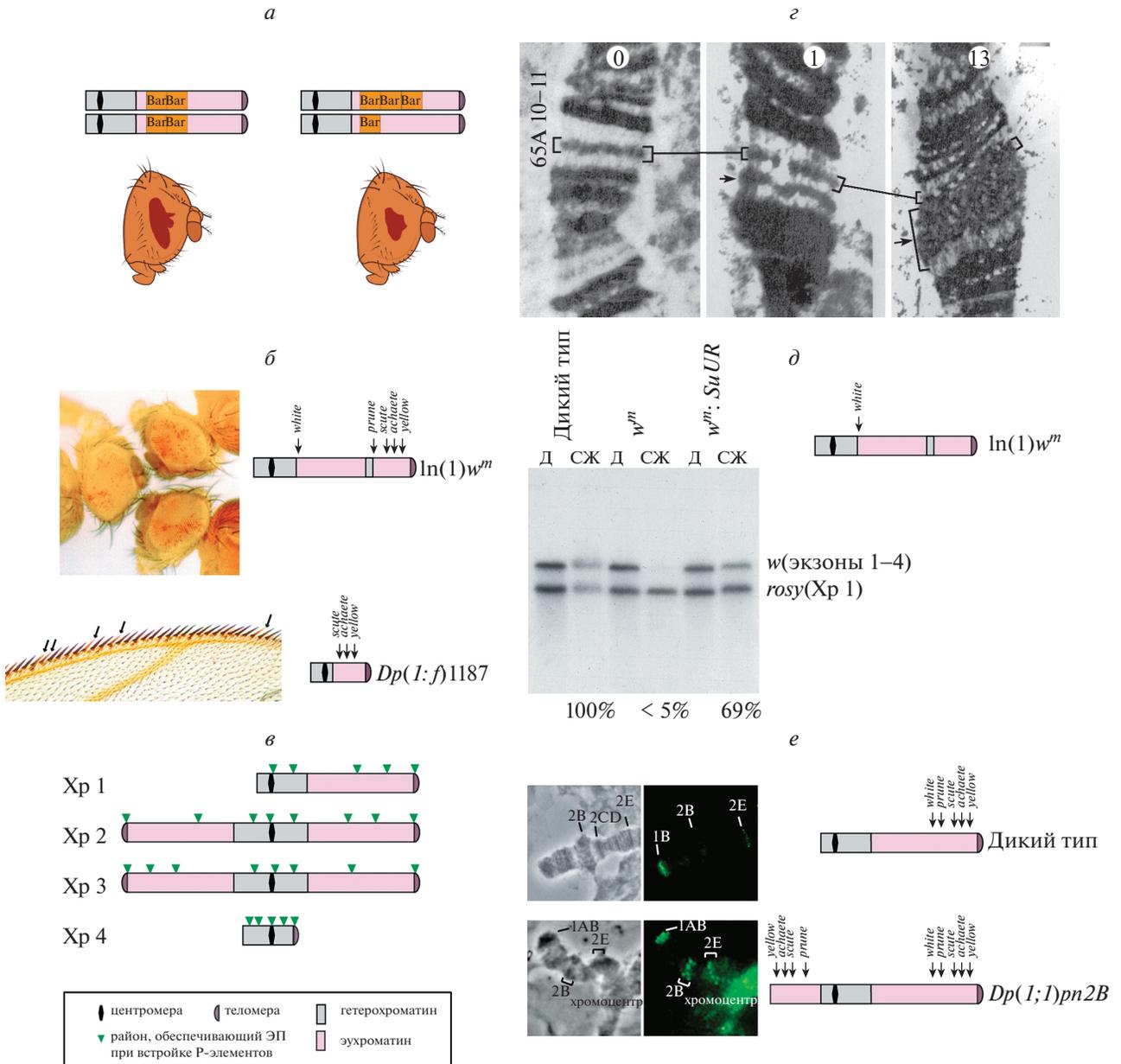


Рис. 1. Типы и характерные свойства эффекта положения (ЭП) гена у *D. melanogaster*. **а** – Стабильный ЭП гена *Bar*. **б** – Мозаичный ЭП генов *white* и *yellow*, вызванных инверсией $In(1)w^m$ и свободной дупликацией $Dp(1:f)1187$ хромосомы X соответственно. **в** – Схема участков генома, способных вызывать ЭП встроек Р-элементов. **г** – Электронно-микроскопические снимки ультратонких срезов района 65АВ политенных хромосом слюнных желез личинок (междиск в норме, а также при 1 и 13 копиях Р-элемента, формирующих новый тонкий (отмечен стрелкой) и крупный (отмечен стрелкой и скобкой) диск соответственно) (Любезно предоставлены В.Ф. Семешинным и В.В. Шломой и частично опубликованы в свободном доступе [39]). **д** – Саузерн-блот-анализ недорепликации ДНК гена *white* в политенных хромосомах слюнных желез (СЖ) относительно диплоидных тканей (Д) личинок дрозофилы в результате сдвига репликации в более позднюю временную стадию, как следствие гетерохроматинизации в результате ЭП, вызванного инверсией $In(1)w^m$, и восстановления политенизации при мутации гена-модификатора ЭП *SuUR*. **е** – Непрямое флуоресцентное иммуноокрашивание политенных хромосом слюнных желез личинок, показывающее связывание белка гетерохроматина SUUR с районами 2В и 2Е, которые подвергаются гетерохроматинизации в результате ЭП при дупликации части хромосомы X ($Dp(1;1)pn2B$).

(рис. 1г). По данным световой микроскопии неоднократно показано, что в политенных хромосомах дрозофилы район, подверженный ЭП, претерпевает морфологические изменения, подвер-

гаясь видимой гетерохроматинизации, визуально компактизуясь и приобретая ряд свойств ГХ, в том числе позднюю репликацию, приводящую к недорепликации ДНК [19, 40–43] (рис. 1д). Методом

иммуноокрашивания установлено, что в районах, подверженных гетерохроматинизации в результате ЭП, локализуются белки хроматина, в норме отсутствующие в этих районах [44, 45] (рис. 1e).

Еще один вариант ЭП – феномен, названный **транс-инактивацией**. В отличие от описанной выше гетерохроматинизации, распространяющейся вдоль хромосомы от расположенных на ней в *цис*-положении блоков ГХ, при транс-инактивации сайленсинг генов происходит в другой хромосоме. Так, у дрозофилы при ЭП гена *brown* аллель *bw^D*, подверженный ЭП, доминирует над нормальной копией гена, находящейся в гомологичной хромосоме. Инактивация в этом случае вызвана большим фрагментом (1.6 млн. п.н.) прицентромерного ГХ хромосомы 2, помещенного в локус *bw^D* посредством сложной транспозиции. Оказалось, что такая инактивация нормального аллеля *bw* происходит вследствие его гомологичной конъюгации с подверженным ЭП аллелем *bw^D*, приводящей к попаданию нормального аллеля под влияние прицентромерного ГХ в интерфазном ядре [46–49]. Затем обнаружили еще несколько случаев ЭП, возникающих аналогичным путем [50–55]. Это свидетельствует о транс-инактивации при ЭП как об одном из механизмов эпигенетической инактивации [56–61].

В 1990-е годы начались активные поиски и изучение ЭП и у других организмов, помимо дрозофилы. У дрожжей обнаружен как прицентромерный, так и теломерный ЭП [31, 62]. При этом у двух видов дрожжей ГХ-районы генома формируются разными молекулярными механизмами [63, 64]. Получены убедительные доказательства того, что у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* ЭП возникает при перемещении генов в район центромер [65], а у *Saccharomyces cerevisiae* – при гетерохроматинизации в теломерных районах [66]. Благодаря такой межвидовой дифференциации, дрожжи стали уникальной моделью, которая заложила основы понимания различных механизмов формирования ГХ, вызывающего ЭП гена в прицентромерных и теломерных районах. Теломерный ЭП, обнаруженный как у дрожжей, так и у дрозофилы, имеет лишь часть свойств, характерных для ЭП, вызванного другими типами репрессированного хроматина (прицентромерным и интеркалярным) [67].

Изучение ЭП у млекопитающих (по большей части у мыши и человека) стало возможным лишь в начале 21 века, когда появились технические условия и необходимый инструментарий молекулярной генетики. Однако то, что существенная часть генов-модификаторов ЭП, обнаруженных у дрозофилы, высоко консервативна и имеет ряд гомологов и ортологов как у млекопитающих, так и у человека, дает основание предполагать, что и молекулярные механизмы репрессии, приводящие к ЭП,

эволюционно консервативны [68–71]. Феномен ЭП у млекопитающих показан путем анализа тысяч параллельных репортерных встроек TRIP (Thousands of Reporters Integrated in Parallel) в геноме культивируемых стволовых клеток мыши [72, 73]. Проанализировав экспрессию тысяч встроек в различные локации, обнаружили, что уровень экспрессии одного и того же репортерного гена может различаться в ~1000 раз в зависимости от конкретного сайта встройки в геном. Другой крупномасштабный генетический скрининг проведен у мыши при помощи тандемной встройки GFP-экспрессирующего трансгена, имеющего мозаичный фенотип, чтобы выявить генетические факторы, способные модифицировать ЭП у млекопитающих [74, 75]. В результате были охарактеризованы около 40 генов-модификаторов ЭП мыши, большинство из которых оказались гомологами соответствующих генов дрозофилы [76] (см. раздел “Гены-модификаторы ЭП”).

Подверженность генов человека ЭП показана в ряде экспериментов, в которых репортерные конструкции встраивали в различные участки генома культивируемых клеток [77–80]. Методом 3D-FISH выявлены активные и репрессированные домены генома человека, обеспечивающие значительное повышение или снижение уровня экспрессии интегрированной в них репортерной конструкции [77]. Сформулировано также представление о транскрипционных территориях в геноме млекопитающих, впервые обнаруженных для совместно регулируемых кластеров генов, таких как *Hox*. Нарушения таких кластеров приводят к развитию заболеваний, в частности, лейкоза [81]. С помощью серийного анализа экспрессии генов SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) построена карта транскриптома человека [82]. По уровню транскрипционной активности были выделены домены двух классов. Высоко экспрессирующиеся домены обогащены основаниями С и G, имеют более высокую плотность генов и повышенный индекс коротких диспергированных повторов (Short Interspersed Nuclear Elements, SINE), а сами гены содержат преимущественно короткие интроны. Слабо экспрессирующиеся домены имеют противоположные свойства [83, 84]. Домены этих типов описаны и в геноме мыши [85], более того, их границы оказались достаточно консервативными и воспроизводимыми в сравнении с геномом человека [86]. Большинство генов, принадлежащих высоко экспрессирующимся доменам, относятся к генам домашнего хозяйства или экспрессируются в большинстве тканей, хотя в этих доменах встречается и небольшая процент узкоспецифичных генов [84, 87]. Вставки трансгенов в высоко и слабо экспрессирующиеся домены часто характеризуются соответствующими изменениями уровня экспрессии [77–80].

Один из самых распространенных молекулярных механизмов эпигенетической репрессии, обнаруженных у млекопитающих, — метилирование ДНК, у дрозофилы практически полностью отсутствует [88]. Метилирование ДНК играет важную роль в репрессии инородных встроок в геноме млекопитающих, в том числе ретровирусных [89, 90]. Нарушение метилирования ДНК в геноме человека обнаружено при разных видах рака [91, 92]. И, безусловно, метилирование CpG-островков играет решающую роль в репрессии генов при ЭП, возникающем в результате экспансии tandemных повторов, что приводит к развитию различных нарушений и синдромов у человека [93, 94] (подробнее см. раздел “Клинические аспекты ЭП”). С одной стороны, отсутствие этого эпигенетического механизма у дрозофилы на десятилетия задержало понимание его роли при ЭП. С другой же, подобное различие позволяет изолированно изучать молекулярные механизмы эпигенетической репрессии как с участием метилирования ДНК, так и без него [95].

Представления о молекулярных механизмах, лежащих в основе ЭП гена, значительно расширились за последние десятилетия и начинают использоваться как в фундаментальных исследованиях, так и в клинической практике. Во-первых, это относится к выявлению и лечению ретровирусных инфекций. Локальный состав хроматина может определять переход ВИЧ в латентное (вплоть до недетектируемого) или активное состояние. При заражении ВИЧ не только активно реплицируется в Т-лимфоцитах, но также может переходить в латентную фазу. Таким образом вирус сохраняется в клетках человека и может активироваться уже после окончания антиретровирусной терапии [96, 97]. Во-вторых, с ЭП генов связано большое количество генетических обусловленных заболеваниями и отклонений в развитии человека. Такие заболевания часто связаны с ЭП, возникающим в результате экспансии (увеличения числа копий) tandemных повторов вблизи генов [98, 99] (см. раздел “Клинические аспекты эффекта положения”).

Все приведенные примеры ЭП гена иллюстрируют существенную зависимость уровня экспрессии гена от его локального окружения. Нужно отметить, что до сих пор еще нет точного понимания молекулярных механизмов активации и инактивации гена при ЭП, особенно в случае мозаичных вариантов ЭП (когда стохастически в части клеток одной ткани (органа) ген инактивирован, а в других активен). И до сих пор открытыми остаются вопросы о сходстве или принципиальных различиях молекулярных механизмов инактивации/реактивации генов при разных типах ЭП. Ниже мы последовательно рассмотрим функционирование уровней эпигенетической инактивации, которые могут обеспечивать реPRESSION генов при ЭП. Исчерпывающее описание разнообраз-

ных случаев ЭП и их обсуждение представлено в обзорах [2, 13, 17, 18, 26, 37, 69–71, 100–104].

СОСТОЯНИЯ ХРОМАТИНА, ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТКИ И ГИСТОНОВЫЙ КОД

На протяжении большей части клеточного цикла ДНК в ядре эукариотических клеток связана с разнообразными белками, формируя сложную многоуровневую структуру — хроматин. Именно хроматин обеспечивает строгую иерархию уровней упаковки и неслучайную пространственную конфигурацию геномной ДНК, имеющей большую линейную протяженность (около 2 м в клетках человека), в пределах клеточного ядра, размеры которого измеряются микронами. При этом координируется своевременный доступ к генетической информации множества факторов, регулирующих каждую функцию генома: точную пространственно-временную экспрессию генов, правильный порядок репликации ДНК и верную передачу эпигенетических меток через клеточные деления, выявление и репарацию повреждений и ошибок в ДНК. В ходе развития организма и дифференцировки клеток различные районы хромосом подвергаются эпигенетической репрессии, механизмы которой имеют много общего с репрессией при ЭП: внесение модификаций в гистоны, связывание белков-репрессоров [105–109].

Уже в первых цитологических исследованиях хромосом были выделены два типа хроматина — эухроматин и ГХ. В целом эти понятия остаются актуальными и на сегодняшний день. К эухроматину относится часть генома, насыщенная белоккодирующими генами и регуляторными элементами. Эухроматин имеет низкую степень компактизации и характерный набор гистоновых модификаций. В состав ГХ входит значительная доля геномной ДНК (у многих эукариотических организмов это около трети общей протяженности генома [110]), однако эти области бедны генами, обогащены средне- и высокоповторяющимися последовательностями, сохраняют компактное состояние в течение практически всего клеточного цикла. Кроме того, эти области реплицируются в поздней S-фазе, отличаются от эухроматина набором модификаций гистонов и негистоновых белков, а также обладают выраженной способностью к пространственным контактам между собой и низким уровнем мейотической рекомбинации [17, 111, 112]. Изначально к ГХ относили лишь прицентромерные районы хромосом, которые содержат протяженные участки с регулярным расположением нуклеосом, а также эпигенетически наследуемые модификации гистонов и специфические наборы негистоновых белков-репрессоров [113–116]. С развитием представлений о молекулярной орга-

низации хроматина под ГХ стали подразумевать все районы хромосом, находящиеся в состоянии эпигенетической репрессии, поскольку многие районы так называемого интеркалярного ГХ имеют практически такие же свойства, как и прицентромерный ГХ [35, 117, 118]. Эпигенетическое наследование состояния ГХ тесно связано с репликацией ДНК в S-фазе клеточного цикла. Ферменты, вносящие модификации гистонов, характерные для “молчащих” районов, обнаруживаются только в вилках репликации, работающих в поздней S-фазе [35, 119]. Воспроизведение модификаций гистонов определяет дальнейшую сборку всех соответствующих компонентов хроматина после репликации (подробнее далее по тексту). При ЭП ген попадает в другой хромосомный контекст и, как следствие, происходит изменение временного паттерна репликации, что приводит к перепрограммированию его эпигенетического состояния [119–121]. Домены прицентромерного ГХ формируются уже на ранних этапах эмбриогенеза [122, 123]. Считается, что их сборка начинается на определенных *цис*-элементах, сайленсерах, от которых линейно распространяются модификации гистонов, а следом негистоновые белки ГХ до тех пор, пока не дойдут до “барьера” (подробнее см. раздел “Регуляторные элементы генома”) или до конкурирующего состояния хроматина [71, 124, 125]. Таким образом, ГХ состояние может захватить любой район, если он окажется физически близко к ГХ домену, что часто и происходит при ЭП [18] (последовательные этапы установления эпигенетического состояния хроматина подробно рассмотрены далее).

Первый уровень упаковки хроматина – нуклеосомная укладка. Нуклеосомы представляют собой регулярно расположенные белковые глобулы, вокруг которых ДНК делает $1\frac{3}{4}$ оборота [126–128]. В состав одной глобулы входят гистоны H2A, H2B, H3 и H4. Молекулы H2A, H2B, H3 и H4 формируют коровый октамер, имеющий клиновидную форму, узкую часть которого образует тетрамер (H3–H4)₂, а широкая часть состоит из двух димеров H2A–H2B [129, 130]. С-концевые глобулярные участки гистонов заключены в коровой части октамера, а их подвижные N-хвосты свободно расходятся в стороны [131, 132]. Одна молекула линкерного гистона H1 связывается с внешней стороной нуклеосомы в районе тетрамера (H3–H4)₂, фиксируя на ней нить ДНК [133, 134]. Длина фрагмента ДНК, приходящегося на одну нуклеосому, варьирует и составляет до 200 п.н., из которых непосредственно с гистоновым октамером связаны 145–147 п.н. [132, 135, 136]. В клетках одного организма гистоны каждого типа (кроме H4) представлены набором вариантов. Известно до четырех вариантов гистона H3, восьми – H2A, 11 – H1 и не менее трех вариантов H2B [134, 137, 138]. Молекулы гистонов могут содержать различные

ковалентные модификации определенных аминокислотных остатков их свободных N-хвостов и, в меньшей степени, глобулярной С-концевой части. Эти модификации вносятся в молекулы гистонов уже по завершении их синтеза, т.е. это посттрансляционные модификации, которые могут изменяться в течение клеточного цикла.

Многочисленные исследования показали, что конкретные комбинации гистоновых модификаций однозначно соответствуют определенному статусу хроматиновых доменов и даже отдельных частей генов [121, 139, 140] (рис. 2). Это явление получило название гистоновый код. Согласно современным представлениям, гистоновый код реализуется двумя путями. Во-первых, за счет изменения заряда и/или конформации молекулы разные варианты гистонов по-разному взаимодействуют с другими белками хроматина и с ДНК, изменяя архитектуру нуклеосом и доменов хроматина в целом [134, 141, 142]. Во-вторых, N-хвосты гистонов, в зависимости от комбинации их ковалентных модификаций служат сайтами для посадки разных семейств негистоновых структурных белков хроматина и ремоделирующих факторов [140, 143, 144]. Таким образом, реализуется эпигенетический метаболизм генома – установление, наследование и своевременное переключение состояний хроматина, что позволяет точно координировать во времени и пространстве молекулярные машины клеточных процессов [145–149] (рис. 2).

Гистоновый код – начальный уровень создания эпигенетического контекста, служит динамической платформой, интегрирующей различные эпигенетические сигнальные пути, он определяет уровни упаковки хроматина более высокого порядка [150–152]. Гиперацетилирование гистонов H3 и H4 и метилирование лизина в положении 4 гистона H3 коррелирует с установлением активного статуса хроматина у большинства видов, от дрожжей до дрозофилы и человека [153–155]. Ацетильные группы уменьшают общий заряд остатков лизина; считается, что это ослабляет взаимодействие молекул гистонов с фосфатными группами в ДНК и облегчает доступ машины транскрипции [156]. Помимо изменения биофизических свойств хроматина, ацетилированный лизин служит мишенью для бромодомен-содержащих белков, в число которых входят различные активаторы транскрипции и хроматин-ремоделирующие факторы [157, 158]. При этом связывание конкретных белков с N-хвостами гистонов зависит от комбинации их модификаций; и таким образом реализуется комбинаторная пластичность гистоновый код [143, 144, 159]. Хотя гиперацетилирование гистонов обычно связано с активным состоянием хроматина, существуют и исключения – например, ацетилирование H4K12 (H4K12ac) характерно именно для районов ГХ [160].

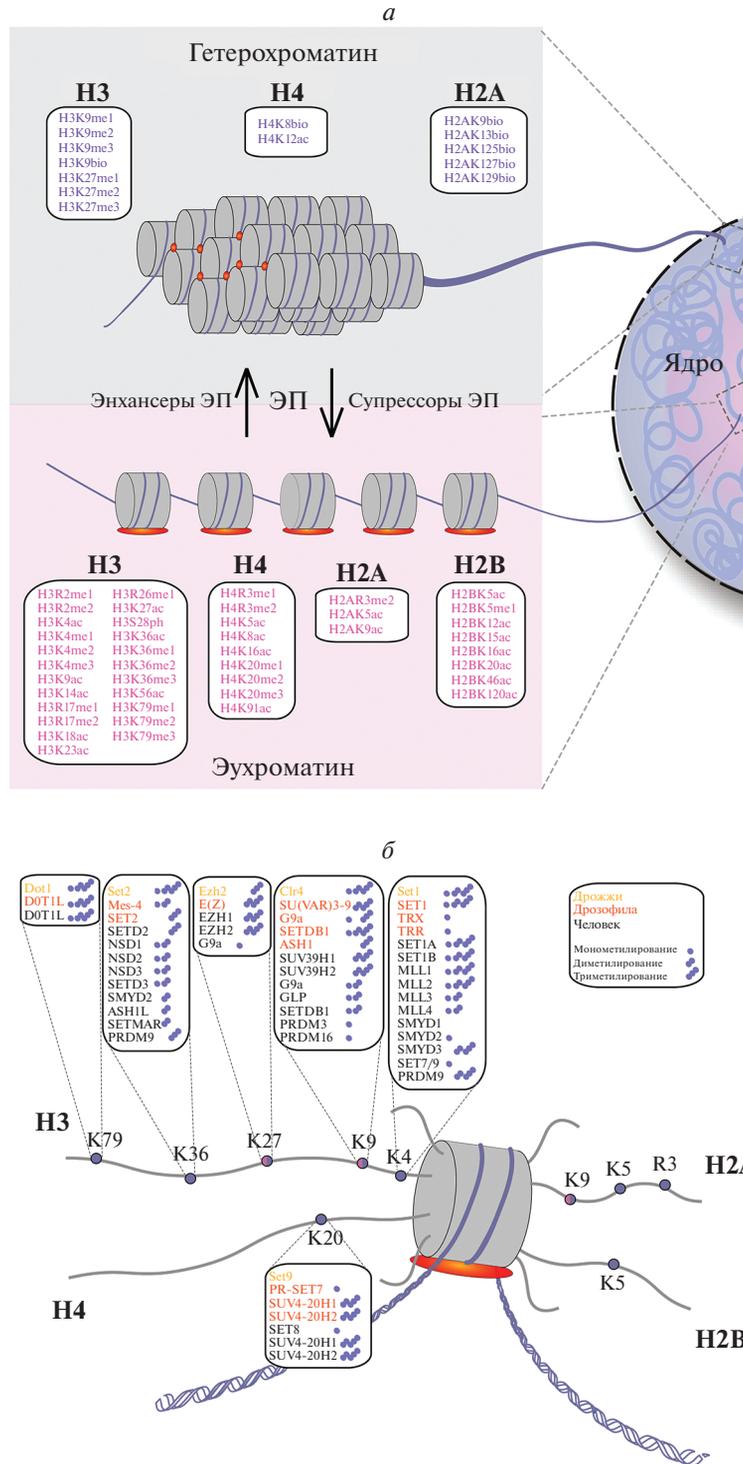


Рис. 2. Условная схема организации репрессированного состояния хроматина – гетерохроматина, и активного состояния хроматина – эухроматина (а), схема нуклеосомы и относительного расположения ковалентных модификаций в N-хвостах гистонов (б). В рамках (а) перечислены известные модификации гистонов, свойственные каждому из этих состояний хроматина. bio – биотинилирование; ac – ацетилирование; me/me2/me3 – моно, ди- и триметилирование аминокислот в составе указанного гистона. В рамках (б) приведены известные гены-модификаторы ЭП дрожжей, дрозофилы и человека, связанные с моно- ди- и триметилированием N-хвостов гистоновых белков. Красными овалами условно обозначен линкерный гистон H1 (на панелях а и б).

Различные варианты метилирования N-концов гистонов играют ключевую роль в разделении активных и репрессированных доменов хромосом (рис. 2а). Обобщая, можно сказать, что к активизирующим модификациям гистонов относится метилирование H3K4, H3K36 и H3K79, в то время как для репрессированных районов хроматина характерно метилирование H3K9, H3K27 и H4K20 [161–164] (рис. 2а). По существующим представлениям, формирование ГХ и, в результате, репрессию генов при ЭП обеспечивает определенный набор модификаций гистонов, что влечет связывание соответствующих комбинаций негистоновых белков-репрессоров. Поэтому для понимания принципов формирования репрессированных доменов хроматина, в частности при ЭП, необходима последовательная идентификация клеточных ферментов, осуществляющих модификации гистонов и выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе функционирования гистонового кода.

ГЕНЫ-МОДИФИКАТОРЫ ЭФФЕКТА ПОЛОЖЕНИЯ КОДИРУЮТ СТРУКТУРНЫЕ И РЕГУЛЯТОРНЫЕ БЕЛКИ ХРОМАТИНА

ЭП гена представляет собой изменение его эпигенетического состояния за счет изменений его нормального хромосомного окружения, не связанного с мутациями или делециями самого гена. Именно поэтому ЭП исторически стал стартовой площадкой, с которой начали изучать молекулярные факторы разных эпигенетических состояний хроматина – активного и репрессированного. Первые исследования механизмов формирования хроматина были основаны на тех наблюдениях, согласно которым фенотипы ЭП изменяются **супрессорными** (ослабляющими) и **энхансерными** (усиливающими) мутациями различных генов – **модификаторов ЭП** [110, 165, 166]. Продукты генов-супрессоров ЭП являются структурными компонентами ГХ, ферментами, которые модифицируют гистоновые белки, или же компонентами ядерной оболочки (ламинаы) [125, 167–171]. Гены-энхансеры ЭП, наоборот, кодируют продукты, участвующие в установлении активного статуса эухроматина, который противостоит гетерохроматинизации [71, 89, 125, 172] (рис. 2б, 3а).

Значительную часть генов-модификаторов ЭП выявили еще в ранних скрининговых исследованиях, выполненных на дрозофиле [32, 173, 174] (рис. 3а). На сегодняшний день известно около 150 генов-супрессоров (**Su(var)**), и более 200 генов-энхансеров (**E(var)**) ЭП, однако молекулярная функция установлена лишь примерно у каждого десятого из них [70, 71, 166] (Табл. S1, см. Приложение на сайте http://www.molec-bio.ru/downloads/2022/3/supp_Boldyreva_rus). Одним из первых был охарактеризован ген

Su(var)2-5 дрозофилы, открытие которого стало фундаментом для формирования представлений о процессах генетической репрессии. Этот ген кодирует обнаруженный в ГХ белок HP1a, содержащий N-концевой хромодомен и C-концевой хромотеновый домен, обеспечивающие его способность взаимодействовать с ди- и триметилированным H3K9 (H3K9me_{2/3}) и с другими белками хроматина [175–177]. Этот белок обнаружен в районах хромосом, подверженных гетерохроматинизации при ЭП [44, 178], как и белок SU(VAR)3-9, продукт одноименного гена-супрессора ЭП [166], который содержит N-концевой хромодомен и C-концевой домен SET [179]. Белок SU(VAR)3-9 высоко консервативен, он обладает активностью гистон-метилтрансферазы, которая специфически метилирует H3K9 [180, 181]. Молекулярный анализ функций белков HP1a и SU(VAR)3-9 предполагает механизм “чтения–записи”, который лежит в основе распространения гетерохроматинизации при ЭП. SU(VAR)3-9, устанавливает модификацию H3K9me_{2/3}, образуя сайт, специфически распознаваемый хромодоменом HP1a, а N-концевой участок SU(VAR)3-9 связывает хромотеновый домен HP1a, стабилизируя тем самым взаимодействие между HP1a и H3K9me_{2/3} и обеспечивая дальнейшее распространение H3K9me_{2/3}. Этот процесс считается основным механизмом репрессии в прицентромном ГХ, он эволюционно консервативен, но при этом вовлекает еще множество других факторов, уже менее консервативных [176, 182]. Кроме того, роль HP1a и SU(VAR) 3–9 не существенна для других типов ЭП (теломерного) и для репрессии вставок Р-элементов в ГХ хромосоме 4 дрозофилы, в которой существенно большее значение имеют другие гистон-метилтрансферазы [183–186]. Гомологи значительной части модификаторов ЭП, обнаруженных у дрозофилы, найдены и у других эукариот – *S. cerevisiae* [187], *Sh. pombe* [188], растений [189] и млекопитающих [75, 76] (рис. 2б), хотя иногда функции этих белков у различных организмов в процессе эволюции изменяются [69–71]. Современные исследования ЭП сосредоточены на определении и анализе довольно сложных паттернов активности генов-модификаторов ЭП и последовательности событий, которые поддерживают в равновесии динамический баланс между ГХ и эухроматином в эукариотическом ядре. Помимо генов-модификаторов ЭП, влияние на степень инактивации генов, подверженных ЭП, оказывают и другие факторы – общее количество ГХ в клетке, скорость развития и температура (у дрозофилы она важна на ранних стадиях развития, когда происходит установление эпигенетически наследуемого репрессированного состояния ГХ). Так, отсутствие хромосомы Y (почти полностью гетерохроматиновой) у самцов X0 дрозофилы приводит к значительному усилению

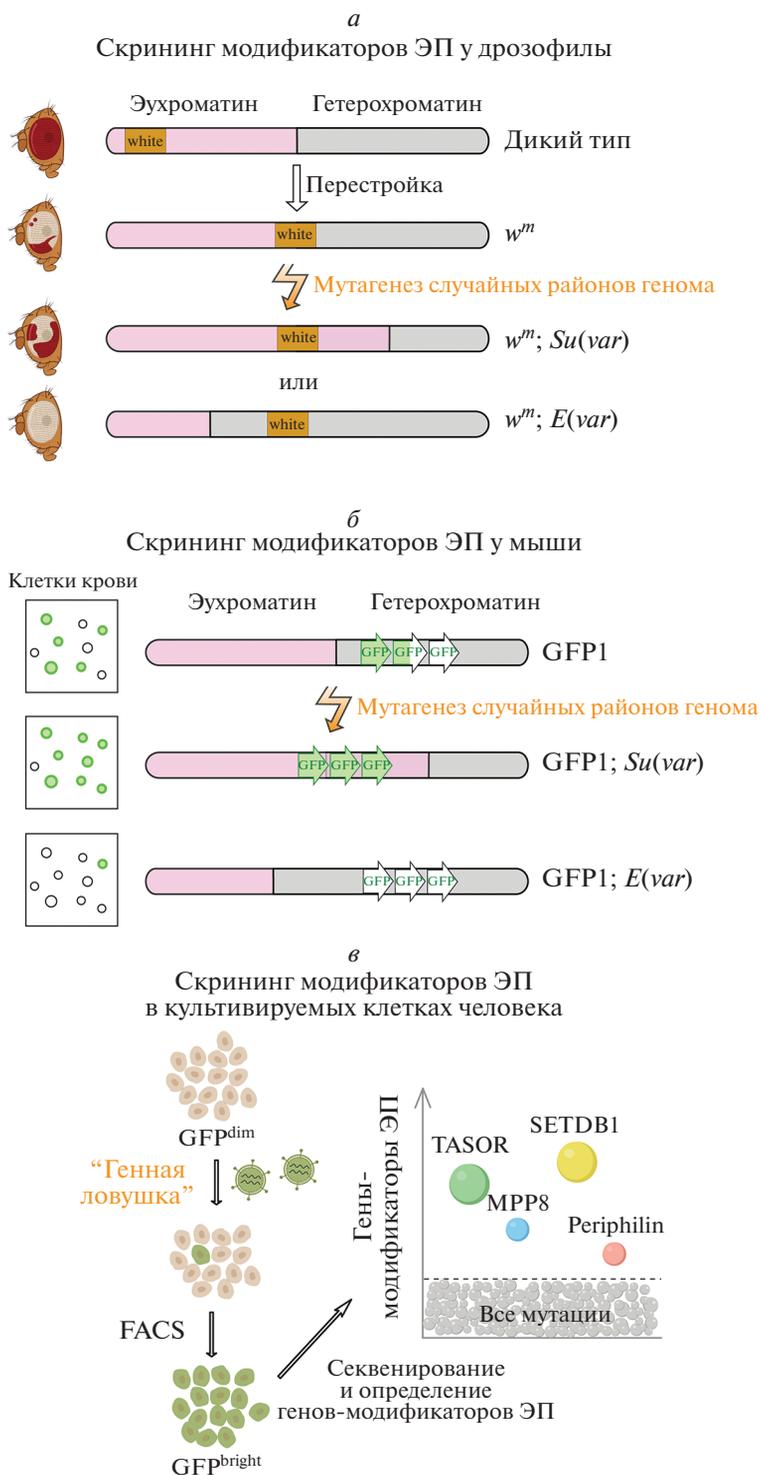


Рис. 3. Схемы скрининговых экспериментов по поиску генов-модификаторов ЭП у дрозофилы (*a*), мыши (*b*) и в культивируемых клетках человека (*в*). GFP^{dim} – клетки с ЭП репортерного гена GFP ; GFP^{bright} – клетки с супрессией ЭП (усиление экспрессии) репортерного гена GFP . Наиболее эффективный способ выявления генов-модификаторов в указанных подходах – инсерционный мутагенез при помощи специальных трансгенных конструкций, позволяющих легко идентифицировать поврежденные гены. Модифицировано по [70] с разрешения издателя.

ЭП генов [190]. Этот факт дополнительно свидетельствует о значении баланса между компонентами активного и репрессированного хроматина в клетке и факторов, обеспечивающих их разграничение во времени и пространстве.

С целью выявления генов мыши, способных быть модификаторами ЭП, проведен крупномасштабный генетический скрининг на основе тандемной вставки GFP-экспрессирующего трансгена, показывающей фенотип мозаичного ЭП [74, 75] (рис. 3б). Выявлены и охарактеризованы примерно 40 генов-модификаторов ЭП мыши, значительная часть которых оказалась ортологичной модификаторам ЭП у дрозофилы [76]. Выявленный с помощью этого скрининга белковый комплекс модификаторов ЭП мыши назван MommeD [74]. В его состав входят гистон-метилтрансферазы SUVAR39H1 и SETDB1 [191–193], гистон-деацетилаза HDAC1 [194], хроматин-ремоделирующие факторы SMARCA5, SMARCC1, PBRM1 и BAZ1B [195], регулятор транскрипции TRIM28 [196], фактор транскрипции KLF1 [197], ДНК-метилтрансферазы DNMT1 и DNMT3B [198, 199]. Выявлено также несколько новых генов-модификаторов ЭП мыши: *Smchd1*, *Rlf* и *D14Abblе* (последний ортологичен гену *TASOR* человека (см. ниже)) [200]. Только три белка из этого списка не имеют ортологов у дрозофилы, это ДНК-метилтрансферазы DNMT1, DNMT3B и SMCHD1, которые участвуют в поддержании инактивации хромосомы X самок, опосредованной метилированием CpG-островков [201].

Подобный скрининг по выявлению генов-модификаторов ЭП человека проведен в 2015 году с использованием культивируемых клеток, содержащих условно гаплоидный набор хромосом, и метода геной ловушки (gene trap) [202, 203]. С целью выявления новых доминантных модификаторов ЭП в клетках человека получен набор встроок GFP-трансгенов, демонстрирующих ЭП [200] (рис. 3б). В результате этого скрининга выявлены четыре гена-модификатора ЭП, один из которых, *SETDB1*, кодирует гистон-метилтрансферазу и является гомологом такого же гена мыши, функция которого – установление репрессирующей гистоновой метки H3K9me3 [204]. Функция модификаторов ЭП у остальных трех генов выявлена впервые. Подтверждено, что белковые продукты этих генов человека входят в один репрессорный комплекс, названный HUSH (HUmAn Silencing Hub). В состав этого комплекса входят белки *TASOR* (Transgene Activation SuppressOR), хромодомен-содержащий фосфопротеин MPP8 и *Periphilin*. Фосфопротеин MPP8 связывается с гистон-метилтрансферазой *SETDB1* [205], а его хромодомен распознает и связывает гистоновую метку H3K9me3 [206]. Это позволяет предположить, что комплекс HUSH человека может осуществлять гетерохроматинизацию с использова-

нием механизма чтения–записи, работающего у дрозофилы, одновременно обеспечивая функциональную связь этого процесса с механизмами репрессии, опосредованной метилированием ДНК [204].

Таким образом, говоря о формировании репрессированных доменов хроматина, следует рассуждать категориями взаимосвязанных молекулярных механизмов установления, распознавания и поддержания эпигенетического состояния, координации этих процессов с другими жизненно важными процессами клетки. К настоящему времени известно более 10 основных эволюционно стабильных сигнальных путей, через которые осуществляются оперативные и долговременные ответы эукариотической клетки на внешние и внутренние сигналы (Pathway Interaction Database <http://pid.nci.nih.gov>, <http://www.ndexbio.org/>). Их анализ показал, что многие белки-модификаторы ЭП вовлечены в эти сигнальные пути, а нарушения в соответствующих генах связаны с различными заболеваниями [70] (табл. S1 Приложения).

В целом, результаты изучения молекулярной функции генов-модификаторов ЭП и механизмов репрессии предполагают, что в клетках эукариот существует ряд альтернативных механизмов, способных устанавливать эпигенетически репрессированное состояние хроматина. В различных типах ГХ репрессия обусловлена разными наборами белков, однако некоторые из них могут быть взаимозаменяемыми. Сам феномен ЭП до сих пор остается уникальной моделью, позволяющей изучать как отдельные функциональные звенья, так и процессы установления эпигенетического статуса хроматина.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ГЕНОМА

Считается, что последовательности ДНК, регулирующие работу генома, занимают значимую часть генома эукариот [207–210]. К основным регуляторным элементам относятся: промоторы, инсуляторы, энхансеры и сайленсеры. Эти элементы способны существенно влиять на уровень экспрессии гена: нуклеотидный состав и архитектура промоторной области определяют уровень, время и тканевую специфичность активности гена. Энхансерные элементы генома способны усиливать экспрессию гена (при сохранении той же промоторной области) и обладают тканеспецифичностью. Инсуляторы, расположенные между энхансером и промотором, блокируют взаимодействие этих элементов. Сайленсерами называют те участки ДНК, с которых начинается сборка и распространение репрессированного состояния хроматина. Одно из главных свойств регуляторных элементов – способность изолированно осуществлять свою функцию. Эти элементы узнаются ДНК-связывающими и хроматин-модифициру-

щими белками, они участвуют также в поддержании доменной организации генома [208, 209, 211]. С разработкой методики фиксации пространственной конформации хромосом (Hi-C) [212] стало ясно, что даже линейно удаленные *cis*-регуляторные элементы генома пространственно сближены с контролируемыми ими мишенями [213–216]. Так, взаимодействие линейно удаленных друг от друга промоторов и энхансеров обусловлено, по всей видимости, формированием крупномасштабных петель ДНК [217, 218].

Инсуляторы были открыты в геноме дрозофилы как последовательности ДНК, способные устанавливать границы между разными состояниями хроматина [219–222]. В настоящий момент инсуляторные мотивы и специфически связывающиеся с ними инсуляторные белки найдены у разных организмов [223, 224], но наибольшее их разнообразие обнаружено у дрозофилы [225]. Инсуляторные белки дрозофилы различаются по своим физическим и биохимическим свойствам. Белки Su(Hw), CTCF, BEAF-32, Ibf1, Ibf2, Pita, ZIFIC, Zw5/Dwg, GAF, Orbp и Clamp связываются со специфическими последовательностями ДНК [226, 227]. Так, удаленно расположенные инсуляторы *guru* образуют кластеры, локализованные на периферии ядра, а связывающийся с ними Su(Hw)-зависимый комплекс осуществляет взаимодействие с ядерной ламиной [211, 228]. Часть из этих белков (CTCF, Zw5/Dwg, Pita, ZIFIC, Orbp) способна образовывать гомодимеры [226, 229–231]. Белок CP190 и продукты гена *mod(mdg4)* не способны связываться со специфическими ДНК, но могут гомодимеризоваться при помощи доменов VTB/POZ [232, 233]. Кроме того, многочисленные изоформы MOD(MDG4) образуют гетеромультимерные комплексы, в том числе, с другими VTB/POZ-белками [225, 234]. Инсуляторные белки входят в состав мультисубъединичных комплексов [210, 225]. Полногеномный анализ сайтов связывания отдельных инсуляторных белков выявил их комбинации, характерные для конкретных локусов генома [211, 235, 236]. Описанные инсуляторы и инсуляторные белки изучены только у дрозофилы, в клетках же млекопитающих пока обнаружен только CTCF и его паралоги – BORIS (Brother Of Regulator of Imprinted Sites)/CTCF1 и CTCF2 [237, 238]. Молекулы белка CTCF, встречающегося у многих эукариот, могут взаимодействовать друг с другом, формируя кластеры и способствуя образованию закрытых хроматиновых доменов [239, 240]. Показано, что направление дальних взаимодействий внутри топологически ассоциированных доменов (ТАДов) человека и млекопитающих определяется ориентацией мотивов ДНК, связывающих белок CTCF [217, 241].

Формирование и динамика архитектуры ядра в большой степени зависит от процесса экстрезии

петель хроматина [242, 243]. Один из основных факторов, участвующих в этом процессе в клетках млекопитающих – белковый комплекс когезин, способный физически выталкивать петли ДНК вплоть до сайтов локализации CTCF [244–246]. Показано, что когезин необходим для правильного формирования ТАДов и поддержания границ между активными и репрессированными компартментами генома [247]. Однако и в отсутствие когезина в клетках млекопитающих сохраняются отдельные крупные ТАДы [247]. В то же время, у дрозофилы до сих пор не найдено механизма экстрезии петель хроматина, подобного когезинзависимому механизму у млекопитающих [248]. Существуют данные, свидетельствующие о том, что инсуляторы не только участвуют в формировании границ крупных консервативных ТАДов (см. раздел “Геномная компартментализация”), но и вовлечены в организацию динамических и тканеспецифических суб-ТАДов [249, 250]. Сравнительно недавно показана также связь инсуляторов и инсуляторных белков с процессом репликации. Например, инсуляторный белок дрозофилы Su(Hw) взаимодействует *in vivo* с субъединицами комплекса ORC и необходим для его рекрутирования на Su(Hw)-связывающие элементы [251, 252]. За последние годы установлено, что помимо канонических функций (архитектура ядра и регуляция транскрипции), инсуляторные комплексы выполняют дополнительные функции, они участвуют в паузировании РНК-полимеразы II, сплайсинге, экспорте мРНК и репарации ДНК [209, 210, 253, 254].

Сайленсерами названы отдельные элементы генома, способные, в отличие от энхансеров, подавлять транскрипцию. Впервые такие элементы были найдены у дрожжей [255, 256]. Функция сайленсеров, по-видимому, реализуется с участием гораздо более сложных, чем у энхансеров, многоступенчатых механизмов, детали которых во многом еще остаются неизученными [257, 258]. Классический и наиболее исследованный пример сайленсеров – PRE (Polycomb Response Elements), инициирующие сборку репрессированных белковых комплексов Polycomb, обеспечивая эпигенетическое наследование репрессированного состояния [259]. Ключевую ролью комплексов Polycomb считается поддержание наследуемого эпигенетического статуса районов генома, экспрессия генов в которых определяет специализацию клеток при дифференцировке, либо их плюрипотентное состояние [260–262]. У млекопитающих обнаружено разрушение доменов, образованных комплексом Polycomb, при когезинзависимой экстрезии петель, однако этот процесс не зависит от CTCF. При этом контакты, обусловленные взаимодействием суперэнхансеров, устойчивы к когезинзависимой экстрезии хроматина [247]. Известны мотивы ДНК, которые способны опосредованно привлекать ко-

репрессоры, не приводя при этом к долговременной репрессии и эпигенетической памяти, как это происходит в случае PRE. Например, транскрипционный фактор KRAB, специфично связывающийся посредством своих доменов цинковых пальцев с определенными мотивами ДНК в промоторных областях генов, способен привлекать корепрессор KAP1 и индуцировать формирование неактивной хроматина при помощи HP1/SU(VAR)3-9-зависимого механизма [263]. Известен особый класс лигандзависимых корепрессоров ядерных рецепторов. Эти корепрессоры способны выступать в роли как репрессоров, так и активаторов, в зависимости от конформации ядерного рецептора и локального контекста хроматина [264, 265]. Ключевую роль в этих процессах играют гистондеацетилазы, которые рекрутируются корепрессорами [265, 266]. Таким образом, через соответствующие транскрипционные факторы корепрессоры специфично привлекаются к местам активной транскрипции, где, по-видимому, осуществляют тонкую регуляцию уровня транскрипции, обеспечивая механизмы обратной либо сигналзависимой регуляции [267].

В недавних масштабных исследованиях в геномах дрозофилы, нематоды, мыши и человека выявлены десятки тысяч регуляторных элементов [208, 216, 268–271]. В частности, функциональный скрининг, выполненный на дрозофиле, показал, что в зависимости от локального окружения хроматина, ткани и стадии развития значительная часть регуляторных элементов может выступать и как сайленсер, и как энхансер. Делеция таких элементов зачастую вызывает нарушение функции соответствующих генов-мишеней [216]. С нарушением *cis*-регуляторных элементов связан широкий ряд заболеваний, при которых, в частности, наблюдается нарушение функции генов вследствие ЭП [272, 273].

Все сказанное хорошо укладывается в современную парадигму, согласно которой метаболизм генома представляет собой сложную иерархически организованную саморегулирующуюся машину, все уровни которой уравновешены и взаимосвязаны [274, 275]. Регуляторные элементы генома, по-видимому, играют важнейшую роль в этих процессах, однако для детального понимания функций регуляторных элементов в метаболизме генома необходимо еще существенный пласт исследований.

ГЕНОМНАЯ КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИЯ

Начало эры высокопроизводительного секвенирования ДНК и биоинформатических методов анализа открыло возможности полногеномного картирования с высоким разрешением различных компонентов хроматина (в частности, описанных выше) и их устойчивых комбинаций, ассоциированных с конкретными участками гено-

ма [249, 276–278]. В результате выполнения проектов ENCODE и modENCODE получены данные о профилях связывания различных белков и распределениях посттрансляционных модификаций гистонов в различных типах клеток дрозофилы, нематоды, мыши и человека (<https://www.encodeproject.org/>) [268, 269]. Подтвердились предположения о том, что профили связывания многих белков хроматина с геномной ДНК и ковалентные модификации самих молекул ДНК являются тканеспецифическими и в значительной мере определяют активность генов при развитии организма, формировании тканей и дифференцировке клеток. Кроме того, эти данные позволили выделить в изученных геномах функциональные хроматиновые домены – как стабильно эпигенетически наследующиеся и даже эволюционно консервативные, так и претерпевающие оперативные модификации при дифференцировке, нарушении развития и заболеваниях [270, 279–281].

Доменная организация хроматина – один из уровней регуляции экспрессии генов, важный механизм которого состоит в ограничении перекрестного влияния регуляторных элементов генома, находящихся в контрастных состояниях хроматина [282, 283] (см. раздел “Регуляторные элементы генома”). Неслучайное расположение материала хромосом внутри интерфазного клеточного ядра обнаружили еще в 1970-е годы. Методами радиоактивного мечения, а также FISH-гибридизации в 1980-е годы показано, что каждая хромосома занимает определенный пространственный компартмент в объеме ядра; эти компартменты названы хромосомными территориями [284–286]. Затем обнаружили, что обогащенные генами хромосомы, либо отдельные их участки, как правило, располагаются ближе к центру ядра, а обедненные – ближе к его периферии, и эта особенность эволюционно консервативна [287–291]. В дальнейшем выявили связь между удаленностью того или иного участка хромосомы от центра ядра и его GC-составом, временем репликации и активностью генов в данном участке [292–296]. Поскольку набор этих свойств характерен для большинства участков хромосом, располагающихся на периферии ядра и взаимодействующих с ядерной ламинной, эту зону выделили как отдельный ядерный компартмент, а связанные с ним участки хромосом назвали доменами, ассоциированными с ламинной (ЛАДами) [297, 298]. В составе ЛАДов обнаруживаются прицентромерные районы GX и часть теломерных районов хромосом [299–301]; показано специфичное обогащение ЛАДов гистоновыми метками репрессированного хроматина – H3K9me2/3 и H3K27me3 [299, 302]. Выявлены также участки ДНК размером 4–6 т.п.н., которые достаточны для связывания хроматина с ядерной ламинной и способствуют репрессии генов. Показано, что с такими последовательностями

ми связывается деацетилаза гистонов HDAC3 в комплексе с репрессором транскрипции сKrox и белком внутреннего слоя ядерной оболочки Lap2β, что, вероятно, инициирует установление и распространение репрессированного статуса в ЛАДах [303]. Другой белок внутреннего слоя ядерной оболочки, эмерин, связывает и каталитически активирует HDAC3 [304, 305]. Таким образом, в репрессивных механизмах в ЛАДах, по видимому, участвует также гистоновый код. Существует целый ряд работ, подтверждающий подавление экспрессии генов, входящих в ЛАДы, в различных модельных системах. Так, показано подавление транскрипции в теломерном локусе дрожжей при его контактах с ядерной мембраной, а также отдаление от ядерной мембраны Ig-локуса В-лимфоцитов человека перед его активацией [295, 296]. С другой стороны, активация транскрипции неактивных генов, расположенных в ЛАДах, сопровождается деконденсацией хроматина и перемещением соответствующих локусов от периферии ядра в его центр [306–308]. При ЭП транскрипция гена в каждой конкретной клетке коррелирует с удалением гена от места локализации сателлитной ДНК в ГХ, расположенной на периферии ядра [309].

При том, что контакты отдельных участков хроматина с ядерной ламиной динамичны и взаимосвязаны с экспрессией генов, изучение процесса дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши выявило конститутивные ЛАДы и интер-ЛАДы – районы генома, которые стабильно контактируют или не контактируют с ядерной ламиной, а также факультативные ткане- и стадиейспецифичные ЛАДы [306, 310]. Конститутивные ЛАДы оказались районами ГХ, наиболее обедненными генами; их характеризует также АТ-богатый состав и насыщенность длинными диспергированными повторами (Long Interspersed Nuclear Element, LINE) и консервативность их протяженности и расположения в геномах мыши и человека [310]. Исходя из этого предполагается, что конститутивные ЛАДы выполняют роль некоего якорного каркаса для пространственной организации ДНК генома внутри эукариотического ядра [300].

Помимо ЛАДов, весома́я доля районов ГХ найдена еще в одном ядерном компартменте, названном ядрышко-ассоциированными доменами (Nucleolus-Associated Domains, NAD) [311, 312]. Кроме локусов генов рРНК, которые, как долго считалось, образуют ядрышко, этот компартмент также содержит участки ГХ практически всех хромосом [313]. Обнаружено большое перекрытие между ЛАДами и NAD [311, 313]. NAD также обогащены репрессирующими метками гистонного кода, большинство генов в них неактивны. Предполагают, что в ЛАДах и NAD хроматин находится в одном и том же, репрессированном, состоя-

нии, а распределение конкретных неактивных районов генома между этими компартментами происходит случайным образом. Так, показано, что некоторые участки хромосом, ассоциированные с ядрышком в материнской клетке, могут после митотического деления оказываться на периферии ядра в дочерних клетках [311, 313]. Ряд данных говорит о том, что локализация определенных участков генома в NAD тесно связана с возрастом и старением [314, 315].

Разработка методов фиксации конформации хромосомы – от 3С до Hi-C – открыла возможность сопоставить данные о составе хроматиновых доменов с их взаимным расположением в ядре на уровне всего генома [218, 316, 317]. Выявляемые этими методами контактные домены – ТАДы – часто содержат в своем составе топологические структуры более низкого порядка, называемые суб-ТАДами [318]. Так, построена карта топологических взаимодействий хроматина с высоким разрешением (до 4 т.п.н.) в эмбриональных стволовых клетках и клетках-предшественниках нейронов человека [319]. Установлено, что контакты чаще происходят между областями хроматина внутри ТАДов, чем между областями генома, входящими в разные ТАДы [320]. ТАДы устойчиво сохраняют свои границы в процессе развития организма и дифференцировки клеток [318]. Более того, принципы организации генома в контактные домены консервативны у разных видов – от дрозофилы до млекопитающих [321]. ТАДы колокализируются с временными доменами репликации [322], определяют уровень транскрипции генов, входящих в них, и служат барьером, разграничивающим активность генов, принадлежащих другим доменам [250]. Оказалось, что каждый ТАД содержит характерный преобладающий набор эпигенетических маркеров, соответствующий определенному состоянию хроматина [211]. С использованием метода, совместившего Hi-C и DamID, недавно показали, что ЛАДы соответствуют неактивной фракции ТАДов (доменам типа В), а снижение количества ламина приводит к перемещению части ЛАДов в активную фракцию ТАДов (домены типа А) [323]. Предполагают, что миграция районов генома в ЛАДы из активного домена типа А способствует ограничению доступа транскрипционных факторов к промоторам генов, расположенных в ЛАДах [324]. Нарушения ядерной компартментализации и границ ТАДов выявляют при различных заболеваниях человека и разных видах рака [250, 325–327]. Все эти данные указывают на важность изучения не только нарушений функции отдельных генов, но и отслеживания эпигенетических эффектов, в частности, пространственной организации генома внутри ядра.

Недавно обнаружили существенную роль биофизических свойств хроматина в его простран-

ственной организации внутри ядра [328]. Выявлены характеристики ГХ доменов, сходные со свойствами капель жидкости, которые обусловлены высокой склонностью белка HP1 к олигомеризации и физическими свойствами таких конгломератов [329–331]. На данный момент эти свойства объясняют динамическую устойчивость районов ГХ и присущий им эффект “спрединга”. Очищенные белки HP1а дрозофилы и HP1 α человека *in vitro* способны к разделению жидких фаз (Liquid-Liquid Phase Separation, LLPS) и самопроизвольно-му формированию безмембранных обособленных капель [330]. В ядре, по-видимому, за счет фазового разделения транскрипционные факторы задерживаются на поверхности таких ГХ капель, в то время как связанная с нуклеосомами ДНК проникает внутрь капель беспрепятственно [330, 332, 333]. Предполагают, что ГХ капли могут сливаться, даже если они сформировались на отдаленных участках генома [334, 335]. Домены активного хроматина также формируют компартменты с жидкостными свойствами, которые заключают в себе машину транскрипции и склонны к слиянию, сближая, например, промоторы с энхансерами [336, 337]. В этой связи стоит отметить, что у млекопитающих обнаружены суперэнхансеры – регуляторные элементы очень большой протяженности (с медианным размером в несколько десятков т.п.н.), которые состоят из наборов отдельных энхансерных элементов, способных взаимодействовать друг с другом в пространстве и интегрально усиливать транскрипционную активность множественных генов-мишеней [338]. Количество суперэнхансеров в клетке на 1–2 порядка меньше обычных энхансеров, при этом их мишенями часто становятся гены, определяющие идентичность клетки [338, 339]. Функционирование суперэнхансеров определяется способностью транскрипционных мастер-факторов (master transcription factors) привлекать хроматин-ремоделирующие факторы, коактиваторы, в том числе способные ковалентно модифицировать гистоны, а также другие факторы транскрипции [338, 340]. Высокая локальная концентрация по крайней мере некоторых из перечисленных факторов обеспечивает разделение жидких фаз и пространственную компартиментализацию суперэнхансеров и сближенных с ними промоторов генов-мишеней [338–340]. Комбинация методик фазового разделения хроматина и Hi-C открыла возможность сравнительного анализа всех типов пространственных взаимодействий внутри ядра. Оказалось, что как домены активного и репрессированного хроматина, так и ТАДы, ранжируются по стабильности и длительности существования [341].

Таким образом, процессы, которые регулируются пространственной структурой генома, взаимосвязаны с процессами установления пространственной структуры хроматина в ядре, по-видимо-

му, в обоих направлениях. Развитие современных методов исследований сформировало базу для разработки новых методов масштабного изучения и сравнительного анализа как роли локального состояния хроматина, так и отдельных функциональных элементов генома в регуляции экспрессии генов. Эта база может широко использоваться для изучения эпигенетических эффектов, в частности генов ЭП, у различных организмов.

КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭФФЕКТА ПОЛОЖЕНИЯ ГЕНА

При заболеваниях человека, связанных с ЭП генов, наблюдается перемещение (путем перестроек) регуляторных элементов либо их удаление (в результате делеции), а также перемещение гена посредством перестроек и делеций в контрастное состояние хроматина. Кроме того, выявлены различные отклонения в формировании ГХ: нарушение экспрессии генов, обусловленное их гетерохроматинизацией (при перестройках либо в результате локальной экспансии (увеличения числа) повторенных последовательностей); сверхэкспрессия генов, связанная с уменьшением количества ГХ [342, 343].

В число заболеваний человека, связанных с ЭП генов, входят некоторые виды рака, патологии развития, чаще всего вызванные перестройками хромосом (транслокациями, инверсиями и делециями), в том числе соматических, и широкий ряд нейродегенеративных заболеваний, обусловленных экспансией коротких повторов в промоторных областях определенных генов. Злокачественные гемопатии, как правило, возникают вследствие приобретенных соматических перестроек, чаще всего, транслокаций. При этих заболеваниях вовлеченный в перестройку ген зачастую подпадает под влияние энхансерной либо же промоторной области другого гена, что приводит к изменению уровня и паттерна экспрессии первого гена [344]. В качестве типичного примера можно привести неходжкинскую лимфому Беркитта, при которой ген *c-MYC* (Хр. 8) в результате транслокации попадает под влияние энхансера гена тяжелой цепи иммуноглобулина в хромосоме 14, что приводит к сверхэкспрессии *c-MYC* в В-лимфоцитах [345]. Подобные случаи ЭП, связанные с влиянием чужеродных регуляторных элементов, выявлены в случае генов *BCL2* при фолликулярной лимфоме и *BCL6* при диффузной В-крупноклеточной лимфоме [346, 347]. Еще один пример заболеваний, обусловленных перемещением гена в другое состояние хроматина – медуллобластомы 3 и 4 групп, наиболее частая причина детской смертности от рака. При медуллобластомах выявлена сверхэкспрессия генов *GFI1* и *GFI1B*, которые переносятся соматическими перестройками из репрессированных районов генома в области,

обогащенные ацетилированными H3K9 и H3K27, ассоциированные с суперэнхансерами [348].

Ряд заболеваний, входящих в класс заболеваний со сбалансированными хромосомными аберрациями (ВСА), связан с перестройками, точки разрыва которых расположены на расстоянии до 400 т.п.н. как выше, так и ниже гена, подверженного ЭП в результате этих перестроек [349, 350]. В отдельных случаях ЭП может, по-видимому, распространяться на 1 млн.п.н. и даже более от точки разрыва перестройки (табл. S2, см. Приложение на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2022/3/supp_Boldyreva_rus). Что интересно, на расстоянии от 400 до 800 т.п.н. от точек разрыва хромосомных перестроек не находили. Это может объясняться присутствием критических регуляторных элементов в этих областях (вероятно, суперэнхансеров), поскольку их удаление приводит к летальным нарушениям. Вторым объяснением может быть роль пространственной структуры хроматина, а не *цис*-элементов, нарушение которой может существенно влиять на ядерную компартментализацию. На текущий момент известно около 40 синдромов и заболеваний человека, которые развиваются при нарушении экспрессии генов в результате ЭП, для большинства из этих генов найдены мутации со сходными фенотипическими проявлениями [343].

Еще одна распространенная причина заболеваний, связанных с ЭП генов, — изменение числа tandemных повторов в промоторных или 5'-нетранслируемых районах генов, что приводит к нарушению их экспрессии [98, 351]. В настоящее время известно около 50 таких заболеваний человека (чаще всего дегенеративных), которые характеризуются тяжелым течением, тогда как эффективных методов их лечения и предотвращения пока не существует. Повторяющиеся последовательности составляют по различным оценкам от 50 до 70% генома человека [352, 353]. К tandemным повторам относятся такие участки генома, в которых две и более копии повторной последовательности ДНК ориентированы голова-к-хвосту. По длине повторенного мотива (единицы повтора) эти последовательности делят на микросателлиты (повтор 1–6 п.н.), минисателлиты (7–100 п.н.) и макросателлиты (100 п.н. и более) [351, 354, 355]. Самые короткие tandemные повторы (тринуклеотиды) составляют 1–3% протяженности генома человека [352, 355]. Микросателлитами часто обогащены промоторные районы генов [356, 357], включая гены, существенные для нейrogenеза, дифференцировки нейронов, развития нервной системы и адгезии клеток [358]. Наиболее распространенные в геноме человека микросателлиты (более трети всех микросателлитов, 36.4%) представлены A/T-богатыми мотивами, а в промоторных областях генов человека часто локализуется CCG/CGG (74% случаев этого сателлита в геноме), хотя его

представленность в геноме в целом очень невелика (менее 1% от всех обнаруженных микросателлитов) [357]. Похожий мотив CCG/CGGG обнаруживается преимущественно (62%) также в промоторных областях генов человека. Микросателлиты CCG/CGG высоко консервативны у млекопитающих, тогда как другие G/C-богатые мотивы не относятся к консервативным [359]. Экспансия именно CCG/CGG часто приводит к развитию заболеваний, связанных с гетерохроматинизацией генов в результате ЭП (табл. S3). По числу копий все tandemные повторы в одних и тех же геномных локусах сильно варьируют у разных лиц и могут влиять на уровень активности генов [94, 356–358, 360–364]. Механизм репрессии генов, подверженных гетерохроматинизации в результате экспансии сателлитов, по-видимому, аналогичен механизмам инактивации tandemных вставок трансгенов, которая осуществляется эпигенетически и приводит к гетерохроматинизации как самих повторенных последовательностей, так и прилежащих участков генома (генов) [365, 366]. Ключевую роль в этом процессе у млекопитающих играет метилирование ДНК GC-богатых повторов [94, 367, 368]. Считается, что число копий tandemных повторов может легко уменьшаться или увеличиваться за счет ошибок в ходе репликации или репарации ДНК, и неравной рекомбинации [98, 342, 369, 370]. Важно отметить, что частота других мутаций, например, однонуклеотидных замен (SNP) намного ниже, чем частота изменения числа копий коротких повторов в геноме [371–375]. Вклад различных tandemных повторов в развитие заболеваний, связанных с расстройствами аутистического спектра (ASD, Autistic Spectrum Disorders) оценен в недавних работах [376, 377]. Анализ 17231 геномов индивидов с вновь диагностированными ASD, членов семей с больными ASD, а также здоровых людей (популяционный контроль) с использованием алгоритма ExpansionHunter Denovo, детектирующего повторы с длиной мотива от 2 до 20 п.н., выявил 37865 tandemно повторенных мотивов в 31793 разных локусах генома человека. В богатых генами участках генома tandemные повторы наиболее часто обнаруживались в областях, прилежащих (на расстоянии около 1 т.п.н.) к точкам инициации транскрипции либо в 5'-нетранслируемых областях. Интересно отметить, что 2588 участков генома с экспансией tandemных повторов, выявленных в этой работе у индивидов с ASD, находятся в генах, вовлеченных в развитие нервной и сердечно-сосудистой систем, а также мышечной ткани [99]. С помощью биоинформатического метода MonSTR показано возникновение 35 новых полиморфных tandemных повторов, из которых 25 найдены в геномах больных ASD. Большинство таких повторов локализовано вблизи генов *PDCD1*, *KCNB1*, *AGO1*, *CACNA2D3*, *FOXP1*, *RFX3* и *MED13L*, мута-

ции в которых, как показано ранее, ассоциированы с заболеваниями ASD [376]. Результаты еще одного сравнительного анализа 544 геномов подтвердили, что значительная часть уникальных локусов CCG/CGG-микросателлитов (всего в геноме человека их чуть более 6000) расположена в 5'-нетранслируемых областях генов (1836), экзонах (1529) или в непосредственной близости от промоторных областей (849). Такие повторы идентифицированы либо внутри генов, либо рядом с ними (всего 4370 генов), 410 из этих генов, как показано ранее, связаны с заболеваниями нервной системы человека [377].

Молекулярные механизмы патогенеза заболеваний, связанных с ЭП, нередко имеют комплексную природу, в них может участвовать не только ЭП, но и другие нарушения, что осложняет выявление роли ЭП. Так, недавно обнаружили дополнительные механизмы лице-плече-лопаточной миодистрофии Ландузи–Дежерина – считающегося классическим примером ЭП. Снижение числа копий теломерных повторов, наблюдаемое при этом заболевании, приводит к уменьшению количества GX и сверхэкспрессии генов в норме репрессированных теломерным GX. У здоровых людей в прителомерном районе хромосомы 4 находится около 100 копий макросателлита D4Z4 (единица повтора длиной 3.3 т.п.н.), в то время как у больных таких копий лишь 1–10 [378–381], и в клетках мышц повышена экспрессия генов *FRG1*, *FRG2* и *ANT1*, расположенных рядом с областью повторов D4Z4 [382]. Исходя из данных, полученных на мышечных моделях, предположили, что наиболее вероятной причиной появления симптомов миодистрофии Ландузи–Дежерина можно считать сверхэкспрессию гена *FMRI* [383], которая сопровождается также нарушением сплайсинга генов, специфичных для мышц [384].

Экспансия микросателлитных повторов приводит к развитию ряда моногенных заболеваний человека (табл. S3 Приложения). Заболевание проявляется, когда экспансия превышает некий критический пороговый уровень, который сильно варьирует и специфичен для конкретной патологии. Одним из первых таких заболеваний стал синдром Мартина–Белл (синдром ломкой X хромосомы), при котором умственная отсталость сопровождается также нарушениями аутистического спектра [385]. В норме число тринуклеотидов CGG в 5'-нетранслируемой области гена *FMRI* варьирует от 5 до 44, тогда как у больных находят более 200 копий CGG [386, 387]. Репрессия гена *FMRI* обусловлена гиперметилированием промотора и 5'-нетранслируемой области этого гена [388]. Ген *FMRI* кодирует РНК-связывающий белок FMRP, участвующий в метаболизме (трансляции, транспорте и стабильности) мРНК [389]. Недавно в модельной системе показали возмож-

ность участия микроРНК в механизме репрессии гена *FMRI* [390], что также свидетельствует о сложных молекулярных механизмах ЭП, связанных с экспансией микросателлитов.

Понимание молекулярных механизмов ЭП имеет большое значение и для выявления и лечения ретровирусных инфекций, в первую очередь, ВИЧ. ВИЧ не только активно реплицируется в инфицированных Т-лимфоцитах, он может переходить в латентную фазу вплоть до недетектируемого уровня, в результате чего сохраняется в клетках человека и способен проявить себя по окончании антиретровирусной терапии (АРТ) [96, 391]. ВИЧ может переходить в латентное состояние на двух этапах: пре- и постинтегративном. Прединтегративное (эписомное) латентное состояние возникает, когда цикл репликации ВИЧ прерывается до события интеграции вирусной кДНК в геном клеток человека [392]. Эписомная кДНК ВИЧ может быть линейной или кольцевой, но обычно она обнаруживается в течение недолгого времени, хотя такие формы провируса способны и дольше сохраняться в макрофагах или в клетках головного мозга, тем не менее, клинически эти формы менее значимы, чем интегративная латентность ВИЧ [393–395]. Интегративная латентность ВИЧ возникает в результате блокировки ядерного экспорта вирусной РНК и трансляции белков вирусной оболочки. В значительной степени ВИЧ подавляется еще на уровне транскрипции, что делает провирус трудно детектируемым [396–398]. Для элиминации клеток с латентными провирусами применяют соединения-реактиваторы, которые запускают процессы репликации и наработки вирусных частиц в клетке, делая ее уязвимой для АРТ. Однако оказалось, что вследствие влияния локального окружения хроматина и регуляторных элементов генома такие препараты активируют только определенные группы провирусов, а значительная их часть сохраняется в латентном состоянии [399]. На сегодняшний день это является главной причиной, затрудняющей полное удаление ВИЧ. Поэтому изучение эпигенетических механизмов инактивации провируса ВИЧ служит целям поиска и разработки новых подходов к диагностике и лечению ВИЧ-инфекции. Значительный прогресс обеспечило использование штрихкодированных провирусов ВИЧ, основанное на методе TRIP (см. раздел “Новые методы изучения эффекта положения”). Этот метод позволяет не только определить места встраивания ретровируса в геном и детектировать уровень его экспрессии в зависимости от локального окружения хроматина, но также выявить предрасположенность к выходу из латентного состояния при применении того или иного реактивирующего соединения [391].

Транскрипция ВИЧ представляет собой сложный механизм, в котором участвуют как вирусные, так и клеточные факторы. Провирус ВИЧ нарабатывает короткие зрелые транскрипты, кодирующие трансактиватор (TAT) и регулятор экспрессии вириона (REV). Когда количество трансактиватора TAT достигнет определенного порога, он связывается с вирусной РНК, инициируя транскрипцию на промоторе провируса путем рекрутирования комплекса факторов элонгации (P-TEFb), состоящего из циклинзависимой киназы 9 (CDK9) и циклина T1 [400, 401]. Для активации РНК-полимеразы II должно произойти высвобождение CDK9 и связывание NELF (Negative Elongation Factor) и DSIF (DRB Sensitivity Inducing Factor) [402]. TAT также связывает белок PBAF (Polybromo-associated BRG-Associated Factor), ремоделирующий хроматин, который, по видимому, обеспечивает открытую конформацию хроматина в месте встраивания провируса [403]. Нарушения этого механизма активации провируса приводят к переходу ВИЧ в латентное состояние. Так, фосфорилирование TAT киназой CDK2 приводит к задержке инициации транскрипции провируса [404]. Транскрипция провируса также зависит от наличия и соотношения транскрипционных факторов и транскрипционных репрессоров клетки-хозяина. Ядерный фактор NF-κB, участвующий в активации Т-клеток, может активировать транскрипцию ВИЧ даже в отсутствие белка TAT [405]. В таких клетках включается механизм обратной регуляции, опосредованный NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells), и накапливается фосфорилированная форма TAT [406, 407].

В инактивацию провируса ВИЧ вовлечен ряд белков, участвующих в процессах эпигенетической репрессии. В их число входят YY1 и LSF [408], которые действуют как модификаторы ЭП. Фактор CBF способен связываться с промотором провируса ВИЧ и эпигенетически подавлять транскрипцию, рекрутируя гистон-деацетилазы [409, 410]. Показана существенная зависимость активности провирусов от эпигенетического состояния хроматина в районах встроок и влияние метилирования CpG в промоторе провируса ВИЧ, которое препятствует доступу транскрипционных факторов [90, 411]. Показано, что вставки провируса ВИЧ чаще происходят в районы открытого хроматина [412–414]. Недавно обнаружили, что эндогенные ретровирусы (остатки копий ретровирусов, внедрившихся в геномную ДНК когда-либо ранее) человека могут взаимодействовать с экзогенными вирусами, включая ВИЧ. Возможна как сборка химерных вирусных частиц из белков и РНК эндогенных и экзогенных вирусов, так и реактивация латентного провируса [415–417]. Кроме того, эти события могут приводить к интеграции в геном кДНК невирусного происхождения [418].

Для группы ретровирусов человека hsERV показано, что остатки ретровирусов в геноме млекопитающих могут играть роль энхансеров эндогенных генов [419]. Предполагается, что в эволюции белоккодирующих генов [419] они играют роль, сходную с ролью тандемных повторов [363]. В связи с этим разрабатываются альтернативные терапевтические стратегии, направленные на эпигенетическую инактивацию провирусов в геноме инфицированных клеток [397].

НОВЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ЭФФЕКТА ПОЛОЖЕНИЯ

В последние десятилетия кардинально расширились возможности изучения и анализа влияния локального окружения хроматина на экспрессию генов. Методы, основанные на анализе корреляций экспрессии генов и полногеномных профилей распределения белков хроматина, позволяют выявлять закономерности на уровне всего генома (см. раздел “Геномная компартиментализация”). С другой стороны, совершенствуются методы создания и внедрения генно-инженерных конструкций, а также культивирования клеточных линий различного происхождения и генотипа. Революционными стали методы мультиплексного анализа TRIP и MPRA (Massive Parallel Reporter Assay), основанные на использовании ДНК-штрихкодов и позволяющие одновременно анализировать экспрессию одного и того же репортерного гена во множестве разных локальных хроматиновых контекстов и функционирование множества разных вариантов регуляторных последовательностей [72, 216, 271] (рис. 4а). С помощью этих подходов определена способность различных *cis*-регуляторных мотивов ДНК влиять на активность близлежащих и удаленных генов, которая в большой степени варьирует в зависимости от типа клеток и значительно зависит от локальной конформации хроматина [420].

На основе MPRA получил новый виток развития такой классический метод изучения состояния хроматина, как определение плотности упаковки нуклеосом [421, 422] (рис. 4б). В частности, показана зависимость между посадкой различных факторов транскрипции и формированием закрытого либо открытого состояния хроматина на промоторах разного типа [423]. А один из новых методов, MIAA (Multiplexed Integrated Accessibility Assay), позволил массово анализировать способность различных мотивов ДНК формировать открытую конформацию хроматина, которая, как правило, связана с активацией экспрессии генов [424]. В этой методике химеры исследуемых белков с ДНК-аденин-метилтрансферазой *Dam Escherichia coli* метилируют GATC-мотивы в геномной ДНК. Усовершенствованный вариант этого метода – MadID, основан на использова-

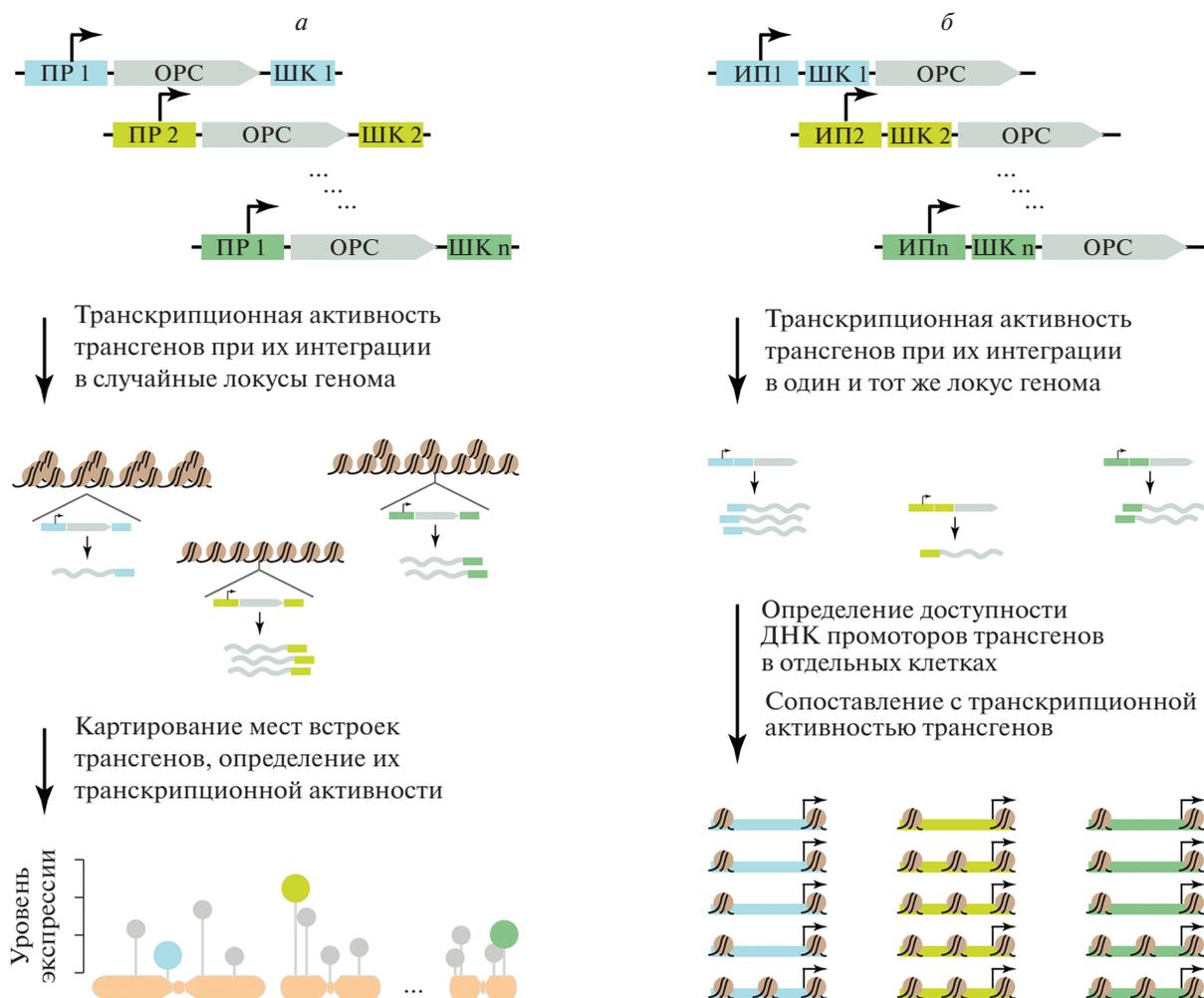


Рис. 4. Принцип и возможности экспериментальных подходов TRIP и MPRA. *a* – Штрихкодированные репортерные конструкции, которые содержат ограниченный набор разных промоторных элементов, интегрируются в случайные локусы генома клеток при помощи векторов на основе ДНК-транспозонов или лентивирусов. В дальнейшем картируют сайты вставок репортерных конструкций и определяют уровень их транскрипционной активности. *б* – Штрихкодированные конструкции, несущие огромное разнообразие последовательностей промоторных элементов, интегрируются в один и тот же локус генома посредством гомологичной или сайт-специфической рекомбинации. Последующие измерения степени доступности промоторной ДНК могут быть выполнены на единичных клетках. Штрихкоды служат универсальными метками как последовательностей ДНК (*a* и *б*), так и сайтов их локализации в геноме (*a*). ПР – промотор, ШК – штрихкод, ИП – исследуемая последовательность ДНК, ОРС – открытая рамка считывания.

нии неспецифичной ДНК-аденин-метилтрансферазы *M.EcoGII E. coli*, что позволяет идентифицировать контакты исследуемого белка с геномной ДНК практически в любом хромосомном контексте, в частности, в участках ГХ, обедненных мотивами GATC [425].

Современный арсенал методов молекулярной генетики позволяет использовать различные подходы и их комбинации для функциональной диссекции механизмов ЭП, и выявлять роль отдельных генов и их продуктов в этих механизмах. Так, проведенные за последнее десятилетие крупномасштабные скрининговые исследования с использованием генных ловушек позволили выявить

и охарактеризовать несколько десятков генов-модификаторов ЭП у млекопитающих, включая человека [74–76, 195, 200] (рис. 3б, 3в). Вставки репортерных конструкций различного дизайна в геномы культивируемых клеточных линий используются для изучения способности конкретных участков генома влиять на уровень экспрессии генов и вызывать их ЭП [77–80]. Системы регулируемой индукции экспрессии репортерного гена позволяют точно определить ту интенсивность экспрессии трансгена, которая может противостоять гетерохроматинизации при ЭП. Так, с использованием системы на основе дрожжевых белков GAL4 и термочувствительного варианта белка GAL80^{ts}

(ингибитор GAL4) показано, что увеличение экспрессии репортерного трансгена в 100 и более раз от фонового уровня препятствует ГХ репрессии в случае *транс*-инактивации, вызываемой инверсией *In(2)A4* у дрозофилы [426].

В качестве удобной модели для функциональной диссекции механизмов генной репрессии у человека используют культивируемые клетки, содержащие условно гаплоидный набор хромосом [427]. Для поиска генов, вовлеченных в изучаемый молекулярный механизм, разработаны несколько вариаций метода генной ловушки. Этот метод заключается в массовом повреждении генов лентивирусными вставками с последующим функциональным скринингом и идентификацией сайтов вставок провирусов (поврежденных генов) [202, 203]. Большие возможности для изучения ЭП у человека открывает молекулярная характеристика сбалансированных хромосомных аномалий (Balanced Chromosomal Abnormalities, ВСА). Анализ геномов пациентов с ВСА позволяет, в частности, обнаружить скомпенсированные случаи ЭП и определить хромосомные перестройки, а также возможное образование химерных транскриптов в результате хромосомных перестроек, с точностью до нуклеотида [326, 428, 429].

Третье поколение технологий секвенирования ДНК (TGS) открыло возможности непрерывного прочтения длинных последовательностей, в том числе, высоко повторенных фрагментов ДНК (Pacific Biosciences (PacBio) и Oxford Nanopore Technologies (ONT)), обеспечив, тем самым, прорыв в изучении роли tandemных повторов в развитии заболеваний человека. Так, сравнительный анализ более 500 индивидуальных геномов выявил более 6000 уникальных локусов повторов, значительная доля которых расположена в непосредственной близости к промоторным областям генов, а также сильно варьирует по длине. Такие повторы идентифицированы либо внутри, либо рядом более чем с 4000 генов, лишь десятая часть которых, как показано ранее, связана с заболеваниями нервной системы человека [377]. TGS открывает новые горизонты исследований распространения tandemных повторов в геноме человека и их роли в развитии различных заболеваний.

Получение и накопление больших массивов данных секвенирования геномов и необходимость сравнительного анализа данных, полученных от большого числа индивидов, влечет за собой активную разработку новых методов обработки и биоинформатического получения мета-данных. Например, с помощью метода MonSTR можно сравнивать данные полногеномного секвенирования выборки геномов, полученных от пациентов с подтвержденным диагнозом ASD и их родителей. Этот подход позволил также идентифицировать и охарактеризовать полиморфизмы коротких tandemных по-

второв, возникающих *de novo*, и связанных прежде всего с изменением числа таких повторов в конкретном локусе. Таким образом выявлено возникновение 35 новых полиморфизмов tandemных повторов, из которых 25 найдены в геномах больных ASD. Большинство таких полиморфизмов располагаются вблизи генов, мутации которых ассоциированы с заболеваниями класса ASD [376].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

История исследований ЭП гена насчитывает без малого 100 лет. Этот феномен демонстрирует фундаментальные различия между активным и репрессированным хроматином. ЭП генов представляет собой изменение лишь эпигенетического состояния, не связанного с мутациями или делециями самого гена. Различные виды ЭП удобно использовать для исследования и характеристики молекулярных процессов, лежащих в основе установления и переключения эпигенетического состояния. Современный арсенал методов полногеномных исследований и новые возможности массового молекулярного моделирования вместе с инструментами биоинформатического анализа открывают новые перспективы изучения эпигенетических механизмов генной репрессии и регуляции, в частности, с использованием ЭП гена как уникальной модельной системы.

Учитывая перспективы широкого внедрения генной инженерии и геномного редактирования как методов терапии генетических нарушений, необходимо иметь максимально точные представления о путях взаимного влияния генетического и эпигенетического уровня функционирования генома. Вводя трансгенные конструкции в ту или иную геномную локацию, нужно быть уверенным, во-первых, в безопасности и нейтральности такого внедрения для сохранения локального состояния хроматина, а во-вторых, обеспечить правильный уровень и паттерн экспрессии трансгена в условиях эпигенетического влияния локального геномного контекста. С этой, практической, точки зрения безусловно важно досконально понимать законы и механизмы эпигенетической регуляции и геномного метаболизма эукариотической клетки.

Авторы выражают благодарность А.А. Огиенко за помощь в подготовке и оформлении рисунков, М.Н. Егоровой за подготовку отдельных материалов. Первый автор выражает большую благодарность Е.С. Беляевой и И.Ф. Жимулеву за многолетнее научное руководство и мощную научную базу, а также Д.Е. Корякову за мудрые конструктивные замечания и Т.Д. Колесниковой за ценные советы по подготовке отдельных материалов обзора.

Подготовка данного обзора выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта №20-14-50398 (Funding: The reported study was funded by RFBR, project number 20-14-50398).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sturtevant A.H. (1925) The effects of unequal crossing over at the bar locus in *Drosophila*. *Genetics*. **10**, 117–147.
- Lewis E.B. (1950) The phenomenon of position effect. *Adv. Genet.* **3**, 73–115.
- Muller H.J. (1930) Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J. Genet.* **22**, 299–334.
- Dobzhansky T. (1936) Position effects on genes. *Biol. Rev.* **11**, 364–384.
- Demerec M. (1940) Genetic behavior of euchromatic segments inserted into heterochromatin. *Genetics*. **25**, 618–627.
- Muller H.J. (1932) Further studies on the nature and causes of gene mutations. *Proc. Sixth Int. Congr. Genet.* **1**, 213–255.
- Паншин И.Б. (1938) Цитогенетические аспекты эффекта положения генов *white (mottled)* и *cubitus interruptus*. *Биол. журн.* **7**, 838–868.
- Tartof K.D., Hobbs C., Jones M. (1984) A structural basis for variegating position effects. *Cell*. **37**, 869–878.
- Reuter G., Wolff I., Friede B. (1985) Functional properties of the heterochromatic sequences inducing wm4 position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*. **93**, 132–139.
- Прокофьева-Бельговская А.А. (1945) Гетерохроматизация как изменение цикла хромосомы. *Журн. общей биологии*. **4**(2), 93–124.
- Schultz J. (1939) The function of heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **22**, 27–33.
- Tolchkov E.V., Kramerova I.A., Lavrov S.A., Rashedova V.I., Bonaccorsi S., Alatorsev V.E., Gvozdev V.A. (1997) Position-effect variegation in *Drosophila melanogaster* X chromosome inversion with a breakpoint in a satellite block and its suppression in a secondary rearrangement. *Chromosoma*. **106**, 520–525.
- Гвоздев В.А., Алаторцев В.Е., Аравин А.А., Калмыкова А.И., Коган Г.Л., Лавров С.А., Наумова Н.М., Нурминский Д.И., Рашева В.И., Толчков Е.В., Тулин А.В., Шевелев Ю.Я. (1999) Гетерохроматин: молекулярная эволюция и эффекты положения генов у *Drosophila melanogaster*. *Молекуляр. биология*. **33**, 14–25.
- Sabl J.F., Henikoff S. (1996) Copy number and orientation determine the susceptibility of a gene to silencing by nearby heterochromatin in *Drosophila*. *Genetics*. **142**, 447–458.
- Howe M., Dimitri P., Berloco M., Wakimoto B.T. (1995) Cis-effects of heterochromatin on heterochromatic and euchromatic gene activity in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **140**, 1033–1045.
- Zhimulev I.F., Belyaeva E.S., Fomina O.V., Protopyov M.O., Bolshakov V.N. (1986) Cytogenetic and molecular aspects of position effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*. **94**, 492–504.
- Жимулев И.Ф. (1993) *Гетерохроматин и эффект положения гена*. Новосибирск: Наука, 490 с.
- Жимулев И.Ф., Беляева Е.С. (2003) Гетерохроматин, эффект положения гена и генетический сайленсинг. *Генетика*. **39**, 187–201.
- Belyaeva E.S., Zhimulev I.F. (1991) Cytogenetic and molecular aspects of position effect variegation in *Drosophila*. III. Continuous and discontinuous compaction of chromosomal material as a result of position effect variegation. *Chromosoma*. **100**, 453–466.
- Talbert P.B., Henikoff S. (2000) A reexamination of spreading of position-effect variegation in the white-roughest region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **154**, 259–272.
- Дубинин Н.П., Сидоров Б.Н. (1935) Эффект положения гена *hairy*. *Биол. журн.* **4**(3), 555–568.
- Хвостова В.В. (1939) Роль инертных частей хромосом в эффекте положения гена *cubitus interruptus* у *Drosophila melanogaster*. *Изв. АН СССР, Сер. биол. наук*. **4**, 541–574.
- Hessler A.Y. (1958) V-type position effect at the light locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **43**, 395–403.
- Schultz J. (1936) Variegation in *Drosophila* and the inert chromosome regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **22**, 27–33.
- Baker W.K. (1953) V-type position effects on a gene normally located in heterochromatin. *Genetics*. **38**, 328–344.
- Spofford J.B. (1976) Position-effect variegation in *Drosophila*. In: *The Genetics and Biology of Drosophila*. Eds Ashburner M., Novitski E. London: Acad. Press. **1**, 955–1018.
- Rubin G.M., Spradling A.C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*. **218**, 348–353.
- Spradling A.C., Rubin G.M. (1982) Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science*. **218**, 341–347.
- Hazelrigg T., Levis R., Rubin G.M. (1984) Transformation of white locus DNA in *Drosophila*: dosage compensation, zeste interaction, and position effects. *Cell*. **36**, 469–481.
- Steller H., Pirrotta V. (1985) Expression of the *Drosophila white* gene under the control of the *hsp70* heat shock promoter. *EMBO J.* **4**, 3765–3772.
- Ahmad K., Golic K.G. (1996) Somatic reversion of chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **144**, 657–670.
- Wallrath L.L., Elgin S.C. (1995) Position effect variegation in *Drosophila* is associated with an altered chromatin structure. *Genes Dev.* **9**, 1263–1277.

33. Balasov M.L., Belyaeva E.S., Shestopal S.A., Makunin I.V., Zhimulev I.F. (2000) The transposon A(R)4-24P[white, rosy] in *Drosophila melanogaster* is subject to position-effect variegation at a non-centromeric insertion site. *Mol. Gen. Genet.* **264**, 105–111.
34. Zhimulev I.F., Semeshin V.F., Kulichkov V.A., Belyaeva E.S. (1982) Intercalary heterochromatin in *Drosophila*. 1. Localization and general characteristics. *Chromosoma*. **87**, 197–122.
35. Zhimulev I.F., Belyaeva E.S. (2003) Intercalary heterochromatin and genetic silencing. *Bioessays*. **25**, 1040–1051.
36. Belyaeva E.S., Demakov S.A., Pokholkova G.V., Alekseyenko A.A., Kolesnikova T.D., Zhimulev I.F. (2006) DNA underreplication in intercalary heterochromatin regions in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* correlates with the formation of partial chromosomal aberrations and ectopic pairing. *Chromosoma*. **115**, 355–366.
37. Weiler K.S., Wakimoto B.T. (1995) Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* **29**, 577–605.
38. Semeshin V.F., Demakov S.A., Perez Alonso M., Belyaeva E.S., Bonner J.J., Zhimulev I.F. (1989) Electron microscopical analysis of *Drosophila* polytene chromosomes. V. Characteristics of structures formed by transposed DNA segments of mobile elements. *Chromosoma*. **97**, 396–412.
39. Semeshin V.F., Shloma V.V., Zhimulev I.F. (2001) Formation and morphology of dark puffs in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Hereditas*. **134**, 15–22.
40. Hartmann-Goldstein I.J. (1967) On the relationship between heterochromatization and variegation in *Drosophila*, with special reference to temperature-sensitive periods. *Genet. Res.* **10**, 143–159.
41. Kornher J.S., Kauffman S.A. (1986) Variegated expression of the Sgs-4 locus in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*. **94**, 205–216.
42. Karpen G.H., Spradling A.C. (1990) Reduced DNA polytenization of a minichromosome region undergoing position-effect variegation in *Drosophila*. *Cell*. **63**, 97–107.
43. Umbetova G.H., Belyaeva E.S., Baricheva E.M., Zhimulev I.F. (1991) Cytogenetic and molecular aspects of position effect variegation in *Drosophila melanogaster*. IV. Underreplication of chromosomal material as a result of gene inactivation. *Chromosoma*. **101**, 55–61.
44. Belyaeva E.S., Demakova O.V., Umbetova G.H., Zhimulev I.F. (1993) Cytogenetic and molecular aspects of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. V. Heterochromatin-associated protein HP1 appears in euchromatic chromosomal regions that are inactivated as a result of position-effect variegation. *Chromosoma*. **102**, 583–590.
45. Belyaeva E.S., Boldyreva L.V., Volkova E.I., Nanyayev R.A., Alekseyenko A.A., Zhimulev I.F. (2003) Effect of the *Suppressor of Underreplication (SuUR)* gene on position-effect variegation silencing in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **165**, 1209–1220.
46. Slatik H.M. (1955) Position effects at the *brown* locus in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **40**, 5–23.
47. Henikoff S., Dreesen T.D. (1989) Trans-inactivation of the *Drosophila brown* gene: evidence for transcriptional repression and somatic pairing dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**, 6704–6708.
48. Dernburg A.F., Broman K.W., Fung J.C., Marshall W.F., Philips J., Agard D.A., Sedat J.W. (1996) Perturbation of nuclear architecture by long-distance chromosome interactions. *Cell*. **85**, 745–759.
49. Беляева Е.С., Похолкова Г.В., Жимулев И.Ф. (2006) Эффект положения мозаичного типа *brown^D* и его связь с ассоциациями гетерохроматинных районов у *Drosophila melanogaster*. *ДАН*. **409** (4), 559–561.
50. Hinton T. (1950) A correlation of phenotypic changes and chromosomal rearrangements at the two ends of an inversion. *Genetics*. **35**, 188–205.
51. Dorer D.R., Henikoff S. (1997) Transgene repeat arrays interact with distant heterochromatin and cause silencing *in cis* and *trans*. *Genetics*. **147**, 1181–1190.
52. Martin-Morris L.E., Csink A.K., Dorer D.R., Talbert P.B., Henikoff S. (1997) Heterochromatic trans-inactivation of *Drosophila white* transgenes. *Genetics*. **147**, 671–677.
53. Sass G.L., Henikoff S. (1999) Pairing-dependent mislocalization of a *Drosophila brown* gene reporter to a heterochromatic environment. *Genetics*. **152**, 595–604.
54. Csink A.K., Bounoutas A., Griffith M.L., Sabl J.F., Sage B.T. (2002) Differential gene silencing by trans-heterochromatin in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **160**, 257–269.
55. Абрамов Ю.А., Кибанов М.В., Гвоздев В.А., Лавров С.А. (2011) Генетический и молекулярный анализы явления транс-инактивации генов у *Drosophila melanogaster*, обусловленного эу-гетерохроматиновой перестройкой гомологичной хромосомы. *ДАН*. **437**(2), 261–265.
56. Sage B.T., Csink A.K. (2003) Heterochromatic self-association, a determinant of nuclear organization, does not require sequence homology in *Drosophila*. *Genetics*. **165**, 1183–1193.
57. Thakar R., Csink A.K. (2005) Changing chromatin dynamics and nuclear organization during differentiation in *Drosophila* larval tissue. *J. Cell. Sci.* **118**, 951–960.
58. Шацких А.С., Гвоздев В.А. (2013) Формирование гетерохроматина и транскрипция в связи с транс-инактивацией генов и их пространственной организации в ядре. *Биохимия*. **78**, 784–794.
59. Nisha P., Plank J.L., Csink A.K. (2008) Analysis of chromatin structure of genes silenced by heterochromatin *in trans*. *Genetics*. **179**(1), 359–373.)
60. Abramov Y.A., Shatskikh A.S., Maksimenko O.G., Bonaccorsi S., Gvozdev V.A., Lavrov S.A. (2016) The differences between *cis*- and *trans*-gene inactivation caused by heterochromatin in *Drosophila*. *Genetics*. **202**, 93–106.
61. Shatskikh A.S., Abramov Y.A., Lavrov S.A. (2017) Trans-inactivation: repression in a wrong place. *Fly (Austin)*. **11**, 96–103.

62. Tartof K.D. (1994) Position effect variegation in yeast. *Bioessays*. **16**, 713–714.
63. Grunstein M., Gasser S.M. (2013) Epigenetics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5** (7), a017491.
64. Allshire R.C., Ekwall K. (2015) Epigenetic regulation of chromatin states in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a018770.
65. Allshire R.C., Javerzat J.P., Redhead N.J., Cranston G. (1994) Position effect variegation at fission yeast centromeres. *Cell*. **76**, 157–169.
66. Gottschling D.E., Aparicio O.M., Billington B.L., Zakian V.A. (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell*. **63**, 751–762.
67. Ottaviani A., Gilson E., Magdinier F. (2008) Telomeric position effect: from the yeast paradigm to human pathologies? *Biochimie*. **90**, 93–107.
68. Corradini N., Rossi F., Giordano E., Caizzi R., Verni F., Dimitri P. (2007) *Drosophila melanogaster* as a model for studying protein-encoding genes that are resident in constitutive heterochromatin. *Heredity* (Edinb). **98**, 3–12.
69. Girton J.R., Johansen K.M. (2008) Chromatin structure and the regulation of gene expression: the lessons of PEV in *Drosophila*. *Adv. Genet.* **61**, 1–43.
70. Fodor B.D., Shukeir N., Reuter G., Jenuwein T. (2010) Mammalian *Su(var)* genes in chromatin control. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **26**, 471–501.
71. Elgin S.C., Reuter G. (2013) Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a017780.
72. Akhtar W., de Jong J., Pindyurin A.V., Pagie L., Meuleman W., de Ridder J., Berns A., Wessels L.F., van Lohuizen M., van Steensel B. (2013) Chromatin position effects assayed by thousands of reporters integrated in parallel. *Cell*. **154**, 914–927.
73. Akhtar W., Pindyurin A.V., de Jong J., Pagie L., Ten Hoeve J., Berns A., Wessels L.F., van Steensel B., van Lohuizen M. (2014) Using TRIP for genome-wide position effect analysis in cultured cells. *Nat. Protoc.* **9**, 1255–1281.
74. Blewitt M.E., Vickaryous N.K., Hemley S.J., Ashe A., Bruxner T.J., Preis J.I., Arkell R., Whitelaw E. (2005) An N-ethyl-N-nitrosourea screen for genes involved in variegation in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 7629–7634.
75. Ashe A., Morgan D.K., Whitelaw N.C., Bruxner T.J., Vickaryous N.K., Cox L.L., Butterfield N.C., Wickling C., Blewitt M.E., Wilkins S.J., Anderson G.J., Cox T.C., Whitelaw E. (2008) A genome-wide screen for modifiers of transgene variegation identifies genes with critical roles in development. *Genome Biol.* **9**, R182.
76. Blewitt M., Whitelaw E. (2013) The use of mouse models to study epigenetics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a017939.
77. Gierman H.J., Indemans M.H., Koster J., Goetze S., Seppen J., Geerts D., van Driel R., Versteeg R. (2007) Domain-wide regulation of gene expression in the human genome. *Genome Res.* **17**, 1286–1295.
78. Liu N., Lee C.H., Swigut T., Grow E., Gu B., Bassik M.C., Wysocka J. (2018) Selective silencing of euchromatic L1s revealed by genome-wide screens for L1 regulators. *Nature*. **553**, 228–232.
79. Maricque B.B., Chaudhari H.G., Cohen B.A. (2018) A massively parallel reporter assay dissects the influence of chromatin structure on cis-regulatory activity. *Nat. Biotechnol.* **10**, 1038/nbt.4285.
80. Leemans C., van der Zwalm M.C.H., Brueckner L., Comoglio F., van Schaik T., Pagie L., van Arensbergen J., van Steensel B. (2019) Promoter-intrinsic and local chromatin features determine gene repression in LADs. *Cell*. **177**, 852–864. e814.
81. Gould A. (1997) Functions of mammalian Polycomb group and trithorax group related genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 488–494.
82. Caron H., van Schaik B., van der Mee M., Baas F., Riggins G., van Sluis P., Hermus M.C., van Asperen R., Boon K., Voute P.A., Heisterkamp S., van Kampen A., Versteeg R. (2001) The human transcriptome map: clustering of highly expressed genes in chromosomal domains. *Science*. **291**, 1289–1292.
83. Lercher M.J., Urrutia A.O., Pavlicek A., Hurst L.D. (2003) A unification of mosaic structures in the human genome. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2411–2415.
84. Versteeg R., van Schaik B.D., van Batenburg M.F., Roos M., Monajemi R., Caron H., Bussemaker H.J., van Kampen A.H. (2003) The human transcriptome map reveals extremes in gene density, intron length, GC content, and repeat pattern for domains of highly and weakly expressed genes. *Genome Res.* **13**, 1998–2004.
85. Mijalski T., Harder A., Halder T., Kersten M., Horsch M., Strom T.M., Liebscher H.V., Lottspeich F., de Angelis M.H., Beckers J. (2005) Identification of coexpressed gene clusters in a comparative analysis of transcriptome and proteome in mouse tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 8621–8626.
86. Singer G.A., Lloyd A.T., Huminiecki L.B., Wolfe K.H. (2005) Clusters of co-expressed genes in mammalian genomes are conserved by natural selection. *Mol. Biol. Evol.* **22**, 767–775.
87. Lercher M.J., Urrutia A.O., Hurst L.D. (2002) Clustering of housekeeping genes provides a unified model of gene order in the human genome. *Nat. Genet.* **31**, 180–183.
88. Lyko F., Beisel C., Marhold J., Paro R. (2006) Epigenetic regulation in *Drosophila*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **310**, 23–44.
89. Nishibuchi G., Dejardin J. (2017) The molecular basis of the organization of repetitive DNA-containing constitutive heterochromatin in mammals. *Chromosome Res.* **25**, 77–87.
90. Pearson R., Kim Y.K., Hokello J., Lassen K., Friedman J., Tyagi M., Karn J. (2008) Epigenetic silencing of human immunodeficiency virus (HIV) transcription by formation of restrictive chromatin structures at the viral long terminal repeat drives the progressive entry of HIV into latency. *J. Virol.* **82**, 12291–12303.
91. Serman A., Vlahovic M., Serman L., Bulic-Jakus F. (2006) DNA methylation as a regulatory mechanism

- for gene expression in mammals. *Coll. Antropol.* **30**, 665–671.
92. Dawson M.A., Kouzarides T. (2012) Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell.* **150**, 12–27.
 93. LaCroix A.J., Stably D., Sahraoui R., Adam M.P., Mehaffey M., Kernan K., Myers C.T., Fagerstrom C., Anadiotis G., Akkari Y.M., Robbins K.M., Gripp K.W., Baratela W.A.R., Bober M.B., Duker A.L., Doherty D., Dempsey J.C., Miller D.G., Kircher M., Bamshad M.J., Nickerson D.A., Mefford H.C., Sol-Church K. (2019) GGC repeat expansion and exon 1 methylation of XYLT1 is a common pathogenic variant in Baratela-Scott syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **104**, 35–44.
 94. Quilez J., Guilmatre A., Garg P., Highnam G., Gymrek M., Erlich Y., Joshi R.S., Mittelman D., Sharp A.J. (2016) Polymorphic tandem repeats within gene promoters act as modifiers of gene expression and DNA methylation in humans. *Nucl. Acids Res.* **44**, 3750–3762.
 95. Cedar H., Bergman Y. (2009) Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 295–304.
 96. Turner A.W., Margolis D.M. (2017) Chromatin regulation and the histone code in HIV latency. *Yale J. Biol. Med.* **90**, 229–243.
 97. Lange U.C., Verdikt R., Ait-Ammar A., Van Lint C. (2020) Epigenetic crosstalk in chronic infection with HIV-1. *Semin. Immunopathol.* **42**, 187–200.
 98. Khristich A.N., Mirkin S.M. (2020) On the wrong DNA track: molecular mechanisms of repeat-mediated genome instability. *J. Biol. Chem.* **295**, 4134–4170.
 99. Trost B., Engchuan W., Nguyen C.M., Thiruvahindrapuram B., Dolzhenko E., Backstrom I., Mirceta M., Mojarad B.A., Yin Y., Dov A., Chandrakumar I., Prasolava T., Shum N., Hamdan O., Pellicchia G., Howe J.L., Whitney J., Klee E.W., Baheti S., Amaral D.G., Anagnostou E., Elsabbagh M., Fernandez B.A., Hoang N., Lewis M.E.S., Liu X., Sjaarda C., Smith I.M., Szatmari P., Zwaigenbaum L., Glazer D., Hartley D., Stewart A.K., Eberle M.A., Sato N., Pearson C.E., Scherer S.W., Yuen R.K.C. (2020) Genome-wide detection of tandem DNA repeats that are expanded in autism. *Nature.* **586**, 80–86.
 100. Tartof K.D., Bishop C., Jones M., Hobbs C.A., Locke J. (1989) Towards an understanding of position effect variegation. *Dev. Genet.* **10**, 162–176.
 101. Spradling A.C., Karpen G.H. (1990) Sixty years of mystery. *Genetics.* **126**, 779–784.
 102. Zhimulev I.F. (1998) Polytene chromosomes, heterochromatin, and position effect variegation. *Adv. Genet.* **37**, 1–555.
 103. Parnell T.J., Grade S.K., Geyer P.K., Wallrath L.L. (2006) Position effect variegation in human genetic disease. *eLS, Wiley Online Library.* <https://doi.org/10.1038/npg.els.0006040>
 104. Schulze S.R., Wallrath L.L. (2007) Gene regulation by chromatin structure: paradigms established in *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Entomol.* **52**, 171–192.
 105. Kramer J.A., McCarrey J.R., Djakiew D., Krawetz S.A. (1998) Differentiation: the selective potentiation of chromatin domains. *Development.* **125**, 4749–4755.
 106. Rasmussen T.P. (2003) Embryonic stem cell differentiation: a chromatin perspective. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, 100.
 107. Szutorisz H., Canzonetta C., Georgiou A., Chow C.M., Tora L., Dillon N. (2005) Formation of an active tissue-specific chromatin domain initiated by epigenetic marking at the embryonic stem cell stage. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1804–1820.
 108. Шевченко А.И., Павлова С.В., Дементьева Е.В., Голубева Д.В., Закиян С.М. (2006) Модификации хроматина в процессе инактивации X-хромосомы у самок млекопитающих. *Генетика.* **42**(9), 1225–1234.
 109. Ball A.R., Jr., Yokomori K. (2011) Damage site chromatin: open or closed? *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 277–283.
 110. Eissenberg J.C., Reuter G. (2009) Cellular mechanism for targeting heterochromatin formation in *Drosophila*. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* **273**, 1–47.
 111. Peng J.C., Karpen G.H. (2008) Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**, 204–211.
 112. Janssen A., Colmenares S.U., Karpen G.H. (2018) Heterochromatin: guardian of the genome. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **34**, 265–288.
 113. Richards E.J., Elgin S.C. (2002) Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell.* **108**, 489–500.
 114. Dillon N., Festenstein R. (2002) Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet.* **18**, 252–258.
 115. Dimitri P., Corradini N., Rossi F., Verni F. (2005) The paradox of functional heterochromatin. *Bioessays.* **27**, 29–41.
 116. Huisinga K.L., Brower-Toland B., Elgin S.C. (2006) The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. *Chromosoma.* **115**, 110–122.
 117. Колесникова Т.Д., Андреева Е.Н., Пиндюрин А.В., Анянко Н.Г., Белякин С.Н., Шлома В.В., Юрлова А.А., Макунин И.В., Похолокова Г.В., Волкова Е.И., Заруцкая Е.А., Кокоза Е.Б., Семешин В.Ф., Беляева Е.С., Жимулев И.Ф. (2006) Ген *SuUR* и его участие в организации эпигенетически репрессированных районов хромосом *Drosophila melanogaster*. *Генетика.* **42**(8), 1013–1028.
 118. Belyaeva E.S., Goncharov F.P., Demakova O.V., Kolesnikova T.D., Boldyreva L.V., Semeshin V.F., Zhimulev I.F. (2012) Late replication domains in polytene and non-polytene cells of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One.* **7**, e30035.
 119. McNairn A.J., Gilbert D.M. (2003) Epigenomic replication: linking epigenetics to DNA replication. *Bioessays.* **25**, 647–656.
 120. Allshire R., Bickmore W. (2000) Pausing for thought on the boundaries of imprinting. *Cell.* **102**, 705–708.
 121. Turner B.M. (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell.* **111**, 285–291.
 122. Vlassova I.E., Graphodatsky A.S., Belyaeva E.S., Zhimulev I.F. (1991) Constitutive heterochromatin in early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **229**, 316–318.

123. Bogolyubova I., Bogolyubov D. (2020) Heterochromatin morphodynamics in late oogenesis and early embryogenesis of mammals. *Cells*. **9**(6), e1497.
124. Labrador M., Corces V.G. (2002) Setting the boundaries of chromatin domains and nuclear organization. *Cell*. **111**, 151–154.
125. Ebert A., Schotta G., Lein S., Kubicek S., Krauss V., Jenuwein T., Reuter G. (2004) *Su(var)* genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev.* **18**, 2973–2983.
126. Kornberg R.D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*. **184**, 868–871.
127. Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P. (1975) Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. *Cell*. **4**, 281–300.
128. Finch J.T., Lutter L.C., Rhodes D., Brown R.S., Rushton B., Levitt M., Klug A. (1977) Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature*. **269**, 29–36.
129. Thomas J.O., Kornberg R.D. (1975) An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **72**, 2626–2630.
130. Arents G., Burlingame R.W., Wang B.C., Love W.E., Moudrianakis E.N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 10148–10152.
131. Lilley D.M., Pardon J.F., Richards B.M. (1977) Structural investigations of chromatin core protein by nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*. **16**, 2853–2860.
132. Luger K., Mader A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. **389**, 251–260.
133. Varshavsky A.J., Bakayev V.V., Georgiev G.P. (1976) Heterogeneity of chromatin subunits *in vitro* and location of histone H1. *Nucl. Acids Res.* **3**, 477–492.
134. Fyodorov D.V., Zhou B.R., Skoultchi A.I., Bai Y. (2018) Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **19**, 192–206.
135. Allan J., Hartman P.G., Crane-Robinson C., Aviles F.X. (1980) The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature*. **288**, 675–679.
136. Mirzabekov A.D., Shick V.V., Belyavsky A.V., Bavykin S.G. (1978) Primary organization of nucleosome core particle of chromatin: sequence of histone arrangement along DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **75**, 4184–4188.
137. Talbert P.B., Henikoff S. (2010) Histone variants – ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**, 264–275.
138. Martire S., Banaszynski L.A. (2020) The roles of histone variants in fine-tuning chromatin organization and function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **21**, 522–541.
139. Strahl B.D., Allis C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*. **403**, 41–45.
140. Jenuwein T., Allis C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*. **293**, 1074–1080.
141. Tessarz P., Kouzarides T. (2014) Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **15**, 703–708.
142. Zentner G.E., Henikoff S. (2013) Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 259–266.
143. Taverna S.D., Li H., Ruthenburg A.J., Allis C.D., Patel D.J. (2007) How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1025–1040.
144. Lee J.S., Smith E., Shilatifard A. (2010) The language of histone crosstalk. *Cell*. **142**, 682–685.
145. Коряков Д.Е. (2006) Модификации гистонов и регуляция работы хроматина. *Генетика*. **42**(9), 1170–1185.
146. Kouzarides T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*. **128**, 693–705.
147. Bannister A.J., Kouzarides T. (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381–395.
148. Zhang T., Cooper S., Brockdorff N. (2015) The interplay of histone modifications – writers that read. *EMBO Rep.* **16**, 1467–1481.
149. Lawrence M., Daujat S., Schneider R. (2016) Lateral thinking: how histone modifications regulate gene expression. *Trends Genet.* **32**, 42–56.
150. Cheung P., Allis C.D., Sassone-Corsi P. (2000) Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*. **103**, 263–271.
151. Fischle W., Wang Y., Allis C.D. (2003) Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **15**, 172–183.
152. Gelato K.A., Fischle W. (2008) Role of histone modifications in defining chromatin structure and function. *Biol. Chem.* **389**, 353–363.
153. Bernstein B.E., Kamal M., Lindblad-Toh K., Bekiranov S., Bailey D.K., Huebert D.J., McMahon S., Karlsson E.K., Kulbokas E.J., 3rd, Gingeras T.R., Schreiber S.L., Lander E.S. (2005) Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*. **120**, 169–181.
154. Pokholok D.K., Harbison C.T., Levine S., Cole M., Hannett N.M., Lee T.I., Bell G.W., Walker K., Rolfe P.A., Herbolsheimer E., Zeitlinger J., Lewitter F., Gifford D.K., Young R.A. (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*. **122**, 517–527.
155. Schubeler D., MacAlpine D.M., Scalzo D., Wirbelauer C., Kooperberg C., van Leeuwen F., Gottschling D.E., O'Neill L.P., Turner B.M., Delrow J., Bell S.P., Groudine M. (2004) The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* **18**, 1263–1271.
156. Wade P.A., Pruss D., Wolffe A.P. (1997) Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 128–132.
157. Marmorstein R., Zhou M.M. (2014) Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a018762.

158. Lloyd J.T., Glass K.C. (2018) Biological function and histone recognition of family IV bromodomain-containing proteins. *J. Cell. Physiol.* **233**, 1877–1886.
159. Murr R. (2010) Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Adv. Genet.* **70**, 101–141.
160. Turner B.M., Birley A.J., Lavender J. (1992) Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell.* **69**, 375–384.
161. Kouzarides T. (2002) Histone methylation in transcriptional control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 198–209.
162. Lachner M., O'Sullivan R.J., Jenuwein T. (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J. Cell. Sci.* **116**, 2117–2124.
163. Black J.C., Van Rechem C., Whetstone J.R. (2012) Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Mol. Cell.* **48**, 491–507.
164. Rando O.J. (2012) Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**, 148–155.
165. Locke J., Kotarski M.A., Tartof K.D. (1988) Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect. *Genetics.* **120**, 181–198.
166. Schotta G., Ebert A., Dorn R., Reuter G. (2003) Position-effect variegation and the genetic dissection of chromatin regulation in *Drosophila*. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **14**, 67–75.
167. James T.C., Elgin S.C. (1986) Identification of a non-histone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3862–3872.
168. Wustmann G., Szidonya J., Taubert H., Reuter G. (1989) The genetics of position-effect variegation modifying loci in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 520–527.
169. Csink A.K., Henikoff S. (1996) Genetic modification of heterochromatic association and nuclear organization in *Drosophila*. *Nature.* **381**, 529–531.
170. Pindyurin A.V., Ilyin A.A., Ivankin A.V., Tselebrovsky M.V., Nenasheva V.V., Mikhaleva E.A., Pagie L., van Steensel B., Shevelyov Y.Y. (2018) The large fraction of heterochromatin in *Drosophila* neurons is bound by both B-type lamin and HP1a. *Epigenetics Chromatin.* **11**, 65.
171. Guthmann M., Burton A., Torres-Padilla M.E. (2019) Expression and phase separation potential of heterochromatin proteins during early mouse development. *EMBO Rep.* **20**, e47952.
172. Meyer-Nava S., Nieto-Caballero V.E., Zurita M., Valadez-Graham V. (2020) Insights into HP1a-chromatin interactions. *Cells.* **9**(8), e1866.
173. Elgin S.C. (1996) Heterochromatin and gene regulation in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 193–202.
174. Brown E.J., Nguyen A.H., Bachtrog D. (2020) The *Drosophila* Y chromosome affects heterochromatin integrity genome-wide. *Mol. Biol. Evol.* **37**, 2808–2824.
175. Eissenberg J.C., James T.C., Foster-Hartnett D.M., Hartnett T., Ngan V., Elgin S.C. (1990) Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 9923–9927.
176. Jacobs S.A., Taverna S.D., Zhang Y., Briggs S.D., Li J., Eissenberg J.C., Allis C.D., Khorasanizadeh S. (2001) Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *EMBO J.* **20**, 5232–5241.
177. Nielsen P.R., Nietlispach D., Mott H.R., Callaghan J., Bannister A., Kouzarides T., Murzin A.G., Murzina N.V., Laue E.D. (2002) Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature.* **416**, 103–107.
178. Vogel M.J., Pagie L., Talhout W., Nieuwland M., Kerkhoven R.M., van Steensel B. (2009) High-resolution mapping of heterochromatin redistribution in a *Drosophila* position-effect variegation model. *Epigenetics Chromatin.* **2**, 1.
179. Reuter G., Gausz J., Gyurkovics H., Friede B., Bang R., Spierer A., Hall L.M., Spierer P. (1987) Modifiers of position-effect variegation in the region from 86C to 88B of the *Drosophila melanogaster* third chromosome. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 429–436.
180. Rea S., Eisenhaber F., O'Carroll D., Strahl B.D., Sun Z.W., Schmid M., Opravil S., Mechtler K., Ponting C.P., Allis C.D., Jenuwein T. (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature.* **406**, 593–599.
181. Schotta G., Ebert A., Krauss V., Fischer A., Hoffmann J., Rea S., Jenuwein T., Dorn R., Reuter G. (2002) Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.* **21**, 1121–1131.
182. Eskeland R., Eberharter A., Imhof A. (2007) HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary factors. *Mol. Cell Biol.* **27**, 453–465.
183. Fanti L., Giovinazzo G., Berloco M., Pimpinelli S. (1998) The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *Mol. Cell.* **2**, 527–538.
184. Seum C., Reo E., Peng H., Rauscher F.J., 3rd, Spierer P., Bontron S. (2007) *Drosophila* SETDB1 is required for chromosome 4 silencing. *PLoS Genet.* **3**, e76.
185. Brower-Toland B., Riddle N.C., Jiang H., Huisinga K.L., Elgin S.C. (2009) Multiple SET methyltransferases are required to maintain normal heterochromatin domains in the genome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* **181**, 1303–1319.
186. Robin J.D., Ludlow A.T., Batten K., Magdinier F., Stadler G., Wagner K.R., Shay J.W., Wright W.E. (2014) Telomere position effect: regulation of gene expression with progressive telomere shortening over long distances. *Genes Dev.* **28**, 2464–2476.
187. Aparicio O.M., Billington B.L., Gottschling D.E. (1991) Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell.* **66**, 1279–1287.
188. Grewal S.I., Jia S. (2007) Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 35–46.
189. Henderson I.R., Jacobsen S.E. (2007) Epigenetic inheritance in plants. *Nature.* **447**, 418–424.

190. Berloco M., Palumbo G., Piacentini L., Pimpinelli S., Fanti L. (2014) Position effect variegation and viability are both sensitive to dosage of constitutive heterochromatin in *Drosophila*. *G3* (Bethesda). **4**, 1709–1716.
191. Aagaard L., Laible G., Selenko P., Schmid M., Dorn R., Schotta G., Kuhfittig S., Wolf A., Lebersorger A., Singh P.B., Reuter G., Jenuwein T. (1999) Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier *Su(var)3-9* encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *EMBO J.* **18**, 1923–1938.
192. Hendrich B., Bird A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6538–6547.
193. Ayyanathan K., Lechner M.S., Bell P., Maul G.G., Schultz D.C., Yamada Y., Tanaka K., Torigoe K., Rauscher F.J., 3rd (2003) Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation. *Genes Dev.* **17**, 1855–1869.
194. Hassig C.A., Tong J.K., Fleischer T.C., Owa T., Grable P.G., Ayer D.E., Schreiber S.L. (1998) A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 3519–3524.
195. Timms R.T., Tchasovnikarova I.A., Lehner P.J. (2016) Position-effect variegation revisited: HUSHing up heterochromatin in human cells. *Bioessays.* **38**, 333–343.
196. Whitelaw N.C., Chong S., Morgan D.K., Nestor C., Bruxner T.J., Ashe A., Lambley E., Meehan R., Whitelaw E. (2010) Reduced levels of two modifiers of epigenetic gene silencing, Dnmt3a and Trim28, cause increased phenotypic noise. *Genome Biol.* **11**, R111.
197. Sorolla A., Tallack M.R., Oey H., Harten S.K., Daxinger L.C., Magor G.W., Combes A.N., Ilsley M., Whitelaw E., Perkins A.C. (2015) Identification of novel hypomorphic and null mutations in Klf1 derived from a genetic screen for modifiers of alpha-globin transgene variegation. *Genomics.* **105**, 116–122.
198. Rountree M.R., Bachman K.E., Baylin S.B. (2000) DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat. Genet.* **25**, 269–277.
199. Bachman K.E., Rountree M.R., Baylin S.B. (2001) Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J. Biol. Chem.* **276**, 32282–32287.
200. Tchasovnikarova I.A., Timms R.T., Matheson N.J., Wals K., Antrobus R., Gottgens B., Dougan G., Dawson M.A., Lehner P.J. (2015) Gene silencing. Epigenetic silencing by the HUSH complex mediates position-effect variegation in human cells. *Science.* **348**, 1481–1485.
201. Blewitt M.E., Gendrel A.V., Pang Z., Sparrow D.B., Whitelaw N., Craig J.M., Apedaile A., Hilton D.J., Dunwoodie S.L., Brockdorff N., Kay G.F., Whitelaw E. (2008) SmcHDI, containing a structural-maintenance-of-chromosomes hinge domain, has a critical role in X inactivation. *Nat. Genet.* **40**, 663–669.
202. Carette J.E., Guimaraes C.P., Wuethrich I., Blumen V.A., Varadarajan M., Sun C., Bell G., Yuan B., Muellner M.K., Nijman S.M., Ploegh H.L., Brummelkamp T.R. (2011) Global gene disruption in human cells to assign genes to phenotypes by deep sequencing. *Nat. Biotechnol.* **29**, 542–546.
203. Duncan L.M., Timms R.T., Zavodszky E., Cano F., Dougan G., Randow F., Lehner P.J. (2012) Fluorescence-based phenotypic selection allows forward genetic screens in haploid human cells. *PLoS One.* **7**, e39651.
204. Schultz D.C., Ayyanathan K., Negorev D., Maul G.G., Rauscher F.J., 3rd (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev.* **16**, 919–932.
205. Kokura K., Sun L., Bedford M.T., Fang J. (2010) Methyl-H3K9-binding protein MPP8 mediates E-cadherin gene silencing and promotes tumour cell motility and invasion. *EMBO J.* **29**, 3673–3687.
206. Li J., Li Z., Ruan J., Xu C., Tong Y., Pan P.W., Tempel W., Crombet L., Min J., Zang J. (2011) Structural basis for specific binding of human MPP8 chromodomain to histone H3 methylated at lysine 9. *PLoS One.* **6**, e25104.
207. Riethoven J.J. (2010) Regulatory regions in DNA: promoters, enhancers, silencers, and insulators. *Methods Mol. Biol.* **674**, 33–42.
208. Negre N., Brown C.D., Ma L., Bristow C.A., Miller S.W., Wagner U., Kheradpour P., Eaton M.L., Loriaux P., Sealfon R., Li Z., Ishii H., Spokony R.F., Chen J., Hwang L., Cheng C., Auburn R.P., Davis M.B., Domanus M., Shah P.K., Morrison C.A., Zieba J., Suchy S., Senderowicz L., Victorsen A., Bild N.A., Grundstad A.J., Hanley D., MacAlpine D.M., Mannervik M., Venken K., Bellen H., White R., Gerstein M., Russell S., Grossman R.L., Ren B., Posakony J.W., Kellis M., White K.P. (2011) A cis-regulatory map of the *Drosophila* genome. *Nature.* **471**, 527–531.
209. Разин С.В., Гаврилов А.А., Ульянов С.В. (2015) Регуляторные элементы эукариотического генома, контролирующие транскрипцию. *Молекуляр. биология.* **49**(2), 212–223.
210. Мельникова Л.С., Георгиев П.Г., Головнин А.К. (2020) Функции и механизмы действия инсуляторов в геномах высших эукариот. *Acta Naturae.* **12**(4), 15–33.
211. Schwartz Y.B., Cavalli G. (2017) Three-dimensional genome organization and function in *Drosophila*. *Genetics.* **205**, 5–24.
212. Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L., Imakaev M., Ragoczy T., Telling A., Amit I., Lajoie B.R., Sabo P.J., Dorschner M.O., Sandstrom R., Bernstein B., Bender M.A., Groudine M., Gnirke A., Stamatoyannopoulos J., Mirny L.A., Lander E.S., Dekker J. (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science.* **326**, 289–293.
213. de Laat W., Klous P., Kooren J., Noordermeer D., Palstra R.J., Simonis M., Splinter E., Grosveld F. (2008) Three-dimensional organization of gene ex-

- pression in erythroid cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* **82**, 117–139.
214. Salem T., Gomard T., Court F., Moquet-Torcy G., Brockly F., Forne T., Piechaczyk M. (2013) Chromatin loop organization of the *junb* locus in mouse dendritic cells. *Nucl. Acids Res.* **41**, 8908–8925.
215. Gheldof N., Smith E.M., Tabuchi T.M., Koch C.M., Dunham I., Stamatoyannopoulos J.A., Dekker J. (2010) Cell-type-specific long-range looping interactions identify distant regulatory elements of the *CFTR* gene. *Nucl. Acids Res.* **38**, 4325–4336.
216. Gisselbrecht S.S., Palagi A., Kurland J.V., Rogers J.M., Ozadam H., Zhan Y., Dekker J., Bulyk M.L. (2020) Transcriptional silencers in *Drosophila* serve a dual role as transcriptional enhancers in alternate cellular contexts. *Mol. Cell.* **77**, 324–337 e328.
217. Rao S.S., Huntley M.H., Durand N.C., Stamenova E.K., Bochkov I.D., Robinson J.T., Sanborn A.L., Machol I., Omer A.D., Lander E.S., Aiden E.L. (2014) A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell.* **159**, 1665–1680.
218. Cope N.F., Fraser P., Eskiw C.H. (2010) The yin and yang of chromatin spatial organization. *Genome Biol.* **11**, 204.
219. Udvardy A., Maine E., Schedl P. (1985) The 87A7 chromomere. Identification of novel chromatin structures flanking the heat shock locus that may define the boundaries of higher order domains. *J. Mol. Biol.* **185**, 341–358.
220. Kellum R., Schedl P. (1991) A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell.* **64**, 941–950.
221. Holdridge C., Dorsett D. (1991) Repression of hsp70 heat shock gene transcription by the suppressor of hairy-wing protein of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1894–1900.
222. Geyer P.K., Corces V.G. (1992) DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein. *Genes Dev.* **6**, 1865–1873.
223. Valenzuela L., Kamakaka R.T. (2006) Chromatin insulators. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 107–138.
224. Bushey A.M., Dorman E.R., Corces V.G. (2008) Chromatin insulators: regulatory mechanisms and epigenetic inheritance. *Mol. Cell.* **32**, 1–9.
225. Kyrchanova O., Georgiev P. (2014) Chromatin insulators and long-distance interactions in *Drosophila*. *FEBS Lett.* **588**, 8–14.
226. Zolotarev N., Maksimenko O., Kyrchanova O., Sokolinskaya E., Osadchiy I., Girardot C., Bonchuk A., Ciglar L., Furlong E.E.M., Georgiev P. (2017) Opbp is a new architectural/insulator protein required for ribosomal gene expression. *Nucl. Acids Res.* **45**, 12285–12300.
227. Bag I., Dale R.K., Palmer C., Lei E.P. (2019) The zinc-finger protein CLAMP promotes gypsy chromatin insulator function in *Drosophila*. *J. Cell. Sci.* **132**(5), e-jcs226092.
228. Gerasimova T.I., Byrd K., Corces V.G. (2000) A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA. *Mol. Cell.* **6**, 1025–1035.
229. Zolotarev N., Fedotova A., Kyrchanova O., Bonchuk A., Penin A.A., Lando A.S., Eliseeva I.A., Kulakovskiy I.V., Maksimenko O., Georgiev P. (2016) Architectural proteins Pita, Zw5, and ZIPIC contain homodimerization domain and support specific long-range interactions in *Drosophila*. *Nucl. Acids Res.* **44**, 7228–7241.
230. Bonchuk A., Kamalyan S., Mariasina S., Boyko K., Popov V., Maksimenko O., Georgiev P. (2020) N-terminal domain of the architectural protein CTCF has similar structural organization and ability to self-association in bilaterian organisms. *Sci. Rep.* **10**, 2677.
231. Bonchuk A., Boyko K., Fedotova A., Nikolaeva A., Lushchekina S., Khrustaleva A., Popov V., Georgiev P. (2021) Structural basis of diversity and homodimerization specificity of zinc-finger-associated domains in *Drosophila*. *Nucl. Acids Res.* **49**, 2375–2389.
232. Golovnin A., Mazur A., Kopantseva M., Kurshakova M., Gulak P.V., Gilmore B., Whitfield W.G., Geyer P., Pirrotta V., Georgiev P. (2007) Integrity of the Mod(mdg4)-67.2 BTB domain is critical to insulator function in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 963–974.
233. Bonchuk A., Maksimenko O., Kyrchanova O., Ivlieva T., Mogila V., Deshpande G., Wolle D., Schedl P., Georgiev P. (2015) Functional role of dimerization and CP190 interacting domains of CTCF protein in *Drosophila melanogaster*. *BMC Biol.* **13**, 63.
234. Bonchuk A., Denisov S., Georgiev P., Maksimenko O. (2011) *Drosophila* BTB/POZ domains of “ttk group” can form multimers and selectively interact with each other. *J. Mol. Biol.* **412**, 423–436.
235. Van Bortle K., Ramos E., Takenaka N., Yang J., Wahli J.E., Corces V.G. (2012) *Drosophila* CTCF tandemly aligns with other insulator proteins at the borders of H3K27me3 domains. *Genome Res.* **22**, 2176–2187.
236. Schwartz Y.B., Linder-Basso D., Kharchenko P.V., Tolstorukov M.Y., Kim M., Li H.B., Gorchakov A.A., Minoda A., Shanower G., Alekseyenko A.A., Riddle N.C., Jung Y.L., Gu T., Plachetka A., Elgin S.C., Kuroda M.I., Park P.J., Savitsky M., Karpen G.H., Pirrotta V. (2012) Nature and function of insulator protein binding sites in the *Drosophila* genome. *Genome Res.* **22**, 2188–2198.
237. Hore T.A., Deakin J.E., Marshall Graves J.A. (2008) The evolution of epigenetic regulators CTCF and BORIS/CTCF in amniotes. *PLoS Genet.* **4**, e1000169.
238. Kadota M., Hara Y., Tanaka K., Takagi W., Tanegashima C., Nishimura O., Kuraku S. (2017) CTCF binding landscape in jawless fish with reference to Hox cluster evolution. *Sci. Rep.* **7**, 4957.
239. Yusufzai T.M., Tagami H., Nakatani Y., Felsenfeld G. (2004) CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol. Cell.* **13**, 291–298.
240. Kyrchanova O., Ivlieva T., Toshchakov S., Parshikov A., Maksimenko O., Georgiev P. (2011) Selective interactions of boundaries with upstream region of Abd-B promoter in *Drosophila* bithorax complex and role of dCTCF in this process. *Nucl. Acids Res.* **39**, 3042–3052.

241. Sanborn A.L., Rao S.S., Huang S.C., Durand N.C., Huntley M.H., Jewett A.I., Bochkov I.D., Chinnappan D., Cutkosky A., Li J., Geeting K.P., Gnirke A., Melnikov A., McKenna D., Stamenova E.K., Lander E.S., Aiden E.L. (2015) Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**, E6456–6465.
242. Merckenschlager M., Nora E.P. (2016) CTCF and cohesin in genome folding and transcriptional gene regulation. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **17**, 17–43.
243. Rowley M.J., Corces V.G. (2018) Organizational principles of 3D genome architecture. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 789–800.
244. Fudenberg G., Imakaev M., Lu C., Goloborodko A., Abdennur N., Mirny L.A. (2016) Formation of chromosomal domains by loop extrusion. *Cell Rep.* **15**, 2038–2049.
245. Hansen A.S. (2020) CTCF as a boundary factor for cohesin-mediated loop extrusion: evidence for a multi-step mechanism. *Nucleus*. **11**, 132–148.
246. Banigan E.J., Mirny L.A. (2020) Loop extrusion: theory meets single-molecule experiments. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **64**, 124–138.
247. Rhodes J.D.P., Feldmann A., Hernandez-Rodriguez B., Diaz N., Brown J.M., Fursova N.A., Blackledge N.P., Prathapan P., Dobrinic P., Huseyin M.K., Szczurek A., Kruse K., Nasmyth K.A., Buckle V.J., Vaquerizas J.M., Klose R.J. (2020) Cohesin disrupts polycomb-dependent chromosome interactions in embryonic stem cells. *Cell. Rep.* **30**, 820–835. e810.
248. Matthews N.E., White R. (2019) Chromatin architecture in the fly: living without CTCF/cohesin loop extrusion?: alternating chromatin states provide a basis for domain architecture in *Drosophila*. *Bioessays*. **41**, e1900048.
249. Ernst J., Kheradpour P., Mikkelsen T.S., Shores N., Ward L.D., Epstein C.B., Zhang X., Wang L., Issner R., Coyne M., Ku M., Durham T., Kellis M., Bernstein B.E. (2011) Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature*. **473**, 43–49.
250. Lupianez D.G., Kraft K., Heinrich V., Krawitz P., Brancati F., Klopocki E., Horn D., Kayserili H., Opitz J.M., Laxova R., Santos-Simarro F., Gilbert-Dussardier B., Wittler L., Borschiwer M., Haas S.A., Osterwalder M., Franke M., Timmermann B., Hecht J., Spielmann M., Visel A., Mundlos S. (2015) Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell*. **161**, 1012–1025.
251. Vorobyeva N.E., Mazina M.U., Golovnin A.K., Kopytova D.V., Gurskiy D.Y., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Georgiev P.G., Krasnov A.N. (2013) Insulator protein Su(Hw) recruits SAGA and Brahma complexes and constitutes part of origin recognition complex-binding sites in the *Drosophila* genome. *Nucl. Acids Res.* **41**, 5717–5730.
252. Мазина М.Ю., Воробьева Н.Е., Краснов А.Н. (2013) Способность Su(Hw) создавать платформу для формирования ориджинов репликации не зависит от типа окружающего хроматина. *Цитология*. **55**, 218–224.
253. Воробьева Н.Е., Мазина М.Ю. (2019) Функции инсуляторов в контексте современных полнотомных исследований. *Генетика*. **55**(2), 146–155.
254. Gurudatta B.V., Yang J., Van Bortle K., Donlin-Asp P.G., Corces V.G. (2013) Dynamic changes in the genomic localization of DNA replication-related element binding factor during the cell cycle. *Cell Cycle*. **12**, 1605–1615.
255. Brand A.H., Breeden L., Abraham J., Sternglanz R., Nasmyth K. (1985) Characterization of a “silencer” in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell*. **41**, 41–48.
256. Laurenson P., Rine J. (1992) Silencers, silencing, and heritable transcriptional states. *Microbiol. Rev.* **56**, 543–560.
257. Kamakaka R.T. (1997) Silencers and locus control regions: opposite sides of the same coin. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 124–128.
258. Pirrotta V., Gross D.S. (2005) Epigenetic silencing mechanisms in budding yeast and fruit fly: different paths, same destinations. *Mol. Cell*. **18**, 395–398.
259. Pirrotta V. (2017) Of giraffes’ necks and the inheritance of chromatin states. *Nat. Genet.* **49**, 821–823.
260. Schwartz Y.B., Pirrotta V. (2007) Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 9–22.
261. Ringrose L., Paro R. (2007) Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development*. **134**, 223–232.
262. Bracken A.P., Helin K. (2009) Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **9**, 773–784.
263. Groner A.C., Meylan S., Ciuffi A., Zangger N., Ambrosini G., Denervaud N., Bucher P., Trono D. (2010) KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading. *PLoS Genet.* **6**, e1000869.
264. White J.H., Fernandes I., Mader S., Yang X.J. (2004) Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors. *Vitam. Horm.* **68**, 123–143.
265. Emmett M.J., Lazar M.A. (2019) Integrative regulation of physiology by histone deacetylase 3. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **20**, 102–115.
266. Chanda D., Xie Y.B., Choi H.S. (2010) Transcriptional corepressor SHP recruits SIRT1 histone deacetylase to inhibit LRH-1 transactivation. *Nucl. Acids Res.* **38**, 4607–4619.
267. Reynolds N., O’Shaughnessy A., Hendrich B. (2013) Transcriptional repressors: multifaceted regulators of gene expression. *Development*. **140**, 505–512.
268. Celniker S.E., Dillon L.A., Gerstein M.B., Gunsalus K.C., Henikoff S., Karpen G.H., Kellis M., Lai E.C., Lieb J.D., MacAlpine D.M., Mickle G., Piano F., Snyder M., Stein L., White K.P., Waterston R.H. (2009) Unlocking the secrets of the genome. *Nature*. **459**, 927–930.
269. modENCODE Consortium, Roy S., Ernst J., Kharchenko P.V., Kheradpour P., Negre N., Eaton M.L., Landolin J.M., Bristow C.A., Ma L., Lin M.F., Washietl S., Arshinoff B.I., Ay F., Meyer P.E., Robine N., Washington N.L., Di Stefano L., Berezikov E., Brown C.D., Candéias R., Carlson J.W., Carr A., Jungreis I., Marbach D., Sealfon R., Tolstorukov M.Y.,

- Will S., Alekseyenko A.A., Artieri C., Booth B.W., Brooks A.N., Dai Q., Davis C.A., Duff M.O., Feng X., Gorchakov A.A., Gu T., Henikoff J.G., Kapranov P., Li R., MacAlpine H.K., Malone J., Minoda A., Nordman J., Okamura K., Perry M., Powell S.K., Riddle N.C., Sakai A., Samsonova A., Sandler J.E., Schwartz Y.B., Sher N., Spokony R., Sturgill D., van Baren M., Wan K.H., Yang L., Yu C., Feingold E., Good P., Guyer M., Lowdon R., Ahmad K., Andrews J., Berger B., Brenner S.E., Brent M.R., Cherbas L., Elgin S.C., Gingeras T.R., Grossman R., Hoskins R.A., Kaufman T.C., Kent W., Kuroda M.I., Orr-Weaver T., Perimon N., Pirrotta V., Posakony J.W., Ren B., Russell S., Cherbas P., Graveley B.R., Lewis S., Micklem G., Oliver B., Park P.J., Celniker S.E., Henikoff S., Karpen G.H., Lai E.C., MacAlpine D.M., Stein L.D., White K.P., Kellis M. (2010) Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. *Science*. **330**, 1787–1797.
270. Hoffman M.M., Ernst J., Wilder S.P., Kundaje A., Harris R.S., Libbrecht M., Giardine B., Ellenbogen P.M., Bilmes J.A., Birney E., Hardison R.C., Dunham I., Kellis M., Noble W.S. (2013) Integrative annotation of chromatin elements from ENCODE data. *Nucl. Acids Res.* **41**, 827–841.
271. White M.A. (2015) Understanding how cis-regulatory function is encoded in DNA sequence using massively parallel reporter assays and designed sequences. *Genomics*. **106**, 165–170.
272. Kleinjan D.J., Coutinho P. (2009) Cis-rupture mechanisms: disruption of cis-regulatory control as a cause of human genetic disease. *Brief Funct. Genomic Proteomic*. **8**, 317–332.
273. Diederichs S., Bartsch L., Berkman J.C., Frose K., Heitmann J., Hoppe C., Iggena D., Jazmati D., Karschnia P., Linsenmeier M., Maulhardt T., Mohrmann L., Morstein J., Paffenholz S.V., Ropenack P., Ruckert T., Sandig L., Schell M., Steinmann A., Voss G., Was-muth J., Weinberger M.E., Wullenkord R. (2016) The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations. *EMBO Mol. Med.* **8**, 442–457.
274. West A.G., Fraser P. (2005) Remote control of gene transcription. *Hum. Mol. Genet.* **14**(1), R101–111.
275. Meier K., Brehm A. (2014) Chromatin regulation: how complex does it get? *Epigenetics*. **9**, 1485–1495.
276. Ernst J., Kellis M. (2010) Discovery and characterization of chromatin states for systematic annotation of the human genome. *Nat. Biotechnol.* **28**, 817–825.
277. Filion G.J., van Bemmel J.G., Braunschweig U., Talhout W., Kind J., Ward L.D., Brugman W., de Castro I.J., Kerkhoven R.M., Bussemaker H.J., van Steensel B. (2010) Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell*. **143**, 212–224.
278. Kharchenko P.V., Alekseyenko A.A., Schwartz Y.B., Minoda A., Riddle N.C., Ernst J., Sabo P.J., Larschan E., Gorchakov A.A., Gu T., Linder-Basso D., Plachetka A., Shanower G., Tolstorukov M.Y., Luquette L.J., Xi R., Jung Y.L., Park R.W., Bishop E.P., Canfield T.K., Sandstrom R., Thurman R.E., MacAlpine D.M., Stamatoyannopoulos J.A., Kellis M., Elgin S.C., Kuroda M.I., Pirrotta V., Karpen G.H., Park P.J. (2011) Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature*. **471**, 480–485.
279. Ho J.W., Jung Y.L., Liu T., Alver B.H., Lee S., Ikegami K., Sohn K.A., Minoda A., Tolstorukov M.Y., Appert A., Parker S.C., Gu T., Kundaje A., Riddle N.C., Bishop E., Egelhofer T.A., Hu S.S., Alekseyenko A.A., Rechtsteiner A., Asker D., Belsky J.A., Bowman S.K., Chen Q.B., Chen R.A., Day D.S., Dong Y., Dose A.C., Duan X., Epstein C.B., Ercan S., Feingold E.A., Ferrari F., Garrigues J.M., Gehlenborg N., Good P.J., Haseley P., He D., Herrmann M., Hoffman M.M., Jeffers T.E., Kharchenko P.V., Kolasinska-Zwiercz P., Kotwaliwale C.V., Kumar N., Langley S.A., Larschan E.N., Latorre I., Libbrecht M.W., Lin X., Park R., Pazin M.J., Pham H.N., Plachetka A., Qin B., Schwartz Y.B., Shores N., Stempor P., Vielle A., Wang C., Whittle C.M., Xue H., Kingston R.E., Kim J.H., Bernstein B.E., Dernburg A.F., Pirrotta V., Kuroda M.I., Noble W.S., Tullius T.D., Kellis M., MacAlpine D.M., Strome S., Elgin S.C., Liu X.S., Lieb J.D., Ahringer J., Karpen G.H., Park P.J. (2014) Comparative analysis of metazoan chromatin organization. *Nature*. **512**, 449–452.
280. Yue F., Cheng Y., Breschi A., Vierstra J., Wu W., Ryba T., Sandstrom R., Ma Z., Davis C., Pope B.D., Shen Y., Pervouchine D.D., Djebali S., Thurman R.E., Kaul R., Rynes E., Kirilusha A., Marinov G.K., Williams B.A., Trout D., Amrhein H., Fisher-Aylor K., Antoshechkin I., DeSalvo G., See L.H., Fastuca M., Drenkow J., Zaleski C., Dobin A., Prieto P., Lagarde J., Bussotti G., Tanzer A., Denas O., Li K., Bender M.A., Zhang M., Byron R., Groudine M.T., McCleary D., Pham L., Ye Z., Kuan S., Edsall L., Wu Y.C., Rasmussen M.D., Bansal M.S., Kellis M., Keller C.A., Morrissey C.S., Mishra T., Jain D., Dogan N., Harris R.S., Cayting P., Kawli T., Boyle A.P., Euskirchen G., Kundaje A., Lin S., Lin Y., Jansen C., Malladi V.S., Cline M.S., Erickson D.T., Kirkup V.M., Learned K., Sloan C.A., Rosenbloom K.R., Lacerda de Sousa B., Beal K., Pignatelli M., Flicek P., Lian J., Kahveci T., Lee D., Kent W.J., Ramalho Santos M., Herrero J., Notredame C., Johnson A., Vong S., Lee K., Bates D., Neri F., Diegel M., Canfield T., Sabo P.J., Wilken M.S., Reh T.A., Giste E., Shafer A., Kutayin T., Haugen E., Dunn D., Reynolds A.P., Neph S., Humbert R., Hansen R.S., De Bruijn M., Selleri L., Rudensky A., Josefowicz S., Samstein R., Eichler E.E., Orkin S.H., Levasseur D., Papayannopoulou T., Chang K.H., Skoultschi A., Gosh S., Disteche C., Treuting P., Wang Y., Weiss M.J., Blobel G.A., Cao X., Zhong S., Wang T., Good P.J., Lowdon R.F., Adams L.B., Zhou X.Q., Pazin M.J., Feingold E.A., Wold B., Taylor J., Mortazavi A., Weissman S.M., Stamatoyannopoulos J.A., Snyder M.P., Guigo R., Gingeras T.R., Gilbert D.M., Hardison R.C., Beer M.A., Ren B. (2014) A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature*. **515**, 355–364.
281. Kundaje A., Meuleman W., Ernst J., Bilenky M., Yen A., Heravi-Moussavi A., Kheradpour P., Zhang Z., Wang J., Ziller M.J., Amin V., Whitaker J.W., Schultz M.D., Ward L.D., Sarkar A., Quon G., Sandstrom R.S., Eaton M.L., Wu Y.C., Pfenning A.R.,

- Wang X., Claussnitzer M., Liu Y., Coarfa C., Harris R.A., Shores N., Epstein C.B., Gjonjeska E., Leung D., Xie W., Hawkins R.D., Lister R., Hong C., Gascard P., Mungall A.J., Moore R., Chuah E., Tam A., Canfield T.K., Hansen R.S., Kaul R., Sabo P.J., Bansal M.S., Carles A., Dixon J.R., Farh K.H., Feizi S., Karlic R., Kim A.R., Kulkarni A., Li D., Lowdon R., Elliott G., Mercer T.R., Neph S.J., Onuchic V., Polak P., Rajagopal N., Ray P., Sallari R.C., Siebenthal K.T., Sinnott-Armstrong N.A., Stevens M., Thurman R.E., Wu J., Zhang B., Zhou X., Beaudet A.E., Boyer L.A., De Jager P.L., Farnham P.J., Fisher S.J., Haussler D., Jones S.J., Li W., Marra M.A., McManus M.T., Sunyaev S., Thomson J.A., Tlsty T.D., Tsai L.H., Wang W., Waterland R.A., Zhang M.Q., Chadwick L.H., Bernstein B.E., Costello J.F., Ecker J.R., Hirst M., Meissner A., Milosavljevic A., Ren B., Stamatoyannopoulos J.A., Wang T., Kellis M. (2015) Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*. **518**, 317–330.
282. Стегний В.Н. (2006) Эволюционное значение архитектоники хромосом как формы эпигенетического контроля онто- и филогенеза эукариот. *Генетика*. **42**(9), 1215–1224.
283. Гаврилов А.А., Разин С.В. (2015) Компартиментализация клеточного ядра и пространственная организация генома. *Молекуляр. биология*. **49**(1), 21–39.
284. Zorn C., Cremer C., Cremer T., Zimmer J. (1979) Unscheduled DNA synthesis after partial UV irradiation of the cell nucleus. Distribution in interphase and metaphase. *Exp. Cell. Res.* **124**, 111–119.
285. Cremer T., Cremer C., Schneider T., Baumann H., Hens L., Kirsch-Volders M. (1982) Analysis of chromosome positions in the interphase nucleus of Chinese hamster cells by laser-UV-microirradiation experiments. *Hum. Genet.* **62**, 201–209.
286. Manuelidis L. (1985) Individual interphase chromosome domains revealed by *in situ* hybridization. *Hum. Genet.* **71**, 288–293.
287. Croft J.A., Bridger J.M., Boyle S., Perry P., Teague P., Bickmore W.A. (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell. Biol.* **145**, 1119–1131.
288. Cremer T., Cremer C. (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 292–301.
289. Cremer M., Kupper K., Wagler B., Wizelman L., von Hase J., Weiland Y., Kreja L., Diebold J., Speicher M.R., Cremer T. (2003) Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J. Cell. Biol.* **162**, 809–820.
290. Kupper K., Kolbl A., Biener D., Dittrich S., von Hase J., Thormeyer T., Fiegler H., Carter N.P., Speicher M.R., Cremer T., Cremer M. (2007) Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression. *Chromosoma*. **116**, 285–306.
291. Tanabe H., Muller S., Neusser M., von Hase J., Calcagno E., Cremer M., Solovei I., Cremer C., Cremer T. (2002) Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 4424–4429.
292. Mayer R., Brero A., von Hase J., Schroeder T., Cremer T., Dietzel S. (2005) Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse. *BMC Cell Biol.* **6**, 44.
293. Goetze S., Mateos-Langerak J., Gierman H.J., de Leeuw W., Giromus O., Indemans M.H., Koster J., Ondrej V., Versteeg R., van Driel R. (2007) The three-dimensional structure of human interphase chromosomes is related to the transcriptome map. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 4475–4487.
294. Grasser F., Neusser M., Fiegler H., Thormeyer T., Cremer M., Carter N.P., Cremer T., Muller S. (2008) Replication-timing-correlated spatial chromatin arrangements in cancer and in primate interphase nuclei. *J. Cell. Sci.* **121**, 1876–1886.
295. Andrulis E.D., Neiman A.M., Zappulla D.C., Sternglanz R. (1998) Perinuclear localization of chromatin facilitates transcriptional silencing. *Nature*. **394**, 592–595.
296. Kosak S.T., Skok J.A., Medina K.L., Riblet R., Le Beau M.M., Fisher A.G., Singh H. (2002) Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science*. **296**, 158–162.
297. Kind J., van Steensel B. (2010) Genome-nuclear lamina interactions and gene regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **22**, 320–325.
298. Briand N., Collas P. (2020) Lamina-associated domains: peripheral matters and internal affairs. *Genome Biol.* **21**, 85.
299. Guelen L., Pagie L., Brasset E., Meuleman W., Faza M.B., Talhout W., Eussen B.H., de Klein A., Wessels L., de Laat W., van Steensel B. (2008) Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*. **453**, 948–951.
300. van Steensel B., Belmont A.S. (2017) Lamina-associated domains: links with chromosome architecture, heterochromatin, and gene repression. *Cell*. **169**, 780–791.
301. Lochs S.J.A., Kefalopoulou S., Kind J. (2019) Lamina associated domains and gene regulation in development and cancer. *Cells*. **8**(3), e271.
302. Harr J.C., Luperchio T.R., Wong X., Cohen E., Wheelan S.J., Reddy K.L. (2015) Directed targeting of chromatin to the nuclear lamina is mediated by chromatin state and A-type lamins. *J. Cell. Biol.* **208**, 33–52.
303. Zullo J.M., Demarco I.A., Pique-Regi R., Gaffney D.J., Epstein C.B., Spooner C.J., Luperchio T.R., Bernstein B.E., Pritchard J.K., Reddy K.L., Singh H. (2012) DNA sequence-dependent compartmentalization and silencing of chromatin at the nuclear lamina. *Cell*. **149**, 1474–1487.
304. Boyle S., Gilchrist S., Bridger J.M., Mahy N.L., Ellis J.A., Bickmore W.A. (2001) The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 211–219.
305. Demmerle J., Koch A.J., Holaska J.M. (2012) The nuclear envelope protein emerin binds directly to histone deacetylase 3 (HDAC3) and activates HDAC3 activity. *J. Biol. Chem.* **287**, 22080–22088.

306. Peric-Hupkes D., Meuleman W., Pagie L., Brugge- man S.W., Solovei I., Brugman W., Graf S., Flicek P., Kerkhoven R.M., van Lohuizen M., Reinders M., Wessels L., van Steensel B. (2010) Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Mol. Cell.* **38**, 603–613.
307. Therizols P., Illingworth R.S., Courilleau C., Boyle S., Wood A.J., Bickmore W.A. (2014) Chromatin decondensation is sufficient to alter nuclear organization in embryonic stem cells. *Science.* **346**, 1238–1242.
308. Brueckner L., Zhao P.A., van Schaik T., Leemans C., Sima J., Peric-Hupkes D., Gilbert D.M., van Steensel B. (2020) Local rewiring of genome-nuclear lamina interactions by transcription. *EMBO J.* **39**, e103159.
309. Лавров С.А., Шацких А.С., Кибанов М.В., Гвоздев В.А. (2013) Транскрипционная инактивация генов при эффекте положения у *D. melanogaster* коррелирует на уровне отдельных клеток с их перемещением в гетерохроматиновый компартмент ядра. *Молекуляр. биология.* **47**(2), 1–6.
310. Meuleman W., Peric-Hupkes D., Kind J., Beaudry J.B., Pagie L., Kellis M., Reinders M., Wessels L., van Steensel B. (2013) Constitutive nuclear lamina-genome interactions are highly conserved and associated with A/T-rich sequence. *Genome Res.* **23**, 270–280.
311. Nemeth A., Conesa A., Santoyo-Lopez J., Medina I., Montaner D., Peterfia B., Solovei I., Cremer T., Dopazo J., Langst G. (2010) Initial genomics of the human nucleolus. *PLoS Genet.* **6**, e1000889.
312. Bizhanova A., Kaufman P.D. (2021) Close to the edge: heterochromatin at the nucleolar and nuclear peripheries. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **1864**, 194666.
313. van Koningsbruggen S., Gierlinski M., Schofield P., Martin D., Barton G.J., Ariyurek Y., den Dunnen J.T., Lamond A.I. (2010) High-resolution whole-genome sequencing reveals that specific chromatin domains from most human chromosomes associate with nucleoli. *Mol. Biol. Cell.* **21**, 3735–3748.
314. Dillinger S., Straub T., Nemeth A. (2017) Nucleolus association of chromosomal domains is largely maintained in cellular senescence despite massive nuclear reorganisation. *PLoS One.* **12**, e0178821.
315. Wang M., Lemos B. (2019) Ribosomal DNA harbors an evolutionarily conserved clock of biological aging. *Genome Res.* **29**, 325–333.
316. de Wit E., de Laat W. (2012) A decade of 3C technologies: insights into nuclear organization. *Genes Dev.* **26**, 11–24.
317. Sati S., Cavalli G. (2017) Chromosome conformation capture technologies and their impact in understanding genome function. *Chromosoma.* **126**, 33–44.
318. Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu J.S., Ren B. (2012) Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature.* **485**, 376–380.
319. Phillips-Cremins J.E., Sauria M.E., Sanyal A., Gerasimova T.I., Lajoie B.R., Bell J.S., Ong C.T., Hookway T.A., Guo C., Sun Y., Bland M.J., Wagstaff W., Dalton S., McDevitt T.C., Sen R., Dekker J., Taylor J., Corces V.G. (2013) Architectural protein subclasses shape 3D organization of genomes during lineage commitment. *Cell.* **153**, 1281–1295.
320. Sexton T., Yaffe E., Kenigsberg E., Bantignies F., Leblanc B., Hoichman M., Parrinello H., Tanay A., Cavalli G. (2012) Three-dimensional folding and functional organization principles of the *Drosophila* genome. *Cell.* **148**, 458–472.
321. Wang Q., Sun Q., Czajkowsky D.M., Shao Z. (2018) Sub-kb Hi-C in *D. melanogaster* reveals conserved characteristics of TADs between insect and mammalian cells. *Nat. Commun.* **9**, 188.
322. Pope B.D., Ryba T., Dileep V., Yue F., Wu W., Denas O., Vera D.L., Wang Y., Hansen R.S., Canfield T.K., Thurman R.E., Cheng Y., Gulsoy G., Dennis J.H., Snyder M.P., Stamatoyannopoulos J.A., Taylor J., Hardison R.C., Kahveci T., Ren B., Gilbert D.M. (2014) Topologically associating domains are stable units of replication-timing regulation. *Nature.* **515**, 402–405.
323. Zheng X., Hu J., Yue S., Kristiani L., Kim M., Sauria M., Taylor J., Kim Y., Zheng Y. (2018) Lamins organize the global three-dimensional genome from the nuclear periphery. *Mol. Cell.* **71**(5), 802–815. e7.
324. Buchwalter A., Kaneshiro J.M., Hetzer M.W. (2019) Coaching from the sidelines: the nuclear periphery in genome regulation. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 39–50.
325. Hnisz D., Weintraub A.S., Day D.S., Valton A.L., Bak R.O., Li C.H., Goldmann J., Lajoie B.R., Fan Z.P., Sigova A.A., Reddy J., Borges-Rivera D., Lee T.I., Jaenisch R., Porteus M.H., Dekker J., Young R.A. (2016) Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods. *Science.* **351**, 1454–1458.
326. Redin C., Brand H., Collins R.L., Kammin T., Mitchell E., Hodge J.C., Hanscom C., Pillalamarri V., Seabra C.M., Abbott M.A., Abdul-Rahman O.A., Abeger E., Adley R., Alcaraz-Estrada S.L., Alkuraya F.S., An Y., Anderson M.A., Antolik C., Anyane-Yeboah K., Atkin J.F., Bartell T., Bernstein J.A., Beyer E., Blumenthal I., Bongers E.M., Brilstra E.H., Brown C.W., Bruggenwirth H.T., Callewaert B., Chiang C., Cornig K., Cox H., Cuppen E., Currall B.B., Cushing T., David D., Deardorff M.A., Dheedene A., D’Hooghe M., de Vries B.B., Earl D.L., Ferguson H.L., Fisher H., FitzPatrick D.R., Gerrol P., Giachino D., Glessner J.T., Gliem T., Grady M., Graham B.H., Griffis C., Gripp K.W., Gropman A.L., Hanson-Kahn A., Harris D.J., Hayden M.A., Hill R., Hochstenbach R., Hoffman J.D., Hopkin R.J., Hubshman M.W., Innes A.M., Irons M., Irving M., Jacobsen J.C., Janssens S., Jewett T., Johnson J.P., Jongmans M.C., Kahler S.G., Koolen D.A., Korzelius J., Kroisel P.M., Lacassie Y., Lawless W., Lemyre E., Leppig K., Levin A.V., Li H., Liao E.C., Lim C., Lose E.J., Lucente D., Macera M.J., Manavalan P., Mandrile G., Marcellis C.L., Margolin L., Mason T., Masser-Frye D., McClellan M.W., Mendoza C.J., Menten B., Middelkamp S., Mikami L.R., Moe E., Mohammed S., Mononen T., Mortenson M.E., Moya G., Nieuwint A.W., Ordulu Z., Parkash S., Pauker S.P., Pereira S., Perrin D., Phelan K., Aguilar R.E., Poddighe P.J., Pregno G., Raskin S., Reis L., Rhead W., Rita D., Renkens I., Roelens F., Ruliera J., Rump P., Schilit S.L., Shaheen R., Sparkes R., Spiegel E., Stevens B., Stone M.R., Tagoe J.,

- Thakuria J.V., van Bon B.W., van de Kamp J., van Der Burgt I., van Essen T., van Ravenswaaij-Arts C.M., van Roosmalen M.J., Vergult S., Volker-Touw C.M., Warburton D.P., Waterman M.J., Wiley S., Wilson A., Yerena-de Vega M.C., Zori R.T., Levy B., Brunner H.G., de Leeuw N., Kloosterman W.P., Thorland E.C., Morton C.C., Gusella J.F., Talkowski M.E. (2017) The genomic landscape of balanced cytogenetic abnormalities associated with human congenital anomalies. *Nat. Genet.* **49**, 36–45.
327. Kraft K., Magg A., Heinrich V., Riemenschneider C., Schopflin R., Markowski J., Ibrahim D.M., Acuna-Hidalgo R., Despang A., Andrey G., Wittler L., Timmermann B., Vingron M., Mundlos S. (2019) Serial genomic inversions induce tissue-specific architectural stripes, gene misexpression and congenital malformations. *Nat. Cell. Biol.* **21**, 305–310.
328. Erdel F., Rippe K. (2018) Formation of chromatin sub-compartments by phase separation. *Biophys. J.* **114**, 2262–2270.
329. Strom A.R., Emelyanov A.V., Mir M., Fyodorov D.V., Darzacq X., Karpen G.H. (2017) Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature*. **547**, 241–245.
330. Larson A.G., Elnatan D., Keenen M.M., Trnka M.J., Johnston J.B., Burlingame A.L., Agard D.A., Redding S., Narlikar G.J. (2017) Liquid droplet formation by HP1alpha suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature*. **547**, 236–240.
331. Razin S.V., Ulianov S.V. (2020) Divide and rule: phase separation in eukaryotic genome functioning. *Cells*. **9**(11), e2480.
332. Hyman A.A., Weber C.A., Julicher F. (2014) Liquid-liquid phase separation in biology. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **30**, 39–58.
333. Babokhov M., Hibino K., Itoh Y., Maeshima K. (2020) Local chromatin motion and transcription. *J Mol Biol.* **432**, 694–700.
334. Tatarakis A., Behrouzi R., Moazed D. (2017) Evolving models of heterochromatin: from foci to liquid droplets. *Mol. Cell.* **67**, 725–727.
335. Machida S., Takizawa Y., Ishimaru M., Sugita Y., Sekine S., Nakayama J.I., Wolf M., Kurumizaka H. (2018) Structural basis of heterochromatin formation by human HP1. *Mol. Cell.* **69**, 385–397 e388.
336. Hnisz D., Shrinivas K., Young R.A., Chakraborty A.K., Sharp P.A. (2017) A phase separation model for transcriptional control. *Cell*. **169**, 13–23.
337. Silveira M.A.D., Bilodeau S. (2018) Defining the transcriptional ecosystem. *Mol. Cell.* **72**, 920–924.
338. Wang X., Cairns M.J., Yan J. (2019) Super-enhancers in transcriptional regulation and genome organization. *Nucl. Acids Res.* **47**, 11481–11496.
339. Grosveld F., van Staaldouin J., Stadhouders R. (2021) Transcriptional regulation by (super)enhancers: from discovery to mechanisms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **22**, 127–146.
340. Zhang J., Yue W., Zhou Y., Liao M., Chen X., Hua J. (2021) Super enhancers-functional cores under the 3D genome. *Cell Prolif.* **54**, e12970.
341. Belaghzal H., Borrman T., Stephens A.D., Lafontaine D.L., Venev S.V., Weng Z., Marko J.F., Dekker J. (2021) Liquid chromatin Hi-C characterizes compartment-dependent chromatin interaction dynamics. *Nat. Genet.* **53**, 367–378.
342. Hahn M., Dambacher S., Schotta G. (2010) Heterochromatin dysregulation in human diseases. *J. Appl. Physiol.* **109**, 232–242.
343. Robin J.D., Magdinier F. (2017) Higher-order chromatin organization in diseases: from chromosomal position effect to phenotype variegation. *Handbook Epigenet. 2nd ed. Acad. Press. Chapter 6*, 73–92.
344. Rabbitts T.H. (1994) Chromosomal translocations in human cancer. *Nature*. **372**, 143–149.
345. Rabbitts T.H. (1991) Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell*. **67**, 641–644.
346. Korsmeyer S.J. (1992) Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 785–807.
347. Lossos I.S., Akasaka T., Martinez-Climent J.A., Siebert R., Levy R. (2003) The *BCL6* gene in B-cell lymphomas with 3q27 translocations is expressed mainly from the rearranged allele irrespective of the partner gene. *Leukemia*. **17**, 1390–1397.
348. Northcott P.A., Lee C., Zichner T., Stutz A.M., Erkek S., Kawauchi D., Shih D.J., Hovestadt V., Zapatka M., Sturm D., Jones D.T., Kool M., Remke M., Cavalli F.M., Zuyderduyn S., Bader G.D., VandenBerg S., Esparza L.A., Ryzhova M., Wang W., Wittmann A., Stark S., Sieber L., Seker-Cin H., Linke L., Kratochwil F., Jager N., Buchhalter I., Imbusch C.D., Zipprich G., Raeder B., Schmidt S., Diessl N., Wolf S., Wiemann S., Brors B., Lawrenz C., Eils J., Warnatz H.J., Risch T., Yaspo M.L., Weber U.D., Bartholomae C.C., von Kalle C., Turanyi E., Hauser P., Sanden E., Darabi A., Siesjo P., Sterba J., Zitterbart K., Sumerauer D., van Sluis P., Versteeg R., Volckmann R., Koster J., Schuhmann M.U., Ebinger M., Grimes H.L., Robinson G.W., Gajjar A., Mynarek M., von Hoff K., Rutkowski S., Pietsch T., Scheurlen W., Felsberg J., Reifenberger G., Kulozik A.E., von Deimling A., Witt O., Eils R., Gilbertson R.J., Korshunov A., Taylor M.D., Lichter P., Korbel J.O., Wechsler-Reya R.J., Pfister S.M. (2014) Enhancer hijacking activates GF11 family oncogenes in medulloblastoma. *Nature*. **511**, 428–434.
349. Kleinjan D.J., van Heyningen V. (1998) Position effect in human genetic disease. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1611–1618.
350. Kleinjan D.A., van Heyningen V. (2005) Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 8–32.
351. Hannan A.J. (2018) Tandem repeats mediating genetic plasticity in health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 286–298.
352. Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J., Kann L., Lehoczky J., LeVine R., McEwan P., McKernan K., Meldrim J., Mesirov J.P., Miranda C., Morris W., Naylor J., Raymond C., Rosetti M., Santos R., Sheridan A., Sougnez C., Stange-Thomann Y., Stojanovic N., Subramanian A., Wyman D., Rogers J., Sulston J., Ainscough R., Beck S., Bentley D., Burton J., Clee C., Carter N., Coulson A.,

- Deadman R., Deloukas P., Dunham A., Dunham I., Durbin R., French L., Grafham D., Gregory S., Hubbard T., Humphray S., Hunt A., Jones M., Lloyd C., McMurray A., Matthews L., Mercer S., Milne S., Mullikin J.C., Mungall A., Plumb R., Ross M., Showkeen R., Sims S., Waterston R.H., Wilson R.K., Hillier L.W., McPherson J.D., Marra M.A., Mardis E.R., Fulton L.A., Chinwalla A.T., Pepin K.H., Gish W.R., Chissoe S.L., Wendl M.C., Delehaunty K.D., Miner T.L., Delehaunty A., Kramer J.B., Cook L.L., Fulton R.S., Johnson D.L., Minx P.J., Clifton S.W., Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., Doggett N., Cheng J.F., Olsen A., Lucas S., Elkin C., Uberbacher E., Frazier M., Gibbs R.A., Muzny D.M., Scherer S.E., Bouck J.B., Sodergren E.J., Worley K.C., Rives C.M., Gorrell J.H., Metzker M.L., Naylor S.L., Kucherlapati R.S., Nelson D.L., Weinstock G.M., Sakaki Y., Fujiiyama A., Hattori M., Yada T., Toyoda A., Itoh T., Kawagoe C., Watanabe H., Totoki Y., Taylor T., Weissenbach J., Heilig R., Saurin W., Artiguenave F., Brottier P., Bruls T., Pelletier E., Robert C., Wincker P., Smith D.R., Doucette-Stamm L., Rubenfield M., Weinstock K., Lee H.M., Dubois J., Rosenthal A., Platzer M., Nyakatura G., Taudien S., Rump A., Yang H., Yu J., Wang J., Huang G., Gu J., Hood L., Rowen L., Madan A., Qin S., Davis R.W., Federspiel N.A., Abola A.P., Proctor M.J., Myers R.M., Schmutz J., Dickson M., Grimwood J., Cox D.R., Olson M.V., Kaul R., Shimizu N., Kawasaki K., Minoshima S., Evans G.A., Athanasiou M., Schultz R., Roe B.A., Chen F., Pan H., Ramser J., Lehrach H., Reinhardt R., McCombie W.R., de la Bastide M., Dedhia N., Blocker H., Hornischer K., Nordsiek G., Agarwala R., Aravind L., Bailey J.A., Bateman A., Batzoglu S., Birney E., Bork P., Brown D.G., Burge C.B., Cerutti L., Chen H.C., Church D., Clamp M., Copley R.R., Doerks T., Eddy S.R., Eichler E.E., Furey T.S., Galagan J., Gilbert J.G., Harmon C., Hayashizaki Y., Haussler D., Hermjakob H., Hokamp K., Jang W., Johnson L.S., Jones T.A., Kasif S., Kasprzyk A., Kennedy S., Kent W.J., Kitts P., Koonin E.V., Korf I., Kulp D., Lancet D., Lowe T.M., McLysaght A., Mikkelsen T., Moran J.V., Mulder N., Pollara V.J., Ponting C.P., Schuler G., Schultz J., Slater G., Smit A.F., Stupka E., Szustakowski J., Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J., Wagner L., Wallis J., Wheeler R., Williams A., Wolf Y.I., Wolfe K.H., Yang S.P., Yeh R.F., Collins F., Guyer M.S., Peterson J., Felsenfeld A., Wetterstrand K.A., Patrinos A., Morgan M.J., de Jong P., Catanese J.J., Osoegawa K., Shizuya H., Choi S., Chen Y.J. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. **409**, 860–921.
353. de Koning A.P., Gu W., Castoe T.A., Batzer M.A., Pollock D.D. (2011) Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genet*. **7**, e1002384.
354. Schaap M., Lemmers R.J., Maassen R., van der Vliet P.J., Hoogerheide L.F., van Dijk H.K., Basturk N., de Knijff P., van der Maarel S.M. (2013) Genome-wide analysis of macrosatellite repeat copy number variation in worldwide populations: evidence for differences and commonalities in size distributions and size restrictions. *BMC Genomics*. **14**, 143.
355. Richard G.F., Kerrest A., Dujon B. (2008) Comparative genomics and molecular dynamics of DNA repeats in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 686–727.
356. Vinces M.D., Legendre M., Caldara M., Hagihara M., Verstrepen K.J. (2009) Unstable tandem repeats in promoters confer transcriptional evolvability. *Science*. **324**, 1213–1216.
357. Sawaya S., Bagshaw A., Buschiazzo E., Kumar P., Chowdhury S., Black M.A., Gemmell N. (2013) Microsatellite tandem repeats are abundant in human promoters and are associated with regulatory elements. *PLoS One*. **8**, e54710.
358. Bilgin Sonay T., Carvalho T., Robinson M.D., Greminger M.P., Krutzen M., Comas D., Highnam G., Mittelman D., Sharp A., Marques-Bonet T., Wagner A. (2015) Tandem repeat variation in human and great ape populations and its impact on gene expression divergence. *Genome Res*. **25**, 1591–1599.
359. Sawaya S.M., Lennon D., Buschiazzo E., Gemmell N., Minin V.N. (2012) Measuring microsatellite conservation in mammalian evolution with a phylogenetic birth-death model. *Genome Biol. Evol.* **4**, 636–647.
360. Sawaya S.M., Bagshaw A.T., Buschiazzo E., Gemmell N.J. (2012) Promoter microsatellites as modulators of human gene expression. *Adv. Exp. Med. Biol.* **769**, 41–54.
361. Gymrek M., Willems T., Guilmatre A., Zeng H., Markus B., Georgiev S., Daly M.J., Price A.L., Pritchard J.K., Sharp A.J., Erlich Y. (2016) Abundant contribution of short tandem repeats to gene expression variation in humans. *Nat. Genet.* **48**, 22–29.
362. Rockman M.V., Wray G.A. (2002) Abundant raw material for cis-regulatory evolution in humans. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 1991–2004.
363. Gemayel R., Vinces M.D., Legendre M., Verstrepen K.J. (2010) Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annu. Rev. Genet.* **44**, 445–477.
364. Jansen A., Gemayel R., Verstrepen K.J. (2012) Unstable microsatellite repeats facilitate rapid evolution of coding and regulatory sequences. *Genome Dyn.* **7**, 108–125.
365. Dorer D.R., Henikoff S. (1994) Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell*. **77**, 993–1002.
366. Garrick D., Fiering S., Martin D.I., Whitelaw E. (1998) Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat. Genet.* **18**, 56–59.
367. Brahmachary M., Guilmatre A., Quilez J., Hasson D., Borel C., Warburton P., Sharp A.J. (2014) Digital genotyping of macrosatellites and multicopy genes reveals novel biological functions associated with copy number variation of large tandem repeats. *PLoS Genet*. **10**, e1004418.
368. Poeta L., Drongitis D., Verrillo L., Miano M.G. (2020) DNA hypermethylation and unstable repeat diseases: a paradigm of transcriptional silencing to decipher the basis of pathogenic mechanisms. *Genes (Basel)*. **11**(6), e684.

369. Willems T., Gymrek M., Highnam G., Mittelman D., Erlich Y. (2014) The landscape of human STR variation. *Genome Res.* **24**, 1894–1904.
370. Li Y.C., Korol A.B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* **11**, 2453–2465.
371. Campbell C.D., Chong J.X., Malig M., Ko A., Dumont B.L., Han L., Vives L., O’Roak B.J., Sudmant P.H., Shendure J., Abney M., Ober C., Eichler E.E. (2012) Estimating the human mutation rate using autozygosity in a founder population. *Nat. Genet.* **44**, 1277–1281.
372. Kondrashov A.S. (2003) Direct estimates of human per nucleotide mutation rates at 20 loci causing Mendelian diseases. *Hum. Mutat.* **21**, 12–27.
373. Sun J.X., Helgason A., Masson G., Ebenesersdottir S.S., Li H., Mallick S., Gnerre S., Patterson N., Kong A., Reich D., Stefansson K. (2012) A direct characterization of human mutation based on microsatellites. *Nat. Genet.* **44**, 1161–1165.
374. Weber J.L., Wong C. (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 1123–1128.
375. Brinkmann B., Klintschar M., Neuhuber F., Huhne J., Rolf B. (1998) Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 1408–1415.
376. Mitra I., Huang B., Mousavi N., Ma N., Lamkin M., Yanicky R., Shleizer-Burko S., Lohmueller K.E., Gymrek M. (2021) Patterns of *de novo* tandem repeat mutations and their role in autism. *Nature.* **589**, 246–250.
377. Annear D.J., Vandeweyer G., Elinck E., Sanchis-Juan A., French C.E., Raymond L., Kooy R.F. (2021) Abundance of polymorphic CGG repeats in the human genome suggest a broad involvement in neurological disease. *Sci. Rep.* **11**, 2515.
378. Rijkers T., Deidda G., van Koningsbruggen S., van Geel M., Lemmers R.J., van Deutekom J.C., Figlewicz D., Hewitt J.E., Padberg G.W., Frants R.R., van der Maarel S.M. (2004) FRG2, an FSHD candidate gene, is transcriptionally upregulated in differentiating primary myoblast cultures of FSHD patients. *J. Med. Genet.* **41**, 826–836.
379. Wijmenga C., Hewitt J.E., Sandkuijl L.A., Clark L.N., Wright T.J., Dauwse H.G., Gruter A.M., Hofker M.H., Moerer P., Williamson R., van Ommen G.B., Padberg G.W., Frants R.R. (1992) Chromosome 4q DNA rearrangements associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **2**, 26–30.
380. van Deutekom J.C., Wijmenga C., van Tienhoven E.A., Gruter A.M., Hewitt J.E., Padberg G.W., van Ommen G.B., Hofker M.H., Frants R.R. (1993) FSHD associated DNA rearrangements are due to deletions of integral copies of a 3.2 kb tandemly repeated unit. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 2037–2042.
381. Hewitt J.E., Lyle R., Clark L.N., Valleley E.M., Wright T.J., Wijmenga C., van Deutekom J.C., Francis F., Sharpe P.T., Hofker M., Frants R.R., Williamson R. (1994) Analysis of the tandem repeat locus D4Z4 associated with facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 1287–1295.
382. Gabellini D., Green M.R., Tupler R. (2002) Inappropriate gene activation in FSHD: a repressor complex binds a chromosomal repeat deleted in dystrophic muscle. *Cell.* **110**, 339–348.
383. Gabellini D., D’Antona G., Moggio M., Prelle A., Zecca C., Adami R., Angeletti B., Ciscato P., Pellegrino M.A., Bottinelli R., Green M.R., Tupler R. (2006) Facioscapulohumeral muscular dystrophy in mice overexpressing FRG1. *Nature.* **439**, 973–977.
384. Xynos A., Neguembor M.V., Caccia R., Licastro D., Nonis A., Di Serio C., Stupka E., Gabellini D. (2013) Overexpression of facioscapulohumeral muscular dystrophy region gene 1 causes primary defects in myogenic stem cells. *J. Cell. Sci.* **126**, 2236–2245.
385. Hagerman R., Hagerman P. (2013) Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Lancet Neurol.* **12**, 786–798.
386. Kremer E.J., Pritchard M., Lynch M., Yu S., Holman K., Baker E., Warren S.T., Schlessinger D., Sutherland G.R., Richards R.I. (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n. *Science.* **252**, 1711–1714.
387. Verkerk A.J., Pieretti M., Sutcliffe J.S., Fu Y.H., Kuhl D.P., Pizzuti A., Reiner O., Richards S., Victoria M.F., Zhang F.P., Eussen B.E., van Ommen G.B., Blonden L.A.J., Riggins G.J., Chastain J.L., Kunst C.B., Galjaard H., Caskey C.T., Nelson D.L., Oostra B.A., Warren S.T. (1991) Identification of a gene (*FMR-1*) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell.* **65**, 905–914.
388. Hansen R.S., Gartler S.M., Scott C.R., Chen S.H., Laird C.D. (1992) Methylation analysis of CGG sites in the CpG island of the human *FMR1* gene. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 571–578.
389. Maurin T., Zongaro S., Bardoni B. (2014) Fragile X syndrome: from molecular pathology to therapy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **46**, Pt 2, 242–255.
390. Dolskiy A.A., Yarushkin A.A., Grishchenko I.V., Lemskaya N.A., Pindyurin A.V., Boldyreva L.V., Pustylnyak V.O., Yudkin D.V. (2021) miRNA expression and interaction with the 3’UTR of FMR1 in FRAXopathy pathogenesis. *Noncoding RNA Res.* **6**, 1–7.
391. Chen H.C., Martinez J.P., Zorita E., Meyerhans A., Filion G.J. (2017) Position effects influence HIV latency reversal. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 47–54.
392. Pierson T.C., Zhou Y., Kieffer T.L., Ruff C.T., Buck C., Siliciano R.F. (2002) Molecular characterization of preintegration latency in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **76**, 8518–8531.
393. Pang S., Koyanagi Y., Miles S., Wiley C., Vinters H.V., Chen I.S. (1990) High levels of unintegrated HIV-1 DNA in brain tissue of AIDS dementia patients. *Nature.* **343**, 85–89.
394. Pierson T.C., Kieffer T.L., Ruff C.T., Buck C., Gange S.J., Siliciano R.F. (2002) Intrinsic stability of episomal circles formed during human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol.* **76**, 4138–4144.
395. Kelly J., Beddall M.H., Yu D., Iyer S.R., Marsh J.W., Wu Y. (2008) Human macrophages support persistent

- transcription from unintegrated HIV-1 DNA. *Virology*. **372**, 300–312.
396. Mbyone U., Karn J. (2017) The molecular basis for Human Immunodeficiency Virus latency. *Annu. Rev. Virol.* **4**, 261–285.
397. Vansant G., Bruggemans A., Janssens J., Debyser Z. (2020) Block-and-lock strategies to cure HIV infection. *Viruses*. **12**(1), e84.
398. Shukla A., Ramirez N.P., D'Orso I. (2020) HIV-1 proviral transcription and latency in the New Era. *Viruses*. **2**(5), e555.
399. Lindqvist B., Svensson Akusjarvi S., Sonnerborg A., Dimitriou M., Svensson J.P. (2020) Chromatin maturation of the HIV-1 provirus in primary resting CD4+ T cells. *PLoS Pathog.* **16**, e1008264.
400. Roy S., Delling U., Chen C.H., Rosen C.A., Sonenberg N. (1990) A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev.* **4**, 1365–1373.
401. Zhu Y., Pe'ery T., Peng J., Ramanathan Y., Marshall N., Marshall T., Amendt B., Mathews M.B., Price D.H. (1997) Transcription elongation factor P-TEFb is required for HIV-1 Tat transactivation *in vitro*. *Genes Dev.* **11**, 2622–2632.
402. Ping Y.H., Rana T.M. (2001) DSIF and NELF interact with RNA polymerase II elongation complex and HIV-1 Tat stimulates P-TEFb-mediated phosphorylation of RNA polymerase II and DSIF during transcription elongation. *J. Biol. Chem.* **276**, 12951–12958.
403. Easley R., Carpio L., Dannenberg L., Choi S., Alani D., Van Duyne R., Guendel I., Klase Z., Agbottah E., Kehn-Hall K., Kashanchi F. (2010) Transcription through the HIV-1 nucleosomes: effects of the PBAF complex in Tat activated transcription. *Virology*. **405**, 322–333.
404. Ammosova T., Berro R., Jerebtsova M., Jackson A., Charles S., Klase Z., Southerland W., Gordeuk V.R., Kashanchi F., Nekhai S. (2006) Phosphorylation of HIV-1 Tat by CDK2 in HIV-1 transcription. *Retrovirology*. **3**, 78.
405. West M.J., Lowe A.D., Karn J. (2001) Activation of human immunodeficiency virus transcription in T cells revisited: NF-kappaB p65 stimulates transcriptional elongation. *J. Virol.* **75**, 8524–8537.
406. Hogan P.G., Chen L., Nardone J., Rao A. (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* **17**, 2205–2232.
407. Kinoshita S., Su L., Amano M., Timmerman L.A., Kaneshima H., Nolan G.P. (1997) The T cell activation factor NF-ATc positively regulates HIV-1 replication and gene expression in T cells. *Immunity*. **6**, 235–244.
408. Coull J.J., Romerio F., Sun J.M., Volker J.L., Galvin K.M., Davie J.R., Shi Y., Hansen U., Margolis D.M. (2000) The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1. *J. Virol.* **74**, 6790–6799.
409. Tyagi M., Karn J. (2007) CBF-1 promotes transcriptional silencing during the establishment of HIV-1 latency. *EMBO J.* **26**, 4985–4995.
410. He G., Margolis D.M. (2002) Counterregulation of chromatin deacetylation and histone deacetylase occupancy at the integrated promoter of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the HIV-1 repressor YY1 and HIV-1 activator Tat. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2965–2973.
411. Tyagi M., Pearson R.J., Karn J. (2010) Establishment of HIV latency in primary CD4+ cells is due to epigenetic transcriptional silencing and P-TEFb restriction. *J. Virol.* **84**, 6425–6437.
412. Debyser Z., Christ F., De Rijck J., Gijssbers R. (2015) Host factors for retroviral integration site selection. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 108–116.
413. Marini B., Kertesz-Farkas A., Ali H., Lucic B., Lisek K., Manganaro L., Pongor S., Luzzati R., Recchia A., Mavilio F., Giacca M., Lucic M. (2015) Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection. *Nature*. **521**, 227–231.
414. Lucic M., Siliciano R.F. (2017) Nuclear landscape of HIV-1 infection and integration. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 69–82.
415. Gonzalez-Hernandez M.J., Swanson M.D., Contreras-Galindo R., Cookinham S., King S.R., Noel R.J., Jr., Kaplan M.H., Markovitz D.M. (2012) Expression of human endogenous retrovirus type K (HML-2) is activated by the Tat protein of HIV-1. *J. Virol.* **86**, 7790–7805.
416. Contreras-Galindo R., Kaplan M.H., Contreras-Galindo A.C., Gonzalez-Hernandez M.J., Ferlenghi I., Giusti F., Lorenzo E., Gitlin S.D., Dosik M.H., Yamamura Y., Markovitz D.M. (2012) Characterization of human endogenous retroviral elements in the blood of HIV-1-infected individuals. *J. Virol.* **86**, 262–276.
417. Contreras-Galindo R., Kaplan M.H., Dube D., Gonzalez-Hernandez M.J., Chan S., Meng F., Dai M., Omenn G.S., Gitlin S.D., Markovitz D.M. (2015) Human endogenous retrovirus type K (HERV-K) particles package and transmit HERV-K-related sequences. *J. Virol.* **89**, 7187–7201.
418. Geuking M.B., Weber J., Dewannieux M., Gorelik E., Heidmann T., Hengartner H., Zinkernagel R.M., Hangartner L. (2009) Recombination of retrotransposon and exogenous RNA virus results in nonretroviral cDNA integration. *Science*. **323**, 393–396.
419. Буздин А.А. (2010) Функциональный анализ вставок эндогенных ретровирусов в контексте эволюции генома человека. *Биоорган. химия*. **36**, 38–46.
420. Birnbaum R.Y., Patwardhan R.P., Kim M.J., Findlay G.M., Martin B., Zhao J., Bell R.J., Smith R.P., Ku A.A., Shendure J., Ahituv N. (2014) Systematic dissection of coding exons at single nucleotide resolution supports an additional role in cell-specific transcriptional regulation. *PLoS Genet.* **10**, e1004592.
421. Yan C., Chen H., Bai L. (2018) Systematic study of nucleosome-displacing factors in budding yeast. *Mol. Cell.* **71**, 294–305. e294.
422. Ramani V., Qiu R., Shendure J. (2019) High sensitivity profiling of chromatin structure by MNase-SSP. *Cell. Rep.* **26**, 2465–2476. e2464.
423. Levo M., Avnit-Sagi T., Lotan-Pompan M., Kalma Y., Weinberger A., Yakhini Z., Segal E. (2017) Systematic in-

- investigation of transcription factor activity in the context of chromatin using massively parallel binding and expression assays. *Mol. Cell.* **65**, 604–617. e606.
424. Hammelman J., Krismer K., Banerjee B., Gifford D.K., Sherwood R.I. (2020) Identification of determinants of differential chromatin accessibility through a massively parallel genome-integrated reporter assay. *Genome Res.* **30**, 1468–1480.
425. Sobocki M., Souaid C., Boulay J., Guerineau V., Noordermeer D., Crabbe L. (2018) MadID, a versatile approach to map protein–DNA interactions, highlights telomere–nuclear envelope contact sites in human cells. *Cell Rep.* **25**, 2891–2903. e2895.
426. Шацких А.С., Оленкина О.М., Солодовников А.А., Лавров С.А. (2018) Системы регулируемой экспрессии генов как инструмент исследования гетерохроматинового эффекта положения у *Drosophila melanogaster*. *Биохимия.* **83**(5), 712–723.
427. Kotecki M., Reddy P.S., Cochran B.H. (1999) Isolation and characterization of a near-haploid human cell line. *Exp. Cell. Res.* **252**, 273–280.
428. Higgins A.W., Alkuraya F.S., Bosco A.F., Brown K.K., Bruns G.A., Donovan D.J., Eisenman R., Fan Y., Farra C.G., Ferguson H.L., Gusella J.F., Harris D.J., Herrick S.R., Kelly C., Kim H.G., Kishikawa S., Korf B.R., Kulkarni S., Lally E., Leach N.T., Lemyre E., Lewis J., Ligon A.H., Lu W., Maas R.L., MacDonald M.E., Moore S.D., Peters R.E., Quade B.J., Quintero-Rivera F., Saadi I., Shen Y., Shendure J., Williamson R.E., Morton C.C. (2008) Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 712–722.
429. Chiang C., Jacobsen J.C., Ernst C., Hanscom C., Heilbut A., Blumenthal I., Mills R.E., Kirby A., Lindgren A.M., Rudiger S.R., McLaughlan C.J., Bawden C.S., Reid S.J., Faull R.L., Snell R.G., Hall I.M., Shen Y., Ohsumi T.K., Borowsky M.L., Daly M.J., Lee C., Morton C.C., MacDonald M.E., Gusella J.F., Talkowski M.E. (2012) Complex reorganization and predominant non-homologous repair following chromosomal breakage in karyotypically balanced germline rearrangements and transgenic integration. *Nat. Genet.* **44**, 390–397. S391.

POSITION EFFECT VARIATION: THE ROLE OF THE LOCAL CHROMATIN CONTEXT IN GENE EXPRESSION REGULATION

L. V. Boldyreva¹, *, E. N. Andreyeva¹, and A. V. Pindyurin¹

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: asd@mcb.nsc.ru

Position effect variegation (PEV) is a change in gene expression level resulting from an epigenetic state switch. This effect can be observed when a gene has been moved by chromosomal rearrangements or in the case of identical transgenic constructs being inserted into different regions of the genome. Position effect of a gene results in a significant change of expression level of the same gene depending on its position in the genome. Eukaryotic genome has domain organization, thus the activity of genes within these domains depends not only on DNA sequence of a gene, but also on the state of the surrounding chromatin, i.e. is regulated epigenetically. Chromatin is a complex of DNA, RNA, and associated structural and regulatory proteins. The epigenetic status of chromatin depends on: the replication time of a given genomic region, particular regulatory DNA motifs, contacts with the inner nuclear envelope (lamina) and other chromosome regions (topologically associated domains). Position effect thereby provides a unique tool for study and dissection of molecular and biochemical processes underlying the establishment and switching of the epigenetic states. Understanding the molecular mechanisms of the position effect in human is also important for the clinical implication – for the detection and treatment of retroviral infections, since the local chromatin state may result in the latent state of an infection such as HIV1. Besides, a large number of human neurodegenerative diseases are caused by epigenetic gene inactivation due to expansion of short repeats. Finally, in terms of use gene therapy methods, it is important to develop approaches that can accurately provide the particular required level of the transgene expression.

Keywords: position effect variegation, PEV, modifiers of position effect, epigenetic state, chromatin, histone code, regulatory elements of the genome, *Drosophila*, mammals, human diseases

УДК 576.32/.36

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ И ДРУГИХ ОРГАНИЗМОВ

© 2022 г. Т. А. Тарасенко^а, *, М. В. Кулинченко^а^аСибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: bolotova_t.a@mail.ru

Поступила в редакцию 22.09.2021 г.

После доработки 10.10.2021 г.

Принята к публикации 11.10.2021 г.

Популяция митохондрий в клетках эукариот отличается неоднородностью. Гетерогенность митохондрий может быть определена как вариация тех или иных характеристик митохондрий в пределах одной или разных клеток. Различия между митохондриями могут быть отнесены к негенетическим (структурно-морфологические и биоэнергетические особенности) или к генетическим (различия в числе копий или в последовательности митохондриальной (мт) ДНК). Изменения в последовательности мтДНК могут находить отражение в явлении гетероплазмии, то есть сосуществовании в клетке/организме различных митохондриальных генотипов. В обзоре рассмотрены особенности организации и динамики хондриома клеток растений в сравнении с другими таксономическими группами организмов. Особое внимание уделено причинам и механизмам, ведущим к митохондриальной гетерогенности, феномену гетероплазмии у растений и возможности функциональной специализации у митохондрий, а также роли этих процессов для всего организма. Анализ многочисленных данных показывает, что причиной неоднородного состояния митохондрий в клетке могут быть разные факторы, в том числе видоспецифические особенности процессов митохондриальной динамики, отвечающие за гомогенность популяции этих органелл клетки.

Ключевые слова: митохондриальная динамика, гетерогенность митохондрий, митохондриальная популяция, митохондриальная ДНК, гетероплазмия, комплементация, рекомбинация

DOI: 10.31857/S0026898422020185

ВВЕДЕНИЕ

В клетках эукариотических организмов митохондрии выполняют важнейшие функции, такие как осуществление энергетического метаболизма клетки, запуск клеточной дифференцировки и инициирование гибели клеток. Известно, что митохондрии в клетке могут различаться своей морфологией (форма, размер, плотность) и структурой (сферические, удлинённые, разветвлённые органеллы). Различия в морфологии и структуре хондриома клетки находятся в прямой зависимости от видовой принадлежности и стадии развития эукариотического организма, клеточной и тканевой специализации или метаболического состояния клетки [1]. Структура и функции хондриома зависят от стадии биогенеза органелл, митотической сегрегации, влияющей на локализацию органелл в клетке, и опосредуются консервативным среди всех эукариот механизмом митохондриальной динамики. Этот механизм включает в се-

бя два взаимосвязанных процесса: деления и слияния митохондрий [2], – которые во многом определяют морфологическую пластичность органелл [3]. В соматических клетках растений митохондриальную популяцию чаще всего составляют дискретные органеллы. Их структура поддерживается определенным балансом между процессами деления и слияния, который у растений, по всей видимости, смещен в сторону деления.

Наряду с ядром, хоть и в несопоставимом по объему количестве, митохондрии несут наследственную информацию. Для наследственной информации характерны два взаимодополняющих параметра: *стабильность* и *изменчивость*. Баланс стабильности и вариативности цитоплазматической наследственности осуществляется при участии процессов слияния-деления. Благодаря этому, в клетке поддерживается гомогенность митохондриальной популяции и сохраняется стабильность

Сокращения: мтДНК – митохондриальная ДНК; ЦМС – цитоплазматическая мужская стерильность; ЭР – эндоплазматический ретикулум.

наследования генетической информации, но в то же время и разнообразие органелл. Митохондриальная гетерогенность определяется различиями в составе и числе копий генома, в активности некоторых ферментов, в эффективности транспорта макромолекул [4–7]. Так, например, процесс импорта белков и нуклеиновых кислот в митохондрии, влияющий на генетическую систему этих органелл и их биогенез, может иметь разную эффективность в зависимости от вариаций в белково-липидном составе митохондриальных мембран [5, 8, 9]. В частности, как нами показано ранее [7], субфракции митохондрий из различных растительных источников обладают неодинаковой способностью к импорту ДНК.

Существование подобных взаимосвязей, а также наличие поразительного разнообразия митохондрий растений позволяет сделать предположение о существовании возможной функциональной специализации растительных митохондрий. Митохондриальная гетерогенность может быть ситуативной, как в случае биогенеза/этапов клеточного цикла, адаптивной – как реакция на стресс, функциональной – связанной с особенностями протекания энергетических процессов или при воспроизводстве генетической информации, или регуляторной – при взаимодействии с другими органеллами. Важную роль во взаимодействии между органеллами в меняющихся условиях окружающей среды или стресса играет передача сигналов между митохондриями и ядром [2], митохондриями и хлоропластами [10]. В тканях растений митохондрии часто визуализируют вблизи хлоропластов [11, 12], что, как предполагается, способствует обмену метаболитами и продуктами дыхания. Нарушения в динамике органелл ведут к драматическим последствиям: у животных они приводят к метаболической дисфункции и заболеваниям [13], у растений – к дефектам роста и фотосинтеза, возникновению мужской стерильности [14].

Несмотря на важность понимания того, как происходит контроль и поддержание гетерогенного состояния популяций митохондрий у растений, многие вопросы по-прежнему остаются открытыми. В обзоре рассмотрены механизмы, лежащие в основе формирования генетической и негенетической гетерогенности митохондрий растений в сравнении с млекопитающими и/или дрожжами, приводятся аргументы в пользу ключевой роли особенностей митохондриальной динамики, ответственной за поддержание стабильного воспроизводства новых единиц хондриома и генерацию гетерогенного состояния митохондриальной популяции. Кроме того, мы обсуждаем возможность функциональной специализации митохондрий – выявление механизмов ее возникновения и поддержания позволит существенно углубить понимание феномена мито-

хондриальной гетерогенности и ее роли для организма растения.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ МИТОХОНДРИЙ

На протяжении нескольких десятилетий изучения митохондрий различных организмов широкое применение находили методы разделения грубой фракции изолированных органелл в градиенте плотности сахарозы или перколла, что позволяло не только проводить их очистку, но и выделять отдельные митохондриальные субфракции или субпопуляции. Так, например, из гомогената печени млекопитающих были выделены две митохондриальные фракции, различающиеся коэффициентом седиментации в градиенте плотности сахарозы, – так называемые “тяжелая” и “легкая” фракции [15, 16]. В специализированных клетках органов животных (печень, мышцы, сердце, почки и др.) обнаружено три популяции органелл: молодые протомитохондрии (диаметром от 0.1 до 0.45 мкм), зрелые митохондрии (~1 мкм) и старые постмитохондрии (~2 мкм) [17, 18]. Соотношение этих трех популяций зависело от вида клеток, возраста и ряда других параметров [17]. Для протомитохондрий были показаны более высокие активности ряда ферментов, но сниженное содержание цитохромов. Таким образом, очевидно, что популяция митохондрий в клетках животных отличается гетерогенностью, а причины могут быть связаны как с этапами биогенеза этих органелл на разных стадиях развития организма, так и с различием их метаболических функций.

У растений классификация митохондриальных субпопуляций чаще всего также основывается на их физиологическом состоянии: митохондрии подразделяют на зрелые и молодые, неразвитые митохондрии или протомитохондрии [5, 19–21]. В одной из первых работ по изучению митохондриальных субпопуляций [22] было обнаружено два типа митохондрий в клетках апикальной меристемы корня кукурузы. Для одного типа была характерна хорошо развитая структура крист, для другого типа (вероятно, незрелые органеллы) – гомогенность матрикса. С помощью биохимических методов установили, что развитие крист связано с усилением тканевого дыхания и скорости окисления и фосфорилирования [22]. В дальнейшем “легкие” и “тяжелые” субпопуляции митохондрий выделяли в градиенте плотности сахарозы из проростков фасоли [19] и эмбрионов кукурузы [20]. Митохондрии проростков фасоли разделили на четыре популяции – в соответствии с их седиментационными характеристиками при центрифугировании в градиенте [19]. Для “тяжелых” митохондрий, выделяемых из 2–3-суточных пророщенных эмбрионов кукурузы [20], было характерно наличие двойной

мембраны с большим количеством крист, а также митохондриальный матрикс с высоким содержанием белков. “Легкие” митохондрии, полученные из эмбрионов сухих семян, представляли собой большие органеллы с двойной мембраной с неразвитыми межмембранными структурами [20]. Гомогенность матрикса и нечеткая архитектура крист – эти особенности были обнаружены и при анализе митохондрий, выделенных из молодых растительных тканей, методом электронной микроскопии [20, 23]. Три митохондриальные фракции с различной способностью сопряжения дыхания и фосфорилирования были получены из эмбриональных масс двух видов хвойных (*Picea abies* и *Abies cephalonica*) путем разделения в ступенчатом градиенте перколла [24]. Со временем установили многие другие параметры, характеризующие различия между митохондриями, имеющими тканевую или клеточную специфичность (табл. 1).

Следует отметить, что идентификацию и анализ митохондриальных субпопуляций растений обычно проводили в контексте изучения стадий и путей митохондриального биогенеза при набухании семян [5, 20, 40–42] и их прорастании [26, 43–46]. К настоящему моменту очевидно наличие различных субпопуляций митохондрий в молодых растениях, однако данных о том, что митохондрии различающейся плотности могут присутствовать и в зрелых растительных тканях, недостаточно. Кроме того, набор растительных объектов, на которых была показана неоднородность митохондрий, невелик. Недавно нами обнаружены [7] отдельные субфракции митохондрий, различающиеся по плотности, дыхательному контролю, ультраструктуре и активности импорта ДНК, не только в ткани 3-дневных этиолированных колеоптилей кукурузы, но и во взрослых 4-недельных растениях арабидопсиса и зрелой ткани запасующей паренхимы корнеплода репы. Из этого следует, что митохондриальная популяция растений неоднородна не только в набухающих семенах и молодых проростках, но и в

зрелых тканях, причем гетерогенность может зависеть от видовой принадлежности организма.

ДИНАМИКА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Особенности структурно-морфологической организации клеточной популяции митохондрий

Анализ данных многолетних экспериментальных исследований митохондрий различных организмов – от одноклеточных дрожжей [47, 48] до высших многоклеточных организмов, включая растения [23, 49] и млекопитающих [50, 51], – позволил выявить процессы, лежащие в основе формирования гетерогенности митохондриальной популяции. Так, показано, что митохондриальная популяция единичной клетки, или хондриом, состоит из смеси митохондрий разнородной морфологии, находящейся в постоянном динамическом движении и развитии. Понятие *митохондриальной динамики* обозначает как морфологические изменения органелл, происходящие под воздействием процессов деления и слияния, регулирующих их размер, форму и количество в зависимости от поступающих сигналов внутренней и внешней среды, так и их движение, изменения локализации в цитоплазме, взаимодействие с другими клеточными компонентами (рис. 1).

Для митохондрий клеток млекопитающих и дрожжей характерна сетевая структура [52, 53]: она охватывает всю клетку [54] и состоит из взаимосвязанных удлинённых митохондрий, формируемых ими трубок или канальцев с постоянным диаметром. Типичные митохондрии в фибробластах животных длинные и нитчатые; в гепатоцитах преобладают сферические или яйцевидные органеллы [55]. В дрожжевых клетках от 1 до 10 митохондрий формируют типичную трубчато-сетчатую структуру хондриома [56]. Поддержание структурного баланса хондриома в клетке, по всей видимости, зависит от соотношения процессов деления и слияния митохондрий у организмов различных таксономических групп. Сетевая структура обеспечивает необходимый запас питательных веществ в

Таблица 1. Параметры, характеризующие митохондриальные субпопуляции

Параметры гетерогенности	Ссылки
Структура и морфология	[5, 19, 20, 22, 25]
Плотность органелл	[5, 16, 19, 20, 22, 25, 26]
Белково-липидный состав	[5, 26–28]
Геном	[23, 25, 29–31]
Сопряжение процессов окисления и фосфорилирования	[16, 19, 22, 24, 32]
Мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$)	[33, 34]
Субклеточная локализация	[6, 16, 25, 33, 35]
Взаимодействия между органеллами	[33, 36–39]



Рис. 1. Динамика структурно-морфологических преобразований митохондриальной популяции. Обозначения: ЭР – эндоплазматический ретикулум; ЭТЦ – электронтранспортная цепь митохондрий.

клетке [57] и поддерживается благодаря процессам слияния митохондрий, преобладающим в клетках этих организмов над процессами деления [53].

В отличие от митохондрий дрожжей и млекопитающих, растительные органеллы не формируют непрерывную сеть. Митохондрии растений чаще всего представляют собой маленькие сферические яйцевидные органеллы диаметром 0.2–2.0 мкм [56, 58], у арабидопсиса средний диаметр органелл – 0.8 мкм [58]. Типичная клетка мезофилла может содержать 300–600 таких митохондрий [59, 60]. Однако, поскольку хондриом плеоморфен и динамичен, в морфологии растительных митохондрий также происходят значительные изменения [61, 62]. При определенных условиях митохондрии растений сильно увеличиваются в размерах, вытягиваются или принимают червеобразную форму, подобно митохондриям других организмов [56]: слияние может приводить к образованию длинных трубчатых митохондрий размером 16 мкм [59] или больших тубулореткулярных митохондрий [63].

Динамика митохондриальной популяции на разных этапах развития растений и других организмов

Значительные динамические преобразования хондриом претерпевает в течение клеточного цикла – когда происходят изменения в структуре и морфологии митохондрий и меняется их клеточная локализация [64]. Во время митоза, наряду с движением, изменяются число и форма митохондрий. Изменения в митохондриальной популяции по мере развития этапов клеточного цикла и митоза были описаны еще в конце 40-х годов в клетках поджелудочной железы молодых мышей [65]. В межфазных клетках млекопитающих митохондрии представлены удлинненными канальцами; во время митоза сеть фрагментируется; на выходе из митоза митохондриальные канальцы снова сливаются и образуют взаимосвязанную сеть [66], которая распределяется по всей клетке [67].

В ряде работ с растительными объектами (протопласты табака, апикальные меристемы арабидопсиса) также наблюдали изменения структуры

хондриома во время этапов клеточного цикла. Вопреки типичному описанию морфологии митохондрий растений как маленьких округлых органелл, в клетках апикальной меристемы побега (АМП) у арабидопсиса обнаружили уникальные черты хондриома [63], а именно два типа митохондрий: большая центральная митохондрия с ответвлениями и переменное число маленьких митохондрий в клеточной коре, находящихся в постоянном процессе слияния-деления с центральной митохондрией. Охватывающая “щупальцами” ядро крупная митохондрия сохраняется на протяжении всего клеточного цикла и претерпевает отчетливые изменения в морфологии и размере в зависимости от стадии клеточного цикла. Около 60% мелких митохондрий клетки сливаются с крупными органеллами и образуют своего рода “клеть” (от англ. “cage”) [68]. У арабидопсиса в апикальной меристеме верхушки корня (АМК) митохондрии сохраняют свою классическую округлую форму, а образования одной крупной митохондрии не наблюдается [63]. Такое различие в поведении митохондрий между двумя активно растущими тканями, по-видимому, связано с существованием нескольких путей распределения митохондрий внутри растения во время деления клеток. В отличие от АМК, АМП дает начало цветочной меристеме и женским гаметам с большим числом митохондрий [68].

В экспериментальной системе регенерирующих протопластов табака перед делением (фаза G1-S клеточного цикла) было отмечено так называемое массовое слияние митохондрий (МСМ) [59, 69]. Первоначально митохондрии группируются вместе, а затем сливаются с образованием трубчатых структур и уменьшением общего числа митохондрий. Предполагается, что образование “клетки” (в клетках апикальной меристемы арабидопсиса) или же МСМ (в регенерирующих протопластах табака) способствует смешиванию содержимого митохондрий, включая ДНК, перед распределением по дочерним клеткам [68] и обеспечению клетки энергией, необходимой для процесса деления [63]. Во время G2-фазы происходит деление на множество мелких округлых митохондрий, их число удваивается; с завершением процесса митоза органеллы распределяются между двумя клетками [59, 63].

У животных распределение митохондрий во время митоза может играть важную роль при асимметричном делении стволовых клеток [70]. Делясь асимметрично, стволовые клетки могут генерировать две дочерние клетки с разными судьбами. В результате такого деления одна дочерняя клетка сохраняет способность к самообновлению и образованию новых клеток (так называемую “стволовость”), а другая генерирует дифференцирующиеся взрослые клетки. В клетках-предшественниках молочной железы дифференцированно распреде-

лены митохондрии, содержащие недавно синтезированные белки (“молодые” митохондрии), и митохондрии, содержащие белки, которые были синтезированы на более ранней стадии (“старые” митохондрии). “Старые” митохондрии склонны к сегрегации в дифференцирующуюся дочернюю клетку, в то время как “молодые” — к сегрегации в стволовую дочернюю клетку. Эта сортировка коррелирует с повышенной аккумуляцией “старых” митохондрий в околядерной области и более-менее равномерным распределением “молодых” в цитоплазме стволовых клеток-предшественников — до асимметричного деления. Подавление факторов деления митохондрий приводит к нарушению этой избирательной сортировки на “старых” и “молодых” и, как следствие, к дефектам в поддержании стволовости. Это явление подчеркивает важность распределения митохондрий в судьбе клеток. Какие молекулярные механизмы приводят к распознаванию различного состава митохондрий и каким образом эта информация способствует активной сортировке и распределению митохондрий в дочерние клетки, пока неизвестно [70, 71].

В процессе мейоза также изменяются размер и число митохондрий в клетках растений. Митохондриальные изменения во время мейоза наблюдали как во время развития пыльцы, так и женских мегаспор. При исследовании лилии (*Lilium*) выявлено, что на стадиях профазы I — лептотене и зиготене — митохондрии материнской клетки пыльцы начинают конденсироваться, достигают диаметра 0.5 мкм и остаются в таком виде до стадии тетрад [72]. На стадии тетрад происходит увеличение числа митохондрий. При разделении тетрад структура хондриома возвращается в предшествующее делению состояние. В пыльце ячменя по мере созревания, напротив, как количество, так и размер митохондрий уменьшается в два раза [73]. В клетках пыльцы кукурузы и протопластах из пыльцы митохондрии имеют форму больших сложноветвящихся структур, располагающихся рядом с ядром [74–76]. Замечено, что в вегетативной ткани, окружающей пыльцу, нет такой митохондриальной структуры, как в пыльце [76]. На основании этих данных логично предположить, что число и размер митохондрий меняются именно в процессе развития пыльцы. Однако молекулярный механизм, лежащий в основе слияния и деления митохондрий в изученных видах растений, пока не выяснен [64].

Подобно развитию пыльцы, во время развития мегаспор и производства женских гамет в растениях также наблюдаются изменения количества и морфологии митохондрий. Ранние стадии мегаспорогенеза у высших растений имеют сходство с развитием гамет у самок животных: одна клетка развивается в яйцо, а остальные три гаплоидные клетки деградируют. В ооцитах мышей во время

мейоза I увеличивается количество мтДНК [77], а число митохондрий до завершения мейоза II достигает более 100000 на клетку. Dalton & Carroll [78] обнаружили, что при оогенезе у мышей наследование митохондрий в ходе асимметричных делений мейоза представляет собой уникальный процесс распределения органелл между дочерними клетками. Асимметричное распределение митохондрий преимущественно в ооциты и их исключение из клеток полярного тельца коррелирует с дальнейшей судьбой дочерних клеток: из ооцита развивается функциональная женская гамета, полярное тельце деградирует в течение нескольких часов. В основе этого паттерна наследования лежит митохондриальная динамика, связанная с формированием веретена деления, и реорганизация органелл, происходящая в начале анафазы в мейозе I [78].

Более поздние стадии развития мегаспор у высших растений и животных различаются. Количество, расположение и форма митохондрий женских мегаспор проанализированы у нескольких видов растений. В протопластах кукурузы, полученных из яйцеклеток, митохондрии имеют различную форму, включая взаимосвязанные сети, и расположены вблизи ядра [79]. Подобно кукурузе, крупные нитчатые митохондрии присутствуют в эмбрионе капселлы (*Capsella*) во время оплодотворения [80]. В зародышевом мешке пеларгонии зональной (*Pelargonium zonale*) вместо разветвленной сети наблюдается большое скопление митохондрий [81]. В яйцеклетке арабидопсиса митохондрии имеют как сферическую, так и вытянутую формы [82]. Также значительно увеличивается количество мтДНК во время развития зародышевого мешка, что совпадает с данными, полученными на ооцитах мыши [82]. Во время прогрессирования от незрелого к зрелому зародышевому мешку в *P. zonale* количество мтДНК увеличивается более чем в 900 раз [81].

Недавно показано [83], что в зиготе арабидопсиса митохондрии распределяются полярно вдоль апикально-базальной оси, а при дальнейшем развитии концентрируются в начальной апикальной клетке эмбриона. Полярное распределение митохондрий в зрелых зиготах коррелирует с неравномерным наследованием митохондрий в дочерних клетках, подобно тому, как это происходит в стволовых клетках животных. Апикальные клетки получают плотно упакованные митохондрии, которые помогают этим клеткам сохранять более высокую скорость пролиферации и запускать различные программы развития [84].

В периоде покоя, наступающем после формирования семени, митохондрии находятся в зачаточном состоянии с точки зрения развития крист (протомитохондрии). Paszkiwicz с соавт. [85] показали, что после набухания семян арабидопсиса,

на стадии разрыва семенной кожуры, также происходит активация митохондриальной динамики, которая приводит к массовому слиянию митохондрий с образованием тубулоретикулярной структуры и сопровождается усилением биогенеза митохондриальной мембраны [85]. В сухих семенах и во время стратификации у более 75% популяции митохондрий сохраняется сферическая морфология, а количество и общий объем митохондрий немного уменьшаются, при этом объем индивидуальных органелл варьирует в пределах 3 порядков: от 0.004 до 3.470 мкм³. Через 60 ч от начала набухания и до стадии разрыва семенной кожуры в морфологии митохондрий начинают происходить изменения с формированием в основном тубулоретикулярной структуры с многочисленными ответвлениями. Изменение формы митохондрий сопровождается увеличением объема отдельных органелл (более 25% органелл имеют объем от 0.54 до 38.7 мкм³) и общего объема хондриома. К концу прорастания, на стадии разрыва эндосперма, количество удлинённых митохондрий уменьшается, происходит обратный переход от тубулоретикулярного хондриома к популяции дискретных органелл. На стадии развития корня более 75% митохондрий вновь становятся сферическими, происходит снижение морфологической неоднородности в целом. К тому времени, когда у проростка образуются корневые волоски, большинство митохондрий принимают типичную форму небольших сферических дискретно расположенных органелл.

Таким образом, увеличение количества или размера митохондрий, массовое их слияние с образованием разветвленной сети – все это происходит во время созревания половых клеток и в клетках меристематических тканей при переходе клеточного цикла от G1- к S-фазе. Несмотря на то, что митохондрии входят в состояние гиперслияния, приводящее к тотальному перемешиванию и равномерному распределению содержимого между ними, в индивидуальной клетке во время клеточного цикла сохраняется возможность формирования морфологического разнообразия митохондрий. Очевидно, что отдельные клетки могут иметь различия в скорости клеточного цикла и, следовательно, находиться на разных его стадиях в один момент времени, что служит источником межклеточной митохондриальной гетерогенности в пределах одного организма. Кроме того, митохондриальная популяция может приобретать неоднородность вследствие различий при распределении органелл в клетке. Характер распределения митохондрий в цитозоле определяется функционально-метаболическими нуждами конкретной клетки в данный момент времени [54, 86]. Перинуклеарное скопление объединенных в сеть митохондрий, наблюдаемое в период интерфазы, предшествующий стадии деления, вероятно, происходит для облегчения

транспортировки АТФ в ядро для обеспечения протекающих в нем энергоемких процессов [63] или для оптимизации доставки компонентов ядерного кодирования, необходимых для протекания процессов биогенеза, в митохондрии [85]. Известно, что митохондрии могут различаться по белковому составу — в зависимости от их клеточной локализации [87]. В ходе дифференцировки клеток митохондрии также локализуются в той или иной области цитоплазмы (возле ядра, в клеточной коре), что влияет на последующую сортировку протомитохондрий и зрелых митохондрий. Все эти процессы находятся в зависимости от механизмов динамики митохондриальной популяции в клетке, нарушения которых могут привести в частности, как это показано на клетках животных, к дефектам в поддержании стволовости [70] или в развитии гамет [78].

Механизмы динамики митохондриальной популяции

Динамические изменения в структуре и морфологии митохондрий происходят с вовлечением высококонсервативных клеточных механизмов. Большинство белков, участвующих в процессах слияния и деления, содержат домены для связывания и расщепления GTP, то есть обладают GTPазной активностью [66]. Основным регулятором деления митохондрий животных и дрожжей считается белок с динаминподобной структурой — DRP1 [88]. В цитоплазме DRP1 взаимодействует с белками-рецепторами наружной мембраны митохондрий, такими как FIS1 (белок деления) и MFF (фактор деления митохондрий). Формирующиеся с участием этих белков олигомерные кольцевые структуры DRP1 обволакивают митохондрию и с использованием энергии гидролиза GTP вызывают ее сокращение и деление [89]. Функция DRP1 регулируется специфическими киназами; в зависимости от сайта фосфорилирования может происходить ингибирование или стимулирование процесса деления [66, 90].

Слияние, в такой же степени, как и деление, участвует в динамике морфологии митохондриальной сети. У животных и дрожжей в этот процесс вовлечены митофузины 1/2 (MFN1/2) [91] и OPA1 (белок атрофии зрительного нерва) [92]. Три больших белка с активностью GTPазы образуют в митохондриальной мембране различные ультраструктуры. OPA1 во внутренней ее части взаимодействует с митофузинами (MFN1 и MFN2) с образованием межмембранных белковых комплексов, которые способствуют слиянию внешних мембран с внутренними мембранами. Подобно белкам деления, количество и активность белков слияния регулируется посттрансляционными модификациями.

У растений ряд специфических генов, участвующих в контроле деления митохондрий, обнару-

жен с использованием инсерционных мутантов арабидопсиса. Мутации в этих генах, кодируемых в ядре, приводят к увеличению размера, уменьшению числа, изменению формы митохондрий или образованию митохондриальной сети. Так, для мутантов по генам *mnt1* и *mnt2* характерны гетерогенные митохондрии, по *bmt* — крупные митохондрии, по *nmt* — сетевая структура [93], по *elm1* — удлинённые [94], а по *fmt/friendly* — “дружественные” митохондрии [95]. У многих важных белков деления митохондрий растений есть ортологи у дрожжей или человека. Динаминподобные белки, названные DRP3A и DRP3B [96], — ортологи DRP1 [49, 97, 98], которые, как показано, участвуют и в делении пероксисом [99]. Обнаруженные у растений другие факторы деления: BIGYIN1 и BIGYIN2 — ортологи FIS1 и FZO1 дрожжей [100]. DRP3A и DRP3B, а также BIGYIN1 и BIGYIN2 регулируют размер и количество митохондрий [61, 98, 100]. BIGYIN1, BIGYIN2 и ELM1 локализуются на внешней мембране митохондрий [62, 101]. Взаимодействуя с DRP3A/DRP3B, ELM1 связывает, а BIGYIN1 и BIGYIN2 закрепляют эти белки на внешней мембране митохондрии [102, 103]. Подобно тому, как это происходит в клетках животных и дрожжей, белки DRP3A или DRP3B вызывают сокращение и деление органелл. Сообщалось об участии в динамике митохондрий связанных с внешней мембраной факторов PMD1 и PMD2 (peroxisomal and mitochondrial division factor) [104]; однако до сих пор не появилось доказательств их взаимодействия с DRP3A/B или BIGYIN1/2 [104, 105] и их конкретная роль в делении пока неясна. Предполагается, что эти белки в большей степени связаны с морфогенезом, чем с пролиферацией митохондрий [105].

Слияние митохондрий происходит лишь на определенных стадиях развития растительных клеток: как отмечено выше, удлинённые митохондрии появляются во время прорастания и регенерации, а также в апикальной меристеме побегов [101]. В отличие от процессов деления, явных ортологов белков дрожжей или млекопитающих, участвующих в слиянии, у растений не обнаружено [101]. Однако недавно в клетках эпидермиса табака обнаружена GTPаза AtMIRO2 [106]. MIRO относится к высококонсервативным белкам у всех эукариот. Гомолог у дрожжей, ScGEM1, влияет на взаимодействие митохондрий с эндоплазматическим ретикуломом (ЭР), а гомолог у млекопитающих, HsMIRO1, — на подвижность органелл. Показано, что AtMIRO2 регулирует прикрепление митохондрий к ЭР, а также усиливает кластеризацию и снижает подвижность митохондрий, что способствует их слиянию [106]. Основываясь на аналогии с активностью HsMIRO1, White с соавт. [106] предположили, что в регуляции слияния митохондрий также играет роль миозин. Факторы,

участвующие в ассоциации/кластеризации органелл, по-видимому, играют важную роль и в процессе их слияния [56, 69, 95, 106]. Ранее El Zawily и др. [95] идентифицировали в арабидопсисе ген *FRIENDLY*, экспрессия которого влияла на кластеризацию митохондрий. В мутанте по этому гену обнаружили большие скопления митохондрий вследствие увеличения времени ассоциации между органеллами [95]. Конкретные факторы, вовлеченные в механизмы слияния митохондриальных мембран, еще предстоит выяснить.

Динамические преобразования митохондрий, их движение и структурные изменения тесно связаны с взаимодействиями с другими клеточными компонентами и органеллами. Подвижность митохондрий у дрожжей обеспечивает актиновый цитоскелет — за их активный транспорт “отвечает” моторный белок миозин 2 (MYO2) [107]. У высших эукариот подвижность митохондрий связана с разнонаправленным движением вдоль микротрубочек, регулируемым кинезинами и динеином [108]. Во время митоза митохондрии интенсивно транспортируются, при этом у растений этот процесс опосредован волокнами актинового цитоскелета и происходит со скоростью 10 мкм/с [59]. При переходе от анафазы к раннему цитокинезу митохондрии перемещаются в плоскость деления, предположительно для доставки АТФ в место сокращения актомиозинового кольца. При позднем цитокинезе/раннем G1 митохондрии переносятся из плоскости деления и распространяются по периферии двух дочерних клеток [67]. Последнее событие зависит от взаимодействия белка MIRO со специфичным для клеточного цикла цитоскелетным адаптером — центромерным белком F (CENP-F) [67]. CENP-F — крупный белок, состоящий из закрученных спиралей [109], который одним концом прикреплен к наружной митохондриальной мембране, а другим, экспонированным в цитозоль, связывает микротрубочки и различные адаптеры транспортных и моторных белков. Показано, что участие CENP-F, как и MIRO, необходимо для транспорта митохондрий к периферии клеток [67]. Зигота растений арабидопсиса, мутантных по гену, кодирующему MIRO, содержит аномально увеличенные митохондрии, а апикальная клетка наследует относительно меньшее количество митохондрий, что подтверждает роль MIRO в распределении митохондрий в оплодотворенной яйцеклетке и предопределении характера их наследования [82].

Как было отмечено выше, на слияние митохондрий влияет их взаимодействие с ЭР [56]. Каким образом ЭР и цитоскелет связаны с процессом деления, пока не очень понятно. У почкующихся дрожжей взаимодействие митохондрий с кортикальным ЭР происходит с участием белка NUM1p [110]. На линии клеток HeLa показано, что ЭР взаимодействует лишь с определенным

количеством митохондрий из клеточной популяции, что предполагает существование разных митохондриальных субпопуляций, для которых не исключены разные функции [51]. Известно, что тесные контакты с ЭР важны для передачи сигналов, опосредуемых ионами кальция, от ЭР к митохондриям [111] и для биосинтеза фосфолипидов [112]. Эти контакты могут играть роль и в регуляции митохондриальной морфологии: каналы ЭР, по-видимому, инициируют деление митохондрий, как у дрожжей, так и у млекопитающих, охватывая органеллу и сжимая ее [113]. Протяженные сети ЭР благоприятствуют слиянию и удлинению митохондрий, в то время как более короткие сети приводят к увеличению частоты митохондриального деления и, как следствие, преимущественно к появлению митохондрий небольшого размера [56].

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИТОХОНДРИЙ *in vivo*

Неоднородность митохондрий обусловлена тем, что хондриом в клетках, тканях и органах имеет различия не только в количестве и морфологии митохондрий, но и в содержании составляющих их макромолекул (белков, нуклеоидов, липидов), а также в функциональности органелл. Только половина митохондриальных белков идентична в митохондриях разных органов и тканей млекопитающих [114]. В клетках и тканях растений также обнаружены различия в количестве и активности митохондрий и их белковом и липидном составе [26–28, 115]. Несмотря на то, что явление митохондриальной гетерогенности характерно для многих таксономических групп, преобладание дискретных митохондрий у растительных организмов, в отличие от имеющих сетевую структуру хондриома дрожжей и млекопитающих, чаще приводит к накоплению фенотипических и генетических вариантов этих органелл в пределах одной клетки [14].

Генетическая и негенетическая митохондриальная гетерогенность

Митохондриальная гетерогенность, проявляющаяся в вариативности фенотипических и/или функциональных признаков митохондрий, но не затрагивающая их генетический аппарат, определяется как *негенетическая* [31]. К негенетическим источникам различий относят структурно-морфологические (форма, размер, плотность, белково-липидный состав) и биоэнергетические (мембранный потенциал, транспорт макромолекул, стадия биогенеза, колокализация с другими органеллами клетки) особенности митохондрий. Несмотря на их кажущееся многообразие, эти источники не относятся к независимым, так как в действительности они тесно переплетены и вза-

мно влияют друг на друга. Такой отличительный признак митохондрий как плотность — один из основных параметров гетерогенности митохондрий в растительных тканях — чаще всего ассоциирован со стадией биогенеза этих органелл или со степенью их зрелости; транспорт макромолекул напрямую зависит от белково-липидного состава митохондриальной мембраны.

Генетическая гетерогенность митохондрий проявляется в сосуществовании в клетке различных митохондриальных генотипов и в разном числе копий митохондриального генома внутри одной или разных клеток, что часто становится причиной дефицитного состояния мтДНК. У растений низкое содержание мтДНК в клетке встречается довольно часто [97], некоторые органеллы вовсе не содержат мтДНК [60, 101, 116]. Кроме того, в пределах растительной или животной клетки может встречаться несколько генетических разновидностей митохондрий — явление, называемое митохондриальной *гетероплазмией* [1]. Соотношение различных типов мтДНК в гетероплазматической популяции может быть различным, но обычно преобладает один митотип, тогда как альтернативные присутствуют в очень низкой пропорции. В таких условиях фенотип организма/клетки определяется преобладающим вариантом мтДНК [117]. Исследование явления митохондриальной гетероплазмы у растительных организмов важно для филогеографии видов с обширным ареалом. Рекомбинация, характерная для митохондриальных геномов растений, происходящая между их альтернативными вариантами, приводит к появлению растительных организмов с мозаичными фенотипами. Кроме того, гетероплазматическое состояние митохондриальных геномов растений играет важную роль в контроле цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС) [118].

Кратковременное слияние и гетерогенность митохондрий

Важность воспроизводства генетической информации митохондрий диктует определенную программу биологического поведения клеточной митохондриальной популяции для обеспечения правильного наследования. В эту программу, в зависимости от метаболического и/или физиологического статуса клетки, входят такие события, как слияние митохондрий и последующая рекомбинация мтДНК, распад митохондриальной гиперсети на дискретные митохондрии с идентичным содержимым и их равномерное распределение у периферии клетки перед ее делением. Другими словами, *программа митохондриальной динамики направлена на сохранение стабильного гомогенного состояния популяции органелл* для обеспечения функции корректного наследования и воспроизведения генетической информа-

ции. Несмотря на это, в пределах единичной клетки, а также внутри одной ткани возникают фенотипически и генетически разнообразные митохондрии [14]. Парадоксально, но в основе этого явления также лежат два взаимосвязанных высококонсервативных процесса: деление и слияние органелл [2].

Принципиальная разница между процессами, обеспечивающими стабильность и гомогенность митохондриальной популяции, и процессами, способствующими возникновению митохондриально-го разнообразия, заключается в скорости самого акта слияния-деления. В зависимости от скорости, с которой происходит слияние двух митохондрий, встречающихся друг с другом посредством движения актина, и их последующее разделение, различают *полное* и *неполное слияние митохондрий*. Полное слияние может обеспечить восстановление функций двух митохондрий с мутациями в разных генах, а также смягчить их последствия для клетки в целом за счет обмена белками и липидами с другими митохондриями [55]. В свою очередь, неполное кратковременное слияние митохондрий, составляющих субклеточную популяцию клетки, дает им возможность обмениваться метаболитами без изменения своей морфологии [95, 97]. Параметр скорости единичного акта деления-слияния лимитируется временем нахождения митохондрий в ассоциированном состоянии. Для митохондрий арабидопсиса характерен короткий период ассоциации (среднее значение составляет 15.0 ± 0.7 с), в течение которого может происходить слияние и последующее деление, — явление, также наблюдаемое в некоторых клетках млекопитающих и называемое “поцелуй-и-беги” [95, 119]. Среднее время ассоциации митохондрий арабидопсиса, необходимое для полного слияния (61.5 ± 1.4 с), определили с использованием мутантной линии по гену *FRIENDLY*, который кодирует белок, контролирующей митохондриальную кластеризацию. Оказалось, что ограничение времени межмитохондриальной ассоциации, обусловленное функционированием гена *FRIENDLY*, позволяет поддерживать дискретную организацию хондриома растений [95]. Кратковременное неполное слияние по принципу “поцелуй-и-беги” играет роль в генерации гетероплазматического состояния мтДНК (рис. 2). Несмотря на частичное перемешивание белково-липидных компонентов внешних митохондриальных мембран во время быстрого слияния органелл, внутренняя мембрана почти полностью сохраняет свою индивидуальную структуру, характерную для периода до начала слияния. Перенос мтДНК во время слияния также может протекать более медленно и менее полно, что неудивительно, учитывая прикрепление мтДНК к поверхности внутренней мембраны [120]. Действительно, было показано, что белки внутренней мембраны обладают значи-



Рис. 2. Взаимосвязь клеточных процессов, регулирующих степень гетерогенности мтДНК растений. Механизм “поцелуй-и-беги”, предполагающий быстрое слияние и разделение без полной гомогенизации содержимого митохондрий, вносит вклад в сохранение гетерогенного состояния генетически неоднородной митохондриальной популяции. Комплементация дисфункциональных митохондрий функциональными происходит благодаря их слиянию и последующим событиям перекрестной гомологичной рекомбинации. Гомологичная рекомбинация и мутации вносят вклад в появление гетероплазматических вариантов мтДНК в митохондриальной популяции. В зависимости от степени вредоносности мутаций, в митохондриях запускаются процессы репарации с участием аппарата гомологичной рекомбинации либо происходит митофагическое удаление органелл.

тельно меньшей подвижностью, чем белки, локализованные во внешней мембране [121]. Таким образом, именно неполное слияние можно считать одним из инструментов митохондриального разнообразия, определяющим морфологическую пластичность митохондрий [3] и связанную с ней генетическую гетерогенность.

Следующее после кратковременного слияния разделение митохондрий также способствует неравному распределению нуклеотидов [97] и компонентов митохондриальных мембран [120]. Преобладание процессов деления в клетках растений приводит к появлению дискретного типа организации митохондриальной популяции и, как следствие, к возникновению *внутриклеточной гетерогенности митохондрий* [14]. Когда происходит деление гетероплазматической клетки, имеющей два типа мтДНК, эти генетические варианты распределяются случайным образом по дочерним клеткам, что впоследствии приводит к генетическому дрейфу в сторону мутанта или дикого типа [122]. Таким образом, гетерогенные митохондрии, оказавшиеся в разных клетках после митотического деления, дают начало *межклеточной гетерогенности митохондрий* внутри одной ткани. Межклеточная митохондриальная гетерогенность может возникнуть независимо от клеточного деления, будучи одним из механизмов

адаптации к метаболическому статусу отдельной клетки [123].

Таким образом, существование морфологически и/или генетически тканеспецифичных и клеточноспецифичных митохондрий обусловлено в том числе скоротечностью или незавершенностью динамических процессов, формирующих структуру хондриома растений. Изменения мтДНК, представляющие потенциальную опасность для клетки, могут компенсироваться в процессе митохондриальной *комплементации* (рис. 2), характерном как для растений [62, 97, 124], так и для животных [55].

Как правило, комплементация активируется при потере отдельными митохондриями нормального мембранного потенциала с целью устранения/смягчения эффекта вредоносной мутации [125]. По мере увеличения доли мутантных мтДНК энергетическая функция митохондрий снижается [126]. Сильно поврежденные митохондрии снижают качество клеточной популяции [55], поэтому удаляются из клетки посредством митофагии. В случае, когда недостаток энергии, синтезируемой митохондриями, превышает пороговое значение, в клетке могут начаться апоптотические события [126].

МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ГЕТЕРОПЛАЗМИЯ: ВОЗНИКНОВЕНИЕ И ПОДДЕРЖАНИЕ ГЕТЕРОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ГЕНОМОВ

Митохондриальные популяции в клетках растений могут различаться числом копий мтДНК или нести генетические мутации. Гетерогенность мтДНК — настолько же частое явление, как и морфологическая вариабельность митохондрий; более того, эти явления чаще всего взаимосвязаны. Функционально идентичные клетки, находящиеся в пределах одной ткани, часто имеют разные уровни экспрессии митохондриальных белков, что может коррелировать с гетерогенностью митохондрий на генотипическом и фенотипическом уровнях [14, 52]. У митохондрий с дефектами митохондриального деления, индуцированными стрессом или старением организма, на фоне общей дисфункции происходит потеря мтДНК [127–129]. Неоднородность компонентов и содержимого митохондрий [119] может отражаться на степени поляризации их мембран: снижение содержания в мембране некоторых белков [109] или изменение соотношения липидных составляющих [130]. Снижение содержания мтДНК или ее мутации [55, 128] часто коррелирует с изменением мембранного потенциала. У растительных организмов митохондрии нередко несут нейтральные мутации, не приводящие к видимым последствиям, что, вероятно, служит резервуаром для эволюции митохондриального генома растений.

В отличие от большинства других эукариот, митохондрии растений имеют сложную и своеобразную генетическую систему. В пределах растительного царства структура и размер митохондриального генома сильно варьирует. Если размер большинства митохондриальных геномов животных составляет всего лишь около 16.5 т.п.н. (митДНК человека — 16.6 т.п.н.), то размеры митохондриального генома современных растений в основном находятся в интервале от 200 до 2000 т.п.н. [124], а у отдельных представителей он еще больше: например, 3.9 млн.п.н. у *Amborella trichopoda* и 11.3 млн.п.н. у *Silene conica* [131]. Небольшое число функциональных генов в огромном митохондриальном геноме растений чередуется с длинными межгенными областями, как правило, неизвестного происхождения [132], благодаря чему в нем происходят множественные изомерные перестройки, способствующие быстрой структурной реорганизации мтДНК.

Принимая во внимание, что в клетке млекопитающих присутствует до тысячи копий мтДНК, копийность митохондриальных генов растений относительно низкая. Preuten с соавт. [60] установили, что копийность митохондриальных генов арабидопсиса сильно варьирует в различных органах растения, а также зависит от стадии его развития. Интересно, что число копий генов в клетках листа оказалось существенно меньше общего

числа митохондрий на клетку (приблизительно 450 и 300 митохондрий в протопластах, полученных соответственно из зрелых и молодых листьев). Наибольшее число копий генов арабидопсиса (*ATP1*, *RPS4*, *NAD6* и *COX1*), примерно 300–450 на клетку, обнаружено в меристеме корней, в то время как в листьях и цветах это только 80–140 копий. Исходя из этого, авторы предположили, что отдельные митохондрии растений содержат лишь часть генома или вовсе не содержат ДНК [60]. С этим согласуются данные, что во время деления митохондрий не все дочерние митохондрии наследуют нуклеоиды, а те, что наследуют, не обязательно содержат полный набор генома [97]. При анализе содержания мтДНК, размера митохондриального генома и числа митохондрий на клетку установлено, что некоторые митохондрии растительной клетки содержат неполный геном [133]. При делении митохондрий происходит контролируемое распределение органелл по двум дочерним клеткам, но 25–40% этих органелл, как оказалось, не содержат мтДНК [134]. В результате фрагментации ретикулярных митохондрий в клетках прорастающих семян арабидопсиса их число увеличивается в три раза, при этом копийность мтДНК увеличивается лишь в два раза [85], что ведет к неравномерному распределению нуклеоидов в пределах митохондриальной популяции и, как полагают авторы, становится причиной возникновения генетической неоднородности хондриома. Подобная ситуация может способствовать неравному распределению мтДНК между дочерними клетками, что объясняет некоторые синдромы, связанные с истощением мтДНК [135].

Случайное или стохастическое распределение мтДНК по новым митохондриям, приводящее к появлению органелл с отсутствием полного генома, происходит благодаря субгеномной природе митохондриальных геномов растений [124]. Структурно мтДНК растений существует в основном как совокупность субгеномных кольцевых, линейных и разветвленных молекул различного размера [124, 136]. Некоторые участки мтДНК обладают более высокой копийностью. Так, наряду с превалированием основного генома, представленного, как предполагают, преимущественно линейными молекулами, образующими кольцо перекрывающимися концами [136], в митохондриях присутствуют субстехиометрические молекулы мтДНК [137]. Появление такого фрагментированного генома у растений связывают с меж- и внутримолекулярной *гомологичной рекомбинацией* [105, 132, 138]. мтДНК высших растений богата повторяющимися последовательностями, которые могут участвовать в гомологичной рекомбинации и, следовательно, иметь большое влияние на структуру генома [139]. Крупные повторяющиеся последовательности размером до нескольких тысяч

пар нуклеотидов достаточно часто участвуют в обратимой рекомбинации, тем самым обеспечивая пластичность митохондриального растительного генома. В то же время рекомбинация между повторами среднего (от 50 до 500 п.н.) и малого (<50 п.н.) размера происходит нечасто и, как правило, асимметрично и необратимо [140], генерируя перестройки в мтДНК [141]. Результатом рекомбинации между повторами может стать образование химерных генов, которые вызывают ЦМС у растений [141].

Для митохондриального генома растений было введено определение [137], согласно которому “митотип, или митохондриальный гаплотип, – это набор генетической информации, находящейся в совместно наследуемых молекулах мтДНК, способный играть роль основного генома”. Сложноорганизованная структура, свойственная растительному геному митохондрий, способствует появлению в растительной клетке альтернативных митотипов. Высокая частота меж- и внутримолекулярной гомологичной рекомбинации генерирует альтернативные варианты мтДНК – важный резервуар генетического разнообразия митохондриального генома растений [139]. Рекомбинационные события при участии повторов среднего и малого размера вносят вклад в гетероплазматическое состояние мтДНК и приводят к образованию субстехиометрических популяций мтДНК, или *сублимонов* [140]. Следуя терминологии, применяемой к мтДНК растений, сублимоны – полученные в результате рекомбинации молекулы, присутствующие в митохондриях в очень низких количествах [117]. Иногда сублимоны селективно реплицируются и замещают собой основной геном, что приводит к появлению в растительной клетке альтернативных вариантов митохондриального генома, или митотипов, которые могут рекомбинировать между собой, давая новые варианты мтДНК, или сегрегировать во время роста растений, в результате чего появляются растения с мозаичным фенотипом [137]. Предполагается, что сегрегация двух вариантов мтДНК с изменением их пропорции во время роста *Silene vulgaris* – механизм, который лежит в основе различий в соотношении полов потомства и, как следствие, различных половых фенотипов в разных частях одного и того же растения [142]. Во время развития гетероплазматических NCS-растений (NCS-мутанты кукурузы – от англ. non-chromosomal stripe mutants) происходит сегрегация митохондриальных геномов, мутировавших из нормальных [137]. У животных некоторые митохондриальные перестройки, выявленные в здоровых тканях человека на очень низком уровне, по-видимому, также относятся к продуктам рекомбинации [143].

Гомологичная рекомбинация в митохондриях растений – эффективный механизм репарации, способствующий как устранению нежелательных

изменений в мтДНК, так и поддержанию ее качества [144–146] (см. рис. 2). мтДНК высших растений богата повторяющимися последовательностями, которые наряду с другими копиями митохондриального генома в ходе рекомбинации используются для репарации поврежденных гомологичных участков ДНК [139]. Репарация по пути негомологичной рекомбинации, использующая для восстановления поврежденной ДНК-последовательности с низкой гомологией, в митохондриях растений наблюдается редко [147]. Наличие в митохондриях растений эффективной системы репарации с вовлечением механизма гомологичной рекомбинации – причина низкой скорости мутаций мтДНК большинства видов высших растений по сравнению с животными. Ее кодирующие последовательности высококонсервативны и эволюционируют очень медленно при сильно изменчивой организации митохондриального генома растений в целом [139].

Ядерные гены контролируют организацию митохондриальных геномов и экспрессию кодируемых ими генов. Использование мутантов арабидопсиса позволило охарактеризовать три ядерных гена, участвующих в контроле стехиометрии альтернативных форм мтДНК, генерируемых рекомбинацией. Это гены, кодирующие специфичный для растений белок OSB1, связывающий одноцепочечную ДНК [148], MSH1 – белок из семейства репарации ошибочного спаривания *mutS* – и RECA-подобную рекомбиназу RECA3 [149]. Показано, что MSH1 необходим для поддержания низкого уровня мутаций в митохондриальных и пластидных геномах растений, а отсутствие этого гена у животных, по-видимому, способствует повышенной частоте мутаций генов оргanelл [150]. Ядерный контроль над мтДНК можно рассматривать как механизм, позволяющий отцовскому геному влиять на митохондриальный геном, наследуемый по материнской линии [137]. Двуродительское наследование митохондрий по причине передачи мтДНК по отцовской линии (так называемой “отцовской утечки”) может приводить к перестройкам в результате рекомбинации отцовских и материнских мтДНК, что также ведет к гетероплазмии [151, 152] с последующим присутствием как материнских, так и отцовских митотипов в потомстве. Передача и репликация отцовской мтДНК пшеницы в гибридах ячменя и пшеницы была продемонстрирована при повторных обратных скрещиваниях с родительской пшеницей [153].

Помимо рекомбинации новые митохондриальные генотипы могут возникать на основе таких изменений мтДНК (см. рис. 2), как точечные мутации, делеции и дупликации, которые происходят вследствие повреждений мтДНК активными формами кислорода, ошибок репликации, а также дефектной или неэффективной репарации

[117]. Респираторная дисфункция и низкий потенциал митохондриальной мембраны часто бывают следствием мутаций в мтДНК [55], возникающих, прежде всего, из-за генерации в митохондриальном матриксе больших количеств активных форм кислорода, повреждающих ДНК митохондрий.

Подобные мутации часто наблюдаются при гетероплазмии у человека [154], но редко вносят вклад в генерацию гетероплазмии у растений. Показано, что полиморфизм в митохондриальных гаплотипах растений обычно является результатом рекомбинации [137]. Тем не менее высокий уровень гетероплазмии, связанный с точечными мутациями в некодирующих последовательностях, обнаружен у сортов оливкового дерева (*Olea europaea* L.) [155]. NCS-мутанты кукурузы, образующиеся в результате межклеточной изменчивости стехиометрии мтДНК, несут делеции в ряде белоккодирующих генов, включая *NAD4*, *COX2* и *RPS3/RPL16* [141]. Делеции гена *NAD7* обнаружены также у *Nicotiana sylvestris* [156, 157]. Кроме того, делеция в ЦМС-специфических участках мтДНК может приводить к цитоплазматической реверсии к фертильности у ЦМС-растений [141].

Ситуация, когда молекулы мтДНК в одной и той же клетке содержат множество различных генетических вариантов в низких пропорциях, называется *микрогетероплазмией* [158]. Благодаря многокопийности митохондриального генома присутствие конкретной мутации может наблюдаться в некоторых, но не во всех молекулах, что обеспечивает нейтральность этой мутации для организма. Эволюционная адаптация, вызывающая межклеточную изменчивость пропорции мутаций в зародышевых линиях, получила название “генетического бутылочного горлышка” [159, 160]. В результате действия этого адаптационного механизма одни клетки получают больше мутаций, другие меньше, что препятствует накоплению мутаций из поколения в поколение. Таким образом, ооциты с более низкой пропорцией мутаций могут стать бизнеспособным потомством. У животных межклеточная изменчивость в содержании мутаций наблюдается, как правило, в половых клетках, но встречается и в соматических тканях [161, 162]. У млекопитающих пропорции гетероплазмии могут изменяться на более поздних стадиях развития – как следствие неслучайного клеточного или тканеспецифического отбора [161, 163], предположительно не зависящего от клеточной пролиферации [35, 164]. Не следует путать “генетическое бутылочное горлышко”, обозначающее распространение мутации, с понятием “физического бутылочного горлышка” [160, 165] – состоянием, достигаемым физическим уменьшением числа копий молекул мтДНК на клетку во время развития. “Физическое бутылочное горлышко”, в отличие от “генетического бутылочного горлышка”, напрямую соответствует наблюдаемому ко-

личеству молекул мтДНК в эксперименте [166]. В отношении существования механизма “генетического бутылочного горлышка” у растений есть разные мнения. Ранее сообщалось о сниженном уровне гетероплазмии у оливковых деревьев, размножавшихся половым путем, в сравнении с деревьями, долгое время размножавшимися вегетативно, что происходит, как предполагается, из-за генетического дрейфа во время формирования женской гаметы [155]. Также есть мнение, что механизм “генетического бутылочного горлышка” у растений отсутствует, а наблюдаемая гомогенизация последовательностей мтДНК в клетках зародышей растений, ограничивающая распространение мутантных митохондриальных вариантов, обусловлена генной конверсией и эффективной репарацией ошибочного спаривания [167].

В настоящее время недостаточно данных о том, как митохондриальный геном растений с его сложной популяцией молекул ДНК поддерживается и передается от поколения к поколению. Упомянутое ранее массовое слияние митохондрий, наблюдаемое в клетках апикальной меристемы побегов арабидопсиса [68] и в яйцеклетках *P. zonale* [168], способствует успешному наследованию гетероплазматических геномов благодаря сохранению стабильности митохондриальной популяции в ряду поколений [14, 137]. Тем не менее представленность отдельных последовательностей мтДНК в растительных митохондриях может варьировать в зависимости от ткани/органа растения. Нередко в меристемах и недифференцированных тканях наблюдаются более высокие уровни сублимонов [169–171]. Показано, что последовательность *psv* намного многочисленнее в корневой меристеме, чем в ткани листа фасоли, где она присутствует в виде сублимона [170]. Перестройки хондриома, происходящие во время прорастания семян арабидопсиса, способствуют неравномерному распределению митохондриальных нуклеоидов [85].

Организация митохондриального генома в корневой меристеме риса также существенно отличается от таковой в дифференцированных клетках, что связывают с изменениями стехиометрии молекул мтДНК при ее репликации и распределении во время клеточной дифференцировки [172]. Предполагается, что в меристематической ткани растений находится единая репликационная единица, гарантирующая передачу дочерним клеткам полной генетической информации митохондрий, включая сублимоны [170]. По мере дифференцировки клетки выходят из фазы G1, приобретая обратимое или необратимое состояние покоя (G0) [173]. С течением времени в состоянии необратимого клеточного покоя в зрелых клетках могут накапливаться генетически отличающиеся митохондрии с неравномерным распределением пропорций исходного и мутантного варианта мтДНК.

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ НА ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ

Влияние гетероплазмы на фенотипы живых организмов

Митохондриальные мутации широко распространены в царстве растений и животных. На животных системах (особенно на людях) митохондриальная гетероплазмия активно изучалась из-за тесной связи между ее возникновением и митохондриальными заболеваниями [174]. Широко известно, что мутации мтДНК у млекопитающих приводят к развитию заболеваний различной степени тяжести. В том случае, когда доля митохондрий с мутантной мтДНК превышает патогенное пороговое значение для ткани, появляется симптоматика заболевания [1]. Одни мутации вызывают нарушения, поражающие нервную систему, мышцы, сердце и эндокринные органы на ранних стадиях развития организма, в то время как другие (чаще всего приобретенные), с более мягкими проявлениями в общих фенотипических чертах, приводят к более позднему началу заболевания [159]. Изменения в мтДНК (вставки, делеции, точечные мутации) могут приводить к респираторным проблемам, эпилепсии, сердечной недостаточности, болезни Паркинсона, диабету, рассеянному склерозу и развитию процесса старения [175–177]. Однако митохондриальная гетероплазмия клеток животных, включая человека, не всегда приводит к нарушению митохондриальных функций [178–180]. Многие здоровые люди имеют низкие уровни (<1%) точечных мутаций мтДНК, включая как наследственные, так и приобретенные [159].

У растений особенности структуры и динамики митохондриального генома позволяют поддерживать геномное разнообразие митохондрий без критических воздействий на организм. Первоначально гетероплазмия митохондрий растений также рассматривалась как источник патологических мутаций. Ее обнаруживали в мутантных [181, 182] или гибридных линиях растений [183], а также в растениях, регенерированных из тканевой культуры [184, 185]. Однако позже гетероплазмия была выявлена и в растениях дикого типа [170, 186] и в настоящее время считается нормальным физиологическим состоянием для митохондриальной популяции в растительной клетке [137].

Фенотипические особенности мутантных или гибридных линий растений, обладающих гетероплазмией митохондриального генома, достаточно хорошо изучены. Когда мутации приводят к появлению растений с дефектом, наследуемым по материнской линии, или с мужской стерильностью, их легко обнаружить. Линии, несущие мутации жизненно важных митохондриальных генов в ге-

тероплазматическом состоянии, часто характеризуются замедленным ростом, укорочением стебля, редуцированной и складчатой формой листовой пластины, тогда как гибридные растения, предназначенные исключительно для удовлетворения сельскохозяйственных нужд человека, имеют ценные агрономические характеристики.

Несмотря на вероятную распространенность гетероплазмы в природе [137], пока очень мало известно о ее влиянии на растительные фенотипы в природных популяциях [118]. Альтернативные типы митохондриального генома растений природного происхождения часто отличаются только порядком расположения последовательностей и не содержат мутаций, вредных или существенно влияющих на фенотип [171, 187]. Учитывая множественный механизм возникновения гетероплазмы в клетке, включающий гомологичную рекомбинацию, точечные мутации и двуродительское наследование митохондрий, это явление можно рассматривать как состояние, усложняющее и без того многоуровневую организацию митохондриального генома растений.

Вопрос “нерациональности” организации растительного митохондриального генома подробно обсужден в обзоре М. Woloszynska [137]. Действительно, сложно понять, для чего растениям природных популяций поддерживать гетероплазматическое состояние митохондрий, не дающее им важных фенотипических преимуществ, повышающих их устойчивость и жизнеспособность. Основываясь на универсальности механизмов возникновения гетероплазмы для эукариот, а также на факте существования пластидной гетероплазмы, J. Frey и соавт. [188] высказали предположение, что гетероплазматическое состояние геномов возникло неслучайно и существует в качестве механизма, генерирующего собственное генетическое разнообразие, компенсируя тем самым отсутствие половой рекомбинации. Однако, поскольку к настоящему времени гетероплазмия обнаружена в популяциях лишь нескольких видов растений [189, 190], спешить с выводами относительно ее роли для растительного организма, особенно в отношении фенотипических проявлений, не следует. Необходимы дополнительные исследования распространенности явления митохондриальной гетероплазмы в природных популяциях, что позволит понять роль гетерогенного состояния мтДНК для растительной клетки.

Динамические изменения структуры хондриома и его биоэнергетические функции

В здоровых, молодых и непродлиферирующих (G0) клетках функционально активные митохондрии под воздействием таких факторов, как стресс, изменение потенциала митохондриальных мембран, совместная работа с другими кле-

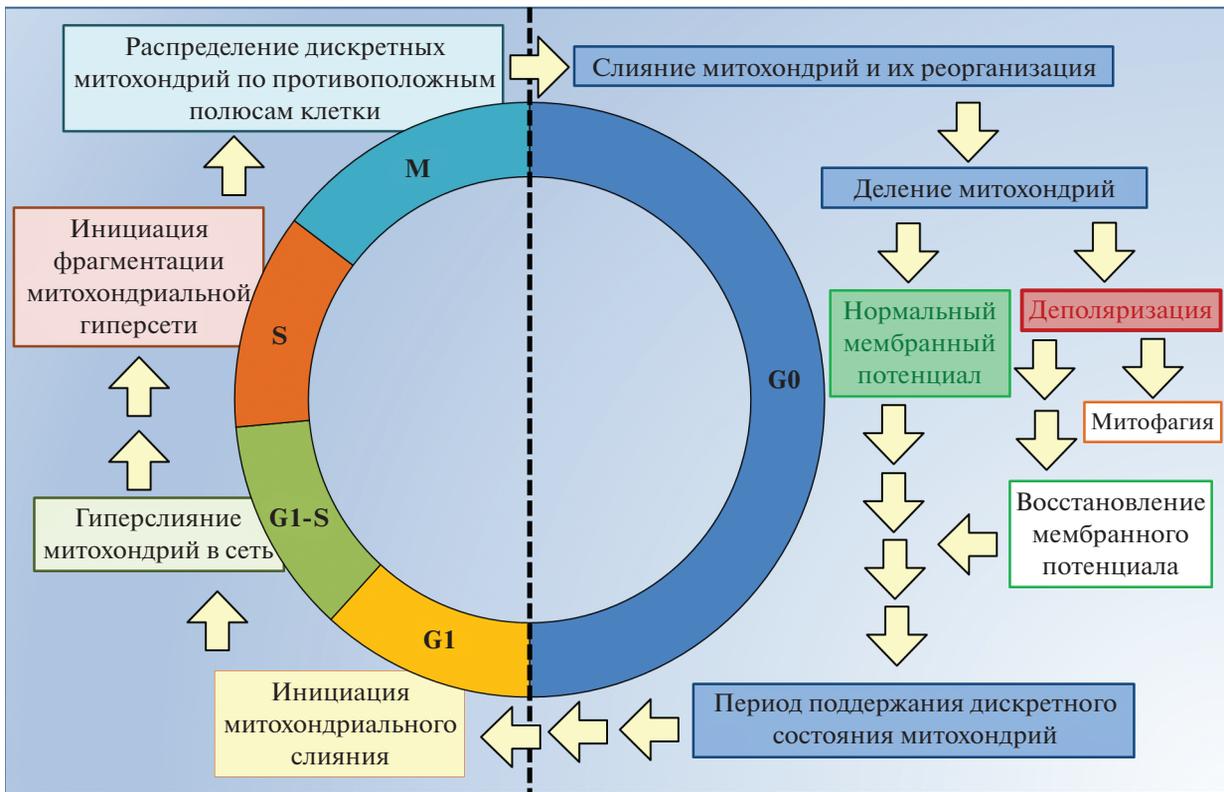


Рис. 3. Митохондриальная динамика и клеточный цикл. В период клеточной пролиферации происходит последовательная смена этапов преобразования структуры митохондриальной популяции (G1, G1-S, S), заканчивающаяся митозом (M). В фазе клеточного покоя G0 этап кратковременного слияния вызывает деление. После деления дочерняя митохондрия либо поддерживает нормальный мембранный потенциал, либо деполаризуется. Деполаризованные митохондрии могут восстанавливать свой мембранный потенциал и входить в стадию поддержания клеткой состояния дискретных органелл, при этом митохондрии, не восстановившие потенциал по истечении нескольких часов, как правило, удаляются из клетки путем митофагии. При условиях, благоприятствующих вхождению клетки в новый клеточный цикл, дискретные митохондрии снова подвергаются слиянию в фазе G1.

точными компартаментами, вовлекаются в динамические процессы, влияющие на качество и структурно-морфологические вариации митохондриальной популяции.

Изменения биоэнергетического состояния клетки оказывают влияние на баланс между процессами слияния и деления митохондрий, что, как следствие, приводит к появлению морфологических вариаций [191]. Показано, что высокая активность дыхательной цепи часто коррелирует с удлинением митохондрий. У дрожжей увеличение активности окислительного фосфорилирования сопровождается элонгацией митохондриальной сети [192]. Индукция гиперслияния митохондрий в клетках животных, происходящая при стрессе, также приводит к повышенной выработке митохондриального АТФ и определяет стрессоустойчивость клеток [193].

В противоположность этому, высокий энергетический статус в клетках фотосинтезирующих растений обеспечивается преимущественно мелкими дискретными митохондриями. Высоко-

энергетическое состояние растительных клеток в дневное время связано с формированием и поддержанием популяции митохондрий небольшого размера, а сниженный энергетический статус в ночное время – с более удлиненными митохондриями [56]. В то же время механизмы энергизации клеток в состоянии клеточной пролиферации универсальны для всех эукариот (рис. 3): непрерывная гиперсеть, формирующаяся на стадии G1-S клеточного цикла, имеет наибольший выход АТФ [63, 64, 194, 195], необходимого клетке во время деления, и позволяет распределять энергию на значительные расстояния по всей клетке.

Морфологические изменения митохондрий играют решающую роль в биоэнергетической реактивации при прорастании семян [85]. Покоящиеся сухие семена содержат дискретные небольшие протомитохондрии, после набухания семян митохондрии сливаются, образуя сетчатую структуру, что приводит к биоэнергетической и метаболической реактивации. Временное слияние митохондрий также наблюдается в протопла-

стах непосредственно перед началом деления клеток и в клетках при низких уровнях света, кислорода или сахарозы [56, 69, 196]. Следовательно, образование длинных слитых митохондрий в зиготе, семенах, меристематических клетках способствует активации биоэнергетических процессов для инициации онтогенеза.

В случае повреждений митохондрии, как правило, происходит деполяризация органелл, что ведет к потере потенциала митохондриальной мембраны, необходимого для генерации АТФ [197]. Патологические условия также вызывают снижение потенциала митохондриальной мембраны в клетках млекопитающих, при этом часть митохондрий сохраняет свой мембранный потенциал неизменным, что приводит к увеличению гетерогенности митохондриальной популяции [198]. Деполяризованные органеллы различной формы, не подлежащие восстановлению, остаются за пределами пула активных митохондрий, вновь сливающихся в протяженные кластеры [120]. Фрагментированные или неслившиеся митохондрии, не способные поддерживать необходимый уровень синтеза АТФ [1, 199], иницируют процессы митофагии, то есть аутофагической деградации митохондрий, и удаляются из клетки (рис. 4). При изучении динамики митохондрий фибробластов показано, что каждая пятая дочерняя митохондрия деполяризуется и элиминируется митофагией [119]. Мелкие фрагментированные митохондрии с выявленной дисфункцией легко захватываются аутофагическими мембранами и затем сливаются с лизосомой [119]. У растений деградация поврежденных или продуцирующих избыток активных форм кислорода митохондрий происходит в вакуоли [200]. Таким образом, динамика митохондрий служит фильтром для отделения и деградации биоэнергетически дисфункциональных митохондрий от здоровых, а митохондриальное деление – первый шаг в поддержании качества митохондриальной популяции.

Способность сети образовывать в результате деления отдельные деполяризованные дочерние митохондрии, составляющие преаутофагический пул клетки, считается одной из важных причин возникновения субклеточной гетерогенности в клетках животных [198, 201, 202]. Причина этого, по-видимому, заключается в том, что определенная часть деполяризованных митохондрий не подвергается деградации. Известно, что некоторые митохондрии с дисфункцией производства энергии могут восстанавливать свою поляризацию, стимулируя процессы слияния с пулом активных, высокоэнергетических органелл с последующим разделением [55] (рис. 4).

Ранее была высказана гипотеза, что в пределах единичной клетки одни митохондрии могут специализироваться на хранении наследственной

информации, а другие выполнять биоэнергетическую функцию [23]. Но действительно ли некоторая часть деполяризованных митохондрий представляет отдельную субпопуляцию клетки с определенной функцией или они составляют некую популяцию “пула ожидания” для восстановления своей энергетической функциональности, предстоит установить в дальнейших исследованиях.

Биогенез мембран митохондрий и их гетерогенность

На поздних стадиях прорастания образовавшаяся вблизи ядра перинуклеарная тубулоретикулярная митохондриальная структура может способствовать обмену молекулами во всем хондриоме, при этом протомитохондрии становятся своего рода каркасами для встраивания новых полипептидов и липидов [85]. Такие динамичные преобразования хондриома на ранних стадиях развития растения способствуют перекрестному взаимодействию между митохондриальным и ядерным геномами и синхронизации митохондриального биогенеза за счет эффективной доставки и импорта тРНК и полипептидов, кодируемых ядерными транскриптами. Эти изменения сопровождаются усилением транскрипции генов, кодирующих компоненты аппарата импорта внутренней мембраны, фолдинга белков и метаболизма мтДНК [203]. Как показано на культивируемых клетках млекопитающих [87], митохондрии с перинуклеарной локализацией обогащены компонентами аппарата импорта белков внешней мембраны по сравнению с митохондриями на периферии. После окончания прорастания перинуклеарные тубулоретикулярные структуры фрагментируются, что вновь приводит к возникновению популяции физически дискретных митохондрий. Мы предполагаем, что популяция митохондрий уже на стадии молодых проростков имеет различия в белково-липидном составе мембран митохондрий. Это предположение подтверждено результатами наших исследований в области митохондриального импорта ДНК растений *in organello* [7]. Так, показано, что митохондриальная популяция, выделенная как из молодых проростков кукурузы, так и из запасающей паренхимы репы и 4-недельных листьев арабидопсиса, представляет собой смесь неоднородных органелл и разделяется как минимум на две субфракции [7]. Эти митохондрии отличались по ультраструктуре, дыхательной активности и эффективности импорта ДНК [204] и имели, по-видимому, разный белково-липидный состав мембран. Нами обнаружена высокая эффективность импорта нуклеиновых кислот в одну из митохондриальных субфракций, что может быть обусловлено повышенным уровнем биогенеза мембран в протомитохондриях по сравнению с более зрелыми органеллами. Пока

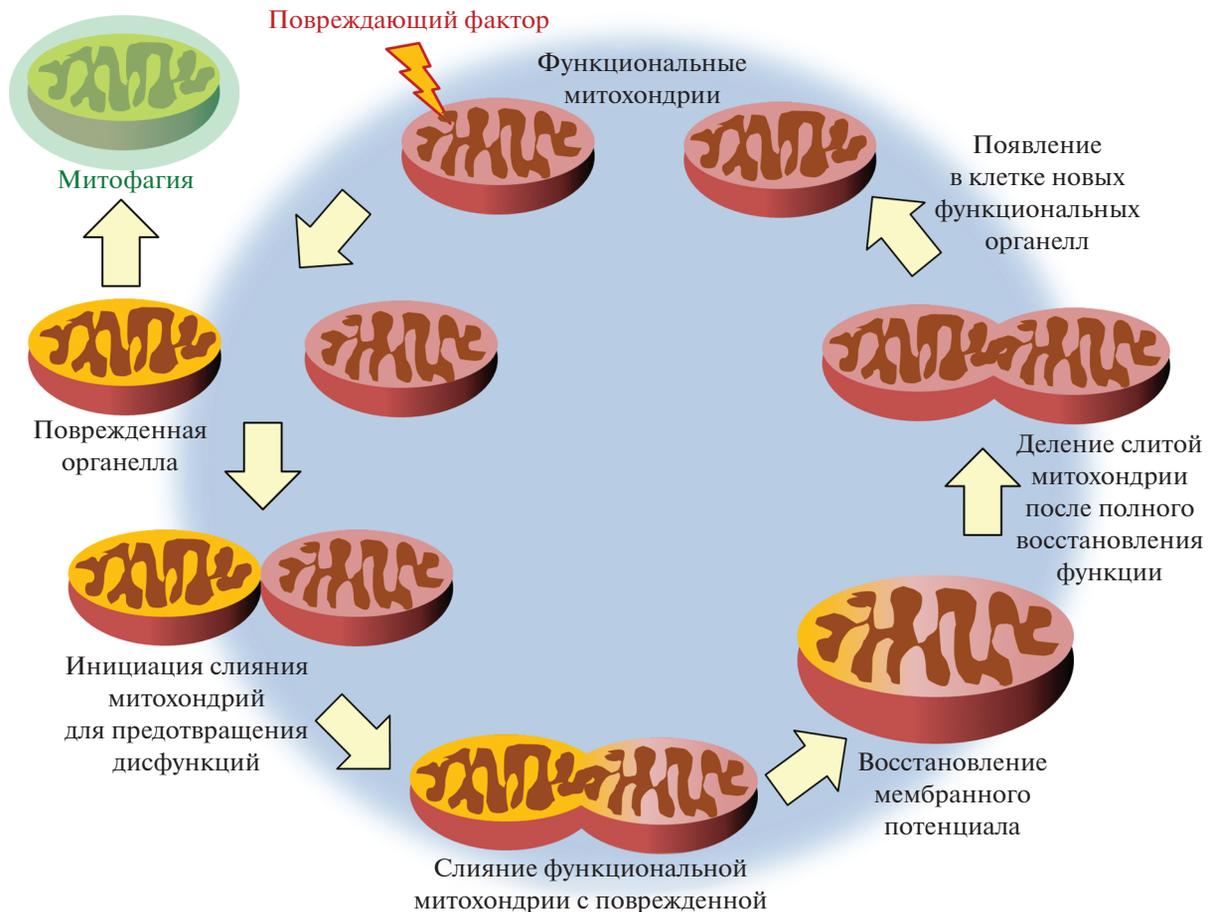


Рис. 4. Комплементация митохондриальной функции с помощью слияния. Слияние позволяет функциональным митохондриям восстанавливать поврежденные органеллы; при этом происходит распределение компонентов между органеллами и предотвращение неблагоприятных эффектов, вызванных воздействием стрессовых факторов. При альтернативном сценарии поврежденные митохондрии отделяются от здоровой популяции и удаляются из цитоплазмы с помощью аутофагической деградации.

неясно, с чем связана такая гетерогенность: отражает она внутриклеточные процессы или различия в метаболическом статусе отдельных клеток одного типа ткани, а значит и их митохондрий. Ранее в листьях арабидопсиса выявлена гетерогенность митохондриальной структуры при акклиматизации растения к холоду [205]. Также показано [26], что митохондрии, выделенные из молодых листьев гороха, имеют меньшую плотность за счет сниженного содержания некоторых матриксных белков в сравнении с органеллами, изолированными из более старых листьев. На основании этих результатов можно предположить, что листья разного возраста служат источником гетерогенных по молекулярному составу митохондрий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Таким образом, создание и поддержание разнообразия популяции митохондрий растений проис-

ходит благодаря особенностям динамики растительных митохондрий. Эта динамика приводит к формированию дискретной организации хондриома с морфологически и генетически разнообразными органеллами, которые могут нести альтернативные варианты митохондриального генома, иметь неравное распределение мтДНК, индивидуальный состав мембран и разную степень митохондриальной энергизации. Согласно некоторым исследованиям, митохондрии, по крайней мере в некоторых типах клеток, могут быть разделены на функционально разнообразные субпопуляции, выполняющие различные задачи в клетке [120]. К важнейшим функциям митохондрий относится биосинтез АТФ и поддержание стабильности собственного генома. Однако синтез АТФ сопровождается образованием в дыхательной цепи активных форм кислорода, которые, как известно, могут вызывать повреждения в ДНК. Так, Logan [23, 62] считает, что возникает своего рода конфликт в осуществлении митохондриями двух вышеназванных функций.

Разрешение этого конфликта он видит в существовании в клетке двух субпопуляций митохондрий, одна из которых выполняет преимущественно энергетическую функцию, а другая служит своего рода генетическим хранилищем. Митохондрии этих субпопуляций могут различаться по содержанию мтДНК и мембранных компонентов, обеспечивающих окислительное фосфорилирование.

Стресс также может вызывать возникновение в клетке специализированных субпопуляций митохондрий. Показано, что при воздействии на лист арабидопсиса патогенными грибами появляется вторая субпопуляция органелл, наряду с типичными митохондриями. В мембране этих органелл происходит накопление белка PEN2, способного формировать гомоолигомерные комплексы [6].

Специализация митохондрий может быть связана с межорганельными взаимодействиями [62] либо характеристиками самой митохондрии, такими как белково-липидный состав мембраны и ее проводимость, а также содержание и состав мтДНК. Различия в белково-липидном составе двойной мембраны митохондрий и, как следствие, в эффективности митохондриального импорта [206] могут служить непрямым доказательством наличия у митохондрий функциональной специализации [7].

Неравномерное распределение нуклеотидов мтДНК среди митохондрий [60, 85] также указывает на потенциальное разделение функций между физически дискретными членами хондриома. Возникновение гетерогенности наблюдается уже в прорастающих семенах, предшествуя усилению митохондриальной динамики и дыхательной активности. Одновременно с этой гипотетической фазой специализации митохондриальных функций происходит рассинхронизация репликации мтДНК и ядерного генома и ослабление ядерного контроля над рекомбинацией мтДНК [85]. Таким образом, есть данные в пользу возможного разделения функций даже внутри протомитохондриальной популяции.

Для дальнейшего понимания природы гетерогенности митохондрий необходимо найти ответы на ряд важных нерешенных вопросов.

1. Анализ корреляции гетероплазмы растительных видов с их фенотипом

На данном этапе мало что известно о роли неоднородного содержания и состояния мтДНК в природных популяциях растений. Для решения этой задачи необходим широкомасштабный мониторинг митогеномов, представляющий особый интерес для исследования филогеографии видов с обширным ареалом. Митохондриальная гетероплазма имеет важные последствия для эволюции

ЦМС растений [207–209]. Стехиометрия, присущая митохондриальному геному растений, контролируется ядерными генами, поэтому гетероплазмия может быть полезна для установления функционального взаимодействия между двумя геномами.

2. Механизм “поцелуй-и-беги” и функциональная специализация

Дискретный тип организации митохондриальной популяции растений представляет больше возможностей для возникновения специализации у митохондрий. Распространенный механизм “поцелуй-и-беги” ограничивает гомогенизацию содержимого митохондрий, будучи источником фенотипической и генотипической митохондриальной гетерогенности. Однако вопрос, каким образом реализуется последующая специализация митохондрий, остается открытым. Возможно, митохондрии в короткий срок до следующего временного слияния становятся в некоторой степени специализированными или по мере прохождения нескольких циклов слияния-деления постепенно приобретают специализацию. Сохранение таких параметров, как индивидуальная морфология, состав внутренней митохондриальной мембраны и ассоциированной с ней мтДНК, которые были свойственны данной митохондрии до временного слияния [94, 96], свидетельствует о возможном сохранении и ее специализации.

3. Деполяризованные митохондрии: функция или дисфункция

В настоящий момент не до конца выяснено, действительно ли некоторая часть деполяризованных митохондрий составляет отдельную субпопуляцию клетки с определенной функцией или же это “пул ожидания” для восстановления своей энергетической функциональности либо дегенерации.

4. Различия в способности к импорту у субклеточных популяций митохондрий

Ранее нами выявлена гетерогенность митохондрий в клетках различных растительных тканей [7]. Оказалось, что отдельные субфракции митохондрий, выделенные из листьев арабидопсиса, паренхимы корнеплодов репы и меристематической ткани колеоптилей кукурузы обладают различающимися структурными и функциональными характеристиками. Особо интригующим результатом оказалась различная способность выделенных митохондриальных субфракций к импорту ДНК. Является ли источником этих различий внутриклеточная гетерогенность митохондриальной популяции, или же мы имеем дело с не менее инте-

ресным феноменом межклеточной гетерогенности в пределах одного типа ткани? Ответ на этот вопрос предстоит получить в дальнейших исследованиях.

В работе использовано оборудование Центра Коллективного Пользования “Биоаналитика” Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (г. Иркутск).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 20-14-50001.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kornick K., Bogner B., Sutter L., Das M. (2019) Population dynamics of mitochondria in cells: a minimal mathematical model. *Front. Phys.* **7**, 146. <https://doi.org/10.3389/fphy.2019.00146>
- Welchen E., Garcia L., Mansilla N., Gonzalez D.H. (2014) Coordination of plant mitochondrial biogenesis: keeping pace with cellular requirements. *Front. Plant Sci.* **4**, 551. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00551>
- Galloway C.A., Yoon Y. (2013) Mitochondrial morphology in metabolic diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 415–430. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4779>
- Mishra N.C., Kumar S. (2005) Apoptosis: a mitochondrial perspective on cell death. *Indian J. Exp. Biol.* **43**, 25–34.
- Howell K.A., Millar A.H., Whelan J. (2006) Ordered assembly of mitochondria during rice germination begins with promitochondrial structures rich in components of the protein import apparatus. *Plant Mol. Biol.* **60**, 201–223. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-3688-7>
- Fuchs R., Kopischke M., Klapprodt C., Hause G., Meye A.J., Schwarzländer M., Fricker M.D., Lipka V. (2016) Immobilized subpopulations of leaf epidermal mitochondria mediate PENETRATION2-dependent pathogen entry control in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **28**, 130–145. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00887>
- Tarasenko T.A., Subota I.Yu., Tarasenko V.I., Konstantinov Y.M., Koulintchenko M.V. (2020) Plant mitochondrial subfractions have different ability to import DNA. *Theor. Exp. Plant Physiol.* **32**, 5–18. <https://doi.org/10.1007/s40626-020-00167-w>
- Murcha M.W., Huang T., Whelan J. (1999) Import of precursor proteins into mitochondria from soybean tissues during development. *FEBS Lett.* **464**, 53–59. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01674-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01674-9)
- Weber-Lotfi F., Koulintchenko M., Ibrahim N., Hammann P., Mileschina D., Konstantinov Yu.M., Dietrich A. (2015) Nucleic acid import into mitochondria: new insights into the translocation pathways. *Biochim. Biophys. Acta.* **1853**, 3165–3181. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.011>
- Millar A.H., Sweetlove L.J., Giegé P., Leaver C.J. (2001) Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiol.* **127**, 1711–1727.
- Stickens D., Verbelen J.P. (1996) Spatial structure of mitochondria and ER denotes changes in cell physiology of cultured tobacco protoplast. *Plant. J.* **9**, 85–92. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.09010085.x>
- Logan D.C., Leaver C.J. (2000) Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells. *J. Exp. Bot.* **51**, 865–871. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.346.865>
- Wai T., Langer T. (2016) Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* **27**, 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.12.001>
- Johnston I.G. (2019a) Tension and resolution: dynamic, evolving populations of organelle genomes within plant cells. *Mol. Plant.* **12**, 764–783. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.11.002>
- Frisell W.R., Patwardhan M.V., Mackenzie C.G. (1965) Quantitative studies on the soluble compartments of light and heavy mitochondria from rat liver. *J. Biol. Chem.* **240**, 1829–1835.
- Graham J.M. (2002) OptiPrep density gradient solutions for nonmammalian organelles. *ScientificWorldJournal.* **2**, 1444–1448. <https://doi.org/10.1100/tsw.2002.839>
- Белякович А.Г. (1990) *Изучение митохондрий и бактерий с помощью соли тетразолия n-НТФ*. Пушино: ОНТИ НЦБИ.
- Шишмаков Д.А., Анисимов Р.Л., Векшин Н.Л. (2004) Некоторые свойства протомитохондрий. *Биол. мембраны.* **21**, 389–395.
- Dai H., Lo Y.S., Jane W.N., Lee L.W., Chiang K.S. (1998) Population heterogeneity of higher-plant mitochondria in structure and function. *Eur. J. Cell Biol.* **75**, 198–209. [https://doi.org/10.1016/S0171-9335\(98\)80062-9](https://doi.org/10.1016/S0171-9335(98)80062-9)
- Logan D.C., Millar A.H., Sweetlove L.J., Hill S.A., Leaver C.J. (2001) Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. *Plant Physiol.* **125**, 662–672. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.662>
- Begunova E.A., Vekshin N.L. (2015) Protomitochondria from liver cells: similarities with and differences from mitochondria. *Biophysics.* **60**, 921–927. <https://doi.org/10.1134/S0006350915060032>
- Lund H.A., Vatter A.E., Hanson J.B. (1958) Biochemical and cytological changes accompanying growth and differentiation in the roots of *Zea mays*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **4**, 87–96. <https://doi.org/10.1083/jcb.4.1.87>
- Logan D.C. (2006) The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* **57**, 1225–1243. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj151>
- Petrussa E., Bertolini A., Krajňáková J., Casolo V., Macri F., Vianello A. (2008) Isolation of mitochondria from embryogenic cultures of *Picea abies* (L.) Karst.

- and *Abies cephalonica* Loud.: characterization of a K⁺ATP channel. *Plant Cell Rep.* **27**, 137–146. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0436-2>
25. Bakeeva L.E., Kirnos M.D., Aleksandrushkina N.I., Kazimirchuk S.B., Shorning B.Yu., Zamyatnina V.A., Yaguzhinsky L.S., Vanyushin B.F. (1999) Subcellular reorganization of mitochondria producing heavy DNA in aging wheat coleoptiles. *FEBS Lett.* **457**, 122–125. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)01025-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)01025-x)
 26. Vaclare P., Diallo N., Bourguignon J., Macherel D., Douce R. (1996) Regulation of the expression of the glycine decarboxylase complex during pea leaf development. *Plant Physiol.* **112**, 1523–1530. <https://doi.org/10.1104/pp.112.4.1523>
 27. des Francs-Small C.C., Ambard-Bretteville F., Darpas A., Sallantin M., Huet J.C., Pernollet J.C., Rémy R. (1992) Variation of the polypeptide composition of mitochondria isolated from different potato tissues. *Plant Physiol.* **98**, 273–278. <https://doi.org/10.1104/pp.98.1.273>
 28. Bahl J., Demandre C., Chauveau M., Alpha M.J., Roussaux J. (1997) Lipid changes in mitochondria of *Arum maculatum* spadix during inflorescence development. *Plant Physiol. Biochem.* **35**, 693–700. https://doi.org/10.1007/978-94-015-8394-7_55
 29. Small I.D., Isaac P.G., Leaver C.J. (1987) Stoichiometric differences in DNA molecules containing the *atpA* gene suggest mechanisms for the generation of mitochondrial diversity in maize. *EMBO J.* **6**, 865–869. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb04832.x>
 30. Birky C.W. (2001) The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 125–148. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090231>
 31. Aryaman J., Johnston I.G., Jones N.S. (2018) Mitochondrial heterogeneity. *Front. Genet.* **9**, 718. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00718>
 32. Nishimura M., Douce R., Akazawa T. (1982) Isolation and characterization of metabolically competent mitochondria from spinach leaf protoplasts. *Plant Physiol.* **69**, 916–920. <https://doi.org/10.1104/pp.69.4.916>
 33. Collins T.J., Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. (2002) Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J.* **21**, 1616–1627. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1616>
 34. Simeonova E., Garstka M., Koziol-Lipińska J., Mostowska A. (2004) Monitoring the mitochondrial transmembrane potential with the JC-1 fluorochrome in programmed cell death during mesophyll leaf senescence. *Protoplasma.* **223**, 143–153. <https://doi.org/10.1007/s00709-004-0039-5>
 35. Battersby B.J., Shoubridge E.A. (2001) Selection of a mtDNA sequence variant in hepatocytes of heteroplasmic mice is not due to differences in respiratory chain function or efficiency of replication. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2469–2479. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.22.2469>
 36. Staehelin L.A. (1997) The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* **11**, 1151–1165. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.11061151.x>
 37. Köhler R.H., Cao J., Zipfel W.R., Webb W.W., Hanson M.R. (1997) Exchange of protein molecules through connections between higher plant plastids. *Science.* **276**, 2039–2042. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2039>
 38. Smart C.J., Monéger F., Leaver C.J. (1994) Cell-specific regulation of gene expression in mitochondria during anther development in sunflower. *Plant Cell.* **6**, 811–825. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.6.811>
 39. Southworth D., Strout G., Russell S.D. (1997) Freeze-fracture of sperm of *Plumbago zeylanica* L. in pollen and *in vitro*. *Sex. Plant Reprod.* **10**, 217–226. <https://doi.org/10.1007/s004970050090>
 40. Ehrenshaft M., Brambl R. (1990) Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. *Plant Physiol.* **93**, 295–304. <https://doi.org/10.1104/pp.93.1.295>
 41. Botha F.C., Potgieter G.P., Botha A.M. (1992) Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Plant Growth Reg.* **11**, 211–224. <https://doi.org/10.1007/BF00024560>
 42. Bewley J.D. (1997) Seed germination and dormancy. *Plant Cell.* **9**, 1055–1066. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1055>
 43. Bain M.J., Mercer F.V. (1964) Organization resistance and respiration climacteric. *Aust. J. Biol. Sci.* **17**, 78–85. <https://doi.org/10.1071/BI9640078>
 44. Malhotra S.S., Spencer M. (1973) Structural development during germination of different populations of mitochondria from pea cotyledons. *Plant Physiol.* **52**, 575–579. <https://doi.org/10.1104/pp.52.6.575>
 45. Falk K.L., Behal R.H., Xiang C.B., Oliver D.J. (1998) Metabolic bypass of the tricarboxylic acid cycle during lipid mobilization in germinating oilseeds: regulation of NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase versus fumarase. *Plant Physiol.* **117**, 473–481. <https://doi.org/10.1104/pp.117.2.473>
 46. Daley D.O., Considine M.J., Howell K.A., Millar A.H., Day D.A., Whelan J. (2003) Respiratory gene expression in soybean cotyledons during post-germinative development. *Plant Mol. Biol.* **51**, 745–755. <https://doi.org/10.1023/a:1022502501373>
 47. Nunnari J., Marshall W.F., Straight A., Murray A., Sedat J.W., Walter P. (1997) Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell.* **8**, 1233–1242. <https://doi.org/10.1091/mbc.8.7.1233>
 48. Okamoto K., Shaw J.M. (2005) Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 503–536. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.38.072902.093019>
 49. Arimura S., Tsutsumi N. (2002) A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in *Arabidopsis* mitochondrial division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 5727–5731. <https://doi.org/10.1073/pnas.082663299>

50. Bereiter-Hahn J. (1990) Behavior of mitochondria in the living cell. *Int. Rev. Cytol.* **122**, 1–63. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61205-x](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61205-x)
51. Rizzuto R., Pinton P., Carrington W., Fay F.S., Fogarty K.E., Lifshitz L.M., Tuft R.A., Pozzan T. (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science*. **280**, 1763–1766. <https://doi.org/10.1126/science.280.5370.1763>
52. Aryaman J., Bowles C., Jones N.S., Johnston I.G. (2019) Mitochondrial network state scales mtDNA genetic dynamics. *Genetics*. **212**, 1429–1443. <https://doi.org/10.1534/genetics.119.302423>
53. Xie L.-L., Shi F., Tan Z., Li Y., Bode A.M., Cao Y. (2018) Mitochondrial network structure homeostasis and cell death. *Cancer Sci.* **109**, 3686–3694. <https://doi.org/10.1111/cas.13830>
54. Rafelski S.M. (2013) Mitochondrial network morphology: building an integrative, geometrical view. *BMC Biology*. **11**, 71. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-71>
55. Youle R.J., van der Blik A.M. (2012) Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. **337**, 1062–1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219855>
56. Jaipargas E.-A., Barton K. A., Mathur N., Mathur J. (2015) Mitochondrial pleomorphy in plant cells is driven by contiguous ER dynamics. *Front. Plant Sci.* **6**, 783. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00783>
57. Chen H., Chan D.C. (2005) Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum. Mol. Genet.* **14**, R283–R289. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi270>
58. Fuchs P., Rugen N., Carrie C., Elsässer M., Finckmeier I., Giese J., Hildebrandt T.M., Kühn K., Maurino V.G., Ruberti C., Schallenberg-Rüdinger M., Steinbeck J., Braun H.-P., Eubel H., Meyer E.H., Müller-Schüssele S.J., Schwarzländer M. (2020) Single organelle function and organization as estimated from *Arabidopsis* mitochondrial proteomics. *Plant J.* **101**, 420–441. <https://doi.org/10.1111/tpj.14534>
59. Sheahan M.B., Rose R.J., McCurdy D.W. (2004) Organelle inheritance in plant cell division: the actin cytoskeleton is required for unbiased inheritance of chloroplasts, mitochondria and endoplasmic reticulum in dividing protoplasts. *Plant J.* **37**, 379–390. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01967.x>
60. Preuten T., Cincu E., Fuchs J., Zoschke R., Liere K., Borner T. (2010) Fewer genes than organelles: extremely low and variable gene copy numbers in mitochondria of somatic plant cells. *Plant J.* **64**, 948–959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04389.x>
61. Arimura S., Aida G.P., Fujimoto M., Nakazono M., Tsutsumi N. (2004b) *Arabidopsis* dynamin-like protein 2a(ADL2a), like ADL2b, is involved in plant mitochondrial division. *Plant Cell Physiol.* **45**, 236–242. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch024>
62. Logan D.C. (2010) Mitochondrial fusion, division and positioning in plants. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 789–795. <https://doi.org/10.1042/BST0380789>
63. Seguí-Simarro J.M., Coronado M.J., Staehelin L.A. (2008) The mitochondrial cycle of *Arabidopsis* shoot apical meristem and leaf primordium meristematic cells is defined by a perinuclear tentaculate/cage-like mitochondrion. *Plant Physiol.* **148**, 1380–1393. <https://doi.org/10.1104/pp.108.126953>
64. Kianian P.M.A., Kianian S.F. (2014) Mitochondrial dynamics and the cell cycle. *Front. Plant Sci.* **5**, 222. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00222>
65. Christiansen E.G. (1949) Orientation of the mitochondria during mitosis. *Nature*. **163**, 361.
66. Taguchi N., Ishihara N., Jofuku A., Oka T., Mihara K. (2007) Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* **282**, 11521–11529. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607279200>
67. Kanfer G., Courthéoux T., Peterka M., Meier S., Soste M., Melnik A., Reis K., Aspenstrom P., Peter M., Picotti P., Kornmann B. (2015) Mitotic redistribution of the mitochondrial network by Miro and Cenp-F. *Nat. Commun.* **6**, 8015. <https://doi.org/10.1038/ncomms9015>
68. Seguí-Simarro J.M., Staehelin L.A. (2009) Mitochondrial reticulation in shoot apical meristem cells of *Arabidopsis* provides a mechanism for homogenization of mtDNA prior to gamete formation. *Plant Signal. Behav.* **4**, 168–171. <https://doi.org/10.4161/psb.4.3.7755>
69. Sheahan M.B., McCurdy D.W., Rose R.J. (2005) Mitochondria as a connected population: ensuring continuity of the mitochondrial genome during plant cell dedifferentiation through massive mitochondrial fusion. *Plant J.* **44**, 744–755. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02561.x>
70. Katajisto P., Döhla J., Chaffer C.L., Pentimikko N., Marjanovic N., Iqbal S., Zoncu R., Chen W., Weinberg R.A., Sabatini D.M. (2015) Stem cells. Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. *Science*. **348**, 340–343. <https://doi.org/10.1126/science.1260384>
71. Kanfer G., Kornmann B. (2016) Dynamics of the mitochondrial network during mitosis. *Biochem. Soc. Trans.* **44**, 510–516. <https://doi.org/10.1042/BST20150274>
72. Bird J., Porter E.K., Dickinson H.G. (1983). Events in the cytoplasm during male. *J. Cell Sci.* **42**, 27–42
73. Mogenson H.L., Rusche L. (1985) Quantitative ultrastructural analysis of barley sperm. I. Occurrence and mechanism of cytoplasm and organelle reduction and the question of sperm dimorphism. *Protoplasma*. **13**, 1–13. <https://doi.org/10.1007/BF01273229>
74. McConchie C.A., Hough T., Knox R.B. (1987) Ultrastructural analysis of the sperm cells of mature pollen of maize, *Zea mays*. *Protoplasma*. **139**, 9–19. <https://doi.org/10.1007/BF01417530>
75. Wagner V.T., Dumas C., Mogenson H.L. (1988) Morphometric analysis of isolated *Zea mays* sperm. *J. Cell Sci.* **93**, 179–184. <https://doi.org/10.1242/jcs.93.1.179>
76. Mogenson H.L., Wagner V.T., Dumas C. (1990) Quantitative, three-dimensional ultrastructure of iso-

- lated corn (*Zea mays*) sperm cells. *Protoplasma*. **153**, 136–140.
<https://doi.org/10.1007/BF01353997>
77. Mahrous E., Yang Q., Clarke H.J. (2012) Regulation of mitochondrial DNA accumulation during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *Reproduction*. **144**, 177–185.
<https://doi.org/10.1530/REP-12-0113>
 78. Dalton C.M., Carroll J. (2013) Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. *J. Cell Sci.* **126**, 2955–2964.
<https://doi.org/10.1242/jcs.128744>
 79. Faure J., Mogensen H.L., Kranz E., Digonnet C., Dumas C. (1992) Ultrastructural characterization and three-dimensional reconstruction of isolated maize (*Zea mays* L.) egg cell protoplasts. *Protoplasma*. **171**, 97–103.
<https://doi.org/10.1007/BF01403723>
 80. Schulz P., Jensen W.A. (1973) *Capsella* embryogenesis: the central cell. *J. Cell Sci.* **12**, 741–763.
 81. Kuroiwa H., Ohta T., Kuroiwa T. (1996) Studies on the development and three-dimensional reconstruction of giant. *Protoplasma*. **192**, 235–244.
<https://doi.org/10.1007/BF01273895>
 82. Yamaoka S., Nakajima M., Fujimoto M., Tsutsumi N. (2011) MIRO1 influences the morphology and intracellular distribution of mitochondria during embryonic cell division in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* **30**, 239–244.
<https://doi.org/10.1007/s00299-010-0926-5>
 83. Kimata Y., Higaki T., Kurihara D., Ando N., Matsu-moto H., Higashiyama T., Ueda M. (2020) Mitochondrial dynamics and segregation during the asymmetric division of *Arabidopsis* zygotes. *Quant. Plant Biol.* **1**, e3.
<https://doi.org/10.1017/qpb.2020.4>
 84. Gooh K., Ueda M., Aruga K., Park J., Arata H., Higashiyama T., Kurihara D. (2015) Live-cell imaging and optical manipulation of *Arabidopsis* early embryogenesis. *Dev. Cell.* **34**, 242–251.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.008>
 85. Paszkiewicz G., Gualberto J.M., Benamar A., Macherel D., Logan D.C. (2017) *Arabidopsis* seed mitochondria are bioenergetically active immediately upon imbibition and specialize via biogenesis in preparation for autotrophic growth. *Plant Cell.* **29**, 109–128.
<https://doi.org/10.1105/tpc.16.00700>
 86. Quintana A., Hoth M. (2012) Mitochondrial dynamics and their impact on T cell function. *Cell Calcium.* **52**, 57–63.
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.02.005>
 87. Wurm C.A., Neumann D., Lauterbach M.A., Harke B., Egner A., Hell S.W., Jakobs S. (2011) Nanoscale distribution of mitochondrial import receptor Tom20 is adjusted to cellular conditions and exhibits an inner-cellular gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 13546–13551.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1107553108>
 88. Smirnova E., Griparic L., Shurland D.L., van der Blik A.M. (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell.* **12**, 2245–2256.
<https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2245>
 89. van der Blik A.M., Shen Q., Kawajiri S. (2013) Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a011072.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011072>
 90. Chang C.R., Blackstone C. (2010) Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann. NY Acad. Sci.* **1201**, 34–39.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05629.x>
 91. Park Y.-Y., Cho H. (2012) Mitofusin 1 is degraded at G2/M phase through ubiquitylation by MARCH5. *Cell Div.* **7**, 25.
<https://doi.org/10.1186/1747-1028-7-25>
 92. Chen H., Chomyn A., Chan D.C. (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* **280**, 26185–26192.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M503062200>
 93. Logan D.C., Scott I., Tobin A.K. (2003) The genetic control of plant mitochondrial morphology and dynamics. *Plant J.* **36**, 500–509.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01894.x>
 94. Arimura S., Fujimoto M., Doniwa Y., Kadoya N., Nakazono M., Sakamoto W., Tsutsumi N. (2008) *Arabidopsis* elongated mitochondrial 1 is required for localization of dynamin-related protein3A to mitochondrial fission sites. *Plant Cell.* **20**, 1555–1566.
<https://doi.org/10.1105/tpc.108.058578>
 95. El Zawily A.M., Schwarzlander M., Finkemeier I., Johnston I.G., Benamar A., Cao Y., Gissot C., Meyer A.J., Wilson K., Datla R., Macherel D., Jones N.S., Logan D.C. (2014) Friendly regulates mitochondrial distribution, fusion, and quality control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **166**, 808–828.
<https://doi.org/10.1104/pp.114.243824>
 96. Hong Z., Bednarek S.Y., Blumwald E., Hwang I., Jurgens G., Menzel D., Osteryoung K.W., Raikhel N.V., Shinozaki K., Tsutsumi N., Verma D.P. (2003) A unified nomenclature for *Arabidopsis* dynamin-related large GTPases based on homology and possible functions. *Plant Mol. Biol.* **53**, 261–265.
<https://doi.org/10.1023/b:plan.0000007000.29697.81>
 97. Arimura S.I., Yamamoto J., Paul Aida G., Nakazono M., Tsutsumi N. (2004a) Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 7805–7808.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0401077101>
 98. Logan D.C., Scott I., Tobin A.K. (2004) ADL2a, like ADL2b, is involved in the control of higher plant mitochondrial morphology. *J. Exp. Bot.* **55**, 783–785.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erh073>
 99. Aung K., Hu J. (2012) Differential roles of *Arabidopsis* dynamin-related proteins DRP3A, DRP3B, and DRP5B in organelle division. *J. Integr. Plant Biol.* **54**, 921–931.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2012.01174.x>
 100. Scott I., Tobin A.K., Logan D.C. (2006) *BIGYIN*, an orthologue of human and yeast *FIS1* genes functions in the control of mitochondrial size and number in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **57**, 1275–1280.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erj096>
 101. Arimura S.I. (2018) Fission and fusion of plant mitochondria, and genome maintenance. *Plant Physiol.*

- 176, 152–161.
<https://doi.org/10.1104/pp.17.01025>
102. Pan R., Hu J. (2015) Plant mitochondrial dynamics and the role of membrane lipids. *Plant Signal. Behav.* **10**, e1050573.
<https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1050573>
103. Zhang X.C., Hu J.P. (2008) FISSION1A and FISSION1B proteins mediate the fission of peroxisomes and mitochondria in *Arabidopsis*. *Mol. Plant.* **1**, 1036–1047.
<https://doi.org/10.1093/mp/ssn056>
104. Aung K., Hu J. (2011) The *Arabidopsis* tail-anchored protein peroxisomal and mitochondrial division factor1 is involved in the morphogenesis and proliferation of peroxisomes and mitochondria. *Plant Cell.* **23**, 4446–4461.
<https://doi.org/10.1105/tpc.111.090142>
105. Rose R.J. (2021) Contribution of massive mitochondrial fusion and subsequent fission in the plant life cycle to the integrity of the mitochondrion and its genome. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 5429.
<https://doi.org/10.3390/ijms22115429>
106. White R.R., Lin C., Leaves I., Castro I.G., Metz J., Bateman B.C., Botchway S.W., Ward A.D., Ashwin P., Sparkes I. (2020) Miro2 tethers the ER to mitochondria to promote mitochondrial fusion in tobacco leaf epidermal cells. *Commun. Biol.* **3**, 161.
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-0872-x>
107. Altmann K., Frank M., Neumann D., Jakobs S., Westermann B. (2008) The class V myosin motor protein, Myo2, plays a major role in mitochondrial motility in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **181**, 119–130.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200709099>
108. Varadi A., Johnson-Cadwell L.I., Cirulli V., Yoon Y., Allan V.J., Rutter G.A. (2004) Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J. Cell Sci.* **117**, 4389–4400.
<https://doi.org/10.1242/jcs.01299>
109. Rattner J.B., Rao A., Frittle, M.J., Valencia D.W., Yen T.J. (1993) CENP-F is a ca 400 kDa kinetochore protein that exhibits a cell-cycle dependent localization. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **26**, 214–226.
<https://doi.org/10.1002/cm.970260305>
110. Lackner L.L., Ping H., Graef M., Murley A., Nunnari J. (2013) Endoplasmic reticulum-associated mitochondria-cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, E458–E467.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1215232110>
111. Rizzuto R., Brini M., Murgia M., Pozzan T. (1993) Microdomains with high Ca^{2+} close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science.* **262**, 744–747.
<https://doi.org/10.1126/science.8235595>
112. Achleitner G., Gaigg B., Krasser A., Kainersdorfer E., Kohlwein S.D., Perktold A., Zellnig G., Daum G. (1999) Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganellar transport of phospholipids through membrane contact. *Eur. J. Biochem.* **264**, 545–553.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00658.x>
113. Friedman J.R., Lackner L.L., West M., DiBenedetto J.R., Nunnari J., Voeltz G.K. (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science.* **334**, 358–362.
<https://doi.org/10.1126/science.1207385>
114. Mootha V.K., Bunkenborg J., Olsen J.V., Hjerrild M., Wisniewski J.R., Stahl E., Bolouri M.S., Ray H.N., Sihag S., Kamal M., Patterson N., Lander E.S., Mann M. (2003) Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell.* **115**, 629–640.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00926-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00926-7)
115. Robertson E.J., Williams M., Harwood J.L., Lindsay J.G., Leaver C.J., Leech R.M. (1995) Mitochondria increase three-fold and mitochondrial proteins and lipid change dramatically in postmeristematic cells in young wheat leaves grown in elevated CO₂. *Plant Physiol.* **108**, 469–474.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.2.469>
116. Sakamoto W., Takami T. (2018) Chloroplast DNA dynamics: copy number, quality control and degradation. *Plant Cell Physiol.* **59**, 1120–1127.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcy084>
117. Kmiec B., Woloszynska M., Janska H. (2006) Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Curr. Genet.* **50**, 149–159.
<https://doi.org/10.1007/s00294-006-0082-1>
118. Levsen N., Bergero R., Charlesworth D., Wolff K. (2016) Frequent, geographically structured heteroplasmy in the mitochondria of a flowering plant, ribwort plantain (*Plantago lanceolata*). *Heredity.* **117**, 1–7.
<https://doi.org/10.1038/hdy.2016.15>
119. Twig G., Elorza A., Molina A.J.A., Mohamed H., Wikstrom J.D., Walzer G., Stiles L., Haigh S.E., Katz S., Las G., Alroy J., Wu M., Py B.F., Yuan J., Deeney J.T., Corkey B.E., Shirihai O.S. (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* **27**, 433–446.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963>
120. Wikstrom J.D., Twig G., Shirihai O.S. (2009) What can mitochondrial heterogeneity tell us about mitochondrial dynamics and autophagy? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1914–1927.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.06.006>
121. Sukhorukov V.M., Dikov D., Busch K., Strecker V., Wittig I., Bereiter-Hahn J. (2010) Determination of protein mobility in mitochondrial membranes of living cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1798**, 2022–2032.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.07.016>
122. Wallace D.C. (2007) Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 781–821.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.081205.150955>
123. Jakobs S., Stoldt S., Neumann D. (2011) Light microscopic analysis of mitochondria heterogeneity in cell population and within single cells. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **123**, 1–19.
https://doi.org/10.1007/10_2010_81
124. Morley S.A., Nielsen B.L. (2017) Plant mitochondrial DNA. *Front. Biosci.* **22**, 1023–1032.
<https://doi.org/10.2741/4531>

125. Szczepanowska J., Malinska D., Wieckowski M.R., Duszynski J. (2012) Effect of mtDNA point mutations on cellular bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta.* **1817**, 1740–1746.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.028>
126. Wallace D.C., Fan W. (2009) The pathophysiology of mitochondrial disease as modeled in the mouse. *Genes Dev.* **23**, 1714–1736.
<https://doi.org/10.1101/gad.1784909>
127. Lee S., Kim S., Sun X., Lee J.H., Cho H. (2007) Cell cycle-dependent mitochondrial biogenesis and dynamics in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 111–117.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.091>
128. Parone P.A., Da Cruz S., Tondera D., Mattenberger Y., James D.I., Maechler P., Barja F., Martinou J.-C. (2008) Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One.* **3**, e3257.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003257>
129. Yoon Y.S., Yoon D.S., Lim I.K., Yoon S.H., Chung H.Y., Rojo M., Malka F., Jou M.J., Martinou J.C., Yoon G. (2006) Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1. *J. Cell Physiol.* **209**, 468–480.
<https://doi.org/10.1002/jcp.20753>
130. Tateda C., Watanabe K., Kusano T., Takahashi Y. (2011) Molecular and genetic characterization of the gene family encoding the voltage-dependent anion channel in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **62**, 4773–4785.
<https://doi.org/10.1093/jxb/err113>
131. Rice D.W., Alverson A.J., Richardson A.O., Young G.J., Sanchez-Puerta M.V., Munzinger J., Barry K., Boore J.L., Yan Zhang Y., De Pamphilis C.W., Knox E.B., Palmer J.D. (2013) Horizontal transfer of entire genomes via mitochondrial fusion in the angiosperm *Amborella*. *Science.* **342**, 1468–1473.
<https://doi.org/10.1126/science.1246275>
132. Mower J.P., Sloan D.B., Alverson A.J. (2012) Plant mitochondrial genome diversity: the genomics revolution. *Plant Gen. Div.* **1**, 123–144.
https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1130-7_9
133. Lonsdale D.M., Brears T., Hodge T.P., Melville S.E., Rottmann W.H. (1988) The plant mitochondrial genome: homologous recombination as mechanism for generating heterogeneity. *Philos. Trans.* **319**, 149–163.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1988.0039>
134. Legros F., Malka F., Frachon P., Lombès A., Rojo M. (2004) Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J. Cell Sci.* **117**, 2653–2662.
<https://doi.org/10.1242/jcs.01134>
135. Arciuch V.G.A., Elguero M.E., Poderoso J.J., Carreras M.C. (2012) Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 1150–1180.
<https://doi.org/10.1089/ars.2011.4085>
136. Gualberto J.M., Milesina D., Wallet C., Niazi A.K., Weber-Lotfi F., Dietrich A. (2014) The plant mitochondrial genome: dynamics and maintenance. *Biochimie.* **100**, 107–120.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.016>
137. Woloszynska M. (2010) Heteroplasmy and stoichiometric complexity of plant mitochondrial genomes—though this be madness, yet there’s method in’t. *J. Exp. Bot.* **61**, 657–671.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erp361>
138. Abdelnoor R.V., Yule R., Elo, A., Christensen A.C., Meyer-Gauen G., Mackenzie S.A. (2003) Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to *MutS*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 5968–5973.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1037651100>
139. Chevigny N., Schatz-Daas D., Lotfi F., Gualberto J.M. (2020) DNA repair and the stability of the plant mitochondrial genome. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 328.
<https://doi.org/10.3390/ijms21010328>
140. Woloszynska M., Trojanowski T. (2009) Counting mtDNA molecules in *Phaseolus vulgaris*: sublimons are constantly produced by recombination via short repeats and undergo rigorous selection during substoichiometric shifting. *Plant Mol. Biol.* **70**, 511–521.
<https://doi.org/10.1007/s11103-009-9488-8>
141. Newton K.J., Gabay-Laughnan S., De Paepe R. (2004) Mitochondrial mutations in plants. In: *Plant Mitochondria: From Genome to Function. Advances in Photosynthesis and Respiration.* **17**, 121–141.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2400-9_7
142. Andersson S. (1999) Quantitative genetics of leaf morphology in *Crepis tectorum* ssp. *pumila* (Asteraceae). *J. Heredity.* **90**, 556–561.
<https://doi.org/10.1093/jhered/90.5.556>
143. Kajander O.A., Rovio A.T., Majamaa K., Poulton J., Spelbrink J.N., Holt I.J., Karhunen P.J., Jacobs H.T. (2000) Human mtDNA sublimons resemble rearranged mitochondrial genomes found in pathological states. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 2821–2835.
<https://doi.org/10.1093/hmg/9.19.2821>
144. Knorre D.A., Popadin K.Y., Sokolov S.S., Severin F.F. (2013) Roles of mitochondrial dynamics under stressful and normal conditions in yeast cells. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2013**, 139491.
<https://doi.org/10.1155/2013/139491>
145. Christensen A.C. (2013) Plant mitochondrial genome evolution can be explained by DNA repair mechanisms. *Genome Biol. Evol.* **5**, 1079–1086.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evt069>
146. Boesch P., Weber-Lotfi F., Ibrahim N., Tarasenko V., Cosset A., Paulus F., Lightowler R.N., Dietrich A. (2011) DNA repair in organelles: pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging. *Biochim. Biophys. Acta.* **1813**, 186–200.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.002>
147. Cappadocia L., Maréchal A., Parent J.S., Lepage E., Sygusch J., Brisson N. (2010) Crystal structures of DNA-Whirly complexes and their role in *Arabidopsis* organelle genome repair. *Plant Cell.* **22**, 1849–1867.
<https://doi.org/10.1105/tpc.109.071399>
148. Zaegel V., Guermann B., Le Ret M., Andres C., Meyer D., Erhardt M., Canaday J., Gualberto J.M., Imbault P. (2006) The plant-specific ssDNA binding protein OSB1 is involved in the stoichiometric transmission of mitochondrial DNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **18**, 3548–3563.
<https://doi.org/10.1105/tpc.106.042028>

149. Shedge V., Arrieta-Montiel M., Christensen A.C., Mackenzie S.A. (2007) Plant mitochondrial recombination surveillance requires unusual RecA and MutS homologs. *Plant Cell*. **19**, 1251–1264. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048355>
150. Wu Z., Waneka G., Broz A.K., King C.R., Sloan D.B. (2020) MSH1 is required for maintenance of the low mutation rates in plant mitochondrial and plastid genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117**, 16448–16455. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001998117>
151. Ladoukakis E.D., Zouros E. (2001) Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 1168–1175. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003904>
152. Ramsey A.J., Mandel J.R. (2019) When one genome is not enough: organellar heteroplasmy in plants. *Ann. Plant Rev. Online*. **2**(2). <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0616>
153. Aksyonova E., Sinyavskaya M., Danilenko N., Pershina L., Nakamura C., Davydenko O. (2005) Heteroplasmy and paternally oriented shift of the organellar DNA composition in barley–wheat hybrids during backcrosses with wheat parents. *Genome*. **48**, 761–769. <https://doi.org/10.1139/g05-049>
154. Khrapko K., Coller H.A., André P.C., Li X.C., Hanekamp J.S., Thilly W.G. (1997) Mitochondrial mutational spectra in human cells and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 13798–13803. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13798>
155. Garcia-Diaz A., Oya R., Sanchez A., Luque F. (2003) Effect of prolonged vegetative reproduction of olive tree cultivars (*Olea europaea* L.) in mitochondrial homoplasmy and heteroplasmy. *Genome*. **46**, 377–381. <https://doi.org/10.1139/g03-017>
156. Li X.Q., Chetrit P., Mathieu C., Vedel F., De Paepe R., Remy R., Ambard-Bretteville F. (1988) Regeneration of cytoplasmic male-sterile protoclones of *Nicotiana sylvestris* with mitochondrial variations. *Curr. Genet.* **13**, 261–266. <https://doi.org/10.1007/BF00387773>
157. Pla M., Mathieu C., De Paepe R., Chetrit P., Vedel F. (1995) Deletion of the last two exons of the mitochondrial *nad7* gene results in lack of the NAD7 polypeptide in a *Nicotiana sylvestris* CMS mutant. *Mol. Gen. Genet.* **248**, 79–88. <https://doi.org/10.1007/BF02456616>
158. Guo Y., Li C., Sheng Q., Winther J.F., Cai Q., Boice J.D., Shyr Y. (2013) Very low-level heteroplasmy mtDNA variations are inherited in humans. *J. Genet. Genomics*. **40**, 607–615. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.10.003>
159. Stewart J.B. Chinnery P.F. (2015) The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 530–542. <https://doi.org/10.1038/nrg3966>
160. Zhang Y., Wang C., Jin Y., Yang Q., Meng Q., Liu Q., Dai Y., Cai L., Liu Z., Liu K., Sun H. (2018) Activating the PGC-1 α /TERT pathway by Catalpol ameliorates atherosclerosis via modulating ROS production, DNA damage, and telomere function: implications on mitochondria and telomere link. *Oxidat. Med. Cell. Longevity*. 2018, **2876350**. <https://doi.org/10.1155/2018/2876350>
161. Sekiguchi K., Imaizumi K., Matsuda H., Mizuno N., Yoshida K., Senju H., Sato H., Kasai K. (2003) MtDNA sequence analysis using capillary electrophoresis and its application to the analysis of mtDNA in hair. *Japanese Journal of Science and Technology for Identification*. **7**, 123–130. <https://doi.org/10.3408/jasti.7.123>
162. Wilton P.R., Zaidi A., Makova K., Nielsen R. (2018) A population phylogenetic view of mitochondrial heteroplasmy. *Genetics*. **208**, 1261–1274. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300711>
163. Jenuth J.P., Peterson A.C., Fu K., Shoubridge E.A. (1996) Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* **14**, 146–151. <https://doi.org/10.1038/ng1096-146>
164. Chinnery P.F. (2002) Modulating heteroplasmy. *Trends Genet.* **18**, 173–176. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(01\)02636-1](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(01)02636-1)
165. Johnston I.G. (2019b) Varied mechanisms and models for the varying mitochondrial bottleneck. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 294. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00294>
166. Johnston I.G., Jones N.S. (2016) Evolution of cell-to-cell variability in stochastic, controlled, heteroplasmic mtDNA populations. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 1150–1162. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.09.016>
167. Galtier N. (2011) The intriguing evolutionary dynamics of plant mitochondrial DNA. *BMC Biol.* **9**, 61. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-61>
168. Kuroiwa H., Kuroiwa T. (1992) Giant mitochondria in the mature egg cell of *Pelargonium zonale*. *Protoplasma*. **168**, 184–188. <https://doi.org/1007/BF01666264>
169. Kanazawa A., Tsutsumi N., Hirai A. (1994) Reversible changes in the composition of the population of mtDNAs during dedifferentiation and regeneration in tobacco. *Genetics*. **138**, 865–870. <https://doi.org/10.1093/genetics/138.3.865>
170. Arrieta-Montiel M., Lyznik A., Woloszynska M., Janska H., Tohme J., Mackenzie S. (2001) Tracing evolutionary and developmental implications of mitochondrial stoichiometric shifting in the common bean. *Genetics*. **158**, 851–864. <https://doi.org/10.1093/genetics/158.2.851>
171. Albert B., Lelandais C., Pla M., Leuret C., Vitart V., Mathieu C., Sihachakr D., Godelle B., de Paepe R. (2003) Amplification of *Nicotiana sylvestris* mitochondrial subgenomes is under nuclear control and is associated with phenotypic changes. *Genetica*. **117**, 17–25. <https://doi.org/10.1023/a:1022356330794>
172. Suzuki T., Kawano S., Sakai A., Hirai A., Kuroiwa T. (1996) Variability of mitochondrial subgenomic molecules in the meristematic cells of higher plants. *Genes Genet. Syst.* **71**, 329–333. <https://doi.org/10.1266/ggs.71.329>
173. Velappan Y., Signorelli S., Considine M.J. (2017) Cell cycle arrest in plants: what distinguishes quiescence, dormancy and differentiated G1? *Ann. Bot.* **120**, 495–

509.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcx082>
174. Chinnery P.F., Turnbull D.M. (1999) Mitochondrial DNA and disease. *Lancet*. **354**, S17–S21.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)90244-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)90244-1)
175. Taylor R.W. (2005) Gene therapy for the treatment of mitochondrial DNA disorder. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **5**, 183–194.
<https://doi.org/10.1517/14712598.5.2.183>
176. Trifunovic A., Larsson N.-G. (2008) Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *J. Intern. Med.* **263**, 167–178.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01905.x>
177. Wallace D.C. (2010) Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ. Mol. Mutagen.* **51**, 440–450.
<https://doi.org/10.1002/em.20586>
178. Li M., Schönberg A., Schaefer M., Schroeder R., Nasidze I., Stoneking M. (2010) Detecting heteroplasmy from high-throughput sequencing of complete human mitochondrial DNA genomes. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 237–249.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.07.014>
179. Li M., Rothwell R., Vermaat M., Wachsmuth M., Schröder R., Laros J.F.J., van Oven M., de Bakker P.I.W., Bovenberg J.A., van Duijn C.M., van Ommen G.-J., Slagboom P.E., Swertz M.A., Wijmenga C., Kayser M., Boomsma D.I., Zöllner S., de Knijff P., Stoneking M. (2016) Transmission of human mtDNA heteroplasmy in the genome of the Netherlands families: support for a variable-size bottleneck. *Genome Res.* **26**, 417–426.
<https://doi.org/10.1101/gr.203216.115>
180. Rebolledo-Jaramillo B., Su M.S.-W., Stoler N., McElhoo J.A., Dickens B., Blankenberg D., Korneliusson T.S., Chiaromonte F., Nielsen R., Holland M.M., Paul I.M., Nekrutenko A., Makova K.D. (2014) Maternal age effect and severe germ-line bottleneck in the inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, 15474–15479.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1409328111>
181. Gu J., Miles D., Newton K.J. (1993) Analysis of leaf sectors in the NCS6 mitochondrial mutant of maize. *Plant Cell*. **5**, 963–971.
<https://doi.org/10.1105/tpc.5.8.963>
182. Sakamoto W., Kondo H., Murata M., Motoyoshi F. (1996) Altered mitochondrial gene expression in a maternal distorted leaf mutant of Arabidopsis induced by chloroplast mutator. *Plant Cell*. **8**, 1377–1390.
<https://doi.org/10.1105/tpc.8.8.1377>
183. Bellaoui M., Martin-Canadell A., Pelletier G., Budar F. (1998) Lowcopy-number molecules are produced by recombination, actively maintained and can be amplified in the mitochondrial genome of *Brassicaceae*: relationship to reversion of the male sterile phenotype in some cybrids. *Mol. Gen. Genet.* **257**, 177–185.
<https://doi.org/10.1007/s004380050637>
184. Vitart V., De Paepe R., Mathieu C., Chetrit P., Vedel F. (1992) Amplification of substoichiometric recombinant mitochondrial DNA sequences in a nuclear, male sterile mutant regenerated from protoplast culture in *Nicotiana glauca*. *Mol. Gen. Genet.* **233**, 193–200.
<https://doi.org/10.1007/BF00587579>
185. Hartmann C., Recipon H., Jubier M.F., Valon C., Delcher-Besin E., Henry Y., De Buyser J., Lejeune B., Rode A. (1994) Mitochondrial DNA variability detected in a single wheat regenerant involves a rare recombination event across a short repeat. *Curr. Genet.* **25**, 456–464.
<https://doi.org/10.1007/BF00351786>
186. Taylor D.R., Olson M.S., McCauley D.E. (2001) A quantitative genetic analysis of nuclear-cytoplasmic male sterility in structured populations of *Silene vulgaris*. *Genetics*. **158**, 833–841.
<https://doi.org/10.1093/genetics/158.2.833>
187. Welch M.E., Darnell M.Z., McCauley D.E. (2006) Variable populations within variable populations: quantifying mitochondrial heteroplasmy in natural populations of the gynodioecious plant *Silene vulgaris*. *Genetics*. **174**, 829–837.
<https://doi.org/10.1534/genetics.106.059246>
188. Frey J.E., Frey B., Forcioli D. (2005) Quantitative assessment of heteroplasmy levels in *Senecio vulgaris* chloroplast DNA. *Genetica*. **123**, 255–261.
<https://doi.org/10.1007/s10709-004-3711-y>
189. Pearl S.A., Welch M.E., McCauley D.E. (2009) Mitochondrial heteroplasmy and paternal leakage in natural populations of *Silene vulgaris*, a gynodioecious plant. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 537–545.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msn273>
190. Mandel J.R., McCauley D.E. (2015) Pervasive mitochondrial sequence heteroplasmy in natural populations of wild carrot, *Daucus carota* spp. *carota* L. *PLoS One*. **10**, e0136303.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136303>
191. Mishra P., Chan D.C. (2016) Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol.* **212**, 379–387.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201511036>
192. Jakobs S., Martini N., Schauss A.C., Egner A., Westermann B., Hell S.W. (2003) Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J. Cell Sci.* **116**, 2005–2014.
<https://doi.org/10.1242/jcs.00423>
193. Tondera D., Grandemange S., Jourdain A., Karbowski M., Mattenberger Y., Herzig S., Da Cruz S., Clerc P., Raschke I., Merkwirth C., Eheses S., Krause F., Chan D.C., Alexander C., Bauer C., Youle R., Langer T., Martinou J.-C. (2009) SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J.* **28**, 1589–1600.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2009.89>
194. Mitra K., Wunder C., Roysam B., Lin G., Lippincott-Schwartz J. (2009) A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 11960–11965.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0904875106>
195. Yao C.-H., Wang R., Wang Y., Kung C.-P., Weber J.D., Patti G.J. (2019) Mitochondrial fusion supports increased oxidative phosphorylation during cell proliferation. *Elife*. **8**, e41351.
<https://doi.org/10.7554/eLife.41351>
196. Ramonell K.M., Kuang A., Porterfield D.M., Crispi M.L., Xiao Y., McClure G., Musgrave M.E. (2001) Influence of atmospheric oxygen on leaf structure and starch deposition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*

- Environ.* **24**, 419–428.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00691.x>
197. May A.I., Devenish R.J., Prescott M. (2012) The many faces of mitochondrial autophagy: making sense of contrasting observations in recent research. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, 431684.
<https://doi.org/10.1155/2012/431684>
198. Popkov V.A., Plotnikov E.Y., Lyamzaev K.G., Silachev D.N., Zorova L.D., Pevzner I.B., Jankauskas S.S., Zorov S.D., Babenko V.A., Zorov D.B. (2015) Mitodiversity. *Biochemistry (Mosc.)*. **80**, 532–541.
<https://doi.org/10.1134/S000629791505003X>
199. Li F., Chung T., Vierstra R.D. (2014) Autophagy-related11 plays a critical role in general autophagy- and senescence-induced mitophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **26**, 788–807.
<https://doi.org/10.1105/tpc.113.120014>
200. Minibayeva F., Dmitrieva S., Ponomareva A., Ryabovol V. (2012) Oxidative stress-induced autophagy in plants: the role of mitochondria. *Plant Physiol. Biochem.* **59**, 11–19.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.02.013>
201. Wikstrom J.D., Katzman S.M., Mohamed H., Twig G., Graf S.A., Heart E., Molina A.J.A., Corkey B.E., Moitoso de Vargas L., Danial N.N., Collins S., Shirihai O.S. (2007) beta-Cell mitochondria exhibit membrane potential heterogeneity that can be altered by stimulatory or toxic fuel levels. *Diabetes*. **56**, 2569–2578.
<https://doi.org/10.2337/db06-0757>
202. Distelmaier F., Koopman W.J., Testa E.R., de Jong A.S., Swarts H.G., Mayatepe E., Smeitink J.A.M., Willems P.H.G. (2008) Life cell quantification of mitochondrial membrane potential at the single organelle level. *Cytometry A*. **73**, 29–38.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.20503>
203. Law S.R., Narsai R., Taylor N.L., Delannoy E., Carrie C., Giraud E., Millar A.H., Small I., Whelan J. (2012) Nucleotide and RNA metabolism prime translational initiation in the earliest events of mitochondrial biogenesis during *Arabidopsis* germination. *Plant Physiol.* **158**, 1610–1627.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.192351>
204. Konstantinov Y.M., Dietrich A., Weber-Lotfi F., Ibrahim N., Klimenko E.S., Tarasenko V.I., Bolotova T.A., Koulintchenko M.V. (2016) DNA import into mitochondria. *Biochemistry (Mosc.)*. **81**, 1044–1056.
<https://doi.org/10.1134/S0006297916100035>
205. Armstrong A.F., Logan D.C., Tobin A.K., O'Toole P., Atkin O.K. (2006) Heterogeneity of plant mitochondrial responses underpinning respiratory acclimation to the cold in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Cell Environ.* **29**, 940–949.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01475.x>
206. Tarasenko T.A., Klimenko E.S., Tarasenko V.I., Koulintchenko M.V., Dietrich A., Weber-Lotfi F., Konstantinov Y.M. (2021) Plant mitochondria import DNA via alternative membrane complexes involving various VDAC isoforms. *Mitochondrion*. **60**, 43–58.
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.07.006>
207. Wade M.J., McCauley D.E. (2005) Paternal leakage sustains the cytoplasmic polymorphism underlying gynodioecy but remains invisible by nuclear restorers. *Am. Nat.* **166**, 592–602.
<https://doi.org/10.1086/491660>
208. McCauley D.E. (2013) Paternal leakage, heteroplasmy, and the evolution of plant mitochondrial genomes. *New Phytol.* **200**, 966–977.
<https://doi.org/10.1111/nph.12431>
209. Christie J.R., Schaerf T.M., Beekman M. (2015) Selection against heteroplasmy explains the evolution of uniparental inheritance of mitochondria. *PLoS Genet.* **11**, e1005112.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005112>

MITOCHONDRIA POPULATION HETEROGENEITY IN PLANT CELLS AND OTHER ORGANISMS

T. A. Tarasenko¹, * and M. V. Koulintchenko¹

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch,
Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

*e-mail: bolotova_t.a@mail.ru

Mitochondria population of eukaryotic cells is heterogeneous. Heterogeneity of mitochondria can be defined as the variation of certain characteristics of mitochondria within the same or different cells. Differences between mitochondria can be attributed as non-genetic (structural-morphological and bioenergetic features) or genetic (differences in a copy number or sequence of mtDNA). Changes in the mtDNA sequence can be reflected in the phenomenon of heteroplasmy, i.e. coexistence in the cell/organism of various mitochondrial genotypes. The review considers the features of the organization and dynamics of the chondriome of plant cells in comparison with other taxonomic groups of organisms. Particular attention is paid to the reasons and mechanisms leading to mitochondrial heterogeneity, the phenomenon of heteroplasmy in plants and the possibility of functional specialization in mitochondria, as well as the role of these processes for the whole organism. Analysis of numerous data shows that the heterogeneous state of mitochondria in the cell appears, among other things, due to the species-specific features of the processes of mitochondrial dynamics, which are responsible for the homogeneity of the mitochondrial population.

Keywords: mitochondrial dynamics, mitochondrial heterogeneity, mitochondrial population, mitochondrial DNA, heteroplasmy, complementation, recombination

УДК 577.21

МикроРНК miR-375 КАК МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ РЕГУЛЯТОР СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

© 2022 г. Н. А. Матвеева^{a, b}, Н. М. Баулина^{a, b, 1}, И. С. Киселев^{a, b, 1},
Б. В. Титов^{a, b}, О. О. Фаворова^{a, b, *}

^aНациональный медицинский исследовательский центр кардиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 121552 Россия

^bРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997 Россия

*e-mail: olga_favorova@mail.ru

Поступила в редакцию 21.09.2021 г.

После доработки 12.10.2021 г.

Принята к публикации 12.10.2021 г.

МикроРНК miR-375 действует как многофункциональный регулятор активности многих физиологических и патологических клеточных процессов путем взаимодействия с большим числом генов-мишеней. Эта микроРНК вовлечена в регуляцию дифференцировки и функционирования клеток нервной и иммунной систем, костной и жировой ткани и даже жизненного цикла ряда вирусов. Изменения экспрессии miR-375 обнаружены при канцерогенезе, воспалении, аутоиммунных и сердечно-сосудистых заболеваниях. С каждым годом появляются новые исследования, расширяющие наше представление о круге процессов, регулируемых этой микроРНК. Согласно последним данным, miR-375 может быть использована в качестве биомаркера и терапевтической мишени при некоторых заболеваниях. В этом обзоре обсуждается роль miR-375 в функционировании сердечно-сосудистой системы в норме и при патологических состояниях.

Ключевые слова: микроРНК, miR-375, сердечно-сосудистая система, сердечно-сосудистые заболевания, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0026898422020100

ВВЕДЕНИЕ

МикроРНК – класс одноцепочечных некодирующих РНК длиной 21–23 н. Эти РНК регулируют экспрессию генов на транскрипционном и/или посттранскрипционном уровне за счет специфического связывания с 3'-нетранслируемой областью своих мРНК-мишеней, что приводит к последующей деградации этих мРНК и/или блокированию процесса их трансляции [1]. Опосредованная микроРНК регуляция экспрессии генов описана у животных, растений, зеленых водорослей и некоторых вирусов [2]. По данным последней версии miRBase (выпуск 22) всего у 271 вида найдено 48860 зрелых микроРНК, из них 2654 идентифицированы в организме человека [3]. Гены микроРНК обычно располагаются в межгенных областях или в интронах кодирующих и некодирующих генов; они транскрибируются в виде первичных транскриптов (при-микроРНК) и далее

подвергаются многоступенчатому биогенезу, при котором сначала процессируются в пре-микроРНК и, наконец, в зрелые микроРНК. Гены микроРНК могут транскрибироваться как поодиночке, так и в составе кластера в виде полицистронного транскрипта. Зрелые микроРНК содержат на 5'-конце затравочную область (область узнавания мишени длиной 6–8 н.), которая в первую очередь отвечает за связывание микроРНК с мРНК-мишенью [4]. МикроРНК на основании сходства последовательности их затравочных областей группируются в семейства [5].

Экспрессия отдельных микроРНК в зависимости от типа клеток и стадии эмбрионального и постэмбрионального развития варьирует от высокоспецифичной до повсеместной, причем различия в профилях микроРНК между клеточными линиями и тканями в основном обусловлены из-

¹ Эти авторы внесли равный вклад в подготовку статьи.

Сокращения: ВПС – врожденный порок сердца; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; ИМ – инфаркт миокарда; AUC – Area Under The ROC Curve (площадь под ROC-кривой); ХСН – хроническая сердечная недостаточность; LDHB – лактат-дегидрогеназа В.

менениями в экспрессии относительно небольшого числа микроРНК [6].

Для микроРНК характерна плейотропность (одна микроРНК может связываться со многими мРНК-мишенями) и вырожденность или избыточность (уровень одной мРНК может регулироваться многими микроРНК) [7]. Формируя сложную регуляторную сеть, молекулы микроРНК обеспечивают дополнительный контроль различных биологических процессов, таких как развитие и старение организма [8, 9], пролиферация и дифференцировка отдельных клеточных популяций [10, 11], апоптоз [12], иммунный ответ [13], проведение сигнала [14], метаболизм [15] и др. Показано участие отдельных микроРНК в развитии различных заболеваний [7, 16, 17], в том числе сердечно-сосудистых [18, 19].

Настоящий обзор посвящен роли одной из микроРНК – miR-375 – в развитии и функционировании сердечно-сосудистой системы в норме и при патологии. Согласно современным представлениям, miR-375, первоначально описанная как наиболее экспрессируемая в бета-клетках поджелудочной железы [20], действует как многофункциональный регулятор различных клеточных путей [21].

ГЕН *MIR375* И РЕГУЛЯЦИЯ ЕГО ЭКСПРЕССИИ

Ген *MIR375* человека, кодирующий микроРНК miR-375, расположен в межгенной области на хромосоме 2 [22]. Он локализован в области 2q35 между генами *CRYBA2* (Crystallin Beta A2) и *CFAP65* (Cilia- and flagella-associated protein 65, coiled-coil domain-containing protein 108) и транскрибируется с собственного промотора с помощью РНК-полимеразы II с образованием при-микроРНК (primary miRNA) pri-miR-375 (рис. 1). В результате гидролиза pri-miR-375 с помощью микропроцессорного комплекса, включающего РНКазу III Drosha и белок DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene), образуется предшественник микроРНК (precursor miRNA) pre-miR-375, который представляет собой шпильку длиной ~70 н., состоящую из двухцепочечного стебля и одноцепочечного участка со свободным 3'-концом. После транспорта pre-miR-375 в цитоплазму мультибелковый комплекс, включающий РНКазу III Dicer, вырезает петлевой участок pre-miR-375 с образованием дцРНК длиной 21–23 п.н., состоящей из зрелых miR-375-3p и miR-375-5p [23]. Далее в обзоре мы будем уточнять, какую из зрелых miR-375 изучали исследователи, если эта информация была предоставлена.

Перед геном *MIR375* расположена высоко консервативная область, содержащая ТАТА-бокс и три Е-бокса [24]. С ТАТА-боксом связывается РНК-

полимераза II, которая транскрибирует *MIR375*. С Е-боксами могут связываться факторы транскрипции, имеющие мотив спираль-петля-спираль, которые опосредуют инициацию транскрипции и регулируют экспрессию miR-375 (рис. 1).

Помимо транскрипционных факторов, на экспрессию miR-375 могут оказывать влияние эпигенетические факторы, в частности, метилирование ДНК. Найдены два CpG-островка (рис. 1), метилирование цитозинов в которых может регулировать экспрессию miR-375 у людей: первый (CpG-1) находится на 2000 п.н. выше гена и имеет размер примерно 700 п.н., а второй (CpG-2) охватывает примерно 850 п.н. и перекрывается с сайтом начала транскрипции. Оказалось, что активная транскрипция *MIR375* происходит при гиперметилировании первого сайта и гипометилировании второго [25].

В регуляторной области гена *MIR375* обнаружены консенсусные последовательности для связывания фактора транскрипции CTCF. Белок CTCF – многофункциональный транскрипционный фактор, содержащий II мотивов цинковых пальцев, может действовать и как активатор, и как репрессор транскрипции. Предполагают, что связывание CTCF с неметилированной ДНК в CpG-1 блокирует транскрипцию miR-375, в то время как метилирование этой области препятствует взаимодействию ДНК с CTCF и тем самым активирует транскрипцию [25].

При патологических состояниях наблюдаются изменения уровня экспрессии гена *MIR375* (в том числе активируется его эктопическая экспрессия), обусловленные, в основном, изменением метилирования его промотора или активностью кольцевых и других некодирующих РНК, выступающих в роли “микроРНК-губок” [21, 26].

Наиболее полно нарушение регуляции экспрессии miR-375 изучено при онкологических заболеваниях и при сахарном диабете. Исследование метилирования промотора гена miR-375, которое проводилось на различных клеточных линиях человека, включая гепатокарциному и меланому, показало, что статус метилирования отрицательно коррелирует с уровнем экспрессии miR-375. Нарушение метилирования промотора рассматривается как одна из причин снижения уровня miR-375, которое часто наблюдается при разных видах злокачественных опухолей [23]. В целом, опухолевые клетки человека имеют высокий уровень метилирования промотора гена miR-375 и, как следствие, низкий уровень miR-375 по сравнению с нормальными тканями.

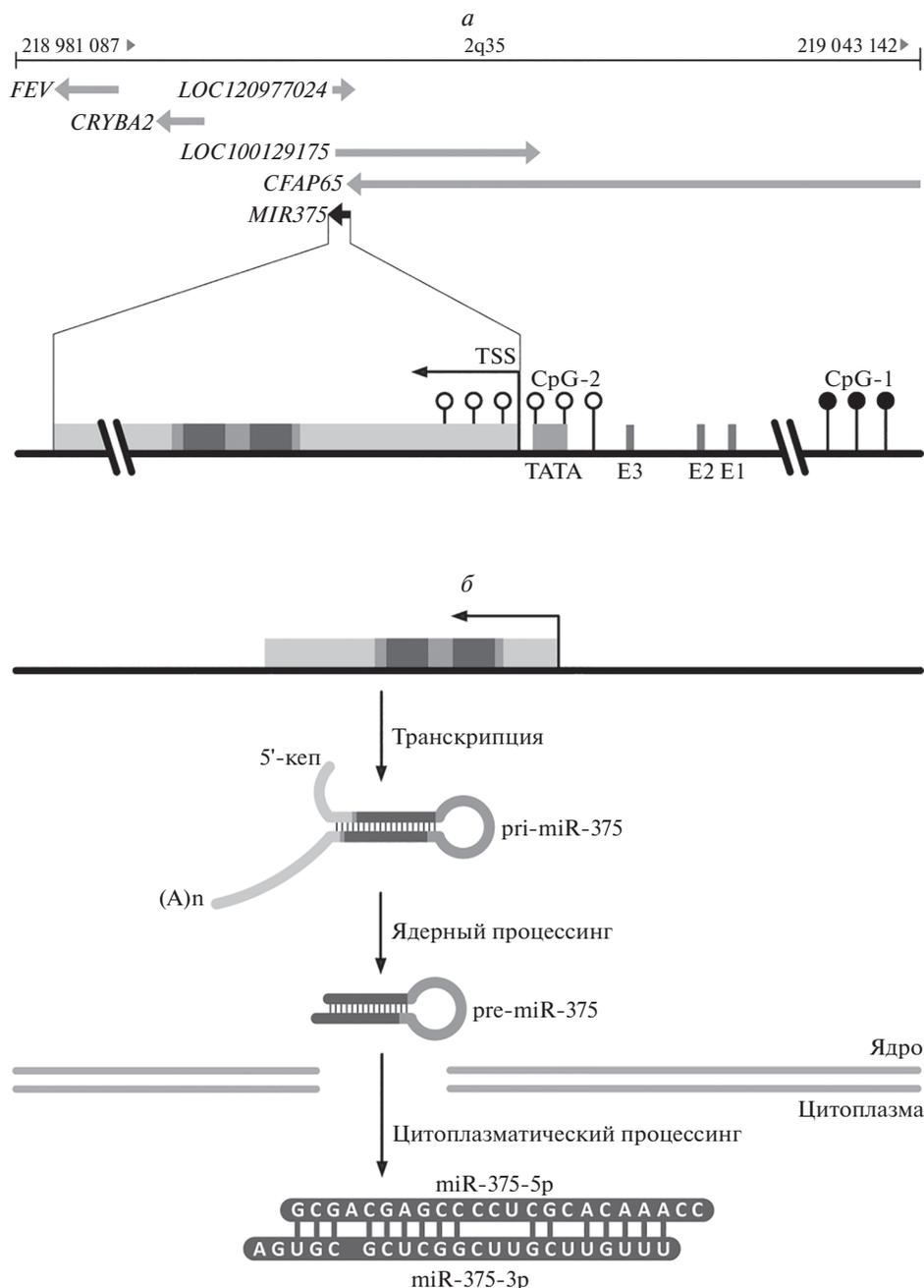


Рис. 1. Хромосомная локализация гена *MIR375* и биогенез зрелой микроРНК. *a* – Структура области гена *MIR375*. Ген *MIR375* располагается в локусе 2q35 (поблизости от генов *FEV*, *CRYBA2*, *LOC120977024*, *LOC100129175* и *CFAP65*) и транскрибируется с собственного промотора. На расстоянии 24 н. от точки начала транскрипции (transcription start site, TSS) располагаются ТАТА-боксы и три Е-боксы (Е1, Е2 и Е3). Показаны два CpG-островок; для поддержания активной экспрессии *MIR375* CpG-1 должен быть гиперметилирован, а CpG-2 – гипометилирован. *b* – Процессинг miR-375. После синтеза первичного транскрипта гена *MIR375* (pri-miR-375) происходит его ядерный процессинг с образованием микроРНК-предшественника (pre-miRNA-375) и транспорт последнего в цитоплазму, где образуются зрелые микроРНК (miR-375-3p и miR-375-5p).

МикроРНК miR-375 КАК РЕГУЛЯТОР СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

Опубликованные данные об участии miR-375 в физиологических процессах, происходящих в сердечно-сосудистой системе человека, весьма не-

многочисленны. В основном изучают возможность использования этой микроРНК в качестве биомаркера различных сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) или проводят эксперименты на животных или клеточных линиях.

Сао и соавт. показали, что miR-375 экспрессируется на высоком уровне в сердце мыши в эмбриогенезе [27], а нарушение экспрессии miR-375 ассоциировано с врожденным пороком сердца (ВПС). Так, значительное повышение уровня miR-375 по сравнению с контролем наблюдали в миокарде межжелудочковой перегородки у 22-недельных плодов с дефектом межжелудочковой перегородки [28]. Избыточная экспрессия miR-375 нарушала эмбриональное развитие сердца у рыб *Danio rerio*: выявлено снижение частоты сердечных сокращений, отек перикарда и аномальное образование сердечной петли [29].

Связанные с ВПС изменения в экспрессии miR-375 обнаружены у беременных: у женщин, носящих плод с ВПС, в сыворотке крови значительно повышен уровень miR-375-3p, наряду с miR-19b, miR-22 и miR-29c, что может быть использовано для пренатальной диагностики пороков сердца на 18–22 неделе беременности [30]. В работе [31] подтверждено повышение уровня miR-375 в сыворотке крови женщин, вынашивающих плод с ВПС, а также описан возможный механизм влияния miR-375 на кардиомиоциты при ВПС. Поскольку ВПС часто приводит к гипоксии миокарда, для изучения функциональной роли miR-375 использовали миобласты крысы H9c2, находящиеся в состоянии хронической гипоксии, которая индуцирует снижение жизнеспособности клеток H9c2, повышение скорости апоптоза и возрастание активности каспазы-3, что сопровождалось повышением уровня miR-375-3p. Сверхэкспрессия miR-375-3p способствовала индуцированному гипоксией апоптозу в клетках H9c2, тогда как нокдаун miR-375-3p препятствовал его развитию [31]. Обсуждается возможность оценки уровня miR-375-3p в материнской сыворотке в качестве потенциального биомаркера для пренатального выявления пороков сердца плода.

Существуют некоторые противоречия между результатами [31] и данными работы [32], опубликованной приблизительно в то же время и выполненной также на клетках H9c2. В ней утверждается, что повреждение клеток H9c2, вызванное гипоксией с последующей реоксигенацией, которое приводит к значительному увеличению скорости апоптоза и активности каспазы-3, напротив, сопровождается понижением уровня miR-375, а сверхэкспрессия miR-375 заметно снижает апоптоз и уровни каспазы-3 по сравнению с нормальными клетками. Авторы даже предлагают использовать при инфаркте миокарда (ИМ) miR-375-мимики (mimic-miR-375) – синтетические короткие двухцепочечные олигонуклеотиды, имитирующие предшественники микроРНК [32]. Возможным объяснением различий, полученных в цитированных работах, могут быть особенности гипоксического воздействия, применявшегося в этих исследованиях. В [31] анализировали

клетки в состоянии хронической гипоксии и наблюдали постепенное нарастание уровня miR-375 через 24, 48 и 72 ч после начала воздействия, а в [32] снижение уровня miR-375 детектировали после гипоксии в течение 24 ч с последующей реоксигенацией в течение 6 ч.

Показана также вовлеченность miR-375 в развитие заболеваний сердца, обусловленных атеросклерозом, к которым в первую очередь относят ишемическую болезнь сердца и ее наиболее тяжелую клиническую форму – острый ИМ. Как известно, ведущую роль в развитии атеросклероза играет воспаление, в котором принимают активное участие различные клетки иммунной системы [33]. Недавно на распространенной модели атеросклероза у мышей с дефицитом ApoE детально описали роль miR-375 в функционировании клеток иммунной системы [34]. Наблюдали повышенную экспрессию miR-375 в атеросклеротических бляшках в аорте, в макрофагах костного мозга и перитонеальных макрофагах, полученных от таких мышей. Ингибирование miR-375 значительно снижало образование пенистых клеток, что сопровождалось усиленной экспрессией генов, участвующих в оттоке холестерина, и снижением экспрессии генов, участвующих в притоке холестерина. Кроме того, подавление экспрессии miR-375 способствовало увеличению экспрессии маркеров противовоспалительных макрофагов M2 и снижению – провоспалительных макрофагов M1; сверхэкспрессия miR-375 приводила к противоположным результатам. В итоге снижение образования пенистых клеток и ослабление провоспалительного ответа макрофагов приводили к замедлению развития атеросклероза у мышей с дефицитом ApoE [34].

Значительный интерес представляют данные о том, что уровень циркулирующей miR-375 в плазме крови больных значимо понижается после ИМ, вследствие чего эта микроРНК может рассматриваться, наряду с рядом других микроРНК, в качестве маркера ИМ. Анализ уровней различных микроРНК в плазме периферической крови с использованием ДНК-микрочипа [35] или высокопроизводительного секвенирования [36] показал, что у больных ИМ с подъемом сегмента ST уровень miR-375 существенно снижается в течение суток после появления первых симптомов заболевания в сравнении со здоровыми индивидами. Эти результаты валидированы в обеих работах методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Спустя 5 дней после ИМ различия между уровнями циркулирующей miR-375 у больных и в контроле становились незначимыми [35]. Поскольку известны механизмы избирательного транспорта микроРНК из сосудистого русла в окружающие ткани путем эндцитоза экзосом и микровезикул [37, 38], предположили, что причиной снижения уровня miR-375

в плазме может быть ее активный импорт в клетки, участвующие в патогенезе ИМ [36]. Мы оценили диагностический потенциал снижения уровня miR-375 в плазме больных ИМ, используя величину площади под ROC-кривой (Area Under The ROC Curve, AUC), и показали высокую эффективность классификатора (AUC = 0.94) [32]. Уменьшение уровня miR-375 в плазме крови наблюдали также у больных системной красной волчанкой при развитии у них атеросклероза [39]. Не выявлено различий в уровне циркулирующей miR-375 у больных ИМ разного типа [40].

Данные об изменении уровня miR-375 в плазме крови при ишемии, полученные в экспериментах с модельными животными, не столь однозначны. Согласно [35], ни острая ишемия миокарда, ни острая ишемия задних конечностей у мышей не приводили к существенному изменению уровня miR-375 в плазме. Однако в работе [32] снижение уровня этой микроРНК наблюдали в плазме крови мышей с острым ИМ.

В отличие от плазмы крови, где уровень miR-375 при ИМ снижается, в тканях сердца он, напротив, повышается [41, 42]. Так, подавление экспрессии miR-375 с помощью анти-miR-375 при экспериментальном ИМ у мышей снижает воспалительную реакцию, уменьшает апоптоз кардиомиоцитов в ишемизированном миокарде и размер зоны инфаркта, улучшает функцию левого желудочка и реваскуляризацию [41]. Похожий эффект достигается и при трансплантации в зону ишемизированного миокарда стволовых клеток костного мозга (ВМРАС), в которых предварительно проведен *ex vivo* нокдаун гена miR-375 [42]. На моделях экспериментального ИМ *in vivo* и гипоксического повреждения желудочковых кардиомиоцитов новорожденных мышей *in vitro* показано, что подавление апоптоза после ИМ обусловлено связыванием miR-375 длинной некодирующей РНК LNC_000898 [26].

Четырехлетнее проспективное исследование, направленное на сравнение уровней циркулирующих микроРНК у больных острым коронарным синдромом и ишемическим инсультом, не выявило различий в уровне miR-375 и ее связи с последующими сердечно-сосудистыми событиями [43]. При атеросклерозе внутренних сонных артерий уровень miR-375 в сыворотке крови коррелировал с типом бляшки: в фиброзных бляшках он был выше, чем в богатых липидами, тромботических и кальцифицированных бляшках [44].

Многие заболевания сердца в конечном итоге приводят к хронической сердечной недостаточности (ХСН). Анализ *in silico* выявил, что miR-375 в числе других микроРНК ассоциирована с ремоделированием левого желудочка и прогрессированием ХСН после ИМ [45]. Показано, что циркулирующую miR-375 можно использовать для

дифференциальной диагностики форм ХСН с сохраненной и со сниженной фракцией выброса: ее уровень был ниже у больных со сниженной фракцией выброса, а наилучшие результаты для дифференциальной диагностики (AUC = 0.854) давала совместная оценка уровней натрийуретического пептида типа В и miR-328, -30с, -221 и -375 [46].

Исследование механизма действия miR-375 при ХСН проведено *in vivo* на мышинной модели сердечной недостаточности, вызванной доксорубицином, и *in vitro* на кардиомиоцитах крыс (H9c2) и кардиомиоцитах мышей, обработанных доксорубицином. Доксорубицин значительно усиливал экспрессию miR-375 *in vitro* и *in vivo*, а ингибирование miR-375 восстанавливало окислительно-восстановительный гомеостаз миокарда, предотвращало индуцированный доксорубицином окислительный стресс и апоптоз кардиомиоцитов [47].

Опубликованы единичные работы, в которых оценивали уровень miR-375 при других заболеваниях сердечно-сосудистой системы: фибрилляции предсердий [48], поражении миокарда при сепсисе [49], гипертрофии миокарда [50, 51] и др. Не выявлено изменений в уровне циркулирующей miR-375 при фибрилляции предсердий [48]. Уменьшение экспрессии miR-375-3р наблюдали в миокарде крыс с экспериментальным сепсисом, а повышение или понижение miR-375-3р уменьшало или усиливало повреждение миокарда соответственно [49].

Пилотное исследование на 10 животных выявило снижение уровня miR-375 в сыворотке крови собак с миксоматозной дегенерацией митрального клапана, приводящей к эксцентрической гипертрофии сердца, по сравнению с контрольной группой [51].

Гипертрофия сердца у крыс, вызванная поперечным сужением аорты, а также гипертрофия кардиомиоцитов *in vitro*, индуцированная ангиотензином II, приводили к увеличению экспрессии miR-375-3р. Нокдаун miR-375-3р уменьшал гипертрофию кардиомиоцитов, снижал уровни мРНК и белка тяжелой цепи β -миозина и натрийуретического пептида типа В, т.е. уменьшал проявления гипертрофии и вызванной ею сердечной недостаточности. Проведенное на тех же моделях параллельное определение уровня лактатдегидрогеназы В (LDHB) – одного из ключевых ферментов клеточного метаболизма – показало, что эффект LDHB противоположен эффекту miR-375. При этом наличие сайта связывания miR-375 в мРНК LDHB позволило предположить, что нокдаун miR-375-3р подавляет вызванную ангиотензином II гипертрофию кардиомиоцитов за счет увеличения экспрессии LDHB [50].

Несмотря на ограниченное число клинических исследований, можно констатировать, что miR-375 является перспективным биомаркером

различных ССЗ, особенно в сочетании с другими потенциальными маркерами. Как показывают эксперименты на модельных животных и клеточных линиях, представление о miR-375, как о новом многофункциональном регуляторе [21], полностью справедливо для сердечно-сосудистой системы в норме и при патологии.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ микроРНК miR-375 ПРИ ССЗ

МикроРНК miR-375, как и другие микроРНК, характеризуются плейотропностью: согласно miRTarBase – базе данных по экспериментально подтвержденным мишеням микроРНК [52], мишенями miR-375 служат более 450 различных генов. При этом опубликованные к настоящему моменту исследования в основном посвящены механизмам молекулярного действия miR-375 в контексте ее влияния на сигнальный каскад PI3K/PDK1/Akt1.

При экспериментальном ИМ у мышей введение анти-miR-375 нарушало связывание miR-375 с PDK1 и таким образом способствовало активации сигнального каскада PI3K/PDK1/Akt1. Это воздействие оказывало терапевтический эффект на клетки ишемизированного миокарда, снижая воспалительный ответ, подавляя апоптоз кардиомиоцитов и улучшая функции левого желудочка [41, 42]. С использованием доксорубициновой модели ХСН показано, что ингибирование miR-375 повышает активность PI3K/PDK1/Akt1, уменьшает повреждение миокарда и апоптоз кардиомиоцитов в первую очередь за счет нарушения связывания miR-375 с транскриптом гена *PDK1* [47].

Напротив, по данным [49], связывание miR-375 с глобальным регулятором транскрипции BRD4 приводит к активации пути PI3K/PDK1/Akt1 и уменьшению повреждений миокарда у крыс с сепсисом. Показано также, что miR-375 связывается с 3'-UTR мРНК фактора роста соединительной ткани *Stgf*, который способен активировать каскад PI3K/PDK1/Akt1; однако воздействие мимика miR-375 на клетки PC12 после ишемии/реперфузии усиливало экспрессию PI3K, Akt1 и p21, а также приводило к усилению миграции и пролиферации клеток [53]. Эти данные свидетельствуют о сложности регуляторных воздействий miR-375, нарушение равновесия между которыми в разных условиях приводит к разнонаправленному влиянию на сигнальный каскад PI3K/PDK1/Akt1. Можно предположить, что такое разнонаправленное действие miR-375 определяется ее плейотропностью, поскольку многие из ее многочисленных генов-мишеней участвуют в антагонистичных процессах.

В последние годы для поиска ключевых генов-мишеней микроРНК все чаще применяется биоинформатический анализ, что позволяет выде-

лить среди всего множества мишеней те, которые могут иметь наибольшее функциональное значение при тех или иных физиологических или патологических состояниях.

С целью поиска генов, преимущественно вовлеченных в развитие ССЗ, в исследовании [36] из числа всех экспериментально подтвержденных генов-мишеней miR-375 выбраны те, связь которых с ССЗ, согласно базе данных DisGenNet [54], показана в двух или более работах. Таких генов оказалось 21: *ADIPOR2*, *BCL2*, *CASP3*, *CDKN2B*, *CTGF*, *F3*, *HSP90AA1*, *IGF1R*, *IGFBP3*, *INSIG2*, *ITGB1*, *MYC*, *NPPB*, *PARP1*, *PIK3CA*, *PROCR*, *PTPN1*, *SGMS2*, *TNNI3*, *TP53*, *YWHAZ* (рис. 2). Одним из двух центральных элементов в сети взаимодействий этих генов ожидаемо был ключевой участник сигнального каскада PI3K/PDK1/Akt1 – ген *PIK3CA*. Вторым таким геном оказался *TP53*, который кодирует белок-онкосупрессор p53.

Появление открытых наборов данных о совокупности транскриптов (транскриптомном профиле) ткани сердца, полученных с использованием высокопроизводительных методов, позволило применить похожий подход для поиска генов-мишеней miR-375, экспрессия которых специфична для миокарда. Гены-мишени miR-375, экспрессирующиеся в сердечной мышце, были отобраны с использованием баз данных The Human Protein Atlas [55], miRTarBase [52] и STRING [56]. Ключевыми звеньями сети их взаимодействий, помимо *PIK3CA*, уже идентифицированного ранее [36], оказались гены *RHOA*, *MAPK3*, *PAFAN1B1*, *CTNNA1*, *MYC*, *PRKCA*, *ERBB2* и *CDC42*. Анализ перепредставленности этих генов в известных сигнальных путях показал, что основная функция miR-375 в сердечной мышце может состоять в регуляции сигнальных путей, зависимых от Rho-GTPаз [57].

В ряде экспериментальных работ обнаружено, что ключевыми генами-мишенями miR-375 в сердечно-сосудистой системе могут служить гены сигнального пути Notch, очень важного для развития аортального клапана, желудочков, атриоventрикулярного канала и других структур сердца. Повышенная экспрессия miR-375-3p приводила к апоптозу, ингибированию пролиферации и дифференцировки клеток линии P19 в кардиомиоциты *in vitro* через сигнальный путь Notch [28]. В эндотелиальных клетках микрососудов легких (PMEC, Pulmonary Microvascular Endothelial Cells) miR-375-3p подавляла экспрессию *Notch1* [58]. У *D. rerio* избыточная экспрессия miR-375 приводила к подавлению многих генов, в том числе *notch2*, и нарушала эмбриональное развитие сердца [29].

В единичных работах обнаружено влияние miR-375 и на другие сигнальные пути. Согласно [31], в клетках H9c2 miR-375-3p подавляет экспрессию фактора транскрипции FOXP1, который

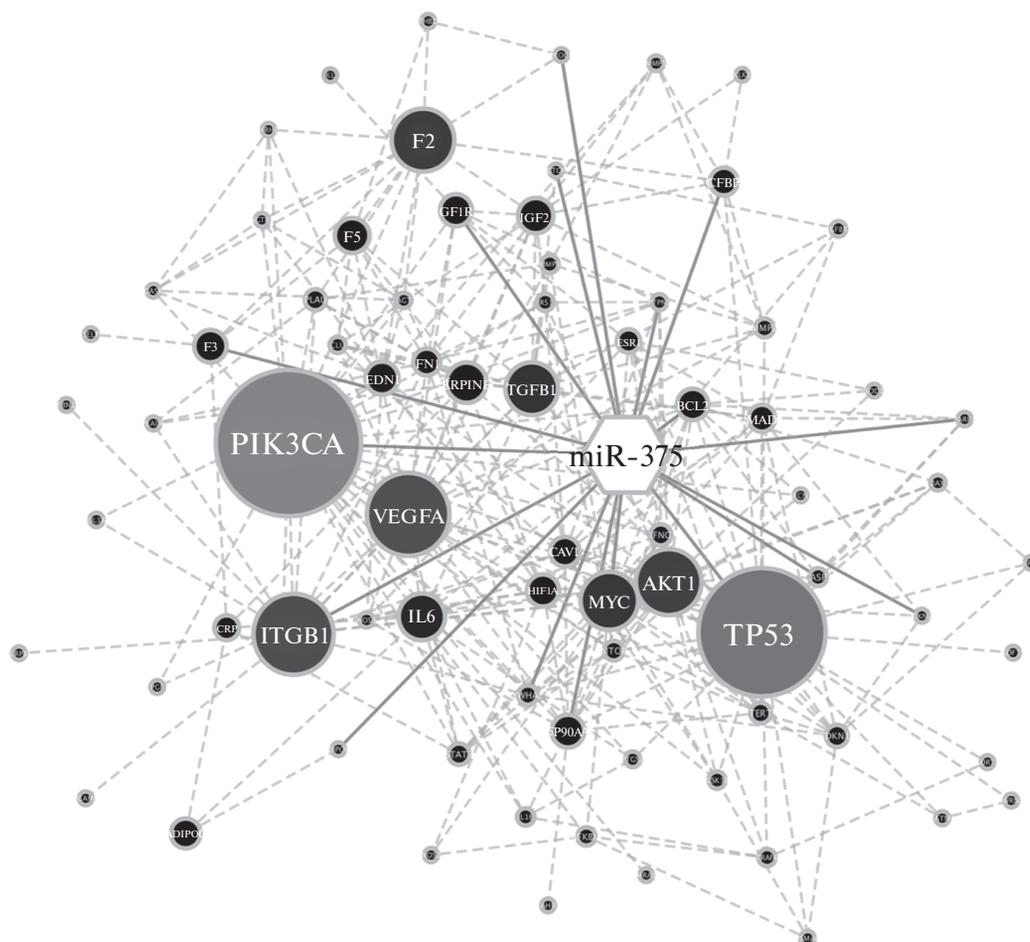


Рис. 2. Сеть взаимодействий miR-375 (шестиугольник) и ее генов-мишеней, вовлеченных в развитие ССЗ (кружки). Сплошными линиями обозначены взаимодействия miR-375 с ее генами-мишенями, пунктирными – взаимодействия между мишенями. Возрастание размеров и градиент цвета кружков от черного к серому показывают увеличение параметра центральности генов-мишеней в сети их взаимодействия [36].

участвует в морфогенезе сердца, мозга и легких, и Bcl2-подобного антиапоптотического белка. В тех же клетках, трансфицированных miR-375-мишником, значительно увеличивалась экспрессия мРНК протеинкиназы NLK и самого фермента, входящего в семейство митоген-активируемых протеинкиназ и участвующего в регуляции пролиферации и дифференцировки кардиомиоцитов [32]. В клетках иммунной системы мышей с дефицитом ApoE нокаун miR-375 стимулировал экспрессию фактора транскрипции KLF4, который участвует в поляризации макрофагов и способствует их переходу к M2-фенотипу [34]. Важно отметить, что выраженность регуляторных эффектов микроРНК на их гены-мишени может зависеть не только от уровня экспрессии самих микроРНК, но и от наличия в мРНК-мишенях полиморфных вариантов в области их связывания с микроРНК. Так, при изучении 10 полиморфных вариантов генов, связанных с кардио-метаболическими фенотипами, показано [59],

что полиморфизмы, расположенные в сайтах посадки микроРНК, могут влиять на взаимодействие микроРНК с мРНК-мишенью. В частности, это показано для полиморфизма rs11735092, расположенного в сайте посадки miR-375 в гене *HSD17B13* (Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 13). Этот ген участвует в регуляции гомеостаза липидов печени, и носительство аллеля rs11735092*С препятствует микроРНК-зависимой регуляции экспрессии и способствует липогенезу [59].

В целом, полученные к настоящему моменту экспериментальные данные свидетельствуют о том, что основные молекулярные эффекты miR-375 при ССЗ связаны в первую очередь с регуляцией экспрессии ряда важнейших компонентов сигнальных каскадов PI3K/PDK1/Akt1 и Notch, а результаты анализа *in silico* указывают на вовлечение этой микроРНК еще и в тесно связанные с этими каскадами p53- и Rho-зависимые сигнальные пути, участвующие в поддержании равнове-

сия между смертью и выживанием клетки. Все это делает miR-375 важным участником процессов, связанных с ответом клетки на гипоксические воздействия и воспалительные реакции, занимающие центральное положение в патогенезе многих распространенных ССЗ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-015-00123).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jonas S., Izaurralde E. (2015) Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 421–433.
- Kamanu T.K.K., Radovanovic A., Archer J.A.C., Bajic V.B. (2013) Exploration of miRNA families for hypotheses generation. *Sci. Rep.* **3**, 2940.
- Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucl. Acids Res.* **47**, D155–162.
- Bartel D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* **136**, 215–233.
- Lim L.P., Lau N.C., Weinstein E.G., Abdelhakim A., Yekta S., Rhoades M.W., Burge C.B., Bartel D.P. (2003) The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* **17**, 991–1008.
- Landgraf P., Rusu M., Sheridan R., Sewer A., Iovino N., Aravin A., Pfeffer S., Rice A., Kamphorst A.O., Landthaler M., Lin C., Soccia N.D., Hermida L., Fulci V., Chiaretti S., Foà R., Schliwka J., Fuchs U., Novosel A., Müller R.U., Schermer B., Bissels U., Inman J., Phan Q., Chien M., Weir D.B., Choksi R., De Vita G., Frezzetti D., Trompeter H.I., Hornung V., Teng G., Hartmann G., Palkovits M., Di Lauro R., Wernet P., Macino G., Rogler C.E., Nagle J.W., Ju J., Papavasiliou F.N., Benzinger T., Lichter P., Tam W., Brownstein M.J., Bosio A., Borkhardt A., Russo J.J., Sander C., Zavolan M., Tuschl T. (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell.* **129**, 1401–1414.
- Baulina N.M., Kulakova O.G., Favorova O.O. (2016) MicroRNAs: the role in autoimmune inflammation. *Acta Naturae.* **8**, 21–33.
- Ivey K.N., Srivastava D. (2015) microRNAs as developmental regulators. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a008144.
- Smith-Vikos T., Slack F.J. (2012) MicroRNAs and their roles in aging. *J. Cell Sci.* **125**, 7–17.
- Hwang H.-W., Mendell J.T. (2006) MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br. J. Cancer.* **94**, 776–780.
- Song L., Tuan R.S. (2006) MicroRNAs and cell differentiation in mammalian development. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **78**, 140–149.
- Subramanian S., Steer C.J. (2010) MicroRNAs as gatekeepers of apoptosis. *J. Cell. Physiol.* **223**, 289–298.
- Momen-Heravi F., Bala S. (2018) miRNA regulation of innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* **103**, 1205–1217.
- Inui M., Martello G., Piccolo S. (2010) MicroRNA control of signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 252–263.
- Vienberg S., Geiger J., Madsen S., Dalgaard L.T. (2017) MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* **219**, 346–361.
- Peng Y., Croce C.M. (2016) The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **1**, 15004.
- Viswambharan V., Thanseem I., Vasu M.M., Poovathinal S.A., Anitha A. (2017) miRNAs as biomarkers of neurodegenerative disorders. *Biomark. Med.* **11**, 151–167.
- Zhou S.S., Jin J.P., Wang J.Q., Zhang Z.G., Freedman J.H., Zheng Y., Cai L. (2018) miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacol. Sin.* **39**, 1073–1084.
- Khudiakov A.A., Panshin D.D., Fomicheva Y.V., Knyazeva A.A., Simonova K.A., Lebedev D.S., Михайлов Е.Н., Kostareva A.A. (2021) Different expressions of pericardial fluid microRNAs in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and ischemic heart disease undergoing ventricular tachycardia ablation. *Front. Cardiovasc. Med.* **8**, 647812.
- Poy M.N., Eliasson L., Krutzfeldt J., Kuwajima S., Ma X., Macdonald P.E., Pfeffer S., Tuschl T., Rajewsky N., Rorsman P., Stoffel M. (2004) A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature.* **432**, 226–230.
- Liu Y., Wang Q., Wen J., Wu Y., Man C. (2021) MiR-375: a novel multifunctional regulator. *Life Sci.* **275**, 119323.
- Baroukh N.N., Van Obberghen E. (2009) Function of microRNA-375 and microRNA-124a in pancreas and brain. *FEBS J.* **276**, 6509–6521.
- Yan J.-W., Lin J.-S., He X.-X. (2014) The emerging role of miR-375 in cancer: the emerging role of miR-375 in cancer. *Int. J. Cancer.* **135**, 1011–1018.
- Avnit-Sagi T., Kantorovich L., Kredon-Russo S., Hornstein E., Walker M.D. (2009) The promoter of the pri-miR-375 gene directs expression selectively to the endocrine pancreas. *PLoS One.* **4**, e5033.
- de Souza Rocha Simonini P., Breiling A., Gupta N., Malekpour M., Youns M., Omranipour R., Malekpour F., Volinia S., Croce C.M., Najmabadi H., Diederichs S., Sahin O., Mayer D., Lyko F., Hoheisel J.D., Riazalhosseini Y. (2010) Epigenetically deregulated microRNA-375 is involved in a positive feedback loop with estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Cancer Res.* **70**, 9175–9184.
- Yan M., Liu Q., Jiang Y., Wang B., Ji Y., Liu H., Xie Y. (2020) Long noncoding RNA LNC_000898 alleviates cardiomyocyte apoptosis and promotes cardiac repair after myocardial infarction through modulating the miR-375/PDK1 axis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **76**, 77–85.
- Cao L., Kong L.P., Yu Z.B., Han S.P., Bai Y.F., Zhu J., Hu X., Zhu C., Zhu S., Guo X.R. (2012) microRNA

- expression profiling of the developing mouse heart. *Int. J. Mol. Med.* **30**, 1095–1104.
28. Wang L., Song G., Liu M., Chen B., Chen Y., Shen Y., Zhu J., Zhou X. (2016) MicroRNA-375 overexpression influences P19 cell proliferation, apoptosis and differentiation through the Notch signaling pathway. *Int. J. Mol. Med.* **37**, 47–55.
 29. Zhuang S., Fu Y., Li J., Li M., Hu X., Zhu J., Tong M. (2020) MicroRNA-375 overexpression disrupts cardiac development of zebrafish (*Danio rerio*) by targeting Notch2. *Protoplasma.* **257**, 1309–1318.
 30. Zhu S., Cao L., Zhu J., Kong L., Jin J., Qian L., Zhu C., Hu X., Li M., Guo X., Han S., Yu Z. (2013) Identification of maternal serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for prenatal detection of fetal congenital heart defects. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **424**, 66–72.
 31. Li Y., Li X., Wang L., Han N., Yin G. (2021) miR-375-3p contributes to hypoxia-induced apoptosis by targeting forkhead box P1 (FOXP1) and Bcl2 like protein 2 (Bcl2l2) in rat cardiomyocyte h9c2 cells. *Biotechnol. Lett.* **43**, 353–367.
 32. Ali Sheikh M.S. (2020) Overexpression of miR-375 protects cardiomyocyte injury following hypoxic-reoxygenation injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, 7164069.
 33. Libby P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* **420**, 868–874.
 34. Qiu Y., Xu J., Yang L., Zhao G., Ding J., Chen Q., Zhang N., Yang R., Wang J., Li S., Zhang L. (2021) MiR-375 silencing attenuates pro-inflammatory macrophage response and foam cell formation by targeting KLF4. *Exp. Cell Res.* **400**, 112507.
 35. D'Alessandra Y., Devanna P., Limana F., Straino S., Di Carlo A., Brambilla P.G., Rubino M., Carena M.C., Spazzafumo L., De Simone M., Micheli B., Biglioli P., Achilli F., Martelli F., Maggolini S., Marenzi G., Pompilio G., Capogrossi M.C. (2010) Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **31**, 2765–2773.
 36. Baulina N., Osmak G., Kiselev I., Matveeva N., Kukaeva N., Shakhnovich R., Kulakova O., Favorova O. (2018) NGS-identified circulating miR-375 as a potential regulating component of myocardial infarction associated network. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **121**, 173–179.
 37. Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–659.
 38. Xu D., Tahara H. (2013) The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 368–375.
 39. Kay S.D., Carlsen A.L., Voss A., Burton M., Diederichsen A., Poulsen M.K., Heegaard N. (2019) Associations of circulating cell-free microRNA with vasculopathy and vascular events in systemic lupus erythematosus patients. *Scand. J. Rheumatol.* **48**, 32–41.
 40. Gacoń J., Kabłak-Ziembicka A., Stępień E., Enguita F.J., Karch I., Derlaga B., Żmudka K., Przewłocki T. (2016) Decision-making microRNAs (miR-124, -133a/b, -34a and -134) in patients with occluded target vessel in acute coronary syndrome. *Kardiol. Pol.* **74**, 280–288.
 41. Garikipati V.N.S., Verma S.K., Jolardarashi D., Cheng Z., Ibeti J., Cimini M., Tang Y., Khan M., Yue Y., Benedict C., Nickoloff E., Truongcao M.M., Gao E., Krishnamurthy P., Goukassian D.A., Koch W.J., Kishore R. (2017) Therapeutic inhibition of miR-375 attenuates post-myocardial infarction inflammatory response and left ventricular dysfunction via PDK-1-AKT signalling axis. *Cardiovasc. Res.* **113**, 938–949.
 42. Garikipati V.N.S., Krishnamurthy P., Verma S.K., Khan M., Abramova T., Mackie A.R., Qin G., Benedict C., Nickoloff E., Johnson J., Gao E., Losordo D.W., Houser S.R., Koch W.J., Kishore R. (2015) Negative regulation of miR-375 by interleukin-10 enhances bone marrow-derived progenitor cell-mediated myocardial repair and function after myocardial infarction. *Stem Cells Dayt. Ohio.* **33**, 3519–3529.
 43. Gacoń J., Badacz R., Stępień E., Karch I., Enguita F.J., Żmudka K., Przewłocki T., Kabłak-Ziembicka A. (2018) Diagnostic and prognostic micro-RNAs in ischaemic stroke due to carotid artery stenosis and in acute coronary syndrome: a four-year prospective study. *Kardiol. Pol.* **76**, 362–369.
 44. Badacz R., Przewłocki T., Gacoń J., Stępień E., Enguita F.J., Karch I., Żmudka K., Kabłak-Ziembicka A. (2018) Circulating miRNA levels differ with respect to carotid plaque characteristics and symptom occurrence in patients with carotid artery stenosis and provide information on future cardiovascular events. *Postepy W Kardiologii Interwencyjnej Adv. Interv. Cardiol.* **14**, 75–84.
 45. Charrier H., Cuvellez M., Dubois-Deruy E., Mulder P., Richard V., Bauters C., Pinet F. (2019) Integrative system biology analyses identify seven microRNAs to predict heart failure. *Non-Coding RNA.* **5**, E22.
 46. Watson C.J., Gupta S.K., O'Connell E., Thum S., Glezeva N., Fendrich J., Gallagher J., Ledwidge M., Grote-Levi L., McDonald K., Thum T. (2015) MicroRNA signatures differentiate preserved from reduced ejection fraction heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **17**, 405–415.
 47. Zhang H., Tian Y., Liang D., Fu Q., Jia L., Wu D., Zhu X. (2020) The effects of inhibition of microRNA-375 in a mouse model of doxorubicin-induced cardiac toxicity. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **26**, e920557.
 48. Zhelankin A.V., Vasiliev S.V., Stonogina D.A., Babalyan K.A., Sharova E.I., Doludin Y.V., Shchekochikhin D.Y., Generozov E.V., Akselrod A.S. (2020) Elevated plasma levels of circulating extracellular miR-320a-3p in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, E3485.
 49. Hong X., Wang J., Li S., Zhao Z., Feng Z. (2021) MicroRNA-375-3p in endothelial progenitor cells-derived extracellular vesicles relieves myocardial injury in septic rats via BRD4-mediated PI3K/AKT signaling pathway. *Int. Immunopharmacol.* **96**, 107740.
 50. Feng H., Wu J., Chen P., Wang J., Deng Y., Zhu G., Xian J., Huang L., Ouyang W. (2019) MicroRNA-375-3p inhibitor suppresses angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy by promoting lactate dehydrogenase B expression. *J. Cell. Physiol.* **234**, 14198–14209.
 51. Ro W.-B., Kang M.-H., Song D.-W., Lee S.-H., Park H.-M. (2021) Expression profile of circulating

- MicroRNAs in dogs with cardiac hypertrophy: a pilot study. *Front. Vet. Sci.* **8**, 652224.
52. <http://mirtarbase.cuhk.edu.cn/>
53. Ou J., Kou L., Liang L., Tang C. (2017) MiR-375 attenuates injury of cerebral ischemia/reperfusion via targeting Ctgf. *Biosci. Rep.* **37**, BSR20171242.
54. <https://www.disgenet.org/>
55. <https://www.proteinatlas.org/>
56. <https://string-db.org/>
57. Osmak G., Kiselev I., Baulina N., Favorova O. (2020) From miRNA target gene network to miRNA function: miR-375 might regulate apoptosis and actin dynamics in the heart muscle via Rho-GTPases-dependent pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, E9670.
58. An Y., Liu Z., Ding H., Lv Q., Fan H., Hou S., Cai W., Liu S. (2020) MiR-375-3p regulates rat pulmonary microvascular endothelial cell activity by targeting Notch1 during hypoxia. *J. Int. Med. Res.* **48**, 030006052092685.
59. Ghanbari M., Franco O.H., de Looper H.W.J., Hofman A., Erkeland S.J., Dehghan A. (2015). Genetic variations in microRNA-binding sites affect microRNA-mediated regulation of several genes associated with cardio-metabolic phenotypes. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **8**, 473–486.

MicroRNA miR-375 AS A MULTIFUNCTIONAL REGULATOR OF THE CARDIOVASCULAR SYSTEM

N. A. Matveeva^{1, 2}, N. M. Baulina^{1, 2}, I. S. Kiselev^{1, 2}, B. V. Titov^{1, 2}, and O. O. Favorova^{1, 2, *}

¹ National Medical Research Center for Cardiology, Moscow, 121552 Russia

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

*e-mail: olga_favorova@mail.ru

MicroRNA (miRNA) miR-375 acts as a multifunctional regulator of the activity of many physiological and pathological cellular processes by interacting with a large number of target genes. MiR-375 is involved in the regulation of the differentiation and functioning of cells of the nervous and immune systems, bone and adipose tissue, and even the life cycle of a number of viruses. Changes in miR-375 expression were found in carcinogenesis, inflammation, autoimmune and cardiovascular diseases. Every year, new studies appear that expand our understanding of the range of processes regulated by this miRNA. According to the latest data, miR-375 can be used as a biomarker and therapeutic target in some diseases. This review discusses the role of miR-375 in the functioning of the cardiovascular system in health and disease.

Keywords: miRNA, miR-375, cardiovascular system, cardiovascular diseases, gene expression

УДК 577.21

ВЫБОР ДОНОРНОЙ МОЛЕКУЛЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ ПО ГЕНОМНОМУ РЕДАКТИРОВАНИЮ В КЛЕТКАХ ЖИВОТНЫХ

© 2022 г. О. В. Володина^а, С. А. Смирнихина^а *^аМедико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

*e-mail: smirnikhinas@gmail.com

Поступила в редакцию 15.07.2021 г.

После доработки 08.10.2021 г.

Принята к публикации 12.11.2021 г.

Редактирование генома стало мощным инструментом изучения свойств генов или изменения нуклеотидной последовательности. За последние несколько десятилетий разработаны программируемые нуклеазы, которые могут вносить двухцепочечный разрыв в интересующий участок молекулы ДНК. Репарация ДНК после инициации двухцепочечного разрыва может пойти по пути негомологичного соединения концов (NHEJ), которое приводит к различным ошибкам и нокауту гена. Другие варианты репарации – направленная гомологичная репарация (HDR) или репарация с помощью одноцепочечной матрицы (SSTR) – позволяют вносить желаемые изменения в ген. В природе HDR происходит в присутствии донорной матрицы – сестринской хроматиды. При редактировании генома животных клеток эффективность HDR и SSTR значительно ниже, чем NHEJ. Чтобы искусственно повысить их эффективность, а также ввести донорную молекулу для нужного изменения геномной ДНК используют двухцепочечные ДНК, одноцепочечные олигонуклеотиды и длинные одноцепочечные ДНК. В данном обзоре рассмотрены донорные молекулы, которые используются для репарации двухцепочечных разрывов с помощью HDR или SSTR при редактировании генома, их применение и модификации, повышающие эффективность HDR и SSTR.

Ключевые слова: геномное редактирование, донорные молекулы, дцДНК, длинные дцДНК, олигонуклеотиды

DOI: 10.31857/S0026898422030168

ВВЕДЕНИЕ

Целевое редактирование генома стало мощным инструментом изучения свойств генов или изменения нуклеотидной последовательности. За последние несколько десятилетий разработаны программируемые нуклеазы – нуклеазы цинковых пальцев (ZFN) [1], мегануклеазы [2], эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN) [3], а также система, основанная на коротких палиндромных повторах, регулярно расположенных группами (CRISPR) и CRISPR-ассоциированных белках (Cas) [4], которые позволяют вносить двухцепочечный разрыв (ДЦР) в интересующую геномную последовательность [5].

Репарация молекулы ДНК, в которой возник ДЦР, может проходить несколькими путями, основные из которых – негомологичное соединение концов (NHEJ) и направленная гомологичная репарация (HDR) [6]. К более редкому механизму репарации ДЦР можно отнести отжиг одиночной цепи (SSA – single strand annealing), частным случаем которого является репарация с помощью одноцепочечной матрицы (SSTR).

При NHEJ часто возникают ошибки, представленные в основном короткими вставками и делециями (инделами). В многоэтапном процессе NHEJ участвуют белки, которые распознают, укорачивают и лигируют концы ДНК. После укорачивания образуются концы ДНК различной

Сокращения: ZFN (Zinc Finger Nuclease) – нуклеазы цинковых пальцев; TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) – эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции; CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; PAM (Protospacer Adjacent Motif) – мотив, прилежащий к протоспейсеру; a-NHEJ (alternative Non-Homologous End Joining) – альтернативное негомологичное соединение концов; доцДНК – длинная одноцепочечная ДНК; дцДНК – двухцепочечная ДНК; ДЦР – двухцепочечный разрыв; c-NHEJ (classic Non-Homologous End Joining) – каноническое негомологичное соединение концов; MMEJ (Microhomology-Mediated End Joining) – микрогомологичное соединение концов; HDR (Homology Directed Repair) – направленная гомологичная репарация; NHEJ (Non-Homologous End Joining) – негомологичное соединение концов; оцОДН – одноцепочечные олигонуклеотиды; SSTR (Single Strand Template Repair) – репарация с помощью одноцепочечной матрицы; SDSA (Synthesis-Dependent Strand Annealing) – синтеззависимый отжиг цепи.

конфигурации, а поврежденные концы цепи соединяются лигазой без использования молекулярных доноров. В результате исправленная ДНК часто содержит мутации [7]. В исследовательских целях путь NHEJ в сочетании с геномным редактированием можно использовать для направленного нокаута генов [8].

Оставшиеся два механизма – HDR и SSTR – менее ошибочны, однако требуют введения донорной молекулы, с которой должна произойти рекомбинация для репарации ДЦР [9, 10]. При этом эффективность HDR и SSTR при редактировании генома клеток животных ниже, чем NHEJ [11–13], однако только эти два механизма открывают возможность внесения в геном целенаправленных изменений, таких как вставка фрагмента или целого гена.

Низкая эффективность HDR и SSTR обусловлена несколькими факторами. Во-первых, HDR прямо конкурирует с путем репарации NHEJ. NHEJ активен на протяжении всего клеточного цикла, тогда как HDR ограничена лишь поздней фазой G2 и S клеточного цикла, когда происходит репликация ДНК перед делением клетки. HDR конкурирует также с еще одним механизмом репарации – микргомологичным соединением концов (MHEJ), активным в S (и ранней M) фазах [14]. Во-вторых, на HDR могут отрицательно влиять соматические или спорадические мутации в таких генах, как *RAD51*, *BRCA1* или *BRCA2*, белковые продукты которых непосредственно участвуют в репарации ДЦР. В случае организма или клеточной линии с уже существующей мутацией в этих генах, а также при попытке их редактирования с помощью CRISPR-Cas работа будет существенно осложнена [15]. Показано, что задержка клеточного цикла в фазах G2/M повышает эффективность геномного редактирования [16]. Наилучших результатов удалось добиться при использовании нокодазола, который эффективно и обратимо блокирует клеточный цикл в фазе G2/M, когда ДНК уже полностью реплицировалась, а ядерная оболочка остается разрушенной, что улучшает доступ Cas9 к ДНК и повышает эффективность HDR [17].

МЕХАНИЗМЫ РЕПАРАЦИИ

Репарация ДЦР может пойти разными путями в зависимости от таких факторов, как фаза клеточного цикла, наличие и близость донорной молекулы, активность факторов, участвующих в разных путях репарации.

Путь NHEJ не зависит от донорной молекулы и фазы клеточного цикла, поэтому он является доминирующим. В ходе NHEJ гетеродимер Ku70-Ku80 соединяет концы ДНК, а затем комплекс LIG4-XRCC4 осуществляет лигирование. NHEJ делится на каноническое негомологичное со-

единение концов (κ-NHEJ) и альтернативное негомологичное соединение концов (α-NHEJ), также называемое микргомологичным соединением концов (MHEJ) (рис. 1). ДЦР репарируются посредством спаривания оснований одиночных цепей ДНК с последующим укорачиванием концевых участков, заполнением пробелов и лигированием ДНК [18].

HDR с использованием двухцепочечной матрицы проходит по каноническому пути, при котором RAD51 образует филаменты на 3'-концах цепи ДНК-мишени, чтобы обеспечить инвазию одиночной цепи поврежденной ДНК в донорную молекулу. При этом необходимы факторы, которые обеспечивают взаимодействие RAD51 с ДНК, включая *BRCA2*, *PALB2* и *DSS1*. Эффективность HDR с использованием двухцепочечной матрицы снижается при истощении или инактивации этих факторов [20]. В ходе HDR комплекс MRN узнает ДЦР, гидролизует 5'-концы ДНК по обе стороны от него на расстоянии 15–20 п.н. [6]. Завершают резекцию белки *SGS1*, *DNA2* и *EXO1* [21]. Затем комплекс MRN перемещается к фланкирующим участкам двухцепочечной матрицы и привлекает протеинкиназу ATM – ключевой фермент сигнальной системы ДЦР [22]. MRN также связывает концы ДНК, что увеличивает его локальную концентрацию и таким образом способствует активации ATM [23]. Белок RPA покрывает одноцепочечные участки ДНК. После этого белок RAD51 образует нуклеопротеиновые филаменты с одноцепочечными 3'-концами ДНК, которые затем выполняют поиск комплементарных участков с образованием структуры Холлидея [24].

HDR может происходить двумя путями: синтезависимым отжига цепи (SDSA) или восстановлением ДЦР. SDSA – предпочтительный путь направленной гомологичной репарации в соматических клетках. Он приводит к облигатному некроссоверному исходу, что позволяет избежать потенциальных хромосомных перестроек и потери гетерозиготности [25]. В процессе SDSA сначала одна из цепей поврежденной ДНК внедряется в молекулу-матрицу, в результате чего образуются D-петля и структура Холлидея [26]. ДНК-полимераза продлевает внедренную цепь комплементарно молекуле-матрице. Одновременно с этим комплементарно вытесненной цепи синтезируется остальная часть поврежденной ДНК. При этом возможен процесс миграции точки ветвления, когда точка пересечения цепей, принадлежащих рекомбинирующим ДНК, начинает перемещаться между ними. Иногда в процессе слияния синтезированных цепей с молекулой ДНК могут возникать гетеродуплексы, другие пробелы и бреши, которые устраняются при лигировании, после чего рекомбинацию можно считать завершенной [24].

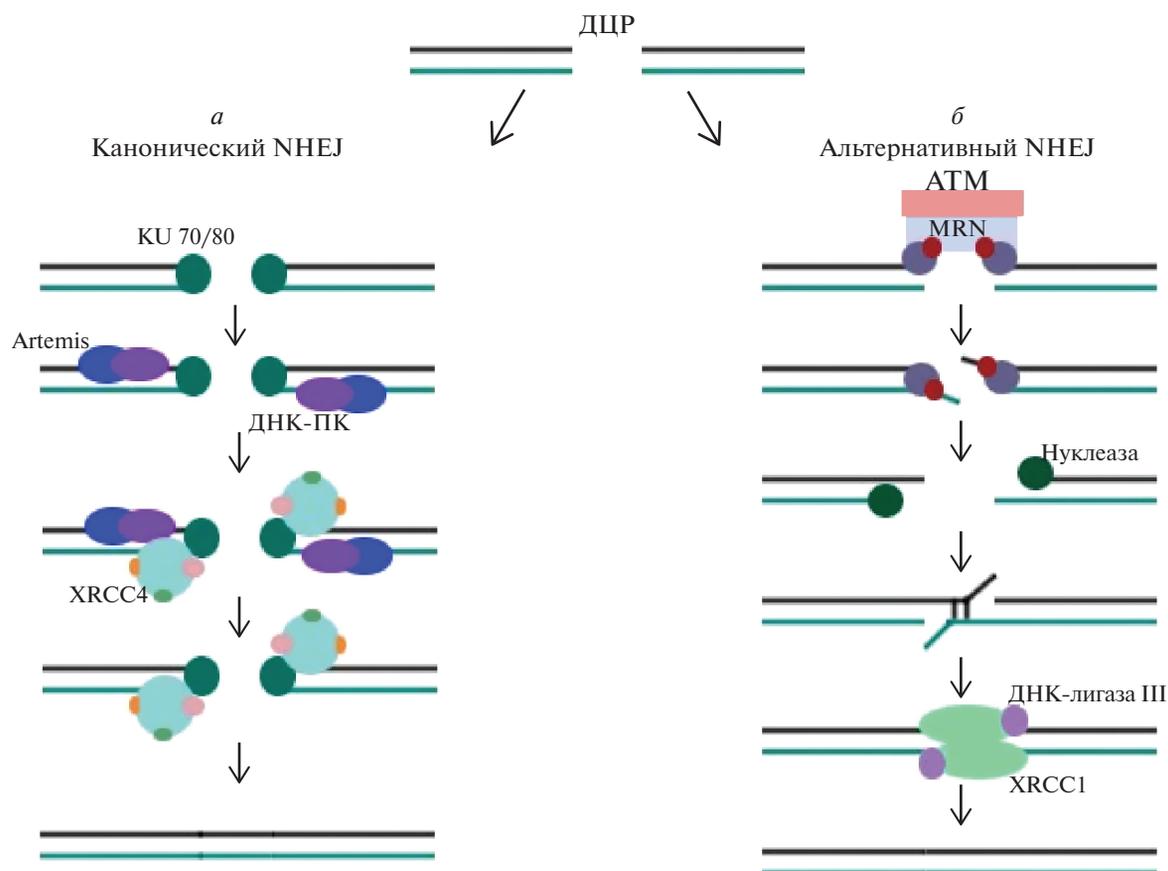


Рис. 1. Канонический и альтернативный пути NHEJ. *a* – Канонический путь NHEJ, включающий белки KU и XRCC4, может консервативным способом соединять концы молекулы ДНК в месте разрыва, даже дистальные и не полностью комплементарные; *b* – основное событие альтернативного пути – делеция на стыке, обычно связанная с использованием внутренних микрогомолий. XRCC1 и ДНК-лигаза-III лигируют концы цепи в месте ДЦР. Адаптировано из работы [19], лицензия Creative Common CC BY. ДЦР – двухцепочный разрыв ДНК, NHEJ – негомологичное соединение концов, ДНК-ПК – ДНК-протеинкиназа.

При восстановлении ДЦР происходит укорочение 5'-концов и инвазия 3'-концов в гомологичную матрицу – этому способствуют белки DMC1 и RAD51. Комплексы стабилизируются, образуется D-петля и затем структура Холлидея. В разрезании структуры Холлидея участвуют резолвазы – ферменты, обладающие эндонуклеазной активностью [27]. В зависимости от исхода разрезания образуется либо кроссоверная последовательность (в большинстве случаев), либо некроссоверная [24].

Если матрицей для репарации ДЦР служит одноцепочечная молекула, то репарация проходит по альтернативному пути – с помощью одноцепочечной матрицы (SSTR) (рис. 2) [10]. SSTR не зависит от RAD51/BRCA2, поскольку RAD51 может способствовать повторному отжигу двух цепей геномной ДНК. В этом случае сразу после разрыва укорачиваются 5'-концы и остаются одноцепочечные 3'-концы, которые участвуют в отжиге с экзогенным донором [28]. Этот вид репарации зависит от RAD52, RAD59, SRS2 и ком-

плекса MRE11–RAD50–XRS2 (MRX) [29]. Как только MRX связывается с молекулой ДНК и иницирует укорочение концов ДЦР, донорная молекула оцДНК с помощью белка RAD52 может отжигаться с доступными концами геномной ДНК. Отжигу способствуют Rad59 и Srs2, они предотвращают взаимодействие концов ДНК с Rad51 и блокируют отжиг, опосредованный Rad52. Матрица оцДНК копируется ДНК-полимеразой (предположительно ДНК-полимеразой δ), а затем отжигается на противоположной стороне ДЦР, вероятно, через Rad52. Несовпадения на 5'-конце донора оцДНК создают облигатный гетеродуплекс, который исправляется Msh2. Участки, которые остаются после SSTR, часто заполняются полимеразой ζ [30].

ВИДЫ И СИНТЕЗ ДОНОРНЫХ МОЛЕКУЛ

На данный момент при геномном редактировании в качестве донорных молекул используют одноцепочечные (одноцепочечные олигонуклеотиды)

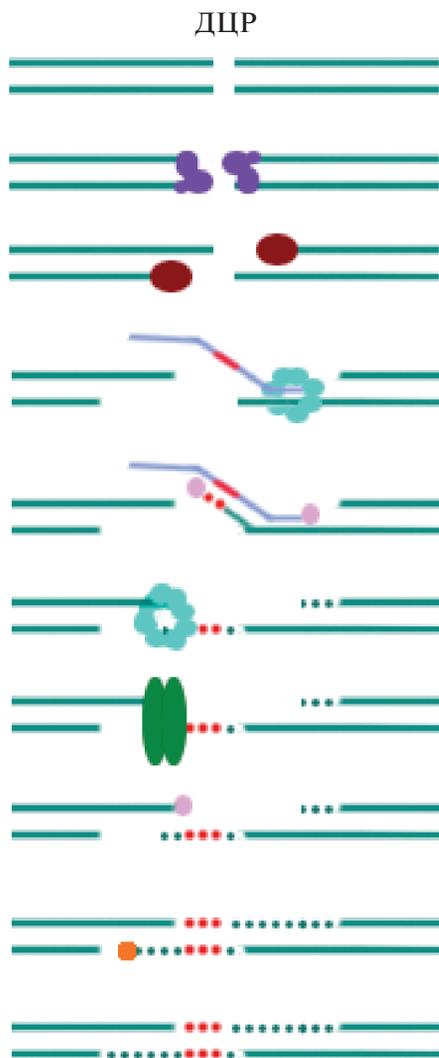


Рис. 2. Репарация ДЦР с использованием одноцепочечных матриц. MRX показан фиолетовым, RAD52 – голубым, Msh2 – зеленым, полимеразы ζ – оранжевым и δ – розовым. Адаптировано из работы [30] с разрешения издательства.

сирибонуклеотиды, оцОДН) и длинные оцДНК (доцДНК) [31, 32]), а также двухцепочечные – плазмиды и продукты амплификации [33, 34].

дцДНК могут быть как специально сконструированными донорными плазидами, так и продуктами амплификации. Плазмиды используют чаще, поскольку обычно они значительно меньше традиционных линейных донорных молекул, а получать их проще и дешевле [35]. Донорная плазида – кольцевая дцДНК, на которой располагаются последовательности для вставки и плечи гомологии. Длина плазмиды может достигать 15 т.п.н., длина плеча гомологии обычно находится в диапазоне от 500 до нескольких тысяч пар нуклеотидов [36]. Гомологичная последовательность может быть амплифицирована из инте-

ресующего гена и затем вставлена в остов плазмиды [37]. Существует опосредованная CRISPR/Cas9 стратегия интеграции с использованием донорной плазмиды, несущей два одинаковых сайта расщепления, фланкирующих кассету с обеих сторон. После доставки донорной плазмиды вместе с мРНК Cas9 и гидовой РНК (гРНК) в клетке разрезаются обе стороны экзогенной кассеты, а в нужный хромосомный сайт вносится также ДЦР. Такой способ, как полагали авторы метода, должен приводить к точной интеграции без плазмидного остова, однако точность этого метода ниже, чем при классическом применении донорных плазмид [38].

Двухцепочечные линейные матрицы обычно создают с помощью ПЦР. Для повышения эффективности HDR при их использовании применяют модификацию 5'-концов. Модифицированные донорные молекулы меньше образуют внехромосомные конкатемеры, что повышает доступность клетки для донорной молекулы, а также могут снижать доступность 5'-концов геномной ДНК для NHEJ.

Важно отметить, что нуклеаза, используемая при редактировании с помощью системы CRISPR-Cas, может быть доставлена в клетки как в виде ДНК (например, в составе плазмиды), так и в виде рибонуклеопротеинового комплекса (РНП-комплекса) вместе с гРНК. В последнем случае нуклеазу можно модифицировать. Разработан метод, в котором длинная двухцепочечная матрица была биотинилирована с 5'-концов. Ее конъюгировали с двумя белками Cas9 (рис. 3). С помощью такой конструкции проведена замена двух экзонов гена А на два экзона гена В для создания модельных мышей. Достигнута 87% целевая эффективность и 12.5% эффективность создания гомозигот при редактировании зигот [39]. Вероятно, эффективность внесения изменений в геном возрастает, поскольку матрица находится недалеко от места разрыва, что способствует повышению вероятности HDR. Этот метод потенциально можно использовать для замены длинного фрагмента ДНК, например, целого гена или энхансера.

Длина доцДНК, служащих матрицами для репарации, может достигать 3 т.н. Для синтеза этих ДНК амплифицируют нужный участок и прилегающие плечи гомологии с помощью ПЦР с двойным биотинилированным прямым праймером. Используют либо химерную ПЦР подходящей ДНК-матрицы, либо субклонирование в случае более сложных матриц [31]. доцДНК, полученная с помощью биотинилирования асимметричных ПЦР-продуктов, нуждается в дальнейшей биотиновой аффинной очистке с использованием взаимодействия биотин-стрептавидин. Создать доцДНК можно также с помощью обратной транскрипции. В этом методе кДНК генерируется процессивной обратной транскриптазой, например, TGIRT-III [40]. Подходы, основанные на обрат-

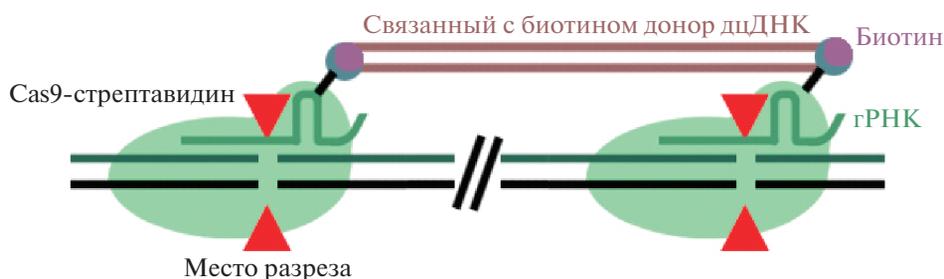


Рис. 3. дцДНК, конъюгированная с белками Cas9. Адаптировано из работы [39] с разрешения издательства.

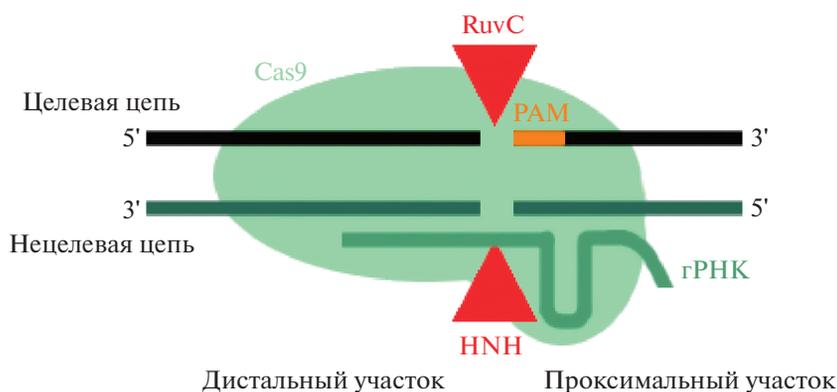


Рис. 4. Введение ДЦР с помощью Cas9.

ной транскрипции, могут эффективно использоваться для получения доноров оцДНК длиной до 3.5 т.н. [41–43]. Однако надо учитывать, что используемые для генерации линейной доцДНК ферменты, осуществляющие обратную транскрипцию, могут допускать ошибки при копировании [44], что затрудняет получение точной последовательности ДНК. Кроме того, эти ферменты часто генерируют укороченные продукты доцДНК [45]. оцОДН – небольшие одноцепочечные молекулы длиной до 200 н., как и любые другие донорные молекулы, состоят из последовательности для вставки и двух плеч гомологии. Длина плеча гомологии может варьировать от 30 до 60 н. (оцОДН можно заказать у биотехнологических компаний [46]). Важно понимать, что стандартный амидофосфитный метод синтеза олигонуклеотидов, используемый в том числе в российских биотехнологических компаниях, сопряжен с большим количеством ошибок при синтезе длинных (более 100) олигонуклеотидов, что ведет к повышению ошибок в экспериментах по редактированию. Ряд ведущих зарубежных компаний гарантируют высокое качество синтеза олигонуклеотидов длиной до 200 н.

ПОДБОР оцОДН ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ SSTR

В зависимости от цепи, на которой отжигается гРНК для CRISPR-Cas9, возможны две различные ориентации оцДНК (“целевая” и “нецелевая”). Целевая оцДНК имеет ту же последовательность, с которой отжигается гРНК, тогда как нецелевая комплементарна ей и содержит последовательность PAM (рис. 4). Предыдущие исследования, в которых в качестве донорных матриц использовали короткие оцДНК, предполагают, что отбор цепи критически влияет на эффективность включения. Это обусловлено тем, что Cas9 высвобождает нецелевую PAM-дистальную цепь геномной ДНК (с которой отжигается гРНК), но плотно захватывает три другие цепи. Свободная цепь становится доступной для отжига с комплементарным ей оцОДН. Донорный оцОДН, комплементарный ненаправленной цепи, повышает частоту SSTR в 2.6 раза по сравнению с оцОДН, комплементарным направленной цепи [47, 48].

Кроме того, в этих исследованиях установлено, что длина плеч гомологии также критически важна для эффективности SSTR при использовании доноров оцДНК. Сконструированы оцОДН с



Рис. 5. Конъюгация оцОДН с Cas9. Адаптировано из работы [50], лицензия Creative Commons Attribution 4.0 International License.

разными длинами плеч на 5'- и 3'-стороне. Наибольшую эффективность ($57 \pm 5\%$) SSTR обеспечивало использование асимметричной оцДНК, оптимизированной для отжига с перекрытием сайта разрезания Cas9 (36 п.н.) на РАМ-дистальной стороне и с удлинением (91 п.н.) на РАМ-проксимальной стороне разрыва [47, 48].

Считается, что более короткое 3'-плечо позволяет оцОДН отжигаться с целевым локусом ДНК без необходимости инвазии 3'-конца поврежденной цепи в ДНК, служащей матрицей [49].

С целью повышения эффективности SSTR с использованием оцДНК с белком Cas9 конъюгировали несколько молекул оцОДН (рис. 5). В ходе исследования доказано, что множественная конъюгация оцОДН с Cas9 значительно увеличивает эффективность точного редактирования генома, и такая платформа совместима с оцОДН различной длины [50].

В одном из экспериментов с оцОДН мутацию расположили ближе к концу плеч гомологии и проверили, сможет ли ингибирование деградации концов оцОДН посредством включения фосфотиоатных связей повысить эффективность редактирования. Введение фосфотиоатных связей позволило повысить эффективность редактирования с мутацией на 3'-конце на 4%. Защита 5'-конца не дала никакого эффекта, как и локализация мутантного нуклеотида рядом с ДЦР и на расстоянии 61 н. от 3'-конца. Защита с помощью фосфотиоатных связей увеличивала эффективность редактирования мутации на расстоянии 15 н. от разрыва и 27 н. у 3'-конца [51].

СРАВНЕНИЕ ДОНОРНЫХ МОЛЕКУЛ

В качестве донорных матриц можно использовать плазмидные дцДНК, с их помощью эффективно проводили модификацию генов в процессе HDR в нескольких эукариотических системах [52]. дцДНК обычно применяют для интеграции больших участков генов, например, флуоресцентных репортерных генов или генов резистентности к антибиотикам, что позволяет затем осуществить селекцию клеток, в которых произошли изменения. Исследования, проведенные на рыбах (*Danio rerio*), показали, что плазмидная ДНК в качестве донорной молекулы более эффективна (46%), чем линейные дцДНК (1%) [53]. Однако у двухпочеч-

ных доноров есть ряд минусов. Их создание может быть дорогим и трудоемким [35], а использование может приводить к нежелательным событиям: дцДНК могут встраиваться в ДНК клетки в процессе NHEJ, что приводит к дублированию плеч гомологии или частичному включению матрицы дцДНК [54]. Также дцДНК могут встраиваться в нецелевые ДЦР, которые встречаются в ДНК клетки независимо от воздействия нуклеаз [55]. Кроме того, матрицы дцДНК могут оказывать цитотоксическое действие на культивируемые клетки [42, 50, 56–59]. Еще одно неудобство заключается в том, что молекулы дцДНК способны формировать большие внехромосомные массивы посредством как концевых соединений, так и путей гомологичной рекомбинации [58, 60]. Сцепление донорных молекул в большие массивы ведет к уменьшению количества отдельных молекул, служащих матрицами для репарации. Более того, если введенная ДНК образует сцепления, будучи изолированной от ядерной ДНК [60], то это может препятствовать репарации с ее участием, пока изолированные сцепленные донорные молекулы не получат доступ к ядру после разрушения ядерной оболочки [61].

ОцОДН в основном используются для исправления точечных мутаций [50]. В отличие от дцДНК готовые оцОДН можно получить за несколько дней, что позволяет ускорить подготовку к редактированию и снизить затраты на синтез матриц [37]. Основной недостаток оцОДН-доноров – их размер, равный примерно 200 н. [62]. Такое ограничение обусловлено повышением количества ошибок в более длинных олигонуклеотидных последовательностях, синтезируемых стандартным амидофосфитным методом, а также сложностью очистки конечного продукта, так как добавляется примесь не полностью синтезированных продуктов. Это ограничение делает невозможным вставку более длинного фрагмента ДНК. Также выяснилось, что опосредованная оцОДН репарация может привести к ошибкам – интеграции части донорной молекулы в неправильном направлении, введении нескольких фрагментов оцОДН с разной ориентацией [63]. По данным недавних исследований оцДНК могут индуцировать вставки или делеции при репарации ДЦР, созданных с использованием системы CRISPR-Cas9 [64, 65].

Недавно стали использовать третий вид матриц – доцДНК [43], подходящий для вставки достаточно большого участка ДНК – от 200 до 5000 н. [66]. При этом доцДНК меньше по размеру и менее цитотоксичны, чем плазмидные матрицы. Первые длинные одноцепочечные матрицы использовали в методе под названием *Easi-CRISPR* (эффективная вставка с помощью оцДНК-CRISPR). *Easi-CRISPR* разработан в качестве одноэтапного метода создания целевой вставки в молекулу ДНК с высокой эффективностью [43]. В этой стратегии использовали доцДНК с предварительно собранными РНП-комплексами crRNA + tracrRNA + Cas9 (RNP) для двух сайтов CRISPR-Cas9 в одном локусе [67]. Проведенное на Т-клетках человека сравнение доцДНК и дцДНК, выявило меньшую цитотоксичность доцДНК. Кроме того, доцДНК реже, чем оцДНК встраивались в нецелевые участки. Эффективность редактирования при использовании доцДНК и дцДНК была сопоставимой – 50–60% [54]. Однако данные об эффективности и надежности этого метода все еще ограничены. В исследовании на мышах установлено, что использование доцДНК привело не только к исправлению целевой мутации, но и ко многим нежелательным событиям – инделам, точечным мутациям, частичной интеграции донора [68]. Химический синтез доцДНК может быть достаточно дорогим по сравнению с синтезом оцОДН. Кроме того, синтез доцДНК с помощью *Easi-CRISPR* и плазмидного разрезания с последующей денатурацией считается трудоемким [44, 69], поэтому доцДНК относительно редко применяют для исправления мутаций или вставки фрагментов ДНК, несмотря на потенциальные преимущества этого метода [70].

В опытах на *D. rerio* сравнили все четыре варианта донорных молекул. С этой целью использовали специально подготовленные доцДНК, симметричные и асимметричные оцОДН, плазмидную донорную молекулу и линейризованную дцДНК (ПЦР-продукт). Ген *tyr* кодирует тирозиназу, которая превращает тирозин в меланин, а рыбки да-нио с мутацией в этом гене (*tyr^{25del/25del}*) имеют фенотип альбиносов. В отредактированных клетках наблюдалось восстановление гена *tyr* с последующим появлением пигментации. При редактировании плазмидой только у 5.4% головастиков появлялось небольшое количество пигмента. При использовании симметричных оцОДН пигмент проявился у 39.1% головастиков, тогда как в случае асимметричных – только у 1.3%. При редактировании с использованием доцДНК 98.5% головастиков имели заметную пигментацию. HDR с применением ПЦР-продуктов дцДНК была неэффективной [46].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На данный момент в редактировании генома с дальнейшей репарацией HDR или SSTR используют одноцепочечные и двухцепочечные донорные молекулы. Нет единого мнения, какой из типов донорных молекул наиболее эффективный; каждый из них применяется в разных целях и имеет свои преимущества и недостатки. Двухцепочечные донорные молекулы выбирают в основном для вставки больших участков, например генов-репортеров, в геном, что может быть полезным для отбора отредактированных клонов клеток по экспрессии маркерного гена (флуоресцентного репортера или устойчивости к определенным антибиотикам) с целью получения клональной культуры. В дальнейшем при вырезании генов-репортеров можно получить клоны клеток с измененным геномом (редактированной мутацией), пригодных, например, для *ex vivo* терапии ряда заболеваний человека. оцОДН используют для небольших изменений генома, таких как исправление точечных мутаций. Такой подход можно использовать, к примеру, для коррекции мутаций, приводящих к наследственным заболеваниям, разработкой терапии *in vivo*. Промежуточный вариант – доцДНК – имеет достаточную длину для интеграции больших фрагментов ДНК, однако отличается высокой стоимостью, сопоставимой с использованием плазмидной ДНК, а также схожей эффективностью, что нивелирует преимущества такого типа матриц. Этот подход пока не нашел широкого применения в экспериментах по геномному редактированию. Несмотря на то, что поставленные задачи зачастую определяют тип используемых донорных молекул, необходимы дополнительные эксперименты, позволяющие определить оптимальные длины и состав донорных молекул в каждом конкретном случае.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ “МГНЦ”.

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

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Durai S., Mani M., Kandavelou K., Wu J., Porteus M.H., Chandrasegaran S. (2005) Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* **33**(18), 3978–5990. <https://doi.org/10.1093/nar/gki912>
2. Silva G., Poirot L., Galetto R., Smith J., Montoya G., Duchateau Ph., Pâques F. (2011) Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: perspectives and challenges for gene therapy. *Curr. Gene*

- Therapy*. **11**(1), 11–27.
<https://doi.org/10.2174/156652311794520111>
3. Cermak T., Doyle E. L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J.A., Somia N.V., Bogdanove A.J., Voytas D.F. (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucl. Acids Res.* **39**(12), e82.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr218>
 4. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. **337**(6096), 816–821.
<https://doi.org/10.1126/science.1225829>
 5. Guha T.K., Wai A., Hausner G. (2017) Programmable genome editing tools and their regulation for efficient genome engineering. *Comp. Struct. Biotechnol. J.* **15**, 146–160.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.12.006>
 6. Symington L.S., Gautier J. (2011) Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu. Rev. Genet.* **45**, 247–271.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132435>
 7. Chang H., Pannunzio N.R., Adachi N., Lieber M.R. (2017) Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**(8), 495–506.
<https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
 8. Li T., Huang S., Zhao X., Wright D.A., Carpenter S., Spalding M.H., Weeks D.P., Yang B. (2011) Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucl. Acids Res.* **39**(14), 6315–6325.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr188>
 9. Devkota S. (2018) The road less traveled: strategies to enhance the frequency of homology-directed repair (HDR) for increased efficiency of CRISPR/Cas-mediated transgenesis. *BMB Rep.* **51**(19), 437–443.
<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.9.187>
 10. Richardson C.D., Kazane K.R., Feng S.J., Zelin E., Bray N.L., Schäfer A.J., Floor S.N., Corn J.E. (2018) CRISPR-Cas9 genome editing in human cells occurs via the Fanconi anemia pathway. *Nat. Genet.* **50**(8), 1132–1139.
<https://doi.org/10.1038/s41588-018-0174-0>
 11. Hockemeyer D., Soldner F., Beard C., Gao Q., Mitalipova M., DeKaveler R.C., Katibah G.E., Amora R., Boydston E.A., Zeitler B., Meng X., Miller J.C., Zhang L., Rebar E.J., Gregory Ph.D., Urnov F.D., Jaenisch R. (2009) Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **27**, 851–857.
<https://doi.org/10.1038/nbt.1562>
 12. Hockemeyer D., Wang H., Kiani S., Lai C.S., Gao Q., Cassidy J.P., Cost G.J., Zhang L., Santiago Y., Miller J.C., Zeitler B., Cherone J.M., Meng X., Hinkley S.J., Rebar E.J., Gregory Ph.D., Urnov F.D., Jaenisch R. (2011) Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat. Biotechnol.* **29**, 731–734.
<https://doi.org/10.1038/nbt.1927>
 13. Sommer D., Peters A., Wirtz T., Mai M., Ackermann J., Thabet Y., Schmidt J., Weighardt H., Wunderlich F.T., Degen J., Schultze J.L., Beyer M. (2014) Efficient genome engineering by targeted homologous recombination in mouse embryos using transcription activator-like effector nucleases. *Nat. Commun.* **5**, 3045.
<https://doi.org/10.1038/ncomms4045>
 14. Heyer W.D., Ehmsen K.T., Liu J. (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **44**, 113–139.
<https://doi.org/10.1146/annurev-genet-051710-150955>
 15. Yanik M., Ponnam S., Wimmer T., Trimborn L., Müller C., Gambert I., Ginsberg J., Janise A., Domicke J., Wende W., Lorenz B., Stieger K. (2018) Development of a reporter system to explore MMEJ in the context of replacing large genomic fragments. *Mol. Therapy. Nucl. Acids*. **11**, 407–415.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.03.010>
 16. Smirnikhina S.A., Anuchina A.A., Lavrov A.V. (2019) Ways of improving precise knock-in by genome-editing technologies. *Hum. Genet.* **138**(1), 1–19.
<https://doi.org/10.1007/s00439-018-1953-5>
 17. Lin S., Staahl B.T., Alla R.K., Doudna J.A. (2014) Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *eLife*. **3**, e04766.
<https://doi.org/10.7554/eLife.04766>
 18. Seol J.H., Shim E.Y., Lee S.E. (2018) Microhomology-mediated end joining: good, bad and ugly. *Mutat. Res.* **809**, 81–87.
 19. González-Marín C., Gosálvez J., Roy R. (2012) Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Internat. J. Mol. Sci.* **13**(11), 14026–14052.
<https://doi.org/10.3390/ijms131114026>
 20. Liu M., Rehman S., Tang X., Fan Q., Chen D., Ma W. (2019) Methodologies for improving HDR efficiency. *Front. Genet.* **9**(691).
<https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00691>
 21. Zhu Z., Chung W.H., Shim E.Y., Lee S.E., Ira G. (2008) Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell*. **34**(6), 981–994.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.037>
 22. Falck J., Coates J., Jackson S.P. (2005) Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*. **434**(7033), 605–611.
<https://doi.org/10.1038/nature03442>
 23. Dupré A., Boyer-Chatenet L., Gautier J. (2006) Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**(5), 451–457.
<https://doi.org/10.1038/nsmb1090>
 24. Helleday T., Lo J., van Gent D.C., Engelward B.P. (2007) DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair*. **6**(7), 923–935.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2007.02.006>
 25. Liu J., Ede C., Wright W. D., Gore S.K., Jenkins S.S., Freudenthal B.D., Washington M.T., Veaute X., Heyer W.-D. (2017) Srs2 promotes synthesis-dependent strand annealing by disrupting DNA polymerase δ -extending D-loops. *eLife*. **6**, e22195.
<https://doi.org/10.7554/eLife.22195>
 26. McMahon M.S., Sham C.W., Bishop D.K. (2007) Synthesis-dependent strand annealing in meiosis. *PLoS*

- Biol.* **5**(11), e299.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050299>
27. Agmon N., Yovel M., Harari Y., Liefshitz B., Kupiec M. (2011) The role of Holliday junction resolvases in the repair of spontaneous and induced DNA damage. *Nucl. Acids Res.* **39**(16), 7009–7019.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr277>
 28. Davis L., Zhang Y., Maizels N. (2018) Assaying repair at DNA nicks. *Methods Enzymol.* **601**, 71–89.
<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2017.12.001>
 29. Gallagher D.N., Pham N., Tsai A.M., Janto A.N., Choi J., Ira G., Haber J.E. (2020) A Rad51-independent pathway promotes single-strand template repair in gene editing. *PLoS Genet.* **16**(10), e1008689.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008689>
 30. Gallagher D.N., Haber J.E. (2021) Single-strand template repair: key insights to increase the efficiency of gene editing. *Curr. Genet.* **67**, 747–753.
<https://doi.org/10.1007/s00294-021-01186-z>
 31. Hu Z., Zhou M., Wu Y., Li Z., Liu X., Wu L., Liang D. (2019) ssODN-mediated in-frame deletion with CRISPR/Cas9 restores FVIII function in hemophilia A-patient-derived iPSCs and ECs. *Mol. Therapy. Nucl. Acids.* **17**, 198–209.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.05.019>
 32. Bennett H., Aguilar-Martinez E., Adamson A.D. (2021) CRISPR-mediated knock-in in the mouse embryo using long single stranded DNA donors synthesised by biotinylated PCR. *Methods* (San Diego, Calif.). **191**, 3–14.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.10.012>
 33. Cristea S., Freyvert Y., Santiago Y. (2013) *In vivo* cleavage of transgene donors promotes nuclease-mediated targeted integration. *Biotechnol. Bioengin.* **110**(3), 871–880.
<https://doi.org/10.1002/bit.24733>
 34. Fueller J., Herbst K., Meurer M., Gubicza K., Kurtulmus B., Knopf J.D., Kirrmaier D., Buchmuller B.C., Pereira G., Lemberg M.K., Knop M. (2020) CRISPR-Cas12a-assisted PCR tagging of mammalian genes. *J. Cell Biol.* **219**(6), e201910210.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201910210>
 35. Chen F., Pruett-Miller S.M., Davis G.D. (2015) Gene editing using ssODNs with engineered endonucleases. *Methods Mol. Biol.* **1239**, 251–265.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1862-1_14
 36. Мягкая Н.О., Марочкин Н.А., Норбобаева М.Б., Серба Т.В., Стародуб М.А., Курбединов Р.А., Костенко С.А., Заяц И.В. (2020) Обзор метода CRISPR/Cas9 для редактирования генома. *Молодой ученый.* **12**(302), 81–85.
 37. Designing Homologous Repair Templates. New England BioLabs Inc. <https://international.neb.com/applications/genome-editing/designing-homologous-repair-templates>
 38. Mao C.Z., Zheng L., Zhou Y.M., Wu H.-Y., Xia J.-B., Liang C.-Q., Guo X.-F., Peng W.-T., Zhao H., Cai W.-B., Kim S.-K., Park K.-S., Cai D.-Q., Qi X.-F. (2018) CRISPR/Cas9-mediated efficient and precise targeted integration of donor DNA harboring double cleavage sites in *Xenopus tropicalis*. *FASEB J.* **fj201800093**. Advance online publication.
<https://doi.org/10.1096/fj.201800093>
 39. Pineault K.M., Novoa A., Lozovska A., Wellik D.M., Mallo M. (2019) Two CRISPR/Cas9-mediated methods for targeting complex insertions, deletions, or replacements in mouse. *MethodsX.* **6**, 2088–2100.
<https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.09.003>
 40. Roth T.L., Puig-Saus C., Yu R., Shifrut E., Carnevale J., Li P. J., Hiatt J., Saco J., Krystofinski P., Li H., Tobin V., Nguyen D.N., Lee M.R., Putnam A.L., Ferris A.L., Chen J.W., Schickel J.-N., Pellerin L., Carmody D., Alkorta-Aranburu G., Del Gaudio D., Matsumoto H., Morell M., Mao Y., Cho M., Quadros R.M., Gurumurthy C.B., Smith B., Haugwitz M., Hughes S.H., Weissman J.S., Schumann K., Esensten J.H., May A.P., Ashworth A., Kupfer G.M., Greeley S.A.W., Bacchetta R., Meffre E., Roncarolo M.G., Romberg N., Herold K.C., Ribas A., Leonetti M.D., Marson A. (2018) Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature.* **559**(7714), 405–409.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0326-5>
 41. Quadros R.M., Miura H., Harms D.W., Akatsuka H., Sato T., Aida T., Redder R., Richardson G.P., Inagaki Y., Sakai D., Buckley S.M., Seshacharyulu P., Batra S.K., Behlke M.A., Zeiner S.A., Jacobi A.M., Izu Y., Thoreson W.B., Urness L.D., Mansour S.L., Ohtsuka M., Gurumurthy C.B. (2017) Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins. *Genome Biol.* **18**(1), 92.
<https://doi.org/10.1186/s13059-017-1220-4>
 42. Miura H., Gurumurthy C.B., Sato T., Sato M., Ohtsuka M. (2015) CRISPR/Cas9-based generation of knock-down mice by intronic insertion of artificial microRNA using longer single-stranded DNA. *Sci. Rep.* **5**, 12799.
<https://doi.org/10.1038/srep12799>
 43. Leonetti M.D., Sekine S., Kamiyama D., Weissman J.S., Huang B. (2016) A scalable strategy for high-throughput GFP tagging of endogenous human proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**(25), E3501–E3508.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1606731113>
 44. Miura H., Quadros R.M., Gurumurthy C.B., Ohtsuka M. (2018) Easi-CRISPR for creating knock-in and conditional knockout mouse models using long ssDNA donors. *Nat. Protocols.* **13**(1), 195–215.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2017.153>
 45. Harrison G.P., Mayo M.S., Hunter E., Lever A.M. (1998) Pausing of reverse transcriptase on retroviral RNA templates is influenced by secondary structures both 5' and 3' of the catalytic site. *Nucl. Acids Res.* **26**(14), 3433–3442.
<https://doi.org/10.1093/nar/26.14.3433>
 46. Bai H., Liu L., An K., X. Lu, Harrison M., Zhao Y., Yan R., Lu Z., Li S., Lin S., Liang F., Qin W. (2020) CRISPR/Cas9-mediated precise genome modification by a long ssDNA template in zebrafish. *BMC Genomics.* **21**(1), 67.
<https://doi.org/10.1186/s12864-020-6493-4>
 47. Hwang W.Y., Fu Y., Reyon D., Maeder M.L., Kaini P., Sander J.D., Joung J.K., Peterson R.T., Yeh J.-R.J. (2013) Heritable and precise zebrafish genome editing

- using a CRISPR-Cas system. *PLoS One*. **8**(7). e68708 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068708>
48. Richardson C.D., Ray G.J., DeWitt M.A., Curie G.L., Corn J.E. (2016) Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat. Biotechnol.* **34**(3), 339–344. <https://doi.org/10.1038/nbt.3481>
 49. O'Brien A.R., Wilson L., Burgio G., Bauer D.C. (2019) Unlocking HDR-mediated nucleotide editing by identifying high-efficiency target sites using machine learning. *Sci. Rep.* **9**(1), 2788. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39142-0>
 50. Lim D., Sreekanth V., Cox K.J., Law B.K., Wagner B.K., Karp J.M., Choudhary A. (2020) Engineering designer beta cells with a CRISPR-Cas9 conjugation platform. *Nat. Commun.* **11**(1), 4043. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17725-0>
 51. Harmsen T., Klaasen S., van de Vrugt H., Te Riele H. (2018) DNA mismatch repair and oligonucleotide end-protection promote base-pair substitution distal from a CRISPR/Cas9-induced DNA break. *Nucl. Acids Res.* **46**(6), 2945–2955. <https://doi.org/10.1093/nar/gky076>
 52. Shao Y., Guan Y., Wang L., Qiu Z., Liu M., Chen Y., Wu L., Li Y., Ma X., Liu M., Li D. (2014) CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos. *Nat. Protocols.* **9**(10), 2493–2512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.171>
 53. Irion U., Krauss J., Nüsslein-Volhard C. (2014) Precise and efficient genome editing in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. *Development.* **141**(24), 4827–4830. <https://doi.org/10.1242/dev.115584>
 54. Wang B., Karaçay B. Megamer single-stranded donor templates (ssDNA or ssODNs) for successful homology-directed repair (HDR) in genome editing applications. IDT. [https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/megamer-single-stranded-donor-templates-\(ssdna-or-ssODNs\)-for-successful-homology-directed-repair-\(HDR\)-in-genome-editing-applications](https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/megamer-single-stranded-donor-templates-(ssdna-or-ssODNs)-for-successful-homology-directed-repair-(HDR)-in-genome-editing-applications)
 55. Yoshimi K., Oka Y., Miyasaka Y., Kotani Y., Yasumura M., Uno Y., Hattori K., Tanigawa A., Sato M., Oya M., Nakamura K., Matsushita N., Kobayashi K., Mashimo T. (2021) Combi-CRISPR: combination of NHEJ and HDR provides efficient and precise plasmid-based knock-ins in mice and rats. *Hum. Genetics.* **140**(2), 277–287. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02198-4>
 56. Highly specific gene knockins of long sequences using CRISPR/Cas9 and a single-stranded DNA donor template. Takara Bio USA, Inc. https://catalog.takarabio.co.jp/PDFS/Highly-specific-gene-knockins-of-long-sequences-using-CRISPR_Cas9-and-a-single-stranded-DNA-donor-template.pdf
 57. Zhao Y., Zheng Z., Cohen C.J., Gattinoni L., Palmer D.C., Restifo N.P., Rosenberg S.A., Morgan R.A. (2006) High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Mol. Therapy: J. Am. Soc. Gene Therapy.* **13**(1), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.07.688>
 58. Mello C.C., Kramer J.M., Stinchcomb D., Ambros V. (1991) Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* **10**(12), 3959–3970.
 59. Forbes D.J., Kirschner M.W., Newport J.W. (1983) Spontaneous formation of nucleus-like structures around bacteriophage DNA microinjected into *Xenopus* eggs. *Cell.* **34**(1), 13–23. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90132-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90132-0)
 60. Stinchcomb D.T., Shaw J.E., Carr S.H., Hirsh D. (1985) Extrachromosomal DNA transformation of *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* **5**(12), 3484–3496. <https://doi.org/10.1128/mcb.5.12.3484-3496.1985>
 61. Ghanta K.S., Mello C.C. (2020) Melting dsDNA donor molecules greatly improves precision genome editing in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* **216**(3), 643–650. <https://doi.org/10.1534/genetics.120.303564>
 62. Levi T., Sloutskin A., Kalifa R., Juven-Gershon T., Gerlitz O. (2020) Efficient *in vivo* introduction of point mutations using ssODN and a Co-CRISPR approach. *Biol. Proc. Online.* **22**, 14. <https://doi.org/10.1186/s12575-020-00123-7>
 63. Boel A., De Saffel H., Steyaert W., Callewaert B., De Paepe A., Coucke P.J., Willaert A. (2018) CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair by ssODNs in zebrafish induces complex mutational patterns resulting from genomic integration of repair-template fragments. *Dis. Models Mech.* **11**(10), dmm035352. <https://doi.org/10.1242/dmm.035352>
 64. Gratz S.J., Cummings A.M., Nguyen J.N., Hamm D.C., Donohue L.K., Harrison M.M., Wildonger J., O'Connor-Giles K.M. (2013) Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics.* **194**(4), 1029–1035. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.152710>
 65. Wang H., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W., Zhang F., Jaenisch R. (2013) One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* **153**(4), 910–918. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.025>
 66. Guide-it long ssDNA production system v2. Takara Bio USA, Inc. <https://www.takarabio.com/products/gene-function/gene-editing/crispr-cas9/long-ssdna-for-knockins>
 67. Bassett A.R., Tibbit C., Ponting C.P., Liu J.L. (2013) Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep.* **4**(1), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.020>
 68. Codner G.F., Mianné J., Caulder A., Loeffler J., Fell R., King R., Allan A.J., Mackenzie M., Pike F.J., McCabe C.V., Christou S., Joynson S., Hutchison M., Stewart M.E., Kumar S., Simon M.M., Agius L., Anstee Q.M., Volynski K.E., Kullmann D.M., Wells S., Teboul L. (2018) Application of long single-stranded DNA donors in genome editing: generation and validation of mouse mutants. *BMC Biol.* **16**(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0530-7>
 69. Yoshimi K., Kunihiro Y., Kaneko T. (2016) ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat. Commun.* **7**, 10431. <https://doi.org/10.1038/ncomms10431>

70. Ranawakage D.C., Okada K., Sugio K., Kawaguchi Y., Kuninobu-Bonkohara Y., Takada T., Kamachi Y. (2021) Efficient CRISPR-Cas9-mediated knock-in of composite tags in zebrafish using long ssDNA as a donor. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 598634. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.598634>

THE CHOICE OF A DONOR MOLECULE IN GENOME EDITING EXPERIMENTS IN ANIMAL CELLS

O. V. Volodina¹ and S. A. Smirnikhina^{1, *}

¹*Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia*

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

Genome editing is a powerful tool that allows studying properties of genes or changing genetic sequence. Programmable nucleases that can induce double-strand breaks in the genomic sequence of interest have been developed over the past few decades. After initiation of a double-strand break (DSB) in DNA, DSB can be repaired by the path of NHEJ (non-homologous end joining), which leads to various errors and gene knockout. Other repair options HDR (homology directed repair) or SSTR (single-strand template repair) – allow researchers to make desired changes in the gene. HDR occurs in presence of donor template – sister chromatid in natural conditions. Efficiency of HDR and SSTR is significantly lower than efficiency of NHEJ in genome editing. Double-stranded, single-stranded and long single-stranded DNA are used to increase efficiency and to make desired changes in genomic DNA. In this review we discuss donor molecules that are used for DSB repair using HDR or SSTR during genome editing, their application and modifications to increase efficiency of HDR and SSTR.

Keywords: Genome editing, donor molecules, dsDNA, ssODN, lssDNA

УДК 577.218

HEMK-ПОДОБНЫЕ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ

© 2022 г. Н. С. Бизяев^a, А. В. Шувалов^{a, b}, Е. З. Алкалаева^{a, b, *}^aИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия^bЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Москва, 119991 Россия*e-mail: alkalaeva@eimb.ru

Поступила в редакцию 26.11.2021 г.

После доработки 26.11.2021 г.

Принята к публикации 02.12.2021 г.

Трансляционная метилтрансфераза (метилаза) HEMK2 человека, ортологи которой обнаружены у множества прокариот и эукариот, метилирует такие разнообразные субстраты, как остатки глутамин и лизина в составе белков, дезоксиаденозин в ДНК, а также соединения мышьяка. Важным субстратом метилазы HEMK2 является остаток глутамин в инвариантном GGQ-мотиве эукариотического фактора терминации трансляции 1 (eRF1). Метилирование этого остатка ортологами HEMK2 консервативно у эукариот, архей и бактерий, хотя факторы терминации бактерий имеют другие аминокислотные последовательности и структуру. В данном обзоре рассмотрены особенности функционирования метилазы HEMK2 человека и ее ортологов как многофункциональных ферментов, регулирующих клеточные процессы, в частности, биосинтез белка.

Ключевые слова: HEMK2, N6AMT1, eRF1, регуляция трансляции, метилирование, посттрансляционные модификации

DOI: 10.31857/S0026898422030028

ВВЕДЕНИЕ

Метилаза (метилтрансфераза) HEMK2 человека (известная также, как N6AMT1, или KMT9, или C21orf127) и ее ортологи в других эукариотах и археях, участвует в метилировании широкого спектра субстратов, используя в качестве донора метильной группы S-аденозилметионин (SAM). Предполагается, что этот фермент способен метилировать остатки глутамин в факторе терминации трансляции (eRF1), а также в факторах ремоделирования хроматина CHD5 и NUT [1–6], остатки лизина в гистоне H4 [2, 7], токсичные соединения мышьяка [8], а также, возможно, остатки дезоксиаденозина в ДНК [9].

Остатки глутамин в факторах терминации трансляции *Escherichia coli* также подвергаются метилированию метилазой HEMK (Protein release factor methylation C, PrmC) и в митохондриях человека метилазой HEMK1. Обе эти метилазы гомологичны HEMK2 [4, 5, 10–13]. Ген *HEMK E. coli* входит в состав одного оперона с генами, кодирующими фактор терминации трансляции RF1 и глутамил-tРНК-редуктазу, которая участвует в синтезе гема. Из-за этого некоторое время счита-

лось, что и HEMK необходима для синтеза гема, что обусловило название фермента (**heme** – гем) [10, 14]. Однако в дальнейшем участия HEMK в синтезе гема не обнаружили [12].

Все указанные метилазы мы будем далее называть HEMK-подобными метилазами. Необходимо отметить, что метилирование факторов терминации трансляции не является уникальной модификацией компонентов трансляции. Как способ регуляции трансляции описано также метилирование рибосомных белков, трансляционных факторов, а также рРНК [5, 15].

СТРУКТУРА, ОРТОЛОГИ И ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ HEMK- ПОДОБНЫХ МЕТИЛАЗ

Функциональный домен всех HEMK-подобных метилаз устроен сходным образом (рис. 1). Он образован Россмановской укладкой, состоящей из семи β-тяжей, которые расположены приблизительно в одной плоскости и окружены с обеих сторон группами α-спиралей. Такая структура функционального домена позволяет относить HEMK-подобные метилазы к самому крупному первому

Сокращения: SAM – S-аденозилметионин; 6mA – N⁶-метил-2'-дезоксиаденозин; eRF1 – эукариотический фактор терминации трансляции 1.

(I) классу метилаз. Функциональный участок содержит консервативные глицин-богатые и NPPY-мотивы, связывающие, соответственно, SAM и метилируемый субстрат (у арсенита и его производных его значение неизвестно). Все они имеют также консервативные остатки пролина (P), участвующего в стабилизации структуры активного центра, и аспартата (D), участвующего в связывании SAM (рис. 1) [9, 10, 13, 16–20]. Точечный мутант метилазы человека N122A с нефункциональным мотивом NPPY не может метилировать ни остаток глутамин еRF1, ни остаток лизина гистона H4 [2]. Точно также дрожжевые точечные мутанты D77A по консервативному остатку аспартата, а также N122A по NPPY-мотиву не способны эффективно метилировать еRF1 [21].

Метилирование белковых субстратов происходит по S_N2 -механизму за счет оптимального позиционирования субстрата в активном центре с помощью водородных связей, а также дестабилизации SAM, что катализирует нуклеофильную атаку неподеленной пары электронов азота на метильную группу SAM [16, 22].

Несмотря на сходство третичной структуры функционального домена и нескольких консервативных мотивов и остатков, бактериальные HEMK-подобные метилазы довольно сильно отличаются от эукариотических/архейных по первичной структуре. При выравнивании и сравнении последовательностей HEMK-подобных метилаз эукариотические и архейные метилазы кластеризуются в одну группу, что указывает на их близкое родство, тогда как митохондриальные метилазы кластеризуются с метилазой HEMK *E. coli* (рис. 1а). Более того, бактериальные HEMK-подобные метилазы имеют в своем составе дополнительный N-домен, отсутствующий у эукариотических и архейных ортологов HEMK2 [10, 16, 17] (рис. 1б). Интересно, что N-домен бактериальной HEMK охарактеризован как один из примеров пептидов, фолдинг которых начинается непосредственно внутри выходного туннеля рибосомы [23–25].

HEMK2 и его ортологам у архей и эукариот, в отличие от бактериальной HEMK, для эффективного осуществления метилирования необходимо образовать комплекс с белком TRMT112 [1–3, 8, 17, 26, 27]. По данным изотермической титраци-

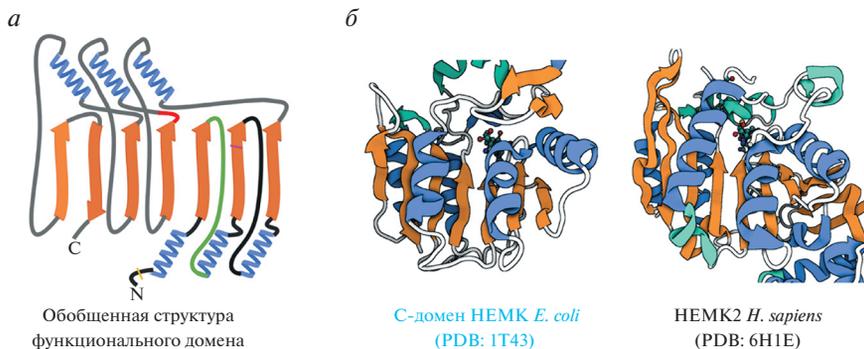
онной калориметрии (ИТС) формирование функционального комплекса HEMK2-TRMT112, среди прочего, необходимо для того, чтобы метилаза связала SAM [2]. Однако у некоторых архей (Methanobacteriales и Thermococcales) обнаружен только ортолог HEMK2, но не TRMT112 [28]. Таким образом, не до конца ясно, насколько эффективно у них функционирует метилаза.

Связанный с метилазой TRMT112 стабилизирует конформацию ее $\beta 3$ – $\beta 4$ -тяжей, необходимую для связывания SAM, а также маскирует гидрофобный регион фермента, что значительно повышает растворимость гетерокомплекса [17, 20, 26]. В отсутствие гомолога TRMT112 метилаза дрожжей MTQ2 (от MethylTransferase glutamine(Q), ортолог HEMK2) образует нерастворимые агрегаты [26]. В культурах клеток млекопитающих нокдаун *TRMT112* не ведет к резкому уменьшению количества HEMK2, как в случае другого ее партнера – WBSCR22 [29]. Однако в клетках дрожжей нокдаун гомолога *TRMT112* уменьшает количество MTQ2, снижая, вероятно, ее стабильность [30].

Ген *HEMK2* человека, расположенный на хромосоме 21, кодирует как функциональную полноразмерную изоформу HEMK2 α , так и нефункциональную изоформу HEMK2 β , в которой отсутствует NPPY-мотив. Обе эти изоформы транскрибируются [1, 29, 31]. Однако нефункциональная изоформа HEMK2 β не способна взаимодействовать с TRMT112 [29]. Клетки мыши также содержат PRED28 α и PRED28 β (ортологи HEMK2 α и HEMK2 β соответственно) [31]. Локализация гена стала причиной появления альтернативного названия HEMK2 – C21orf127 (Chromosome 21 Open Reading Frame 127).

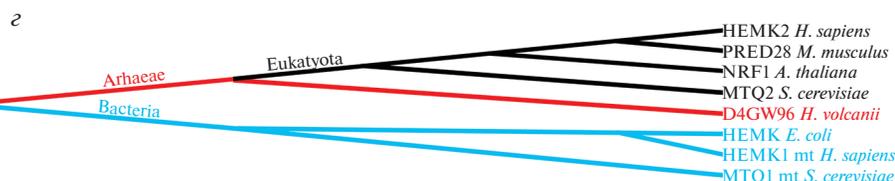
Данные о внутриклеточной локализации белка противоречивы. Методом иммуноокрашивания показана ядерная локализация PRED28 α и PRED28 β мыши [31]. На основании этих данных в базе Uniprot (идентификационный номер Q9Y5N5, дата обращения 23.11.2021) по аналогии также указана ядерная локализация HEMK2 человека. Однако с помощью измерения флуоресценции слитого с GFP белка NRF1 арабидопсиса (ортолог HEMK2) удалось обнаружить лишь в цитоплазме, но не в ядрах клеток [32]. Можно предположить, что добавление GFP влияет на способность метилазы оставаться в ядре. Воз-

Рис. 1. Структуры HEMK-подобных метилаз. На структуре и в последовательностях желтой линией выделен консервативный остаток пролина, зеленым показан консервативный глицин-богатый участок, фиолетовой линией – консервативный остаток аспартата кислой петли, красным – NPPY-мотив. а – Обобщенная схема функционального домена HEMK-подобных метилаз, образованного семью β -тяжами (обозначены оранжевым цветом), которые расположены в одной плоскости и окружены с двух сторон α -спиралями (выделены синим), по данным [16, 19]. б – Структуры функционального домена HEMK бактерии *E. coli* [22] (PDB: 1T43) и HEMK2 человека [2] (PDB: 6H1E). Структуры визуализированы с помощью BioRender.com. в – Сравнение аминокислотных последовательностей HEMK-подобных метилаз. Идентичные, а также сильно и слабо сходные по свойствам остатки выделены темно-серым, серым и светло-серым цветами соответственно. г – Дерево сходства последовательностей HEMK-подобных метилаз. Голубым выделены бактериальные и митохондриальные HEMK-подобные метилазы, красным – архейные, черным эукариотические.



6

HEMK2 <i>H. sapiens</i>	1	-----
PRED28 <i>M. musculus</i>	1	-----
MTQ2 <i>S. cerevisiae</i>	1	-----
NRF1 <i>A. thaliana</i>	1	-----
D4GW96 <i>H. volcanii</i>	1	-----
HEMK1 mt <i>H. sapiens</i>	1	MELWGRMLWALLSGPGRGSTRGWAFSSWQPPLAGLSSAIELVSHWTGVF--EKRGLP
MTQ1 mt <i>S. cerevisiae</i>	1	-----MP-----RISTSLIRKAS
HEMK <i>E. coli</i>	1	-----ME-----YQHWLREAISQLQASE
HEMK2 <i>H. sapiens</i>	1	-----MAGE-----
PRED28 <i>M. musculus</i>	1	-----MAAP-----
MTQ2 <i>S. cerevisiae</i>	1	-----
NRF1 <i>A. thaliana</i>	1	-----MADQGLEESNPMDSLKHPGGIVPTPH
D4GW96 <i>H. volcanii</i>	1	-----
HEMK1 mt <i>H. sapiens</i>	59	EARESSEYIVAVHLGAKTFQSLRPAWLT--QPLTSQQLQCIRESLSSRRLQRMVPVQ----
MTQ1 mt <i>S. cerevisiae</i>	14	RIRPGLHLLPECRTL--EQAKLEYKWLTEELP--PKSIRWACLQRVKHVPVLPQ----
HEMK <i>E. coli</i>	19	SPRRDAEILLEHVTGRGRTF--ILAFGE--TQLTDEQCQLDALLTRRRDGEPIA----
HEMK2 <i>H. sapiens</i>	5	----NFAT--PFHGHVGRGAFSDVYEPAEDTFLLLDALEAAAAELA-----GVEICLEV
PRED28 <i>M. musculus</i>	5	----SVPT--PLYGHVGRGAFRDVYEPAEDTFLLLDALEAAAAELA-----GVEICLEV
MTQ2 <i>S. cerevisiae</i>	1	----MLPT--P----YVKCDYDKVYEPAEDSFLILDCELEKHDPLK--QKFGNRLAIVCEI
NRF1 <i>A. thaliana</i>	27	SQVIYKMP--RIAAIRLVSSHREYVECCDPSFALVDALLADRNLNLI-----EHNPKICMIEI
D4GW96 <i>H. volcanii</i>	1	----MT--D--LAERRGMNTSVYQPAEDSGLLAQAAV-----GRVSGRVLV
HEMK1 mt <i>H. sapiens</i>	112	----YILGEWDFQGLSL--RMVPPVFIERPTEELVEWVLEEVQQRSHAVGSPGSPILILEV
MTQ1 mt <i>S. cerevisiae</i>	64	----YILRSQPFGLADI--VCKPGVLIERWETEEMVMAIIRALNNS--MLSRHTIPLHICDT
HEMK <i>E. coli</i>	70	----HLTGVREFWLSPL--FVSPATLIERPDETCLEVEQALARLPEQ-----PCRILDL
HEMK2 <i>H. sapiens</i>	53	GGSGVVSAPFLASM---IGPQALYMCIDINPEAACTLETARCNKV---HIQPVITDLV
PRED28 <i>M. musculus</i>	53	GAGSGVVSAPFLASM---IGPRALYMCIDINPEAACTLETARCNKV---HVQPVITDLV
MTQ2 <i>S. cerevisiae</i>	50	GGSGIVTTFIMQNKIIPQENSIHLAVDINPWALEATLDTAKLNSCK--SSFLEVIQADLN
NRF1 <i>A. thaliana</i>	82	GCGSGVYITSLILLQNEVPGVHYLAIDTNPITRVTKETLEAHGV---NADVICADLA
D4GW96 <i>H. volcanii</i>	40	GTGSGWVAEQATK----TDADVVASDLNPHACRQAAERAAALRADGHRGFEVVRGSL-
HEMK1 mt <i>H. sapiens</i>	167	GCGSCAISLSLSQ----LQSRVIAVDKREAAISLTHENAQRRLQDRIWIHLDMTSE
MTQ1 mt <i>S. cerevisiae</i>	118	FTGTCTALALSHG----IANCTFAIDVSTRAIKLVKENMLKNKVSGLLVQH--NILSS
HEMK <i>E. coli</i>	117	GTGTGALALALASE----RPDCEIIVDRMPDAVSLAQRNAQHAIKNIH-----ILQS
HEMK2 <i>H. sapiens</i>	106	KGLLPRLTEKVDLLVFNPPYVVTTP--QEVGSHG----IEAAWAGGRNGREVMDRFFPL
PRED28 <i>M. musculus</i>	106	HGLLPRLKGKVDLLVFNPPYVVTTP--EEVGSRG----IEAAWAGGRNGREVMDRFFPL
MTQ2 <i>S. cerevisiae</i>	109	SSI---RNNQVDVLIFFNPPYVPAECVPDVPGRSEADQWLDLALLGGKDGMAITDKLLRQ
NRF1 <i>A. thaliana</i>	138	TGLEKRLAGSVDVIVVFNPPYVTPPE--YEVGMEG----IASAWAGGNGERTVIDKLLPV
D4GW96 <i>H. volcanii</i>	94	--VEFFRDADFADAVFNPPYLPEDL-----EAARDWMEVALTGGEDGREIIDPFLOT
HEMK1 mt <i>H. sapiens</i>	223	RSWTHLPWGFMDLIVSNPPYVFHODMEQL--APEI--RSYEDPAALDGGEGMDIITHIAL
MTQ1 mt <i>S. cerevisiae</i>	173	KASDE--YPSHIDILTGNPPYIRKRDVFNDRVKTSTV--KLFEPRLALVGELECYINLVN---
HEMK <i>E. coli</i>	167	DWFSALAGQQFAMIVSNPPYIDEQDPHLQ--QGDV--RFEPLTALVAADSGMADIVHITIQ
HEMK2 <i>H. sapiens</i>	159	VPDLSRGLFYLVTKENNPETLKIM--KTRGLQGT---TALSRQAGQETLSVLKFTK
PRED28 <i>M. musculus</i>	159	APELLSRGLFYLVTKENNPETFKTM--KTRGLQGT---TALCRQAGQETLSVLRFSK
MTQ2 <i>S. cerevisiae</i>	166	LEQIISPDGVAYILFCARNKPKVIKRFV--DTYKWNVK---LIETRKAGWEVLSVYSFTR
NRF1 <i>A. thaliana</i>	191	VDLLSEKQWFLVLTLSNFPAAECLMM--RKKGYASR---IVVQRSTEEENLVILKFWR
D4GW96 <i>H. volcanii</i>	145	VGRVLPKPGCTVFLLVSSFTGYDEVLARA--EANGFGHE---VVVQESYPYETITVLAL-
HEMK1 mt <i>H. sapiens</i>	281	APRLKDSGSIFFLEVDPRHP--ELVSSWLQSRPDLYLNL---VAVRRDFCGRPRLHRRS
MTQ1 mt <i>S. cerevisiae</i>	227	--YWLPKTDSFFYEIGDVEQFNVVERR--IKEDSYLSRISIGLKYDSNGKARVVYGFKA
HEMK <i>E. coli</i>	224	SRNAIVSGFLLLEHGQQG--EAVRQAFIL--AGYHD---VETCRDYGDNERTVTLGRYY
HEMK2 <i>H. sapiens</i>	214	S-----
PRED28 <i>M. musculus</i>	214	S-----
MTQ2 <i>S. cerevisiae</i>	222	-----
NRF1 <i>A. thaliana</i>	246	DKDEESQDKETSSSSVFSQFSKLSLMEKQWR
D4GW96 <i>H. volcanii</i>	199	-----
HEMK1 mt <i>H. sapiens</i>	337	GP-----
MTQ1 mt <i>S. cerevisiae</i>	283	TPKGRILHQIFASFGTIRHLATALSGHKANC-N
HEMK <i>E. coli</i>	277	Q-----



можно, что локализация метилазы изменяется под действием неких факторов, которые не детектировались в исследованиях. Возможно, что внутриклеточная локализация ортологов в различных организмах не консервативна. Кроме того, предполагается, что малая молекулярная масса метилазы не должна затруднять ее перемещение между ядром и цитоплазмой, и фермент может локализоваться и в ядре, и в цитоплазме [31]. При этом НЕМК1 человека, сходная с бактериальным ферментом, ожидаемо локализуется в митохондриях [13].

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ НЕМК-ПОДОБНЫХ МЕТИЛАЗ

НЕМК-подобные метилазы бактерий

Скрининг профиля экспрессии мутантов *E. coli* с нокаутом *НЕМК* предсказывает влияние метилазы на экспрессию 3275 генов. В частности, нокаут *НЕМК* приводит к подавлению экспрессии генов, связанных с аэробным дыханием, но активирует экспрессию генов анаэробного дыхания. Однако нокаут *НЕМК* не влияет на уровень экспрессии фактора терминации RF1 [12] несмотря на то, что кодирующие их гены находятся в одном опероне [10, 14]. Но сверхэкспрессия *НЕМК* супрессирует токсичность, вызванную сверхэкспрессией гена, кодирующего фактор терминации трансляции RF2, что можно рассматривать как доказательство влияния *НЕМК* на RF2 [10]. Кроме того, у бактерий с нокаутом *НЕМК* повышена частота сквозного прочтения на стоп-кодонах UAG и UGA [12, 33]. Такие бактерии плохо растут на богатой среде и совсем не растут на бедной среде [10, 33]. Мутации и делеции гена *НЕМК* в штамме EC958 *E. coli* (подгруппа штамма ST121) вызывают повышение экспрессии генов, связанных с бактериальным жгутиком (флагеллой) и увеличение количества жгутиков, что ведет к увеличению ее подвижности. Комплементация мутаций и делеций этого гена приводят к восстановлению дикого типа клеток [34].

НЕМК-подобные метилазы эукариот и архей

Обнаружено, что ген *НЕМК2* человека, а также его ортологи у эукариот и архей связаны со множеством физиологических процессов, а его присутствие необходимо для нормального роста и развития клеток различных эукариот и архей и устойчивости в различных стрессовых условиях.

Так, у архей *Haloferax volcanii* нокаут по гену, кодирующему ортолог *НЕМК2*, увеличивает в 2 раза время, необходимое для одного раунда деления клеток, и приводит к уменьшению размера колоний [3].

Нокаут гена *MTQ2*, кодирующего цитозольный/ядерный дрожжевой ортолог *НЕМК2*, а равно внесение в него точечных мутаций, инактивирующих метилирующую активность, приводит к замедлению роста на стандартных средах, повышению чувствительности к падению температуры, высоким концентрациям солей, кальция, кофеина, а также к антибиотикам паромомицину, генетицину (регулируют трансляцию) и полимиксин-β-сульфату (влияет на синтез триглицеридов) [4, 21]. Показано, что *MTQ2* ассоциирован с 60S субъединицами рибосом и, вероятно, является фактором их экспорта из ядра. Нокаут гена *MTQ2* или его мутация, вызывающие потерю связывания белка с SAM или белковым субстратом, приводит к нарушению биогенеза 60S рибосом и “застреванию” предшественников 60S субъединиц в ядре. Также метилаза стимулирует созревание 5.8S и 25S рРНК у дрожжей [21] (рис. 2). Более того, отдельно показано, что дрожжевой гомолог TRMT112 необходим для биогенеза обеих субъединиц рибосом [30].

В клетках дрожжей нокаут митохондриального гена *MTQ1*, кодирующего ортолог *НЕМК1*, не приводит к замедлению роста на стандартных средах, однако замедляет его при росте на средах с неферментируемыми источниками углерода, спиртами, а также повышает эффективность сквозного прочтения стоп-кодонов [4].

Ген, кодирующий NRF1 (ортолог *НЕМК2*), экспрессируется во всех тканях цветкового растения *Arabidopsis thaliana*. Нокаут этого гена приводит к замедлению роста, уменьшению размеров и гиперчувствительности к дефициту железа. Последнее согласуется с тем, что функциональный белок NRF1 необходим для экспрессии большинства генов, индуцируемых недостатком железа, с чем и связано его название (Non-response To Fe-Deficiency 1). Более того, по данным Ribo-Seq нокаут метилазы NRF1 приводит к “зависанию” рибосом около стоп-кодона [32].

Показано, что ортолог *НЕМК2* активно экспрессируется в нервной системе круглого червя *Caenorhabditis elegans* [35]. Этот ген необходим для высвобождения ацетилхолина холинергическими нейронами. У мутантных по данному гену червей нарушены паттерны поведения, кроме того, они менее чувствительны к ингибиторам холинэстераз [35].

Нокаут ортологов генов *НЕМК1* и *НЕМК2* дрожофилы подавляет деление стволовых клеток кишечника, но не энтероцитов [36].

Ген *НЕМК2* человека и его мышинный ортолог экспрессируются во всех тканях, но данные по относительному уровню экспрессии в разных органах противоречивы [8, 31, 37]. Также показано, что сверхэкспрессия *НЕМК2* и его ортологов обеспечивает устойчивость клеток человека и

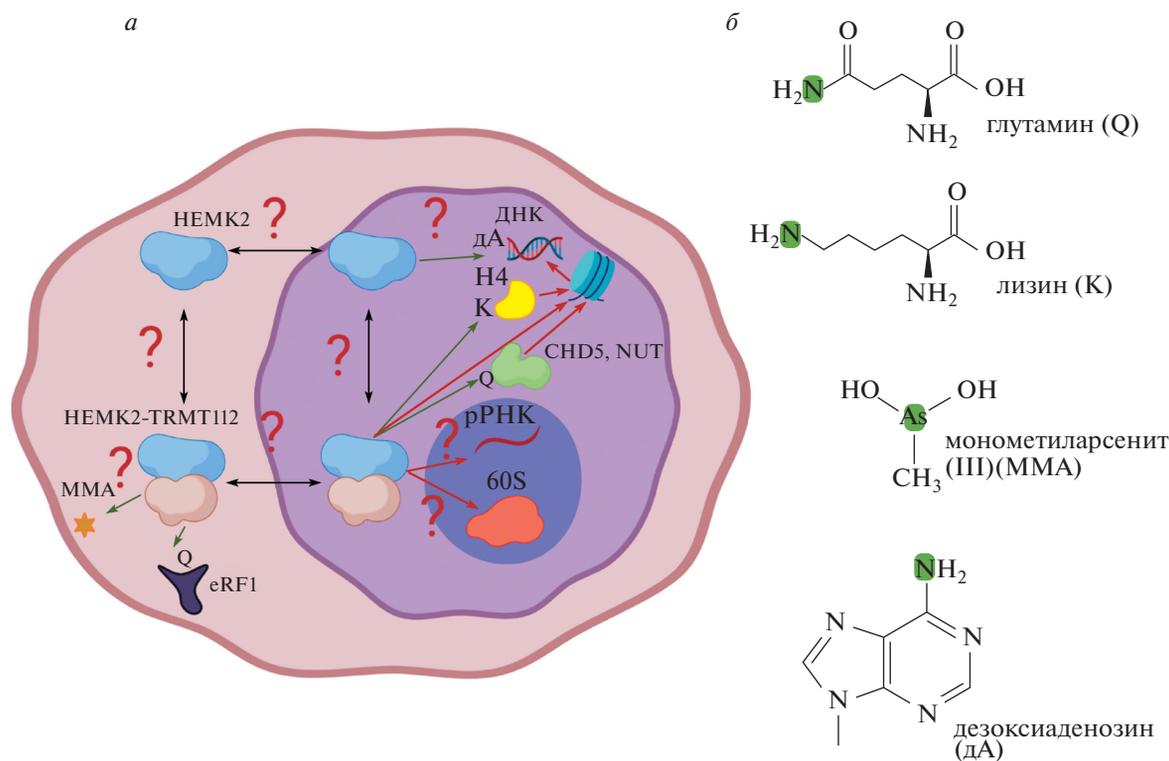


Рис. 2. Схема работы многофункциональной метилазы HEMK2 человека и ее эукариотических ортологов (а) и субстраты HEMK2 (б). Розовым выделена цитоплазма, фиолетовым – ядро. Черные стрелки показывают экспорт метилазы HEMK2 или ее комплекса с TRMT112 (HEMK2-TRMT112) через ядерную мембрану. Зеленые стрелки указывают на субстраты метилирования HEMK2 или HEMK2-TRMT112, красные – на связывание и влияние на функции. Зеленым цветом выделены метилируемые атомы. Рисунок нарисован с использованием BioRender.com.

дрожжей к некоторым соединениям мышьяка [8]. Число копий гена *HEMK2* и уровень его экспрессии понижены в клетках рака желудка и печени, что стимулирует их рост, формирование колоний, миграцию и инвазию. И, наоборот, сверхэкспрессия гена подавляет эти процессы [9]. В другом исследовании нокаут и нокадаун *HEMK2*, напротив, понижали скорость деления клеток рака простаты, но не влияли на такие неопухольевые клетки, как HEK293 или C2C12 [2]. Нокаут *HEMK2* в клетках K562 приводит к нарушению окислительного фосфорилирования [38]. Нокаут *HEMK2* вызывает эмбриональную летальность у мышей, обусловленную нарушением раннего эмбрионального развития, а нокадаун *HEMK2* в клеточной линии HEK-293T человека на 50–60% снижает пролиферацию клеток и несколько повышает уровень экспрессии белка-ингибитора циклинзависимой киназы p21, отвечающей за клеточный ответ на повреждение ДНК [39]. *HEMK2* считается также биомаркером некоторых заболеваний. Его экспрессия снижается при немелкоклеточном раке легкого (NSCLC) [40], а уровень белка HEMK2 повышен при миодистрофии Дюшенна [41]. С помощью коиммунопреципитации выявлена значительная представ-

ленность HEMK2 в области промоторов генов, что указывает на ее участие в регуляции транскрипции (табл. 1, рис. 2). Делеция *HEMK2* ведет к нарушению экспрессии генов, связанных с клеточным циклом [2].

Показано, что митохондриальный *HEMK1* крупного рогатого скота связан с развитием иммунной системы [42]. Однако нокаут *HEMK1* в клеточной линии HeLa человека не влияет значимо на рост клеток, число копий мтДНК, а также на мембранный потенциал митохондрий [13].

МЕТИЛИРУЕМЫЕ СУБСТРАТЫ HEMK-ПОДОБНЫХ МЕТИЛАЗ

Остаток глутамина в факторах терминации трансляции и в факторах ремоделирования хроматина

Показано, что как эукариотические/архейные, так и бактериальные HEMK-подобные метилазы метилируют остатки глутамина в составе белков в N5 положении [4–7, 10–13, 43–46]. Все остатки глутамина (Q), метилируемые HEMK2 человека, объединяет общий сайт узнавания: GQ⁰xxxR, где позиция метилируемого Q обозначена 0. Определена относительная эффективность метилирова-

Таблица 1. Функции НЕМК2 человека и ее ортологов

Функция	Организм	Комментарий	Ссылка
Метилирование остатка глутамина (Q) в факторах терминации трансляции I класса	Бактерии, археи, эукариоты		[4–7, 10–12, 43, 45, 46]
Метилирование остатка глутамина (Q) в факторах ремоделирования хроматина CHD5, NUT	Человек		[20, 45]
Метилирование остатка глутамина (Q) около 50 иных белков-кандидатов, в том числе участвующих в процессах трансляции (RRP1) и сигналинга (TGFB3, ARHGEF10)	Человек	Только биоинформатическое предсказание по аминокислотной последовательности оптимального сайта метилирования [45]	[45]
Метилирование остатка лизина (K) в гистоне H4	Человек		[2, 20]
Метилирование монометиларсенита	Человек, дрожжи	Физиологическое значение не установлено	[8, 27]
Метилирование неорганического трехвалентного арсенита	Дрожжи		[8, 27]
Метилирование остатка дезоксиаденозина	Человек	Подвергается сомнению [7, 22, 31]	[9]
Связывание хроматина в промоторных областях	Человек		[2]
Связывание и влияние на созревание 60S субъединицы	Дрожжи	Не ясна связь с процессом метилирования eRF1, которую обсуждают в [21]	[21]
Влияние на созревание 5.8S и 25S рРНК	Дрожжи	Механизм не показан, только констатация фенотипа мутантов [21]	[21]

ния пептидов, в которых присутствовал каждый возможный аминокислотный остаток в каждом положении от -6 до $+7$, по сравнению с последовательностью дикого типа. Так, в положении $+1$ наблюдается предпочтение остатков серина (S), аргинина (R) и глицина (G), а в $+7$ – остатка аргинина (R). Эти результаты получены на коротких пептидах [20, 45]. Предполагается, что такое метилирование глутамина необратимо [46].

Наиболее изученным и универсальным субстратом всех НЕМК-подобных метилаз является остаток глутамина в составе ультраконсервативного GGQ-мотива факторов терминации трансляции класса I (RF1, RF2 бактерий, aRF1 архей, митохондриальных mRF (mtRF) и цитоплазматического eRF1 эукариот). Показано, что этот остаток метилирован почти в 100% RF1 и RF2 *E. coli* [12, 43], в 50% митохондриального mRF1 дрожжей [4] и 50–75% цитоплазматических eRF1 дрожжей и человека [6, 39]. Однако в митохондриях человека митохондриальные факторы терминации трансляции и их производные метилированы на уровне всего нескольких процентов [13] (табл. 1, рис. 2).

НЕМК 2 метилирует также CHD5 и NUT, участвующие в ремоделировании хроматина и развитии рака [20, 45] (табл. 1, рис. 2). Анализ доменов белков выявил еще девять потенциальных белков-субстратов НЕМК2, в том числе участвующих в процессах трансляции (RRP1) и сигналинга (TGFB3, ARHGEF10). На возможность метилирования еще более 50 белков указывает анализ биоинформатических данных [45] (табл. 1, рис. 2).

Метилирование бактериальных RF1 и RF2 повышает константу гидролиза пептидил-тРНК (k_{cat}) на всех трех стоп-кодонах в 1.1–450 раз [43, 47–50], особенно сильно при гидролизе пептидил-тРНК, оканчивающихся остатками пролина (P) или глицина (G). У *E. coli* найдено 119 и 279 таких белков соответственно; их трансляция может быть наиболее чувствительной к метилированию [47]. Разница в значениях k_{cat} метилированной и неметилированной форм максимальна при кислых значениях pH (6–7) и минимальна при щелочных (7.0–8.5) [50]. Метилирование обуславливает также увеличение коэффициента специфичности гидролиза пептидил-тРНК (k_{cat}/K_M) с участием факторов терминации в 2–14 раз [43, 48, 49]. Интересно, что

различие в значениях k_{cat} и k_{cat}/K_M у неметилованных и метилированных форм снижается при увеличении длины пептида в *in vitro* системе [43]. Метилирование RF2 повышает также уровень гидролиза пептидил-тРНК при независимой от стоп-кодона терминации с участием ArfA/RF2 в 20 раз [48, 49]. Однако отсутствие функциональной митохондриальной HEMK1 не оказывает явного влияния на трансляцию белка в митохондриях [13], однако и уровень метилирования митохондриальных факторов значительно меньше, чем у бактерий (несколько процентов против почти 100%) [12, 13, 43].

Рентгеноструктурный анализ как бактериальных [49], так и эукариотических [51] комплексов рибосомы и факторов терминации, а также докинг бактериальных комплексов *in silico* [52] показывают, что метилирование остатка глутамин фактора терминации стабилизирует положение этого остатка и особенно его боковой группы, которая иначе не имеет фиксированного положения, что приводит к облегчению атаки на молекулу воды [49]. Показано также, что метилирование эукариотического eRF1 не влияет на конформацию свободной молекулы белка [53]. Для эффективного метилирования эукариотический eRF1 и архейный aRF1 должны находиться в составе тройного комплекса с GTP и eRF3 (или aRF3=aEF1 α), а сама метилаза – в гетерокомплексе с TRMT112 [1, 3, 6, 21, 26].

Предполагается, что процесс метилирования eRF1 в ядре с помощью дрожжевого MTQ2, ассоциированного с созревающими 60S субъединицами, может служить частью системы контроля качества рибосом [21].

На молекулярном уровне влияние метилирования eRF1 на его функционирование не показано. Известно лишь, что при нокауте NRF1 арабидопсиса происходит зависание рибосом в районе стоп-кодона, что может указывать на неэффективную терминацию трансляции в отсутствие метилирования eRF1 [32]. Обсуждается также возможность того, что отсутствие холодоустойчивости у клеток дрожжей с нокаутом *MTQ2* может быть связано с нарушениями аппарата трансляции [4].

Не обнаружено кросс-реактивности между бактериальными и эукариотическими/архейными HEMK-подобными метилазами. Показано, что HEMK *E. coli* не способна метилировать eRF1, в том числе в присутствии eRF3 и GTP [6]. Однако различные эукариотические ортологи HEMK2 частично кросс-реактивны: в частности, HEMK2 человека эффективно метилирует eRF1 дрожжей и, наоборот, MTQ2 дрожжей эффективно метилирует eRF1 человека [1, 6].

Остаток лизина в гистоне H4

Комплекс HEMK2–TRMT112 осуществляет монометилирование остатка лизина 12 в гистоне H4 (H4K12), что подтверждено как *in vitro*, так и *in vivo*. Это привело к появлению альтернативного названия HEMK2 – KMT9 (от Lysine (K) N-methyltransferase 9). В культурах клеток человека доля монометилированного гистона H4 составляет 0.04–0.12%, что сравнимо с долей иных модификаций гистоновых белков *in vivo* [2]. Метилирование остатков лизина и глутамин происходит в одном и том же активном центре, более того, метилируемый атом азота в обоих случаях расположен практически в одном и том же месте. Однако различаются некоторые аминокислотные остатки метилазы, важные для связывания, а также позиционирование белковой цепи субстрата. К примеру, HEMK2 с мутацией Y125A в NPPY-мотиве способна метилировать гистон H4, но не eRF1 [2, 20]. При этом, в отличие от eRF1, связывание гистона H4 происходит лишь в присутствии второго субстрата – SAM [2]. При pH 8.0 HEMK2–TRMT112 метилирует гистон H4 *in vitro* значительно хуже, чем eRF1. Эффективность метилирования остатка лизина повышается при защелачивании реакционной смеси вследствие депротонирования аминогруппы [7].

Этой модификацией остатка лизина гистона H4 обогащены промоторы генов, связанных с регуляцией клеточного цикла. Считается, что именно нарушение монометилирования H4K12 приводит к развитию рака предстательной железы при нарушении нормальной экспрессии HEMK2 [2].

Соединения мышьяка

Соединения мышьяка токсичны для человека, они вызывают развитие рака, болезней нервной, эндокринной, сердечно-сосудистой, дыхательной, пищеварительной, половой и выделительной систем. Предполагается, что они участвуют в повреждении молекул ДНК, изменении профиля репарации и метилирования, хромосомных перестройках, нарушении клеточного цикла. В организме неорганические арсенаты восстанавливаются до трехвалентного состояния (арсениты) и подвергаются моно- и диметилированию. При этом физиологическая роль данного процесса окончательно не ясна и остается дискуссионной, так как метилированные арсениты считаются более токсичными, чем неметилированные [54, 55].

В клетках человека метилирование трехвалентного неорганического арсенита до моно- и диметильных производных осуществляется специализированной метилазой AS3MT [54], HEMK2 же участвует лишь в метилировании наиболее токсичного монометиларсенита до диметиларсенита (табл. 1, рис. 2). Уровень экспрессии *AS3MT* в

клетках человека значительно выше, чем *HEMK2* [8]. Показано, что сверхэкспрессия *HEMK2* обеспечивает устойчивость клеточной культуры UROtsa человека к неорганическому арсениту и монометиларсениту [8]. На подобную функцию *in vivo* указывает корреляция между различными полиморфизмами *HEMK2* и содержанием монометиларсенита в выделениях жительниц Аргентинских Анд [56]. Предполагается, что *HEMK2* может метилировать монометиларсенит параллельно с AS3MT, что функционально значимо только при определенных условиях или в определенных тканях [8].

В отличие от *HEMK2* человека, *MTQ2* дрожжей метилирует не только монометиларсенит, но и неорганический трехвалентный арсенит с образованием монометиларсенита, что ведет к активации *Hog1* в *NOG*-сигнальном пути (табл. 1). Это, по-видимому, блокирует возможность дальнейшего проникновения соединений мышьяка в клетку. Нокаут гена данного фермента повышает устойчивость дрожжей к неорганическому арсениту, но не к монометиларсениту. Для нормального функционирования в данном процессе метилаза должна находиться в комплексе с *TRMT112* [8, 27].

Остаток дезоксиаденозина в ДНК

N^6 -метил-2'-дезоксиаденозин (6mA) — распространенная модификация остатка дезоксиаденозина в ДНК бактерий, связанная с функционированием систем рестрикции-модификации, репарации, репликации и сегрегации хромосом. В ДНК различных групп эукариот в последнее время также выявляют 6mA, уровень которого значительно ниже, чем у прокариот. Показано, что эта модификация может участвовать в регуляции хроматина, активации и подавлении экспрессии генов, в процессах эмбрионального развития. При этом физиологическая роль 6mA и его доля в различных группах эукариот отличаются. Наименьшая доля (порядка 10^{-2} – 10^{-4} %) характерна для позвоночных [9, 57–59]. Стоит отметить, что остаток аденозина в РНК бактерий и эукариот также подвергаются этой модификации, что важно для функционирования многих тРНК и рРНК, но данный процесс осуществляют иные ферменты [60].

N^6 -метилирование дезоксиаденозина в ДНК эукариот катализируют разные ферменты. Согласно биоинформатическим данным, метилазы N^6 -аденозина и N^6 -дезоксиаденозина независимо появлялись в разных группах эукариот не менее 13 раз [58].

Предполагается, что в метилировании остатка дезоксиаденозина до 6mA в ДНК инфузорий, дрожифил, зеленых водорослей участвуют *MTA70*-по-

добные метилазы. У зеленых водорослей в этом могут участвовать и *Dams*-подобные метилазы [58]. Найдена и описана *MTA70*-подобная метилаза *DAMT-1*, катализирующая эту реакцию у *C. elegans* [61]. Однако у человека фермент, метилирующий остаток дезоксиаденозина до 6mA, не обнаружен. Предполагается, что эту реакцию может осуществлять *HEMK2* (табл. 1, рис. 2). Во-первых, *HEMK*-подобные метилазы по структуре своего функционального домена близки к группе γ N^6 -аденин-ДНК-метилаз [62]. Во-вторых, по некоторым данным, *HEMK2*, содержащая *NPY*-мотив, необходима для появления 6mA в ДНК *in vivo* и *in vitro* [9]. Доля 6mA в геномной ДНК человека положительно коррелирует с уровнем экспрессии *HEMK2*, а их уровень понижен в опухолевых клетках. Обратные эффекты вызывает деметилаза *ALKBH1*. Доля 6mA в образцах крови человека составляет около 0.056%. Большая абсолютная доля метилирования приходится на межгенные участки, а относительная — на экзоны [9]. Исходя из этого, *HEMK2* имеет еще одно (альтернативное) название — *N6AMT1* (от N^6 Adenine-Specific DNA Methyltransferase 1).

Однако эти данные не подтверждены результатами других исследователей. Так обнаружено, что идентичный натуральному (свободный от тагов и дополнительных аминокислот) рекомбинантный *HEMK2*–*TRMT112*, полученный в клетках *E. coli*, способен метилировать как остаток глутамина в *eRF1*, так и остаток лизина в гистоне *H4*, но не мог метилировать остаток дезоксиаденозина в ДНК [7]. Это согласуется с данными, также не подтверждающими возможность *HEMK2* катализировать реакцию метилирования остатка дезоксиаденозина [22, 31]. Кроме того, известен и другой потенциальный кандидат на роль метилазы остатка дезоксиаденозина — *METL-4* — гомолог метилазы *DAMT-1* *C. elegans* [58]. Таким образом, функция метилирования остатка дезоксиаденозина в ДНК с помощью *HEMK2* остается спорной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя все имеющиеся на сегодняшний момент данные, можно заключить, что *HEMK2* человека и ее ортологи у других эукариот и архей представляет собой необычный пример многофункциональной метилазы, катализирующей несколько различных реакций. Обычно многофункциональность фермента достигается за счет нескольких структурно обособленных доменов, каждый из которых катализирует собственную реакцию, аллостерически контролирует другой домен или взаимодействует с клеточным окружением, как это происходит у белков, обладающих дополнительными (moonlighting) функциями [63–66]. Однако известны и многофункциональные ферменты, в которых один и тот же домен (и даже один актив-

ный сайт) в зависимости от условий может катализировать несколько различных реакций, как это наблюдается у неразборчивых (promiscuous) ферментов. Часть этих реакций, вероятно, побочные, но другая часть может иметь физиологическое значение [65, 67–69]. HEMK2 можно отнести как раз к неразборчивым ферментам. Несмотря на то, что не ясно, насколько физиологически равнозначны реакции метилирования ее многочисленных субстратов, делаются попытки разработать цельную модель физиологической функции HEMK2 и ее эукариотических ортологов. Предложена модель, в которой SAM, в том числе через HEMK1 и HEMK2, служит основным регулятором трансляции в стволовых клетках кишечника, что влияет на активность их деления [36].

Не до конца понятен точный спектр субстратов HEMK2 и ее ортологов. Так, спорным выглядит метилирование ими остатка дезоксиаденозина [7, 22, 31]. Напротив, можно ожидать, что HEMK2 способна метилировать аспарагин так же, как глутамин. Обнаружено N-4-метилирование аспарагина в C-фикоцианине *Anabaena variabilis*. При этом остаток аспарагина находится после двух остатков глицина (GGN), что напоминает метилируемый мотив GGQ в факторах терминации. Замена аспарагина на глутамин приводит к *in vivo* метилированию глутамина, поэтому было выдвинуто предположение, что либо метилазы, осуществляющие данную реакцию, способны использовать в качестве субстрата оба аминокислотных остатка, либо за это ответственны два разных фермента [70, 71]. Однако показано, что HEMK2 не способна метилировать пептид, содержащий такую замену [45]. Таким образом, метилирование аспарагина в GGN-мотиве осуществляют, вероятно, близкие гомологи HEMK2.

HEMK2 это многофункциональный фермент, поэтому нельзя однозначно связать физиологические эффекты, вызываемые их нокаутом и нокдауном, с метилированием конкретных молекул, так как механистическую роль одновременного метилирования всех субстратов HEMK2 и ее ортологов до настоящего времени не изучали. Для того, чтобы научиться адресно контролировать процессы, зависящие от метилируемых молекул, требуется тщательное изучение механизмов модификации каждого субстрата на молекулярном уровне.

Помимо влияния на эффективность трансляции посредством метилирования eRF1, MTQ2 (дрожжевой ортолог HEMK2) участвует в биогенезе и экспорте созревших 60S субъединиц из ядра, а также в созревании 5.8S и 25S рРНК. Однако не очень понятно, почему такая функция ортолога связана с присутствием в нем отдельных аминокислот, участвующих в метилировании. Предполагается, что либо для правильного биогенеза 60S субъединиц и рРНК необходима проверка ка-

чества собранных рибосом с участием метилированного eRF1, либо в этот процесс вовлечены иные субстраты метилазы [21]. Также можно предположить, что эти аминокислотные остатки важны для поддержания правильной структуры метилазы, необходимой для ее функционирования в процессе созревания 60S субъединиц рибосомы. Остается непонятным, насколько этот процесс консервативен и касается других групп живых существ, включая человека.

Известно также, что некоторые факторы трансляции выполняют многочисленные функции вне трансляции. К примеру, eEF1 α слизевика *Dictyostelium* может связывать и модулировать актин [72, 73], eEF1 α человека и лягушки – связывать и участвовать в разрывании микротрубочек [74], растительный eEF1 α – активировать фосфатидилинозитол-4-киназу [75]. А изучение дрожжей, мутантных по факторам терминации трансляции eRF1 и eRF3, указывает на то, что их нормальное функционирование связано не только непосредственно с осуществлением терминации, но и с многочисленными клеточными процессами [76]. Все это поднимает вопрос о значении взаимного влияния процесса терминации и иных клеточных процессов, в том числе и у рассматриваемых HEMK-подобных метилаз.

Мы предполагаем, что комплекс HEMK2–TRMT112 активен как в цитоплазме, где он метилирует монометиларсенит и eRF1, так и в ядре, где метилирует гистон H4, регуляторы хроматина CHD5 и NUT. В ядре этот комплекс может регулировать созревание рРНК и 60S субъединиц по аналогии с дрожжами. Более того, HEMK2 может быть вовлечена в метилирование ДНК. Однако множество аспектов этого процесса остаются не раскрытыми. В частности, не ясно, каким образом происходит и как регулируется транспорт HEMK2, TRMT112 или их комплекса через ядерную мембрану (табл. 1, рис. 2).

Работа по анализу влияния HEMK-подобных метилаз на терминацию трансляции проведена при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 14-14-00487), физиологическое значение HEMK-подобных метилаз изучали при поддержке гранта Российского научного фонда (19-14-00349).

В настоящей работе не использовали людей или животных в качестве объектов исследования

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Figaro S., Scrima N., Buckingham R.H., Heurgué-Hamard V. (2008) HemK2 protein, encoded on human chromosome 21, methylates translation termination factor eRF1. *FEBS Lett.* **582**, 2352–2356.

2. Metzger E., Wang S., Urban S., Willmann D., Schmidt A., Offermann A., Allen A., Sum M., Obier N., Cottard F., Ulferts S., Preca B.-T., Hermann B., Maurer J., Gerschik H., Hornung V., Einsle O., Perner S., Imhof A., Jung M., Schüle R. (2019) KMT9 monomethylates histone H4 lysine 12 and controls proliferation of prostate cancer cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 361–371.
3. van Tran N., Muller L., Ross R.L., Lestini R., Létoquart J., Ulryck N., Limbach P.A., de Crécy-Lagard V., Cianféroni S., Graille M. (2018) Evolutionary insights into Trm112-methyltransferase holoenzymes involved in translation between archaea and eukaryotes. *Nucl. Acids Res.* **46**, 8483–8499.
4. Polevoda B., Span L., Sherman F. (2006) The yeast translation release factors Mrf1p and Sup45p (eRF1) are methylated, respectively, by the methyltransferases Mtt1p and Mtt2p. *J. Biol. Chem.* **281**, 2562–2571.
5. Polevoda B., Sherman F. (2007) Methylation of proteins involved in translation. *Mol. Microbiol.* **65**, 590–606.
6. Heurgué-Hamard V., Champ S., Mora L., Merkoulova-Rainon T., Kisselev L.L., Buckingham R.H. (2005) The glutamine residue of the conserved GGQ motif in *Saccharomyces cerevisiae* release factor eRF1 is methylated by the product of the *YDR140w* gene. *J. Biol. Chem.* **280**, 2439–2445.
7. Woodcock C.B., Yu D., Zhang X., Cheng X. (2019) Human HemK2/KMT9/N6AMT1 is an active protein methyltransferase, but does not act on DNA *in vitro*, in the presence of Trm112. *Cell Discov.* **5**, 50.
8. Ren X., Aleshin M., Jo W.J., Dills R., Kalman D.A., Vulpe C.D., Smith M.T., Zhang L. (2011) Involvement of N-6 adenine-specific DNA methyltransferase 1 (N6AMT1) in arsenic biomethylation and its role in arsenic-induced toxicity. *Environ. Hlth Perspect.* **119**, 771–777.
9. Xiao C.-L., Zhu S., He M., Chen D., Zhang Q., Chen Y., Yu G., Liu J., Xie S.-Q., Luo F., Liang Z., Wang D.-P., Bo X.-C., Gu X.-F., Wang K., Yan G.-R. (2018) N6-methyladenine DNA modification in the human genome. *Mol. Cell.* **71**, 306–318.e7.
10. Heurgue-Hamard V. (2002) The *hemK* gene in *Escherichia coli* encodes the N5-glutamine methyltransferase that modifies peptide release factors. *EMBO J.* **21**, 769–778.
11. Ishizawa T., Nozaki Y., Ueda T., Takeuchi N. (2008) The human mitochondrial translation release factor HMRF1L is methylated in the GGQ motif by the methyltransferase HMPrmC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**, 99–103.
12. Nakahigashi K., Kubo N., Narita S., Shimaoka T., Goto S., Oshima T., Mori H., Maeda M., Wada C., Inokuchi H. (2002) HemK, a class of protein methyl transferase with similarity to DNA methyl transferases, methylates polypeptide chain release factors, and *hemK* knockout induces defects in translational termination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 1473–1478.
13. Fang Q., Kimura Y. (2021) Mammalian HEMK1 methylates glutamine residue of the GGQ motif of mitochondrial release factors. *Research Square.* 1–21. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1049003/v1>
14. Nakayashiki T., Nishimura K., Inokuchi H. (1995) Cloning and sequencing of a previously unidentified gene that is involved in the biosynthesis of heme in *Escherichia coli*. *Gene.* **153**, 67–70.
15. Sergiev P.V., Aleksashin N.A., Chugunova A.A., Polikanov Y.S., Dontsova O.A. (2018) Structural and evolutionary insights into ribosomal RNA methylation. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 226–235.
16. Schubert H.L., Phillips J.D., Hill C.P. (2003) Structures along the catalytic pathway of PrmC/HemK, an N5-glutamine AdoMet-dependent methyltransferase. *Biochemistry.* **42**, 5592–5599.
17. Liger D., Mora L., Lazar N., Figaro S., Henri J., Scrima N., Buckingham R.H., van Tilbeurgh H., Heurgué-Hamard V., Graille M. (2011) Mechanism of activation of methyltransferases involved in translation by the Trm112 ‘hub’ protein. *Nucl. Acids Res.* **39**, 6249–6259.
18. Martin J.L., McMillan F.M. (2002) SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 783–793.
19. Schubert H.L., Blumenthal R.M., Cheng X. (2003) Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 329–335.
20. Gao J., Wang B., Yu H., Wu G., Wan C., Liu W., Liao S., Cheng L., Zhu Z. (2020) Structural insight into HEMK2–TRMT112-mediated glutamine methylation. *Biochem. J.* **477**, 3833–3838.
21. Lacoux C., Wacheul L., Saraf K., Pythoud N., Huvelle E., Figaro S., Graille M., Carapito C., Lafontaine D.L.J., Heurgué-Hamard V. (2020) The catalytic activity of the translation termination factor methyltransferase Mtt2-Trm112 complex is required for large ribosomal subunit biogenesis. *Nucl. Acids Res.* **48**, 12310–12325.
22. Yang Z., Shipman L., Zhang M., Anton B.P., Roberts R.J., Cheng X. (2004) Structural characterization and comparative phylogenetic analysis of *Escherichia coli* HemK, a protein (N5)-glutamine methyltransferase. *J. Mol. Biol.* **340**, 695–706.
23. Holtkamp W., Kokic G., Jager M., Mittelstaet J., Komar A.A., Rodnina M.V. (2015) Cotranslational protein folding on the ribosome monitored in real time. *Science.* **350**, 1104–1107.
24. Mercier E., Rodnina M.V. (2018) Co-translational folding trajectory of the HemK helical domain. *Biochemistry.* **57**, 3460–3464.
25. Liutkute M., Maiti M., Samatova E., Enderlein J., Rodnina M.V. (2020) Gradual compaction of the nascent peptide during cotranslational folding on the ribosome. *ELife.* **9**, e60895.
26. Heurgué-Hamard V., Graille M., Scrima N., Ulryck N., Champ S., van Tilbeurgh H., Buckingham R.H. (2006) The zinc finger protein Ynr046w is plurifunctional and a component of the eRF1 methyltransferase in yeast. *J. Biol. Chem.* **281**, 36140–36148.
27. Lee J., Levin D.E. (2018) Intracellular mechanism by which arsenite activates the yeast stress MAPK Hog1. *Mol. Biol. Cell.* **29**, 1904–1915.
28. Bourgeois G., Létoquart J., van Tran N., Graille M. (2017) Trm112, a protein activator of methyltransferases modifying actors of the eukaryotic translational apparatus. *Biomolecules.* **7**, 7.

29. Leetsi L., Öunap K., Abroi A., Kurg R. (2019) The common partner of several methyltransferases TRMT112 regulates the expression of N6AMT1 isoforms in mammalian cells. *Biomolecules*. **9**, 422.
30. Sardana R., Johnson A.W. (2012) The methyltransferase adaptor protein Trm112 is involved in biogenesis of both ribosomal subunits. *Mol. Biol. Cell*. **23**, 4313–4322.
31. Ratel D., Ravanat J.-L., Charles M.-P., Platet N., Breuillaud L., Lunardi J., Berger F., Wion D. (2006) Undetectable levels of N6-methyl adenine in mouse DNA: cloning and analysis of *PRED28*, a gene coding for a putative mammalian DNA adenine methyltransferase. *FEBS Lett*. **580**, 3179–3184.
32. Kailasam S., Singh S., Liu M., Lin C., Yeh K. (2020) A HemK class glutamine-methyltransferase is involved in the termination of translation and essential for iron homeostasis in *Arabidopsis*. *New Phytol*. **226**, 1361–1374.
33. Mora L., Heurgué-Hamard V., de Zamaroczy M., Kervestin S., Buckingham R.H. (2007) Methylation of bacterial release factors RF1 and RF2 is required for normal translation termination *in vivo*. *J. Biol. Chem*. **282**, 35638–35645.
34. Kakkanat A., Phan M.-D., Lo A.W., Beatson S.A., Schembri M.A. (2017) Novel genes associated with enhanced motility of *Escherichia coli* ST131. *PLoS One*. **12**, e0176290.
35. Nordquist S.K., Smith S.R., Pierce J.T. (2018) Systematic functional characterization of human 21st chromosome orthologs in *Caenorhabditis elegans*. *G3 Genes Genomes Genet*. **8**, 967–979.
36. Obata F., Tsuda-Sakurai K., Yamazaki T., Nishio R., Nishimura K., Kimura M., Funakoshi M., Miura M. (2018) Nutritional control of stem cell division through S-adenosylmethionine in *Drosophila* intestine. *Dev. Cell*. **44**, 741–751.e3.
37. Fagerberg L., Hallström B.M., Oksvold P., Kampf C., Djureinovic D., Odeberg J., Habuka M., Tahmasebpour S., Danielsson A., Edlund K., Asplund A., Sjöstedt E., Lundberg E., Szgyarto C.A.-K., Skogs M., Takanen J.O., Berling H., Tegel H., Mulder J., Nilsson P., Schwenk J., Lindskog C., Danielsson F., Mardinoglu A., Sivertsson A., von Feilitzen K., Forsberg M., Zvalnen M., Olsson I., Navani S., Huss M., Nielsen J., Ponten F., Uhlén M. (2014) Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell. Proteom*. **13**, 397–406.
38. Arroyo J.D., Jourdain A.A., Calvo S.E., Ballarano C.A., Doench J.G., Root D.E., Mootha V.K. (2016) A genome-wide CRISPR death screen identifies genes essential for oxidative phosphorylation. *Cell Metabolism*. **24**, 875–885.
39. Liu P., Nie S., Li B., Yang Z.-Q., Xu Z.-M., Fei J., Lin C., Zeng R., Xu G.-L. (2010) Deficiency in a glutamine-specific methyltransferase for release factor causes mouse embryonic lethality. *Mol. Cell. Biol*. **30**, 4245–4253.
40. Liang B., Shao Y., Long F., Jiang S.-J. (2016) Predicting diagnostic gene biomarkers for non-small-cell lung cancer. *BioMed Res. Internat*. **2016**, 1–8.
41. Spitali P., Hettne K., Tsonaka R., Charrout M., van den Bergen J., Koeks Z., Kan H.E., Hooijmans M.T., Roos A., Straub V., Muntoni F., Al-Khalili-Szigyarto C., Koel-Simmelink M.J.A., Teunissen C.E., Lochmüller H., Niks E.H., Aartsma-Rus A. (2018) Tracking disease progression non-invasively in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *J. Cachexia, Sarcopenia Muscle*. **9**, 715–726.
42. Wagner P., Yin T., Brügemann K., Engel P., Weimann C., Schlez K., König S. (2021) Genome-wide associations for microscopic differential somatic cell count and specific mastitis pathogens in Holstein cows in compost-bedded pack and cubicle farming systems. *Animals*. **11**, 1839.
43. Dincbas-Renqvist V. (2000) A post-translational modification in the GGQ motif of RF2 from *Escherichia coli* stimulates termination of translation. *EMBO J*. **19**, 6900–6907.
44. Desai N., Yang H., Chandrasekaran V., Kazi R., Minczuk M., Ramakrishnan V. (2020) Elongational stalling activates mitoribosome-associated quality control. *Science*. **370**, 1105–1110.
45. Kusevic D., Kudithipudi S., Jeltsch A. (2016) Substrate specificity of the HEMK2 protein glutamine methyltransferase and identification of novel substrates. *J. Biol. Chem*. **291**, 6124–6133.
46. Schubert H.L. (2006) 14 modification of glutamine residues in proteins involved in translation. *Enzymes*. **24**, 437–453.
47. Pierson W.E., Hoffer E.D., Keedy H.E., Simms C.L., Dunham C.M., Zaher H.S. (2016) Uniformity of peptide release is maintained by methylation of release factors. *Cell Rep*. **17**, 11–18.
48. Zeng F., Jin H. (2016) Peptide release promoted by methylated RF2 and ArfA in nonstop translation is achieved by an induced-fit mechanism. *RNA*. **22**, 49–60.
49. Zeng F., Jin H. (2018) Conformation of methylated GGQ in the peptidyl transferase center during translation termination. *Sci. Rep*. **8**, 2349.
50. Indrisiunaite G., Pavlov M.Y., Heurgué-Hamard V., Ehrenberg M. (2015) On the pH dependence of class-1 RF-dependent termination of mRNA translation. *J. Mol. Biol*. **427**, 1848–1860.
51. Li W., Chang S.T.-L., Ward F.R., Cate J.H.D. (2020) Selective inhibition of human translation termination by a drug-like compound. *Nat. Commun*. **11**, 4941.
52. Trobro S., Åqvist J. (2007) A model for how ribosomal release factors induce peptidyl-tRNA cleavage in termination of protein synthesis. *Mol. Cell*. **27**, 758–766.
53. Andér M., Åqvist J. (2009) Does glutamine methylation affect the intrinsic conformation of the universally conserved GGQ motif in ribosomal release factors? *Biochemistry*. **48**, 3483–3489.
54. Thomas D.J., Li J., Waters S.B., Xing W., Adair B.M., Drobna Z., Devesa V., Styblo M. (2007) Arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase and the methylation of arsenicals. *Exp. Biol. Med*. **232**, 3–13.
55. Kapaj S., Peterson H., Liber K., Bhattacharya P. (2006) Human health effects from chronic arsenic poisoning – a review. *J. Env. Sci. Hlth. Part A*. **41**, 2399–2428.
56. Harari F., Engström K., Concha G., Colque G., Vahter M., Broberg K. (2013) N6-adenine-specific DNA methyltransferase 1 (N6AMT1) polymorphisms and

- arsenic methylation in Andean women. *Environ. Health Perspect.* **121**, 797–803.
57. Parashar N.C., Parashar G., Nayyar H., Sandhir R. (2018) N6-adenine DNA methylation demystified in eukaryotic genome: from biology to pathology. *Biochimie.* **144**, 56–62.
 58. Iyer L.M., Zhang D., Aravind L. (2016) Adenine methylation in eukaryotes: apprehending the complex evolutionary history and functional potential of an epigenetic modification. *BioEssays.* **38**, 27–40.
 59. Ratel D., Ravanat J.-L., Berger F., Wion D. (2006) N6-methyladenine: the other methylated base of DNA. *BioEssays.* **28**, 309–315.
 60. Sergiev P.V., Golovina A.Y., Osterman I.A., Nesterchuk M.V., Sergeeva O.V., Chugunova A.A., Evfratov S.A., Andreianova E.S., Pletnev P.I., Laptev I.G., Petriukov K.S., Navalayeu T.I., Koteliansky V.E., Bogdanov A.A., Dontsova O.A. (2016) N6-methylated adenosine in RNA: from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* **428**, 2134–2145.
 61. Greer E.L., Blanco M.A., Gu L., Sendinc E., Liu J., Aristizábal-Corrales D., Hsu C.-H., Aravind L., He C., Shi Y. (2015) DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans*. *Cell.* **161**, 868–878.
 62. Bujnicki J.M., Radlinska M. (1999) Is the HemK family of putative S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases a “missing” zeta subfamily of adenine methyltransferases? A hypothesis. *Internat. Union Biochem. Mol. Biol. Life.* **48**, 247–249.
 63. Kirschner K., Bisswanger H. (1976) Multifunctional proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 143–166.
 64. Jeffery C.J. (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 8–11.
 65. Copley S. (2003) Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 265–272.
 66. Moore B.D. (2004) Bifunctional and moonlighting enzymes: lighting the way to regulatory control. *Trends Plant Sci.* **9**, 221–228.
 67. O’Brien P.J., Herschlag D. (1999) Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. *Chem. Biol.* **6**, R91–R105.
 68. Hult K., Berglund P. (2007) Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends Biotechnol.* **25**, 231–238.
 69. Seelig B. (2017) Multifunctional enzymes from reduced genomes – model proteins for simple primordial metabolism? *Mol. Microbiol.* **105**, 505–507.
 70. Thomas B.A., McMahon L.P., Klotz A.V. (1995) N5-methylasparagine and energy-transfer efficiency in C-phycocyanin. *Biochemistry.* **34**, 3758–3770.
 71. Clarke S. (2002) The methylator meets the terminator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 1104–1106.
 72. Demma M., Warren V., Hock R., Dharmawardhane S., Condeelis J. (1990) Isolation of an abundant 50000-dalton actin filament bundling protein from *Dictyostelium amoebae*. *J. Biol. Chem.* **265**, 2286–2291.
 73. Edmonds B.T., Murray J., Condeelis J. (1995) pH regulation of the F-actin binding properties of *Dictyostelium* elongation factor 1 α . *J. Biol. Chem.* **270**, 15222–15230.
 74. Shiina N., Gotoh Y., Kubomura N., Iwamatsu A., Nishida E. (1994) Microtubule severing by elongation factor 1 α . *Science.* **266**, 282–285.
 75. Yang W., Burkhardt W., Cavallius J., Merrick W.C., Boss W.F. (1993) Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-kinase activator in carrot cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 392–398.
 76. Inge-Vechtomov S., Zhouavleva G., Philippe M. (2003) Eukaryotic release factors (eRFs) history. *Biol. Cell.* **95**, 195–209.

HEMK-LIKE METHYLTRANSFERASES IN THE REGULATION OF CELLULAR PROCESSES

N. S. Biziaev¹, A. V. Shuvalov^{1, 2}, and E. Z. Alkalaeva^{1, 2, *}

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

² Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: alkalaeva@eimb.ru

Methylation is one of the most common modifications of proteins and nucleic acids. In particular, such modification is widely used to control translation. HEMK2 stands out among all human translational methyltransferases (methylases). Its orthologs have been found in many prokaryotes and eukaryotes. The substrates methylated by HEMK2 are glutamine and lysine residues in proteins, deoxyadenosine in DNA, and arsenic compounds (arsenicals). One of the important substrate of HEMK2 methylase is a glutamine residue in the GGQ ultra-conservative motif of the eukaryotic release factor 1 (eRF1). The process of release factor methylation, carried out by HEMK2 orthologues, is conservative among eukaryotes, archaea, and bacteria, although release factors in bacteria have different sequences and structure. In this review, we consider the features of human HEMK2 methylase and its orthologs as multifunctional enzymes that regulate cellular processes, in particular, protein biosynthesis.

Keywords: HEMK2, N6AMT1, eRF1, translation regulation, methylation, post-translational modifications

УДК 577.217

ДИНАМИКА СТРУКТУРЫ мРНК ЭУКАРИОТ В ХОДЕ ТРАНСЛЯЦИИ© 2022 г. Н. С. Бизязев^а, Т. В. Егорова^{а, б}, Е. З. Алкалаева^{а, б, *}^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия^бЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Москва, 119991 Россия

*e-mail: alkalaeva@eimb.ru

Поступила в редакцию 02.11.2021 г.

После доработки 07.12.2021 г.

Принята к публикации 07.12.2021 г.

На настоящий момент нет единого представления о том, какую пространственную структуру образует мРНК в ходе трансляции. Известно, что множество белков, связанных с 5'-концом мРНК, взаимодействуют с белками, связанными с 3'-концом. Более того, такие белки часто влияют на активность друг друга. В пределах одной молекулы мРНК это возможно лишь тогда, когда мРНК образует кольцевую структуру, в которой ее концы сближены. В 90-х годах XX века изучение таких белков привело к появлению гипотезы о существовании структуры трансляционно активной мРНК, представляющей собой замкнутую петлю (closed-loop), в которой концы молекулы зафиксированы рядом друг с другом с помощью белковых и/или РНК-взаимодействий. Однако затем стали появляться свидетельства того, что сближение концов мРНК и формирование closed-loop-структуры не обязательно для трансляции некоторых мРНК. Более того, в некоторых работах утверждалось, что транслируемая мРНК, напротив, должна быть развернута в линейную структуру. Таким образом, пространственная структура транслируемой мРНК не обязательно должна быть универсальной для всех мРНК и может динамически меняться, что влияет на ее функциональную активность. В рамках данного обзора мы обобщили разнообразие экспериментальных данных и гипотез о связи пространственной структуры мРНК с ее трансляционной активностью.

Ключевые слова: трансляция, мРНК, closed-loop мРНК, eIF4F, PABP, рибосома**DOI:** 10.31857/S002689842203003X**ВВЕДЕНИЕ**

Пространственная организация биологических макромолекул важна для их функционирования. Эукариотические мРНК в основном моноцистронны, т.е. кодируют один белок, и имеют в своем составе следующие структурные элементы (рис. 1а): 5'-конец, защищенный кеп-структурой; 5'-нетранслируемую область (5'-НТО); последовательность, кодирующую белок, и 3'-НТО, которая оканчивается поли(А)-хвостом. Необходимо отметить однако, что не все мРНК полиаденилированы, например, гистоновые мРНК часто не содержат поли(А) [1, 2].

В ходе взаимодействия с рибосомой и трансляции молекула мРНК, а также связанные с ней белковые комплексы претерпевают значительные пространственные перестройки. Поэтому для понимания особенностей трансляции мРНК мало лишь изучить ее структуру *in vitro*, необходимо получить информацию о функционально активной конформации этой молекулы *in vivo*. В данном

обзоре мы проанализируем разнообразие взглядов на пространственную организацию трансляционно активной мРНК. На сегодняшний день можно выделить три основных гипотезы (рис. 1б), каждую из них мы рассмотрим в соответствующем разделе. Согласно первой гипотезе трансляционно активна та мРНК, в структуре которой 5'- и 3'-концы молекулы сближены. Согласно второй, напротив, трансляционно активна развернутая мРНК, в которой 5'- и 3'-концы удалены друг от друга. Третья гипотеза предполагает, что структура мРНК динамична, поэтому трансляционная активность мРНК имеет сложную зависимость от ее пространственной организации и иных факторов.

I. ТРАНСЛЯЦИОННО АКТИВНА мРНК СО СБЛИЖЕННЫМИ 5'- И 3'-КОНЦАМИ (CLOSED-LOOP-СТРУКТУРА)

В середине 60-х годов XX века с развитием методов определения пространственной структуры больших молекул стало возможным визуализиро-

Сокращения: eIF – эукариотический фактор инициации трансляции; eRF – эукариотический фактор терминации трансляции; PABP – поли(А)-связывающий белок; НТО – нетранслируемая область мРНК.

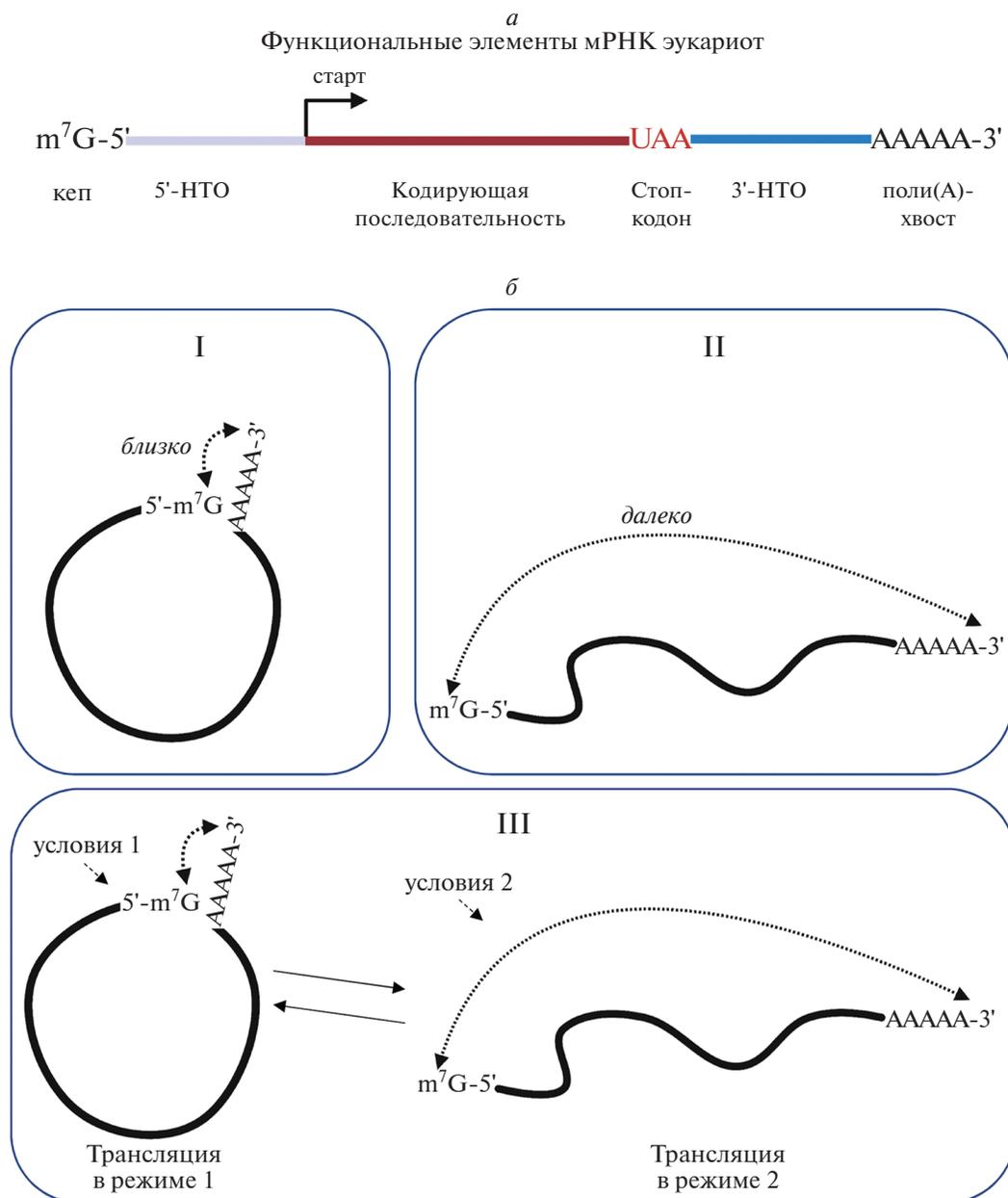


Рис. 1. Представления о структуре мРНК эукариот. *a* – Функциональные элементы мРНК эукариот. С 5'-конца мРНК защищена кеп-структурой, с 3'-конца – поли(А)-хвостом. Кодирующая последовательность фланкирована нетранслируемыми областями (НТО), УАА – пример стоп-кодона, которым заканчивается кодирующая последовательность. *b* – Представления о различных пространственных структурах трансляционно активных мРНК. I – Трансляционно активна мРНК со сближенными 5'- и 3'-концами (структура closed-loop). II – Трансляционно активна линейная мРНК. III – Структура мРНК динамична. Создано с помощью BioRender.com.

вать полисомы – несколько рибосом, одновременно транслирующих белок с одной молекулы мРНК. Обнаружено, что линия из визуализированных рибосом в полисеме может загибаться, в результате чего сближаются ее концы, что может свидетельствовать об аналогичном сближении пространственно удаленных участков самой мРНК [3]. Такие структуры также можно интерпретировать как следствие сближения 5'-конца

мРНК и района стоп-кодона, так как в 3'-нетранслируемой области рибосомы в норме отсутствуют [4]. При этом установить точную конформацию мРНК в экспериментах с полисомами не представляется возможным, так как мРНК такими методами не визуализируется. Уже в 90-х годах с помощью атомно-силовой микроскопии было показано, что в растворе в присутствии эукариотического кеп-связывающего фактора ини-

Таблица 1. Разнообразие closed-loop-структур мРНК

Организм	5'-Концевые элементы	Связующие элементы	3'-Концевые элементы	Ссылка
Эукариоты	eIF4E (на кепе)	eIF4G; eIF4G-eIF4A-eIF4B; eIF4G-eIF4A/eIF3-PAIP1	PAVP (на поли(А)-хвосте)	[1, 5, 8–15, 20, 21, 27]
Вирус гриппа	eIF4E (на кепе); NS1 (на сайте в 5'-НТО)	eIF4G; NS1; NS1-eIF4G	PAVP (на поли(А)-хвосте)	[37, 42, 43]
Ротавирусы	eIF4E (на кепе)	eIF4G	NSP3 (на GACC в 3'-НТО)	[19, 22, 44–47]
Tombusviridae и Luteoviridae	Шпилька в мРНК	–	3'-CITE структура мРНК	[1, 51–54]
Эукариоты	eIF4E (на кепе)	(4E-HP)-Bicoid	BBR-элемент (в 3'-НТО)	[55, 56]
		Maskin-CREB	CRE-элемент (в 3'-НТО)	[58, 61]
		eIF4G-eIF3-SLIP	SLBP (на SL петле в 3'-НТО)	[1, 65–68]
		eIF4G-eIF3-METTL3	Gm ⁶ AGG (в 3'-НТО)	[70]
Человек	Ago2 (на кепе)	–	микроРНК, комплементарная участку в 3'-НТО	[63]
Млекопитающие	eIF4E (на кепе)	eIF4G-GAIT комплекс	GAIT-связывающий участок в 3'-НТО	[64]

циации 4E (eIF4E), поли(А)-связывающего белка (PAVP) и eIF4G¹, который связывает оба этих белка, мРНК фиксируется в циркуляризованном состоянии, тогда как в отсутствие какого-либо из указанных белков этого не происходит [5]. Однако в этой работе для увеличения персистентной длины мРНК использовали длинную антисмысловую ДНК, комплементарную 82% ее полной последовательности, что, как указывают другие авторы [6], препятствует спонтанной циркуляризации молекулы и, возможно, значительно усиливает необходимость PAVP, а также комплекса eIF4E, состоящего из факторов инициации eIF4E, eIF4G и eIF4A, для стабилизации замкнутой структуры. В другой работе с помощью формальдегида проводили быструю сшивку компонентов клетки, находящихся рядом друг с другом. Обнаружено, что eIF4E, связанный на 5'-кепе, часто сшивается с 3'-последовательностями мРНК, а PAVP – с 5'-концевыми последовательностями (но в меньшей степени). Это указывает на физическое сближение eIF4E с 3'-концом мРНК, а PAVP – с 5'-концом [7]. Параллельно стали появляться биохимические свидетельства взаимодействия PAVP и eIF4E, которое приводит к активации трансляции (синергии) в модельных *in vitro* системах [5, 7–15]. В присутствии в системе данных белков проявляется также синергия в активации трансляции такими структур-

ными элементами мРНК, как поли(А)-хвост и кеп [12, 14–18]. В отсутствие поли(А) последовательности eIF4G и PAVP взаимодействуют слабо [19], что указывает на необходимость связывания PAVP с концом мРНК для активации трансляции. Все эти свидетельства привели к формированию гипотезы, согласно которой трансляционно активна мРНК, имеющая структуру со сближенными 5'- и 3'-концами. Эта структура фиксируется взаимодействующими друг с другом белками, которые связаны с разными концами мРНК, или непосредственным взаимодействием участков РНК. Такая структура получила название замкнутой петли (closed-loop). Классическим примером такой структуры считается closed-loop-структура мРНК, зафиксированная взаимодействиями белков eIF4E, eIF4G, eIF4B, eIF3 и PAVP (табл. 1) (рис. 2a).

Взаимодействие в растворе показано как для пар белков инициаторного комплекса eIF4E, eIF4G, eIF4B и eIF3, так и для белков eIF4G и PAVP млекопитающих, земноводных, насекомых, дрожжей и растений [9, 10, 13, 19–27]. Так как эти трансляционные факторы обнаружены у подавляющего большинства эукариот [28], можно предположить, что модель closed-loop является универсальной. Впоследствии обнаружили множество других примеров взаимного влияния связанных с мРНК факторов трансляции различных эукариотических организмов. Так, например, белок PAIP1 взаимодействует как с PAVP, так и с факторами инициации трансляции eIF3 и eIF4A, связывающимися eIF4G. Показано, что взаимодей-

¹ Здесь и далее названия факторов трансляции даны по классификации, принятой у высших эукариот, хотя их ортологи у других организмов могут иметь иное наименование.

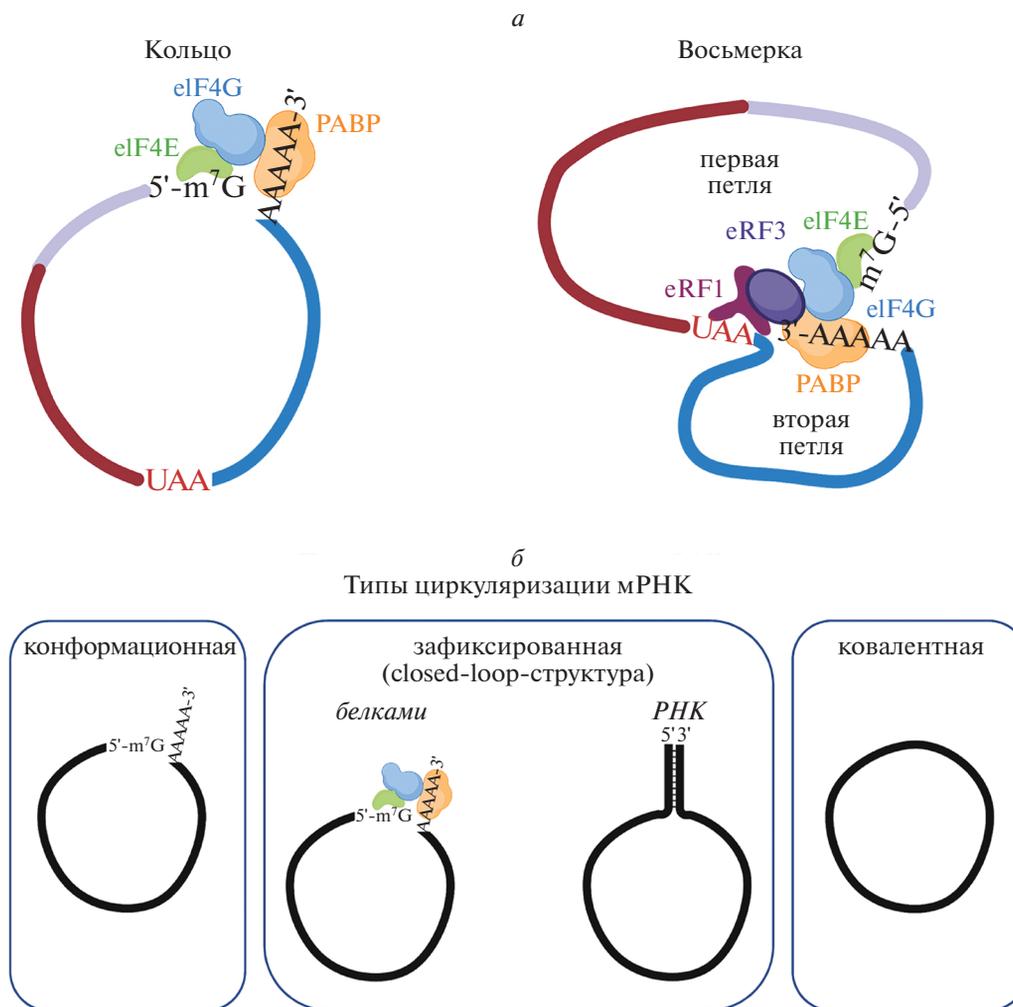


Рис. 2. Разнообразие циркуляризованных структур мРНК. *a* – Модели closed-loop-структур мРНК. Серым обозначена 5'-НТО, красным – основная кодирующая последовательность, синим – 3'-НТО. В кольце кеп-связывающий eIF4E взаимодействует с eIF4G, который также взаимодействует с PABP. За счет этого в мРНК пространственно сближаются 5'- и 3'-концы мРНК. В восьмерке PABP не только взаимодействует с eIF4G–eIF4E, но также связывает eRF3, находящийся в комплексе с eRF1. Во время терминации комплекс eRF1–eRF3 связывает рибосому на стоп-кодоне. За счет таких взаимодействий стоп-кодон (UAA), поли(A)-хвост и кеп взаимно сближаются. Для этого должна формироваться первая петля (из 5'-НТО и кодирующей области) и вторая петля (из 3'-НТО). *b* – Возможные типы циркуляризации мРНК. Создано с помощью BioRender.com.

ствии PAIP1 и eIF3 активирует инициацию трансляции. Считается, что через взаимодействие с eIF3 PAIP1 дополнительно стабилизирует структуру closed-loop, образованную eIF4F–PABP [1, 20, 21].

Обнаружено взаимодействие между PABP и фактором терминации трансляции 3 (eRF3) у дрожжей и человека, что указывает на возможное пространственное сближение поли(A)-хвоста и района стоп-кодона [29–33]. Также показана консервативность взаимодействия гомологов eRF3 и PABP у эукариот [29]. Кроме того, eRF3 может формировать комплекс с PABP, еще одним белком комплекса closed-loop, PAIP1 [34]. Обнаружено, что трансляция и, в частности, стадия

терминации активируются в результате взаимодействия eRF3 с PABP [31–33]. При этом ингибирование взаимодействия eRF3 и PABP в системе из ретикулоцитов кролика не влияет на формирование 80S инициаторных комплексов, но понижает общий уровень трансляции [32]. Имеются также экспериментальные свидетельства того, что связанный с поли(A) PABP может оказывать положительное воздействие на трансляцию и в отсутствие связи с eIF4F [31, 35–37], что также говорит в пользу функциональной значимости кеп-независимых замкнутых структур мРНК (например, при образовании комплекса поли(A)–PABP–eRF3–стоп-кодон). Более того, внутриклеточная концентрация PABP в 3–10 раз превышает концентрацию

eIF4G в клетках млекопитающих и дрожжей, что также указывает на возможность существования таких структур [38, 39]. Все это позволило предложить более сложную пространственную модель мРНК, имеющую структуру в виде восьмерки, в которой одновременно сближены 5'- и 3'-концы мРНК, а также район стоп-кодона (рис. 2a) [32]. В такой структуре можно выделить первую петлю, начинающуюся от 5'-конца и заканчивающуюся стоп-кодоном, и вторую петлю — от стоп-кодона до 3'-конца. Модель формирования второй петли объясняет как связанный с поли(А)-хвостом РАВР стимулирует терминацию трансляции на стоп-кодоне, который в последовательности мРНК обычно значительно удален от поли(А)-хвоста. Эта модель подтверждается еще и тем, что в клетках дрожжей РАВР-зависимая супрессия сквозного чтения стоп-кодонов происходит даже в отсутствие eRF3 [33], а значит, независимо от терминации трансляции, но с сохранением возможности пространственного сближения со стоп-кодоном. Стоит отметить, что в активации терминации трансляции может участвовать и PAIP1, который входит в состав первой петли мРНК и в присутствии eRF1 и eRF3 стабилизирует посттерминационные комплексы рибосом, если в смеси отсутствует РАВР [34]. Помимо этого, пространственное сближение РАВР с природным стоп-кодоном также подавляет на нем процесс нонсенс-опосредованного распада мРНК (NMD), конкурирующего с терминацией [40, 41].

Гипотеза формирования closed-loop-структур также прекрасно объясняет взаимное влияние на трансляцию других белков и РНК-последовательностей, находящихся в противоположных участках мРНК (табл. 1). К примеру, белок NS1 вируса гриппа связывается со специфичным сайтом в 5'-НТО полиаденилированной вирусной мРНК и взаимодействует одновременно со связанными на ней же eIF4G и РАВР, что специфически повышает эффективность трансляции вирусных мРНК [37, 42, 43] (табл. 1). Однако многие вирусы используют стратегию разрушения closed-loop-структуры, образованной eIF4G и РАВР, для подавления трансляции клеточных мРНК. Так, в мРНК ротавирусов, содержащей 5'-кеп, в отсутствие поли(А)-хвоста closed-loop-структура может формироваться посредством взаимодействия комплекса eIF4E-eIF4G с вирусным белком NSP3, связывающимся с последовательностью GACC в 3'-НТО. NSP3 конкурирует с РАВР за связывание с eIF4G, что также ведет к переходу РАВР из цитоплазмы в ядро. Под действием белка NSP3 происходит разрушение классических closed-loop-структур, вызванных взаимодействием eIF4F-РАВР. Все это ведет к супрессии трансляции мРНК хозяина и, напротив, к активации трансляции вирусных мРНК [19, 22, 44–47] (табл. 1). Более того, целевыми последова-

тельными многих протеаз других вирусов служат белки eIF4G и РАВР, что во многих случаях нарушает их взаимодействие [37, 48–50]. Нацеленность вирусов на разрушение взаимодействия eIF4G и РАВР свидетельствует о важности структуры closed-loop для инициации трансляции мРНК хозяина. Альтернативная closed-loop-структура образуется при трансляции одноцепочечных РНК(+) вирусов, относящихся к семействам Tombusviridae и Luteoviridae. В 3'-НТО мРНК этих вирусов содержится последовательности, формирующие кеп-независимые трансляционные элементы (SITE). Эти последовательности связывают комплекс eIF4F и рекрутируют его в область, расположенную перед старт-кодоном, иницируя трансляцию мРНК. SITE сближается с 5'-НТО за счет РНК-РНК-взаимодействий, формируя closed-loop-структуру, необходимую для активации трансляции. Экспериментально показано, что нарушение таких взаимодействий приводит к ингибированию инициации трансляции [1, 51–54] (табл. 1). Кроме того, обнаружено, что часть собственных клеточных систем репрессии трансляции функционирует аналогично вирусным, действуя через конкуренцию за взаимодействие с компонентами, образующими closed-loop-структуру eIF4E-eIF4G-РАВР. Так, в регуляции развития дрозофилы и лягушек происходит связывание белков-регуляторов с 3'-НТО, что ведет к привлечению 4E-связывающих белков (4E-ВР), которые взаимодействуют с eIF4E, вытесняя eIF4G. К примеру, белок Viscoid связывает VBR-элемент в 3'-НТО и 4E-связывающий белок 4E-ВР, который, в свою очередь, связывает eIF4E, вытесняя его из комплекса с eIF4G (табл. 1). Однако в большинстве комплексов (4E-ВР)-eIF4E аффинность последнего к кепу меньше, чем в комплексе с eIF4G, так что не ясно, возможно ли формирование closed-loop-структур через 4E-ВР как альтернативы разрушения closed-loop-структуры РАВР-eIF4G-eIF4E. Стоит отметить, что часть 4E-ВР функционирует именно путем разрушения такой closed-loop-структуры [23, 55–60]. Интересно, что у земноводных образование closed-loop-структуры 3'-НТО-CREB-Maskin-eIF4E-кеп ведет к маскировке мРНК в процессе эмбриогенеза и сопряжено с деаденилированием, что исключает формирование трансляционно активной closed-loop-структуры с участием РАВР. В процессе демаскировки, напротив, происходит разрушение closed-loop-структуры с участием CREB, а также аденилирование мРНК [58, 61]. У мышей обнаружена CREB-зависимая циркадная ритмичность процессов деаденилирования и аденилирования отдельных мРНК, что позволяет контролировать трансляцию [62] (табл. 1). В клетках человека ингибиторный комплекс может образовываться посредством связывания микроРНК с участком 3'-НТО, с которой может взаимодействовать белок аргонавт (Ago2),

имеющий кеп-связывающий домен [63] (табл. 1). Интересно, что появление дополнительной петли в closed-loop-структуре может приводить к подавлению трансляции, формируя альтернативные структуры мРНК, организованные в виде восьмерки. Так, под воздействием интерферона- γ в макрофагах собирается комплекс GAIT, состоящий из тРНК-синтазы, глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы, рибосомного белка L13a и некоторых других. Этот комплекс связывается как со специальным участком посадки в 3'-НТО, так и с eIF4G, находящимся в составе closed-loop-структуры с eIF4E и PABP. Образование такой структуры позволяет пространственно сблизить комплекс GAIT с 5'-НТО, что препятствует сборке на нем 43S преинициаторного комплекса [64] (табл. 1). Еще один случай образования альтернативной структуры closed-loop – трансляция гистоновых мРНК. Показано, что у значительного количества гистоновых мРНК многоклеточных животных отсутствует поли(A)-хвост, но в 3'-НТО находится SL-петля. Closed-loop-структура таких мРНК формируется за счет последовательного взаимодействия SL-петли мРНК и 5'-кепа через белки SLBP-SLIP-eIF3-eIF4G-eIF4E. Показано, что взаимодействия SL-петли и SLBP играют ключевую роль в созревании, деградации и трансляции гистоновых мРНК. Предполагается, что описанная closed-loop-структура, как и образованная eIF4G-PABP, активирует инициацию трансляции [1, 65–68] (табл. 1). Гомологичные SL-петле структуры гистоновых мРНК и гомологи SLBP обнаружены у многих протистов, что говорит об эволюционной древности данной системы [69]. Наконец, недавно показали, что метилтрансфераза METTL3 и фактор инициации eIF3 солокализованы в цитоплазме и в их присутствии полисомы формируют преимущественно компактные кольцеобразные структуры, что не наблюдается в отсутствие METTL3. При дальнейшем изучении обнаружили, что METTL3 одновременно связывается как с GGAC-сайтом в 3'-НТО, так и с eIF3, связанным с белками на кепе. При этом METTL3 метилирует аденозин в консенсусной последовательности GGAC. В присутствии eIF3 и METTL3 повышается эффективность трансляции мРНК, содержащих этот сайт, даже в отсутствие поли(A)-хвоста. Это не наблюдается при ингибировании взаимодействия METTL3 и eIF3. METTL3 – это N⁶-аденозин-метилтрансфераза, активность которой вовлечена в регуляцию трансляции многих онкогенов (в частности, рецептора EGFR в клетках легких) и генов, связанных с апоптозом. Сверхэкспрессия гена, кодирующего этот белок, стимулирует развитие рака легкого, тогда как сверхэкспрессия гена, кодирующего мутантный METTL3, не способный связывать eIF3, не вызывает такого эффекта. Все это свидетельствует о ключевой роли именно closed-loop-структуры, а не

только паттерна метилирования [70] в онкогенной активности METTL3 (табл. 1).

В поддержку существования и функциональной значимости closed-loop-структур мРНК свидетельствует феномен самопроизвольной циркуляризации мРНК в отсутствие специализированных белков (рис. 2б). *In silico* расчеты предсказывают, что концы большинства мРНК в растворе конформационно сближены (<10 нм) [71–75], что подтверждается *in vitro* экспериментами в отсутствие белков, способных стабилизировать такую структуру [76, 77]. Дистанция между концами не зависит от длины мРНК и от ее последовательности [72, 73, 77]. Таким образом, циркуляризация мРНК – это свойство, присущее большинству мРНК, а не результат отбора определенной последовательности [72, 74, 76–78]. Конечно, на это можно возразить, что с началом трансляции рибосомы будут непрерывно плавить вторичную структуру мРНК и этот фактор спонтанного сближения концов перестанет существовать. Однако неясно, каким образом происходит инициация трансляции в closed-loop-структуре и имеется ли там стадия сканирования лидерной последовательности мРНК, в ходе которой будет происходить плавление вторичной структуры. Внедрение в мРНК неструктурированных последовательностей (к примеру, поли(СА)) приводит к расхождению концов мРНК [77]. Соответственно, присутствие комплекса из белков, связанных на разных концах РНК, по-видимому, не является необходимым условием циркуляризации РНК (рис. 2б) [6]. Напротив, способность РНК к циркуляризации может быть использована для организации на ее концах регуляторных белковых комплексов [78]. Добавление поли(A)-хвоста к РНК ведет к увеличению расстояния между ее концами: так, поли(A)-хвост из 30 н. увеличивает его на 5 нм. Таким образом, поли(A)-хвост, не участвуя во взаимодействии с 5'-концом, образует выпетливание из циркуляризованной РНК [77], которое затем может быть исправлено взаимодействиями белков в составе closed-loop-структуры. *In vivo* картирование внутримолекулярных взаимодействий РНК выявило активное спаривание регионов, удаленных друг от друга в первичной структуре [79–81], что может в целом стабилизировать циркуляризованную структуру мРНК. Таким образом, конформация мРНК в closed-loop-моделях близка к ее конформации в отсутствие каких-либо связанных с ней белков, а значит, сворачивание и поддержание closed-loop-структуры мРНК не должны быть энергозатратными для клетки процессами.

Все эти данные позволяют сделать вывод, что формирование closed-loop-структур мРНК играет значительную роль в активации как трансляции в целом, так и ее отдельных этапов. Эта гипотеза успешно предсказывает взаимное влия-

ние на трансляцию белков, связывающихся в противоположных частях мРНК, что отражено в публикациях последних лет [31, 34, 70, 82].

Модель мРНК, имеющей структуру в виде восьмерки (рис. 2а), наиболее полно объясняет вовлечение рибосом в новые раунды трансляции после терминции, наблюдаемое в ряде работ [83, 84]. Согласно этой модели, районы стоп-кодона и 5'-кепа пространственно сближены, что повышает локальную концентрацию компонентов терминции, рециклинга и инициации, а также позволяет 5'-кеп-связанным белкам на прямую взаимодействовать с рибосомой, находящейся в районе стоп-кодона. Предполагается, что такая closed-loop-структура активирует инициацию трансляции путем рекрутирования субъединиц рибосом, формируя 48S инициаторный комплекс [1, 9, 85].

Однако при обсуждении вклада closed-loop-структуры в регуляцию трансляции следует учитывать, что образующие ее белки могут взаимодействовать и активировать друг друга не только в составе такой структуры, но и в свободном состоянии в растворе [1]. Например, если отсутствие белков eIF4G и PABP в клетках человека или дрожжей летально, то отсутствие взаимодействий между ними не летально [86–88]. Также возможно и взаимное влияние белков, связанных с разными молекулами мРНК. К примеру, мРНК, содержащая поли(А)-хвост, стимулирует как трансляцию в целом, так и эффективность терминции трансляции на другой молекуле мРНК без поли(А)-хвоста [31, 89]. Поэтому вопрос о реальном вкладе взаимодействия белков, находящихся на одной молекуле мРНК, в активность трансляции остается открытым.

С другой стороны, циркуляризованная мРНК может быть зафиксирована не только посредством белков (рис. 2б). Например, трансляция мРНК с комплементарными друг другу 5'-НТО и 3'-НТО длиной 30 н., но без 5'-кепа и поли(А)-хвоста, в лизате протекает не менее эффективно, чем трансляция мРНК с той же кодирующей последовательностью, имеющей 5'-кеп и поли(А), и способной образовывать closed-loop-структуру с участием eIF4G и PABP. При этом контрольная мРНК без таких структур транслируется в 3 раза хуже [90]. Стоит упомянуть однако, что у этой работы есть существенные недостатки, которые могут влиять на интерпретацию данных. Так, трансляцию проводили в лизате ретикулоцитов кролика (RRL), где, как известно, плохо воспроизводится как зависимость трансляции от m^7G -кепа, так и синергия между кепом и поли(А)-хвостом. В другой работе показано, что кодирующая последовательность в составе ковалентно циркуляризованной РНК (рис. 2б) может транслироваться в культуре клеток человека и дрозофилы за счет

внутреннего сайта посадки рибосомы (IRES). При добавлении поли(А) или поли(Т)-последовательностей в эту мРНК эффективность трансляции, в отличие от мРНК в closed-loop-структуре, понижается [91]. Интересно, что удалось добиться IRES-зависимой трансляции ковалентно циркуляризованных мРНК по механизму катящегося кольца (рибосома непрерывно транслирует циркуляризованную мРНК по кругу) [92]. В дальнейшем *in vitro* в том же лизате и *in vivo* в культуре клеток HeLa удалось провести трансляцию по механизму катящегося кольца с ковалентно циркуляризованной мРНК, не содержащей IRES, но содержащей неструктурированный участок. Более того, трансляция мРНК размером 129–380 н. происходит значительно лучше в ковалентно циркуляризованной структуре по сравнению с линейной молекулой [93]. Согласно последним исследованиям, клетки эукариот содержат значимое количество ковалентно циркуляризованных РНК, большая часть которых не транслируется, но участвует в различных клеточных процессах (к примеру, в привлечении микроРНК для подавления трансляции). Так что пространственное сближение (а в данном случае даже соединение) концов РНК играет роль не только в функционировании мРНК [94, 95].

Подводя итог, можно сказать, что модель closed-loop-структуры трансляционно активной мРНК имеет множество экспериментальных подтверждений, что делает ее (на сегодняшний момент) наиболее вероятной.

II. ТРАНСЛЯЦИОННО АКТИВНА ЛИНЕЙНАЯ мРНК

Несмотря на множество данных, подтверждающих существование и функциональность closed-loop-структуры, в последнее время стали появляться факты, не укладывающиеся в эту гипотезу. Так недавнее изучение динамики пространственной структуры РНК в клетках методами одномолекулярной флуоресцентной *in situ* гибридизации (smFISH) и микроскопии с помощью отжига коротких антисмысловых флуоресцентных нуклеотидов, комплементарных различным регионам мРНК, показало, что расстояние между концами мРНК повышается с увеличением плотности рибосом, и что активно транслируемые мРНК находятся в конформации, в которой их концы значительно удалены друг от друга [24, 96]. Обработка клеток как пуромицином, вызывающим диссоциацию рибосом с мРНК, так и гомохарингонином, фиксирующим иницирующие рибосомы, приводит к увеличению количества циркуляризованной мРНК. Ингибирование взаимодействия eIF4G и PABP в активно транслирующих клетках никак не влияет на количество циркуляризованной мРНК в сравнении с клетками,

где такое взаимодействие не подавлено. Авторы этих исследований заключили, что наблюдаемый эффект прямо противоположен ожидаемому согласно гипотезе о closed-loop-структуре и, таким образом, опровергает ее. Они считают, что данные *in vivo* более приближены к реальности, чем полученные *in vitro* результаты, на которых базируется первая гипотеза. На основании этого предложена альтернативная гипотеза, согласно которой в клетках функционально активна линейная мРНК [24, 96]. Однако стоит отметить, что структура РНК в этих исследованиях была визуализирована отжигом множества антисмысловых олигонуклеотидов, что могло снизить эффективность образования циркуляризованной мРНК и, соответственно, перевести ее в расплетенную форму, поэтому говорить о полном соответствии модели условиям в клетке не приходится.

В других экспериментах, проведенных на дрожжах, где изучали эффективность трансляции большого количества различных клеточных мРНК (а не единичных модельных мРНК, как делали ранее), обнаружили, что трансляция мРНК с длинными кодирующими последовательностями, в отличие от коротких, относительно слабо или вообще не зависела от eIF4F и PABP, т.е. не была связана с формированием closed-loop-структуры [87, 97]. Эти данные заставляют задуматься о реальном вкладе образования closed-loop-структур мРНК в активацию трансляции.

Тем не менее, представления о трансляционно активной линейной мРНК не объясняют, почему множество элементов, находящихся в одном регионе мРНК, влияет на эффективность элементов, находящихся в других регионах. Эта гипотеза выглядит слишком строгой, а ее выводы пока плохо предсказывают ожидаемую эффективность трансляции мРНК. В настоящий момент имеется альтернативная гипотеза о структуре функциональной мРНК в клетке, подразумевающая синтез двух описанных выше гипотез.

III. СТРУКТУРА мРНК ДИНАМИЧНА

В последнее время появляются свидетельства того, что структура трансляционно активной мРНК динамична, а значит, простой связи между структурой мРНК и ее функцией, как предполагают предыдущие гипотезы, может и не быть [1, 6].

Так, показано, что в клетке различные мРНК имеют разную пространственную структуру. Методами электронной и криоэлектронной микроскопии полисом (как свободных, так и связанных с эндоплазматическим ретикуломом) обнаружены различные формы их пространственной организации, лишь часть из которых образует кольцеобразную структуру [3, 4, 35, 98–102]. Более того,

пространственная организация транслирующихся полисом динамична: первые связавшиеся с мРНК рибосомы в основном формируют кольцеобразную или линейную полисому, связывание большего количества рибосом (до плотности 1 рибосома на 100 н.) приводит к преимущественной линейаризации полисом и дальнейшему формированию более сложных компактных трехмерных петлеобразных структур. Однако кольцеобразные и линейные формы встречаются на любых этапах [100]. Показано также, что в бесклеточной системе трансляции доля кольцеобразных полисом почти не зависит от наличия 5'-кепа, поли(А)-хвоста или их обоих и составляет около 40–50% [102].

В серии исследований на дрожжах обнаружено, что трансляция разных мРНК по-разному зависит от функционирования белков, участвующих в формировании closed-loop-структуры. Так мРНК, содержащие короткие кодирующие последовательности (около 500 н.), в отличие от мРНК с длинными кодирующими последовательностями, преимущественно связаны с eIF4F и PABP, что значительно повышает плотность рибосом на них и стимулирует их активную трансляцию. Значительная часть генов “домашнего хозяйства” (гистоны, рибосомные и митохондриальные белки) транслируются с таких мРНК [36, 103–105]. Обнаружено, что отсутствие дрожжевого белка ASC1 40S субъединицы рибосом (RACK1 у человека) приводит к снижению эффективности трансляции мРНК с короткими кодирующими последовательностями. Предполагается, что этот белок участвует в модуляции трансляции таких мРНК, влияя на формирование closed-loop-структур, что подтверждается его связыванием с eIF4G и 40S субъединицей рибосом [104, 105]. Это согласуется с результатами, согласно которым эффективная трансляция дрожжевых мРНК с короткой кодирующей последовательностью зависит от eIF4G и, как следствие, от формирования closed-loop-структуры, но слабо зависит от хеликазы eIF4A и ее партнера eIF4B, так как такие мРНК имеют неструктурированную 5'-НТО. При этом eIF4A и eIF4B важны для трансляции мРНК, которые не зависят от eIF4G [87, 97]. Во всех исследованиях трансляция мРНК с длинными кодирующими последовательностями относительно слабо или вообще не зависела от eIF4F и PABP. Однако показано, что длинные мРНК также могут образовывать closed-loop-структуру, но, в целом, не удалось обнаружить универсальные корреляции между closed-loop-структурой на мРНК и эффективностью трансляции, длиной кодирующей последовательности и поли(А)-хвоста, а также общей длиной РНК [7]. Здесь необходимо отметить, что эти работы проведены на клетках дрожжей, трансляция в которых может существенно отличаться от трансляции в клетках высших эукариот.

Вариации структуры самой молекулы мРНК, регуляция активности факторов, фиксирующих ее пространственную структуру, регуляция активности рибосомных комплексов, пространственная сегрегация мРНК также открывают широкие и гибкие возможности для регуляции трансляции [1, 6]. Получены данные, показывающие, что структура мРНК динамично изменяется. Например, измерение расстояния между концами мРНК методом smFRET обнаружило флуктуации между различными состояниями молекулы [77]. Также различными методами показано, что эффективность взаимодействия eIF4E с кепом зависит как от этапа инициации, так и от длины мРНК [106], а расстояние между кепом и 3'-НТО изменяется во времени [107]. В процессе инициации у дрожжей обнаруживаются две closed-loop-структуры: первая формируется при сборке 48S преинициаторного комплекса и нуждается в eIF4E, eIF4G, PABP и eIF3, а вторая – при сборке 80S инициаторного комплекса, для нее необходимы дополнительно eRF1 и eRF3, но не стоп-кодон [8]. Причем первого набора белков достаточно для формирования closed-loop-структуры в виде кольца, а второго – для формирования восьмерки.

На структуру молекулы мРНК может влиять динамика длины поли(А)-хвоста, которая может изменяться у одной мРНК с течением времени [108–110]. От длины поли(А)-хвоста зависит, в частности, сколько молекул PABP могут с ним связаться [111]. А от этого, в свою очередь, может зависеть, будет ли на мРНК формироваться стабильная closed-loop-структура.

Более того, длина поли(А)-хвоста не всегда критична для определения трансляционной активности. Так показано, что у земноводных и рыб эффективность трансляции сильно коррелирует с длиной поли(А)-хвоста лишь в раннем эмбриональном периоде [108]. Показано также, что распределение длин поли(А)-хвостов в мРНК незрелых ооцитов и в активированных яйцеклетках дрозофилы сильно отличается, и лишь в яйцеклетках эффективность трансляции коррелирует с длиной поли(А)-хвоста [109]. Это указывает на то, что вклад closed-loop-структуры в регуляцию трансляции мРНК может сложным образом зависеть и от клеточного контекста в целом. Так, нуклеазная обработка RRL приводит к исчезновению эффекта синергии кепса и поли(А)-хвоста, который не восстанавливается при последующем добавлении клеточных РНК [18].

Регуляция аффинности и концентрации белков, образующих или разрушающих разные closed-loop-структуры, может вести к динамической смене структур мРНК. В частности, многие факторы трансляции имеют сайты фосфорилирования, а некоторые взаимодействуют с дополнительными бел-

ками, конкурирующими за их связывание (например, 4E-VP) [1, 23, 55–60, 105, 112].

Суммируя эти данные, едва ли стоит рассматривать closed-loop или линейные структуры мРНК как статичные и единственно необходимые для эффективной трансляции любой мРНК. В публикациях последнего времени преобладает представление, что пространственная организация мРНК может различаться на разных этапах трансляции, в меняющихся условиях (в частности, на разных стадиях клеточного цикла и при стрессе), а также зависеть от состава мРНК. Однако какие-либо универсальные закономерности динамики транслируемых мРНК пока не установлены.

Согласно одним данным, максимальная синергия между 5'-кепом и поли(А)-хвостом и, следовательно, closed-loop-организация мРНК наблюдается при ненасыщающей концентрации факторов и мРНК в цитоплазме, когда эффективность трансляции далека от максимальной, а также при агрегации в условиях стресса. Связывание большого количества рибосом при активной трансляции приводит к разворачиванию мРНК из компактной структуры, что согласуется с исследованиями, рассмотренными в гипотезе II, наблюдавшими линейную мРНК при эффективной трансляции [12, 15, 24, 96] (рис. 3а).

Согласно другим данным, формирование closed-loop-структуры, напротив, повышает эффективность трансляции и плотность рибосом на ней, причем преимущественно на мРНК с короткими кодирующими последовательностями [36, 87, 97, 103–105] (рис. 3б). Это согласуется с тем, что в составе кольцеобразных полисом скорость реинициации повышена, что подтверждает гипотезу closed-loop-зависимого рециклинга [100]. Более того, в *in vitro* трансляции показано, что эффективность трансляции первых связавшихся с кепированной мРНК рибосом не зависит от наличия поли(А)-хвоста, тогда как эффективность последующих раундов трансляции заметно повышается в присутствии поли(А)-хвоста. Такое усиление блокируется добавлением в реакционную смесь как поли(А)-олигонуклеотидов, так и аналога кепса m⁷GpppG. Первый конкурирует с мРНК за связывание PABP, тогда как второй – за eIF4E. При этом оба компонента значительно слабее влияют на кинетику первых раундов трансляции, не зависящей от поли(А)-хвоста. Соответственно, формирование closed-loop-структуры мРНК увеличивает эффективность трансляции только после первых раундов трансляции [17].

Несмотря на то что третья гипотеза наиболее широко и полно описывает имеющиеся разнообразные и противоречивые данные, единая непротиворечивая модель транзientной closed-loop-структуры мРНК и ее регуляции в настоящий момент отсутствует. Эта гипотеза пока не

Модели динамической структуры мРНК

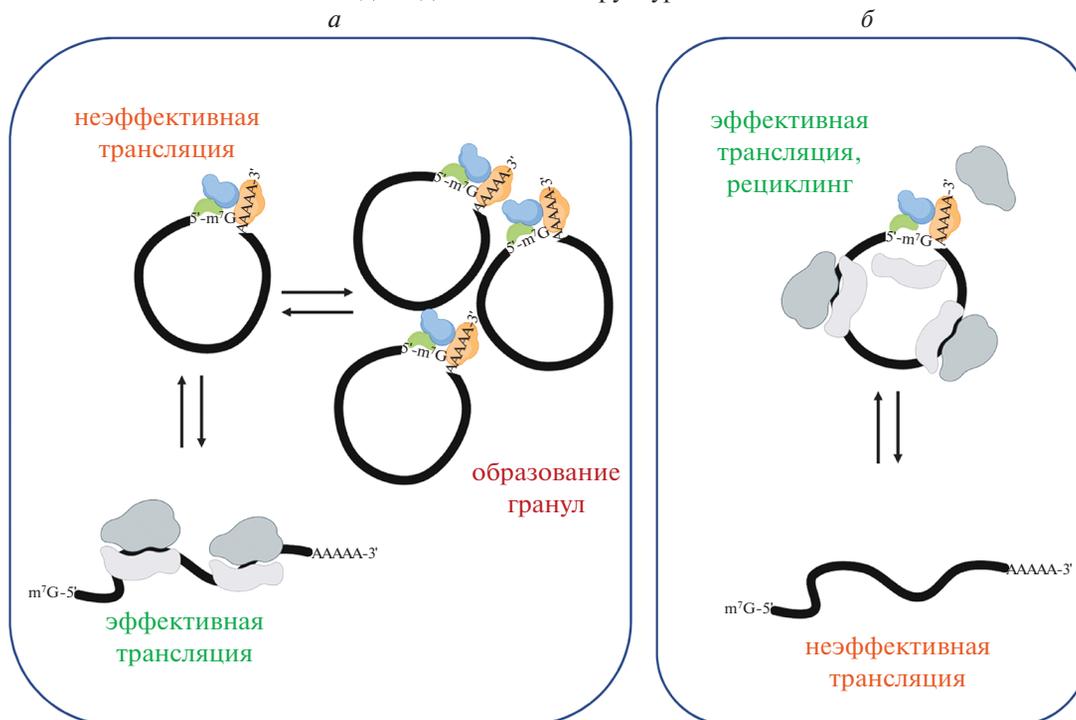


Рис. 3. Модели динамической структуры мРНК. *а* – Модель по Khong и соавт. [96]: closed-loop структура связана с неактивно транскрибируемой или агрегируемой мРНК. *б* – Модель по Thompson и соавт. [105]: closed-loop-структура связана с активно транскрибируемой мРНК, преимущественно с короткой основной кодирующей последовательностью. Создано с помощью BioRender.com.

имеет конкретных универсальных обобщений, не обладает предсказательной силой и лишь констатирует, что любая структура мРНК может играть какую-то особую роль.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы рассмотрели гипотезы, предлагаемые в настоящий момент для объяснения связи между эффективной трансляцией и структурой мРНК. Первые две гипотезы предлагают строгие критерии определения функциональной структуры мРНК, однако каждая из них сталкивается с противоречиями им данными, которые сложно поддаются объяснению в рамках данных гипотез. Третья не определяет единственно правильную структуру мРНК, а напротив, описывает их разнообразие и динамичность. Какая бы из описанных гипотез не оказалась верной, очевидно, что элементы, находящиеся на противоположных концах мРНК, могут влиять на активность друг друга, а значит, каким-то образом взаимодействовать.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 14-14-00487, анализ влияния closed-loop-структур на трансляцию) и Российского научного фонда (№ 19-74-10078, изуче-

ние значения динамичности структуры мРНК в трансляции).

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. Fakim H., Fabian M.R.F. (2019) Communication is key: 5'–3' interactions that regulate mRNA translation and turnover. In: *The Biology of mRNA: Function and Structure. Advances in Experimental Medicine and Biology*. Eds Oeffinger M., Zenklusen D. Cham: Springer Nature Switzerland, **1203**. 149–165.
2. Marzluff W.F. (1992) Histone 3' ends: essential and regulatory functions. *Gene Expr.* **2**, 93–97.
3. Mathias A.P., Williamson R., Huxley H.E., Page S. (1964) Occurrence and function of polysomes in rabbit reticulocytes. *J. Mol. Biol.* **9**, 154–IN11.
4. Christensen A.K., Kahn L.E., Bourne C.M. (1987) Circular polysomes predominate on the rough endoplasmic reticulum of somatotropes and mammatropes in the rat anterior pituitary. *Am. J. Anatomy.* **178**, 1–10.
5. Wells S.E., Hillner P.E., Vale R.D., Sachs A.B. (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell.* **2**, 135–140.

6. Vicens Q., Kieft J.S., Rissland O.S. (2018) Revisiting the closed-loop model and the nature of mRNA 5'–3' communication. *Mol. Cell.* **72**, 805–812.
7. Archer S.K., Shirokikh N.E., Hallwirth C.V., Beilharz T.H., Preiss T. (2015) Probing the closed-loop model of mRNA translation in living cells. *RNA Biol.* **12**, 248–254.
8. Amrani N., Ghosh S., Mangus D.A., Jacobson A. (2008) Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature.* **453**, 1276–1280.
9. Kahvejian A., Svitkin Y.V., Sukarieh R., M'Boutchou M.N., Sonenberg N. (2005) Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.* **19**, 104–113.
10. Le H., Tanguay R.L., Balasta M.L., Wei C.C., Browning K.S., Metz A.M., Goss D.J., Gallie D.R. (1997) Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 16247–16255.
11. Gross J.D., Moerke N.J., Von Der Haar T., Lugovskoy A.A., Sachs A.B., McCarthy J.E.G., Wagner G. (2003) Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell.* **115**, 739–750.
12. Borman A.M., Yanne M., Kean K.M. (2000) Biochemical characterisation of cap-poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: the eIF4G-PABP interaction increases the functional affinity of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. *Nucl. Acids Res.* **28**, 4068–4075.
13. Von Der Haar T., Ball P.D., McCarthy J.E.G. (2000) Stabilization of eukaryotic initiation factor 4E binding to the mRNA 5'-cap by domains of eIF4G. *J. Biol. Chem.* **275**, 30551–30555.
14. Machida K., Shigeta T., Yamamoto Y., Ito T., Svitkin Y., Sonenberg N., Imataka H. (2018) Dynamic interaction of poly(A)-binding protein with the ribosome. *Sci. Rep.* **8**, 17435.
15. Michel Y.M., Poncet D., Piron M., Kean K.M., Borman A.M. (2000) Cap-poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *J. Biol. Chem.* **275**, 32268–32276.
16. Gallie D.R. (1991) The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* **5**, 2108–2116.
17. Alekhina O.M., Terenin I.M., Dmitriev S.E., Vassilenko K.S. (2020) Functional cyclization of eukaryotic mRNAs. *Internat. J. Mol. Sci.* **21**, 1–18.
18. Rifo R.S., Ricci E.P., Decimo D., Moncorge O., Ohlmann T. (2007) Back to basics: the untreated rabbit reticulocyte lysate as a competitive system to recapitulate cap/poly(A) synergy and the selective advantage of IRES-driven translation. *Nucl. Acids Res.* **35**, e121–e121.
19. Safaee N., Kozlov G., Noronha A.M., Xie J., Wilds C.J., Gehring K. (2012) Interdomain allostery promotes assembly of the poly(A) mRNA complex with PABP and eIF4G. *Mol. Cell.* **48**, 375–386.
20. Craig A.W.B., Haghghat A., Yu A.T.K., Sonenberg N. (1998) Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature.* **392**, 520–523.
21. Martineau Y., Derry M.C., Wang X., Yanagiya A., Berlanga J.J., Shyu A.-B., Imataka H., Gehring K., Sonenberg N. (2008) Poly(A)-Binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 6658–6667.
22. Groft C.M., Burley S.K. (2002) Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Mol. Cell.* **9**, 1273–1283.
23. Nelson M.R., Leidal A.M., Smibert C.A. (2004) *Drosophila* cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. *EMBO J.* **23**, 150–159.
24. Adivarahan S., Livingston N., Nicholson B., Rahman S., Wu B., Rissland O.S., Zenklusen D. (2018) Spatial organization of single mRNPs at different stages of the gene expression pathway. *Mol. Cell.* **72**, 727–738.e5.
25. Haghghat A., Sonenberg N. (1997) eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5'-cap structure. *J. Biol. Chem.* **272**, 21677–21680.
26. Tarun S.Z., Sachs A.B. (1996) Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* **15**, 7168–7177.
27. Bushell M., Wood W., Carpenter G., Pain V.M., Morley S.J., Clemens M.J. (2001) Disruption of the interaction of mammalian protein synthesis eukaryotic initiation factor 4B with the poly(A)-binding protein by caspase- and viral protease-mediated cleavages. *J. Biol. Chem.* **276**, 23922–23928.
28. Bannerman B.P., Kramer S., Dorrell R.G., Carrington M. (2018) Multispecies reconstructions uncover widespread conservation, and lineage-specific elaborations in eukaryotic mRNA metabolism. *PLoS One.* **13**, 1–23.
29. Cosson B., Berkova N., Couturier A., Chabelskaya S., Philippe M., Zhouravleva G. (2002) Poly(A)-binding protein and eRF3 are associated *in vivo* in human and *Xenopus* cells. *Biol. Cell.* **94**, 205–216.
30. Hoshino S., Imai M., Kobayashi T., Uchida N., Katada T. (1999) The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-poly(A) tail of mRNA. *J. Biol. Chem.* **274**, 16677–16680.
31. Ivanov A., Mikhailova T., Eliseev B., Yeramala L., Sokolova E., Susorov D., Shuvalov A., Schaffitzel C., Alkalaeva E. (2016) PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. *Nucl. Acids Res.* **44**, 7766–7776.
32. Uchida N., Hoshino S. ichi, Imataka H., Sonenberg N., Katada T. (2002) A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in cap/poly(A)-dependent translation. *J. Biol. Chem.* **277**, 50286–50292.
33. Cosson B., Couturier A., Chabelskaya S., Kiktev D., Inge-Vechtomov S., Philippe M., Zhouravleva G. (2002) Poly(A)-binding protein acts in translation termination via eukaryotic release factor 3 interaction

- and does not influence [PSI(+)] propagation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3301–3315.
34. Ivanov A., Shuvalova E., Egorova T., Shuvalov A., Sokolova E., Bizyaev N., Shatsky I., Terenin I., Alkalaeva E. (2019) Polyadenylate-binding protein-interacting proteins PAIP1 and PAIP2 affect translation termination. *J. Biol. Chem.* **294**, 8630–8639.
 35. Bonderoff J.M., Lloyd R.E. (2010) Time-dependent increase in ribosome processivity. *Nucl. Acids Res.* **38**, 7054–7067.
 36. Costello J., Castelli L.M., Rowe W., Kershaw C.J., Talavera D., Mohammad-Qureshi S.S., Sims P.F.G., Grant C.M., Pavitt G.D., Hubbard S.J., Ashe M.P. (2015) Global mRNA selection mechanisms for translation initiation. *Genome Biol.* **16**, 1–21.
 37. Smith R.W.P., Gray N.K. (2010) Poly(A)-binding protein (PABP): a common viral target. *Biochem. J.* **426**, 1–12.
 38. Kulak N.A., Pichler G., Paron I., Nagaraj N., Mann M. (2014) Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat. Methods.* **11**, 319–324.
 39. Merrick W.C., Pavitt G.D. (2018) Protein synthesis initiation in eukaryotic cells. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, a033092.
 40. Singh G., Rebbapragada I., Lykke-Andersen J. (2008) A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol.* **6**, 860–871.
 41. Ivanov P.V., Gehring N.H., Kunz J.B., Hentze M.W., Kulozik A.E. (2008) Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J.* **27**, 736–747.
 42. Aragón T., de la Luna S., Novoa I., Carrasco L., Ortín J., Nieto A. (2000) Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6259–6268.
 43. Burgui I., Aragón T., Ortín J., Nieto A. (2003) PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J. Gen. Virol.* **84**, 3263–3274.
 44. Vende P., Piron M., Castagne N., Poncet D. (2000) Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J. Virol.* **74**, 7064–7071.
 45. Gratia M., Sarot E., Vende P., Charpilienne A., Baron C.H., Duarte M., Pyronnet S., Poncet D. (2015) Rotavirus NSP3 is a translational surrogate of the poly(A) binding protein-poly(A) complex. *J. Virol.* **89**, 8773–8782.
 46. Harb M., Becker M.M., Vitour D., Baron C.H., Vende P., Brown S.C., Bolte S., Arold S.T., Poncet D. (2008) Nuclear localization of cytoplasmic poly(A)-binding protein upon rotavirus infection involves the interaction of NSP3 with eIF4G and RoXaN. *J. Virol.* **82**, 11283–11293.
 47. Piron M., Vende P., Cohen J., Poncet D. (1998) Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J.* **17**, 5811–5821.
 48. Joachims M., Van Breugel P.C., Lloyd R.E. (1999) Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation *in vitro*. *J. Virol.* **73**, 718–727.
 49. Kuyumcu-Martinez N.M., Van Eden M.E., Younan P., Lloyd R.E. (2004) Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1779–1790.
 50. Prévôt D., Darlix J.L., Ohlmann T. (2003) Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol. Cell.* **95**, 141–156.
 51. Guo L., Allen E.M., Miller W.A. (2001) Base-pairing between untranslated regions facilitates translation of uncapped, nonpolyadenylated viral RNA. *Mol. Cell.* **7**, 1103–1109.
 52. Fabian M.R., White K.A. (2006) Analysis of a 3'-translation enhancer in a tombusvirus: a dynamic model for RNA-RNA interactions of mRNA termini. *RNA.* **12**, 1304–1314.
 53. Nicholson B.L., White K.A. (2011) 3' Cap-independent translation enhancers of positive-strand RNA plant viruses. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 373–380.
 54. Simon A.E., Miller W.A. (2013) 3' Cap-independent translation enhancers of plant viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**, 21–42.
 55. Sonenberg N., Hinnebusch A.G. (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell.* **136**, 731–745.
 56. Cho P.F., Poulin F., Cho-Park Y.A., Cho-Park I.B., Chicoine J.D., Lasko P., Sonenberg N. (2005) A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell.* **121**, 411–423.
 57. Cho P.F., Gamberi C., Cho-Park Y.A., Cho-Park I.B., Lasko P., Sonenberg N. (2006) Cap-dependent translational inhibition establishes two opposing morphogen gradients in *Drosophila* embryos. *Curr. Biol.* **16**, 2035–2041.
 58. Stebbins-Boaz B., Cao Q., de Moor C.H., Mendez R., Richter J.D. (1999) Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Mol. Cell.* **4**, 1017–1027.
 59. Minshall N., Reiter M.H., Weil D., Standart N. (2007) CPEB interacts with an ovary-specific eIF4E and 4E-T in early *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **282**, 37389–37401.
 60. Nakamura A., Sato K., Hanyu-Nakamura K. (2004) *Drosophila* cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA translation in oogenesis. *Dev. Cell.* **6**, 69–78.
 61. Richter J.D. (2007) CPEB: a life in translation. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 279–285.
 62. Kojima S., Sher-Chen E.L., Green C.B. (2012) Circadian control of mRNA polyadenylation dynamics regulates rhythmic protein expression. *Genes Dev.* **26**, 2724–2736.
 63. Kiriakidou M., Tan G.S., Lamprinaki S., De Planell-Saguer M., Nelson P.T., Mourelatos Z. (2007) An

- mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*. **129**, 1141–1151.
64. Kapasi P., Chaudhuri S., Vyas K., Baus D., Komar A.A., Fox P.L., Merrick W.C., Mazumder B. (2007) L13a blocks 48S assembly: role of a general initiation factor in mRNA-specific translational control. *Mol. Cell*. **25**, 113–126.
 65. Wang Z.F., Whitfield M.L., Ingledue T.C., Dominiski Z., Marzluff W.F. (1996) The protein that binds the 3' end of histone mRNA: a novel RNA-binding protein required for histone pre-mRNA processing. *Genes Dev*. **10**, 3028–3040.
 66. Neusiedler J., Mocquet V., Limousin T., Ohlmann T., Morris C., Jalinot P. (2012) INT6 interacts with MIF4GD/SLIP1 and is necessary for efficient histone mRNA translation. *RNA*. **18**, 1163–1177.
 67. Tan D., Marzluff W.F., Dominski Z., Tong L. (2013) Structure of histone mRNA stem-loop, human stem-loop binding protein, and 3' hExo ternary complex. *Science*. **339**, 318–321.
 68. Von Moeller H., Lerner R., Ricciardi A., Basquin C., Marzluff W.F., Conti E. (2013) Structural and biochemical studies of SLIP1-SLBP identify DBP5 and eIF3g as SLIP1-binding proteins. *Nucl. Acids Res*. **41**, 7960–7971.
 69. Samuelsson T., Da M. (2008) Early evolution of histone mRNA 3' end processing. *RNA*. **14**, 1–10.
 70. Choe J., Lin S., Zhang W., Liu Q., Wang L., Ramirez-Moya J., Du P., Kim W., Tang S., Sliz P., Santisteban P., George R.E., Richards W.G., Wong K.-K., Locker N., Slack F.J., Gregory R.I. (2018) mRNA circularization by METTL3–eIF3h enhances translation and promotes oncogenesis. *Nature*. **561**, 556–560.
 71. Fang L.T., Gelbart W.M., Ben-Shaul A. (2011) The size of RNA as an ideal branched polymer. *J. Chem. Physics*. **135**, 19–21.
 72. Yoffe A.M., Prinsen P., Gelbart W.M., Ben-Shaul A. (2011) The ends of a large RNA molecule are necessarily close. *Nucl. Acids Res*. **39**, 292–299.
 73. Clote P., Ponty Y., Steyaert J.M. (2012) Expected distance between terminal nucleotides of RNA secondary structures. *J. Math. Biol*. **65**, 581–599.
 74. Fang L.T. (2011) The end-to-end distance of RNA as a randomly self-paired polymer. *J. Theor. Biol*. **280**, 101–107.
 75. Han H.S.W., Reidys C.M. (2012) The 5'-3' distance of RNA secondary structures. *J. Comput. Biol*. **19**, 867–878.
 76. Leija-Martínez N., Casas-Flores S., Cadena-Nava R.D., Roca J.A., Méndez-Cabañas J.A., Gómez E., Ruiz-García J. (2014) The separation between the 5'-3' ends in long RNA molecules is short and nearly constant. *Nucl. Acids Res*. **42**, 13963–13968.
 77. Lai W.-J.C., Kayedkhordeh M., Cornell E.V., Farah E., Bellaousov S., Rietmeijer R., Salsi E., Mathews D.H., Ermolenko D.N. (2018) mRNAs and lncRNAs intrinsically form secondary structures with short end-to-end distances. *Nat. Commun*. **9**, 4328.
 78. Ermolenko D.N., Mathews D.H. (2021) Making ends meet: new functions of mRNA secondary structure. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. **12**, 1–14.
 79. Aw J.G.A., Shen Y., Wilm A., Sun M., Lim X.N., Boon K.L., Tapsin S., Chan Y.S., Tan C.P., Sim A.Y.L., Zhang T., Susanto T.T., Fu Z., Nagarajan N., Wan Y. (2016) *In vivo* mapping of eukaryotic RNA interactomes reveals principles of higher-order organization and regulation. *Mol. Cell*. **62**, 603–617.
 80. Lu Z., Zhang Q.C., Lee B., Flynn R.A., Smith M.A., Robinson J.T., Davidovich C., Gooding A.R., Goodrich K.J., Mattick J.S., Mesirov J.P., Cech T.R., Chang H.Y. (2016) RNA duplex map in living cells reveals higher-order transcriptome structure. *Cell*. **165**, 1267–1279.
 81. Sharma E., Sterne-Weiler T., O'Hanlon D., Blencowe B.J. (2016) Global mapping of human RNA–RNA interactions. *Mol. Cell*. **62**, 618–626.
 82. Egorova T., Biziaev N., Shuvalov A., Sokolova E., Mukba S., Evmenov K., Zotova M., Kushchenko A., Shuvalova E., Alkalaeva E. (2021) eIF3j facilitates loading of release factors into the ribosome. *Nucl. Acids Res*. **49**, 11181–11196.
 83. Skabkin M.A., Skabkina O.V., Hellen C.U.T., Pestova T.V. (2013) Reinitiation and other unconventional posttermination events during eukaryotic translation. *Mol. Cell*. **51**, 249–264.
 84. Rajkowitzsch L., Vilela C., Berthelot K., Ramirez C.V., McCarthy J.E.G. (2004) Reinitiation and recycling are distinct processes occurring downstream of translation termination in yeast. *J. Mol. Biol*. **335**, 71–85.
 85. Tarun S.Z., Sachs A.B. (1995) A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes Dev*. **9**, 2997–3007.
 86. Kessler S.H., Sachs A.B. (1998) RNA recognition motif 2 of yeast PAB1p is required for its functional interaction with eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol. Cell. Biol*. **18**, 51–57.
 87. Park E.-H., Zhang F., Warringer J., Sunnerhagen P., Hinnebusch A.G. (2011) Depletion of eIF4G from yeast cells narrows the range of translational efficiencies genome-wide. *BMC Genomics*. **12**, 68.
 88. Altmann M., Linder P. (2010) Power of yeast for analysis of eukaryotic translation initiation. *J. Biol. Chem*. **285**, 31907–31912.
 89. Borman A.M., Michel Y.M., Malnou C.E., Kean K.M. (2002) Free poly(A) stimulates capped mRNA translation *in vitro* through the eIF4G–poly(A)-binding protein interaction. *J. Biol. Chem*. **277**, 36818–36824.
 90. Kawaguchi D., Shimizu S., Abe N., Hashiya F., Tomoike F., Kimura Y., Abe H. (2020) Translational control by secondary-structure formation in mRNA in a eukaryotic system. *Nucleosides, Nucleotides Nucl. Acids*. **39**, 195–203.
 91. Wang Y., Wang Z. (2015) Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs. *RNA*. **21**, 172–179.
 92. Chen C.Y., Sarnow P. (1995) Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science*. **268**, 415–417.
 93. Abe N., Matsumoto K., Nishihara M., Nakano Y., Shibata A., Maruyama H., Shuto S., Matsuda A., Yoshida M., Ito Y., Abe H. (2015) Rolling circle translation of circular RNA in living human cells. *Sci. Rep*.

- 5, 16435.
<https://doi.org/10.1038/srep16435>
94. Liu J., Liu T., Wang X., He A. (2017) Circles reshaping the RNA world: from waste to treasure. *Mol. Cancer*. **16**, 1–12.
 95. Cortés-López M., Miura P. (2016) Focus: epigenetics: emerging functions of circular RNAs. *Yale J. Biol. Med.* **89**, 527.
 96. Khong A., Parker R. (2018) mRNP architecture in translating and stress conditions reveals an ordered pathway of mRNP compaction. *J. Cell Biol.* **217**, 4124–4140.
 97. Sen N.D., Zhou F., Harris M.S., Ingolia N.T., Hinnebusch A.G. (2016) eIF4B stimulates translation of long mRNAs with structured 5' UTRs and low closed-loop potential but weak dependence on eIF4G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **113**, 10464–10472.
 98. Christensen A.K., Bourne C.M. (1999) Shape of large bound polysomes in cultured fibroblasts and thyroid epithelial cells. *Anat. Rec.* **255**, 116–129.
 99. Shelton E., Kuff E.L. (1966) Substructure and configuration of ribosomes isolated from mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **22**, 23–31.
 100. Afonina Z.A., Myasnikov A.G., Shirokov V.A., Klaholz B.P., Spirin A.S. (2015) Conformation transitions of eukaryotic polyribosomes during multi-round translation. *Nucl. Acids Res.* **43**, 618–628.
 101. Brandt F., Carlson L.A., Hartl F.U., Baumeister W., Grünwald K. (2010) The three-dimensional organization of polyribosomes in intact human cells. *Mol. Cell*. **39**, 560–569.
 102. Afonina Z.A., Myasnikov A.G., Shirokov V.A., Klaholz B.P., Spirin A.S. (2014) Formation of circular polyribosomes on eukaryotic mRNA without cap-structure and poly(A)-tail: a cryo electron tomography study. *Nucl. Acids Res.* **42**, 9461–9469.
 103. Arava Y., Wang Y., Storey J.D., Liu C.L., Brown P.O., Herschlag D. (2003) Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 3889–3894.
 104. Thompson M.K., Rojas-Duran M.F., Gangaramani P., Gilbert W.V. (2016) The ribosomal protein Asc1/RACK1 is required for efficient translation of short mRNAs. *ELife*. **5**, 1–22.
 105. Thompson M.K., Gilbert W.V. (2017) mRNA length-sensing in eukaryotic translation: reconsidering the “closed loop” and its implications for translational control. *Curr. Genet.* **63**, 613–620.
 106. Çetin B., Leary S.E.O. (2021) mRNA- and factor-driven dynamic variability controls eIF4F-cap recognition for translation initiation. *BioRxiv*. 2021.06.17.448745; <https://doi.org/10.1101/20>
 107. Koch A., Aguilera L., Morisaki T., Munsky B., Stasevich T.J. (2020) Quantifying the dynamics of IRES and cap translation with single-molecule resolution in live cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **27**, 1095–1104.
 108. Subtelny A.O., Eichhorn S.W., Chen G.R., Sive H., Bartel D.P. (2014) Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature*. **508**, 66–71.
 109. Lim J., Lee M., Son A., Chang H., Kim V.N. (2016) MTAIL-seq reveals dynamic poly(A) tail regulation in oocyte-to-embryo development. *Genes Dev.* **30**, 1671–1682.
 110. Park J.-E., Yi H., Kim Y., Chang H., Kim V.N. (2016) Regulation of poly(A) tail and translation during the somatic cell cycle. *Mol. Cell*. **62**, 462–471.
 111. Елисеева И.А., Лябин Д.Н., Овчинников Л.П. (2013) Поли(А)-связывающие белки: строение, функции и регуляция активности. *Успехи биол. химии*. **53**, 3–34.
 112. Hay N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* **18**, 1926–1945.

DYNAMICS OF EUKARYOTIC mRNA STRUCTURE DURING TRANSLATION

N. S. Biziaev¹, T. V. Egorova^{1, 2}, and E. Z. Alkalaeva^{1, 2, *}

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

² Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: alkalaeva@eimb.ru

Currently, there is no single concept of the optimal spatial structure of mRNA during translation. It is known that many proteins, associated with the 5' end of mRNA, interact with proteins associated with the 3' end. Moreover, this interaction often affects the activity of these proteins. Within the same mRNA molecule, this is possible only when the mRNA forms a circular structure in which its ends are spatially close. Discovery of such proteins, in the 90s of the 20th century, made it possible to formulate the closed-loop hypothesis, in which it is assumed that the ends of translationally active mRNA are fixed next to each other due to the interaction of proteins and (or) RNA. However, later it was shown that this structure is not always necessary for translation. Moreover, some authors have proposed a model according to which the translating mRNA, on the contrary, should be unfolded into a linear structure. Thus, the spatial structure of the translating mRNA does not have to be universal for all mRNA and can change dynamically, which affects its functional activity. In this review, we have summarized a variety of experimental data and concepts on the relationship between the spatial structure of mRNA and its translational activity.

Keywords: translation, mRNA, closed-loop mRNA, eIF4F, PABP, ribosome, translational control

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21:579.23"315

КАРТИРОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ
В 5'- И 3'-НЕТРАНСЛИРУЕМЫХ ОБЛАСТЯХ мРНК SIGLEC-15
С ПОМОЩЬЮ РЕПОРТЕРНОГО АНАЛИЗА¹

© 2022 г. L. Wang^a, R. Li^a, X. Lai^a, X. Zhang^a, H. Chen^{a, *}, W. Zhao^{a, **}

^aMolecular Cancer Research Center, School of Medicine, Shenzhen Campus of Sun Yat-sen University, Shenzhen, Guangdong, 518107 P.R. China

*e-mail: chenhm69@mail.sysu.edu.cn

**e-mail: zhaowx5@mail.sysu.edu.cn

Поступила в редакцию 20.07.2021 г.

После доработки 21.10.2021 г.

Принята к публикации 31.10.2021 г.

Siglec-15 – иммунный супрессор, активируемый в различных типах злокачественных опухолей, рассматривается как новая потенциальная мишень для иммунотерапии опухолей. Однако неясно, каким образом экспрессия *Siglec-15* контролируется в нормальных и опухолевых клетках. С использованием репортерного анализа оценили влияние 5'- и 3'-UTR мРНК *Siglec-15* на экспрессию гена. Обнаружено, что 3'-UTR сильно снижает продукцию репортерного белка, тогда как 5'-UTR проявляет умеренное ингибирующее действие. Количественное определение стационарного уровня мРНК выявило хорошее соответствие между количеством белка и представленностью мРНК, содержащей 3'-UTR. Напротив, 5'-UTR слабо влияла на уровень мРНК по сравнению с контролем. Измерение времени полужизни мРНК показало, что 3'-UTR способствует деградации мРНК. Тестирование шести укороченных фрагментов 3'-UTR выявило заметную ингибирующую активность пяти из них в четырех проверенных линиях клеток, а шестой – перекрывающий область 993–1317 – обладал более сильной активностью. Интересно, что область 993–1317 содержит предсказанную структуру стебель–петля из 43 н., проявляющую выраженную ингибирующую активность в четырех линиях клеток. Эти результаты свидетельствуют, что 3'-UTR подавляет экспрессию репортерного гена, вызывая ускоренный распад мРНК, возможно, с использованием нескольких *cis*-регуляторных элементов, а 5'-UTR репрессирует экспрессию гена, ингибируя трансляцию. Таким образом, наши данные дают ключ к пониманию механизмов регуляции экспрессии гена *Siglec-15*.

Ключевые слова: *Siglec-15*, 5'-UTR, 3'-UTR, деградация мРНК, трансляция

DOI: 10.31857/S0026898422030181

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang J., Sun J., Liu L.N., Flies D.B., Nie X., Toki M., Zhang J., Song C., Zarr M., Zhou X., Han X., Archer K.A., O'Neill T., Herbst R.S., Boto A.N., Sanmamed M.F., Langermann S., Rimm D.L., Chen L. (2019) *Siglec-15* as an immune suppressor and potential target for normalization cancer immunotherapy. *Nat. Med.* **25**, 656–666.
2. Angata T., Tabuchi Y., Nakamura K., Nakamura M. (2007) *Siglec-15*: an immune system Siglec conserved throughout vertebrate evolution. *Glycobiology.* **17**, 838–846.
3. Hiruma Y., Hirai T., Tsuda E. (2011) *Siglec-15*, a member of the sialic acid-binding lectin, is a novel regulator for osteoclast differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **409**, 424–429.
4. Kang F.B., Chen W., Wang L., Zhang Y.Z. (2020) The diverse functions of *Siglec-15* in bone remodeling and antitumor responses. *Pharmacol. Res.* **155**, 104728.
5. Cao G., Xiao Z., Yin Z. (2019) Normalization cancer immunotherapy: blocking *Siglec-15*! *Signal. Transduct. Target. Ther.* **4**, 10.
6. Kameda Y., Takahata M., Komatsu M., Mikuni S., Hatakeyama S., Shimizu T., Angata T., Kinjo M., Minami A., Iwasaki N. (2013) *Siglec-15* regulates osteoclast differentiation by modulating RANKL-induced phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Erk pathways in association with signaling Adaptor DAP12. *J. Bone Miner Res.* **28**, 2463–2475.
7. Sato D., Takahata M., Ota M., Fukuda C., Tsuda E., Shimizu T., Okada A., Hiruma Y., Hamano H., Hiratsuka S., Fujita R., Amizuka N., Hasegawa T., Iwasaki N.

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

- (2018) *Siglec-15*-targeting therapy increases bone mass in rats without impairing skeletal growth. *Bone*. **116**, 172–180.
8. Mayr C. (2019) What Are 3' UTRs Doing? *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11**(10), a034728.
 9. Zhao W., Pollack J.L., Blagev D.P., Zaitlen N., McManus M.T., Erle D.J. (2014) Massively parallel functional annotation of 3' untranslated regions. *Nat. Biotechnol.* **32**, 387–391.
 10. Brennan S.E., Kuwano Y., Alkharouf N., Blackshear P.J., Gorospe M., Wilson G.M. (2009) The mRNA-destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis. *Cancer Res.* **69**, 5168–5176.
 11. Zhao W., Erle D.J. (2018) Widespread effects of chemokine 3' untranslated regions on mRNA degradation and protein production in human cells. *J. Immunol.* **201**, 1053–1061.
 12. Guo H., Ingolia N.T., Weissman J.S., Bartel D.P. (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. **466**, 835–840.
 13. An J.J., Gharami K., Liao G.Y., Woo N.H., Lau A.G., Vanevski F., Torre E.R., Jones K.R., Feng Y., Lu B., Xu B. (2008) Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell*. **134**, 175–187.
 14. Chen S., Wang R., Zheng D., Zhang H., Chang X., Wang K., Li W., Fan J., Tian B., Cheng H. (2019) The mRNA export receptor NXF1 coordinates transcriptional dynamics, alternative polyadenylation, and mRNA export. *Mol. Cell*. **74**, 118–131. e117.
 15. Ma W., Mayr C. (2018) A Membraneless organelle associated with the endoplasmic reticulum enables 3'UTR-mediated protein-protein interactions. *Cell*. **175**, 1492–1506. e1419.
 16. Ingolia N.T., Ghaemmaghami S., Newman J.R., Weissman J.S. (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*. **324**, 218–223.
 17. Johnstone T.G., Bazzini A.A., Giraldez A.J. (2016) Upstream ORFs are prevalent translational repressors in vertebrates. *EMBO J.* **35**, 706–723.
 18. Hinnebusch A.G., Ivanov I.P., Sonenberg N. (2016) Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Science*. **352**, 1413–1416.
 19. Rogers J.T., Randall J.D., Cahill C.M., Eder P.S., Huang X., Gunshin H., Leiter L., McPhee J., Sarang S.S., Utsuki T., Greig N.H., Lahiri D.K., Tanzi R.E., Bush A.I., Giordano T., Gullans S.R. (2002) An iron-responsive element type II in the 5'-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript. *J. Biol. Chem.* **277**, 45518–45528.
 20. Jia L., Mao Y., Ji Q., Dersh D., Yewdell J.W., Qian S.B. (2020) Decoding mRNA translatability and stability from the 5' UTR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **27**, 814–821.
 21. Mayr C. (2017) Regulation by 3'-untranslated regions. *Annu. Rev. Genet.* **51**, 171–194.
 22. Leppek K., Schott J., Reitter S., Poetz F., Hammond M.C., Stoecklin G. (2013) Roquin promotes constitutive mRNA decay via a conserved class of stem-loop recognition motifs. *Cell*. **153**, 869–881.
 23. Jodoin R., Perreault J.P. (2018) G-quadruplexes formation in the 5'UTRs of mRNAs associated with colorectal cancer pathways. *PLoS One*. **13**, e0208363.
 24. Jodoin R., Carrier J.C., Rivard N., Bisailon M., Perreault J.P. (2019) G-quadruplex located in the 5'UTR of the BAG-1 mRNA affects both its cap-dependent and cap-independent translation through global secondary structure maintenance. *Nucleic Acids Res.* **47**, 10247–10266.
 25. Ishida-Kitagawa N., Tanaka K., Bao X., Kimura T., Miura T., Kitaoka Y., Hayashi K., Sato M., Maruoka M., Ogawa T., Miyoshi J., Takeya T. (2012) *Siglec-15* protein regulates formation of functional osteoclasts in concert with DNAX-activating protein of 12 kDa (DAP12). *J. Biol. Chem.* **287**, 17493–17502.
 26. Stuiblé M., Moraitis A., Fortin A., Saragosa S., Kalbakji A., Filion M., Tremblay G.B. (2014) Mechanism and function of monoclonal antibodies targeting *siglec-15* for therapeutic inhibition of osteoclastic bone resorption. *J. Biol. Chem.* **289**, 6498–6512.
 27. Sun J., Lu Q., Sanmamed M.F., Wang J. (2021) *Siglec-15* as an emerging target for next-generation cancer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **27**, 680–688.
 28. Andersson R. (2015) Promoter or enhancer, what's the difference? Deconstruction of established distinctions and presentation of a unifying model. *Bioessays*. **37**, 314–323.
 29. Kuersten S., Goodwin E.B. (2003) The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 626–637.
 30. Chen M., Lyu G., Han M., Nie H., Shen T., Chen W., Niu Y., Song Y., Li X., Li H., Chen X., Wang Z., Xia Z., Li W., Tian X.L., Ding C., Gu J., Zheng Y., Liu X., Hu J., Wei G., Tao W., Ni T. (2018) 3' UTR lengthening as a novel mechanism in regulating cellular senescence. *Genome Res.* **28**(3), 285–294. <https://doi.org/10.1101/gr.224451.117>
 31. Schuster S.L., Hsieh A.C. (2019) The untranslated regions of mRNAs in cancer. *Trends Cancer*. **5**, 245–262.
 32. Kataoka K., Shiraishi Y., Takeda Y., Sakata S., Matsumoto M., Nagano S., Maeda T., Nagata Y., Kitanaka A., Mizuno S., Tanaka H., Chiba K., Ito S., Watatani Y., Kakiuchi N., Suzuki H., Yoshizato T., Yoshida K., Sanada M., Itonaga H., Imaizumi Y., Totoki Y., Munakata W., Nakamura H., Hama N., Shide K., Kubuki Y., Hidaka T., Kameda T., Masuda K., Minato N., Kashiwase K., Izutsu K., Takaori-Kondo A., Miyazaki Y., Takahashi S., Shibata T., Kawamoto H., Akatsuka Y., Shimoda K., Takeuchi K., Seya T., Miyano S., Ogawa S. (2016) Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. *Nature*. **534**, 402–406.
 33. Chatterjee S., Pal J.K. (2009) Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell*. **101**, 251–262.
 34. Goodarzi H., Zhang S., Buss C.G., Fish L., Tavazoie S., Tavazoie S.F. (2014) Metastasis-suppressor transcript

- destabilization through TARBP2 binding of mRNA hairpins. *Nature*. **513**, 256–260.
35. Turi A., Loglisci C., Salvemini E., Grillo G., Malerba D., D'Elia D. (2009) Computational annotation of UTR cis-regulatory modules through frequent pattern mining. *BMC Bioinformatics*. **10**(Suppl. 6), S25.
36. Zhao W., Siegel D., Biton A., Tonqueze O.L., Zaitlen N., Ahituv N., Erle D.J. (2017) CRISPR-Cas9-mediated functional dissection of 3'-UTRs. *Nucl. Acids Res.* **45**, 10800–10810.
37. Chendrimada T.P., Gregory R.I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K., Shiekhattar R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. **436**, 740–744.
38. Schneider B.D., Leibold E.A. (2003) Effects of iron regulatory protein regulation on iron homeostasis during hypoxia. *Blood*. **102**, 3404–3411.
39. Kulkarni S., Savaan R., Qi Y., Gao X., Yuki Y., Bass S.E., Martin M.P., Hunt P., Deeks S. G., Telenti A., Pereyra F., Goldstein D., Wolinsky S., Walker B., Young H.A., Carrington M. (2011) Differential microRNA regulation of HLA-C expression and its association with HIV control. *Nature*. **472**, 495–498.

MAPPING REGULATORY ELEMENTS WITHIN 5' AND 3' UTRs OF *SIGLEC15* WITH A USE OF REPORTER SYSTEM

L. Wang¹, R. Li¹, X. Lai¹, X. Zhang¹, H. Chen¹*, and W. Zhao¹**

¹ Molecular Cancer Research Center, School of Medicine, Shenzhen Campus of Sun Yat-sen University, Shenzhen, Guangdong, 518107 P.R. China

*e-mail: chenhm69@mail.sysu.edu.cn

**e-mail: zhaowx5@mail.sysu.edu.cn

Siglec-15 is an immune suppressor with broad upregulation on various cancer types and has emerged as a potential target for cancer immunotherapy. However, it remains unclear how *SIGLEC15* expression is controlled in normal or cancer cells. In this work, we utilized reporter assays to evaluate the impact of the 5' UTR and the 3' UTR of *SIGLEC15* mRNA on gene expression. We found that the 3' UTR dramatically reduced reporter protein production, whereas the 5' UTR showed modest inhibitory effect. Quantification of steady-state mRNA revealed the good coupling of protein amount and mRNA abundance that was associated with the 3' UTR. In contrast, the 5' UTR had little effect on mRNA abundance compared with the empty control. By measuring mRNA half-life, we showed that the 3' UTR markedly promoted mRNA degradation. Testing shortened 3' UTR fragments demonstrated five out of the six having notable inhibitory effect, with the one spanning 993–1317 had the most robust activity. More interestingly, the 993–1317 region contains a predicted 43-nt stem-loop structure that showed apparent inhibitory activity in four cell lines tested. These results suggested that the 3' UTR inhibited reporter gene expression by accelerating mRNA decay possibly via multiple *cis*-regulatory elements, but the 5' UTR repressed gene expression by inhibiting translation. Thus, our findings provided a clue to the molecular mechanism underlying the regulation of *SIGLEC15* expression.

Keywords: *SIGLEC15*, 5' UTR, 3' UTR, mRNA degradation, translation

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21

ПОЛНОГЕНОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК
CD4+ Т-ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНО-ПРОГРЕССИРУЮЩИМ
РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ СВИДЕТЕЛЬСТВУЕТ О ВОВЛЕЧЕННОСТИ
ЭТОГО ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА
В ИММУНОПАТОГЕНЕЗ ЗАБОЛЕВАНИЯ© 2022 г. И. С. Киселев^{a, b, *}, О. Г. Кулакова^{a, b}, Л. В. Данилова^{c, d}, О. А. Батурина^e,
М. Р. Кабилов^e, Е. В. Попова^a, А. Н. Бойко^{a, f}, О. О. Фаворова^{a, b}^aРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997 Россия^bНациональный медицинский исследовательский центр кардиологии Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Москва, 121552 Россия^cИнститут общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия^dJohns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD 21205 USA^eИнститут химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия^fФедеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического
агентства Российской Федерации, Москва, 117997 Россия

*e-mail: kiselev.ivan.1991@gmail.com

Поступила в редакцию 18.10.2021 г.

После доработки 18.10.2021 г.

Принята к публикации 02.11.2021 г.

Рассеянный склероз (РС) — хроническое заболевание ЦНС, патогенез которого включает аутоиммунную и нейродегенеративную компоненты. В большинстве случаев у больных наблюдается ремиттирующая форма РС, однако у 10–15% пациентов развивается первично-прогрессирующий РС (ППРС), существенно отличающийся от ремиттирующего как по механизмам развития патологического процесса, так и по ряду демографических и клинических характеристик. Эти отличия могут объясняться особенностями эпигенетических механизмов регуляции генной экспрессии при ППРС, в том числе одного из них — метилирования ДНК. Особенности метилирования ДНК в различных клеточных популяциях при ППРС остаются практически не изученными. Цель настоящей работы состояла в выявлении дифференциально метилированных CpG-сайтов (ДМС) генома CD4+ Т-лимфоцитов, характеризующих ППРС. Полногеномный анализ метилирования ДНК CD4+ Т-лимфоцитов проводили с использованием ДНК-микрочипов высокой плотности. Идентифицировано 108 ДМС, отличающих больных ППРС, никогда не принимавших иммуномодулирующие препараты, от здоровых индивидов. У больных гиперметилированными оказались 81% этих ДМС. Более половины всех ДМС находятся в области известных генов и входят в состав CpG-островков и соседних с ними областей, что говорит о высокой функциональной значимости этих ДМС при развитии ППРС. Анализ представленности генов, содержащих ДМС, в основных биологических процессах показал их участие в формировании иммунного ответа, процессинге и презентации антигена, развитии иммунной системы, регуляции адгезии клеток к внеклеточному матриксу. Результаты полногеномного анализа метилирования ДНК CD4+ Т-лимфоцитов больных ППРС свидетельствуют о вовлеченности этой эпигенетической модификации в иммунопатогенез заболевания. Полученные данные могут помочь в углублении знаний об особенностях патогенеза этой тяжелой формы РС.

Ключевые слова: рассеянный склероз, первично-прогрессирующий рассеянный склероз, метилирование ДНК, эпигенетика, полногеномный анализ

DOI: 10.31857/S0026898422030089

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) — тяжелое хроническое заболевание ЦНС, сочетающее в своем пато-

генезе аутоиммунную и нейродегенеративную компоненты и сопровождающееся прогрессирующей неврологической дисфункцией [1]. Следствием не-

Сокращения: ДМС — дифференциально метилированный CpG-сайт; МНК — моноклеарные клетки периферической крови; РРС — ремиттирующий рассеянный склероз; РС — рассеянный склероз; ППРС — первично-прогрессирующий рассеянный склероз; EDSS — расширенная шкала инвалидизации (Expanded Disability Status Scale); GO — база данных генной онтологии (Gene Ontology database); SNP — однонуклеотидный полиморфизм (Single Nucleotide Polymorphism).

уклонного нарастания неврологического дефицита является необратимая инвалидизация пациентов в молодом трудоспособном возрасте, что обуславливает высокую социальную и экономическую значимость заболевания.

РС – это комплексное заболевание, которое развивается у лиц с генетической предрасположенностью под воздействием факторов внешней среды. При этом влияние внешних факторов на риск развития РС может быть в значительной мере опосредовано эпигенетическими механизмами регуляции экспрессии генов [2].

Течение РС обладает выраженной клинической гетерогенностью. В большинстве случаев у больных наблюдается ремиттирующая форма РС (РРС), характеризующаяся сменами периодов обострения и ремиссии [3]. Однако у 10–15% пациентов с самого начала болезни происходит непрерывное нарастание неврологического дефицита; такая тяжелая клинически обособленная форма РС получила название первично-прогрессирующего РС (ППРС) [4].

ППРС существенно отличается от РРС как по механизмам развития патологического процесса [5], так и по целому ряду демографических и клинических характеристик, таких как соотношение больных мужчин и женщин, средний возраст дебюта заболевания, клинические признаки дебюта, скорость прогрессирования и др. [4, 6]. Эти отличия могут объясняться особенностями эпигенетических механизмов регуляции генной экспрессии при ППРС.

Эпигенетические модификации генома не затрагивают последовательности ДНК, но при этом способны влиять на экспрессию генов в различных клетках и/или тканях [2]. Один из ключевых эпигенетических процессов – метилирование ДНК в положении С5 цитозинового основания в составе CpG-динуклеотидов. Метилирование CpG-сайтов в области промотора приводит к быстрому подавлению экспрессии генов с участием репрессорных белков [7]. Поиск специфических паттернов метилирования, характеризующих ППРС, может помочь в понимании особенностей развития заболевания.

Наибольшей информативностью при изучении метилирования ДНК обладает полногеномный анализ с использованием ДНК-микрочипов высокой плотности или высокопроизводительного секвенирования. Применение этих методов позволило выявить различия в паттернах метилирования ДНК из различных клеток и тканей больных РРС и здоровых добровольцев [8–12].

Первое исследование метилирования ДНК из мононуклеарных клеток периферической крови (МНК) больных ППРС выявило паттерн метилирования, отличающий эту форму заболевания и от больных РРС, и от здоровых доноров [8]. Одна-

ко МНК представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, а, как показано ранее, паттерны метилирования ДНК в различных типах клеток могут значительно отличаться как в норме, так и при патологии [13]. Это приводит к необходимости изучения особенностей метилирования ДНК в отдельных субпопуляциях клеток крови при ППРС.

В настоящей работе мы изучили метилирование ДНК CD4⁺ Т-лимфоцитов – одной из ключевых для патогенеза РС популяций лейкоцитов крови – у больных ППРС [14].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Характеристика групп. В исследование включены восемь больных ППРС (шесть женщин и двое мужчин) в возрасте от 28 до 58 лет. Диагноз устанавливали согласно критериям МакДональда в редакции 2014 года [15]. Средний балл по расширенной шкале инвалидизации (Expanded Disability Status Scale, EDSS) составил 4.29 ± 0.39 . Больные, включенные в исследование, никогда не принимали иммуномодулирующих препаратов. В контрольную группу вошли восемь здоровых добровольцев (шесть женщин, двое мужчин) в возрасте от 28 до 50 лет без признаков неврологических заболеваний.

Все включенные в исследование индивиды были (согласно данным анкетирования) этническими русскими, все подписали информированное согласие на участие в эксперименте. Проведение исследования одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ.

Выделение ДНК и полногеномный анализ профилей метилирования. Образцы периферической крови собирали в вакуумные пробирки с EDTA. МНК выделяли из крови путем центрифугирования в градиенте фиколл-гипака. Фракцию CD4⁺ Т-лимфоцитов выделяли из МНК с помощью микробус, конъюгированных с антителами к CD4-антигенам (“Miltenyi Biotec”, Германия). Геномную ДНК выделяли из CD4⁺ Т-лимфоцитов с помощью набора DNA Mini Kit (“Qiagen”, Германия) по методике производителя. Бисульфитную конверсию геномной ДНК проводили при помощи набора EZ DNA Methylation-Gold Kit (“Zymo Research”, США). Уровень метилирования ДНК оценивали с помощью биологических микрочипов высокой плотности Infinium HumanMethylation450 BeadChip на сканере чипов iScan (“Illumina”, США) в Центре коллективного пользования “Геномика” (ИХБФМ СО РАН).

Биоинформатический анализ. Анализ данных, в том числе первичная обработка данных и их нормирование, выполнены с использованием пакета methylumi [16] и стандартных средств среды R. Из анализа исключали пробы на ДНК-микрочипе, которые содержали однонуклеотидные полимор-

физмы (SNP) на расстоянии ≤ 10 п.н. от исследуемого CpG-сайта; пробы, перекрывающиеся с повторяющимися последовательностями генома; и пробы, расположенные в половых хромосомах. Из рассмотрения также исключили пробы, у которых величина значимости обнаружения сигнала (detection p -value) была больше 0.05 хотя бы в одном из исследованных образцов. Для оценки уровней метилирования CpG-сайтов вычисляли показатель β , который определяется как отношение интенсивности сигнала метилирования от соответствующей пробы на ДНК-микрочипе к общей интенсивности сигнала (сумма интенсивностей метилированного и неметилированного сигналов) данной пробы. Значения β варьировали от 0 для неметилированных проб до 1 – в полностью метилированных.

Дифференциальное метилирование сайтов определяли с помощью пакета limma [17] среды R. CpG-сайт считали дифференциально метилированным (ДМС), если средние значения показателя бета этого сайта в сравниваемых группах различались более чем на 10% ($|\Delta\beta| > 0.1$), а соответствующая величина p , определенная с помощью t -теста Стьюдента, была меньше 0.01. Локализацию конкретного CpG-сайта в CpG-островке определяли, используя аннотацию UCSC в hg19; ДМС, расположенные в 2 т.п.н. от CpG-островков, относили к соседним с ними областям (shore); локализованные в 2 т.п.н. от соседних областей – к отдаленным областям (shelf). Построение карт интенсивности сигналов ДМС осуществляли с использованием пакетов heatmap и ggplot2 для среды R.

Статистический анализ перепредставленности известных биологических процессов (Biological Process) из базы данных Gene Ontology (GO) генами, содержащими ДМС, проводили с использованием web-инструмента GO Panther (<http://www.pantherdb.org/> [18]). Отбирали значимо обогащенные процессы ($p < 0.05$), включающие не менее двух идентифицированных генов. В случае обогащения нескольких вложенных друг в друга процессов анализировали только обобщающий процесс более высокого уровня.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Чтобы оценить вовлечение эпигенетического механизма метилирования ДНК CD4+ Т-лимфоцитов в развитие ППРС, мы провели профилирование паттернов метилирования более 450000 CpG-сайтов генома этой клеточной популяции в репрезентативных группах больных ППРС и здоровых индивидов. Сравнение уровней метилирования CpG-сайтов в этих группах позволило нам выявить 108 ДМС при ППРС. При иерархической кластеризации образцов ДНК на картах интенсивности сигналов ДМС (рис. 1) больные ППРС и здо-

ровые индивиды группируются в обособленные кластеры.

Характеристика выявленных ДМС представлена в табл. 1. Большая их часть (81%) оказалась гиперметилированной у больных при сравнении с контрольной группой. Более половины всех ДМС (66%) располагаются в области генов (всего выявлено 53 таких гена). Из них ген *OR2L13* содержал восемь ДМС, ген *IGF2BP1* – три ДМС, а гены *ERICH1*, *HKR1*, *IGSF9B*, *LCLAT1*, *NPAS3*, *RHOJ*, *SP140*, *HCG4B* и *HLA-H* – по два ДМС. Уровни метилирования всех ДМС в области генов *C11orf58*, *CCDC172*, *CLRN3*, *RASA3*, *PTCD3*, *SP140*, *TONSL*, *FAM157B* были снижены у больных ППРС по сравнению с контрольной группой. У больных ген *HLA-H* содержал один гипометилированный и один гиперметилированный ДМС, а остальные 44 гена содержали гиперметилированные ДМС.

Выявлены различия в уровне метилирования 16 ДМС в сравниваемых группах более чем на 20% (13 из них расположены в восьми генах). Гиперметилированными на 20–37% были ДМС cg08260406, cg20507276 и cg08944170 (ген *OR2L13*), cg07157030 (*RHOJ*), cg19980771 (*SLC22A16*), cg17749961 и cg12454169 (*LCLAT1*), cg15070894 и cg18786623 (*HCG4B*), cg01053087 и cg05875700 (*ERICH1*). Cg04824555 (*FAM157B*) и cg02938066 (*TONSL*) были гипометилированными у больных на 21 и 22% соответственно.

Для оценки возможного влияния выявленных ДМС на экспрессию генов, в области которых они расположены, проведен анализ их локализации по отношению к функционально значимым скоплениям CpG-сайтов. Как видно из рис. 2, более половины ДМС находятся в функционально наиболее важных областях: в CpG-островках (43%) и в соседних с ними областях (24%).

Проведен статистический анализ перепредставленности известных биологических процессов (GO Biological Process) генами, содержащими ДМС. Как можно видеть из табл. 2, наиболее значимое обогащение наблюдается для процессов “Процессирование и презентация антигена” (GO:0019882) и “Развитие иммунной системы” (GO:0002520). Остальные идентифицированные процессы относятся к глобальным механизмам поддержания жизнедеятельности клетки: “Внутриклеточный метаболизм аминокислот” (GO:0006520), “Регуляция удержания в клетке ионов Ca^{2+} ” (GO:0051282), “Регуляция адгезии клеток к внеклеточному матриксу” (GO:0001952), “Транспорт мРНК” (GO:0051028), “Регуляция морфогенеза клеток” (GO:0022604).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мы впервые идентифицировали различия профилей метилирования ДНК

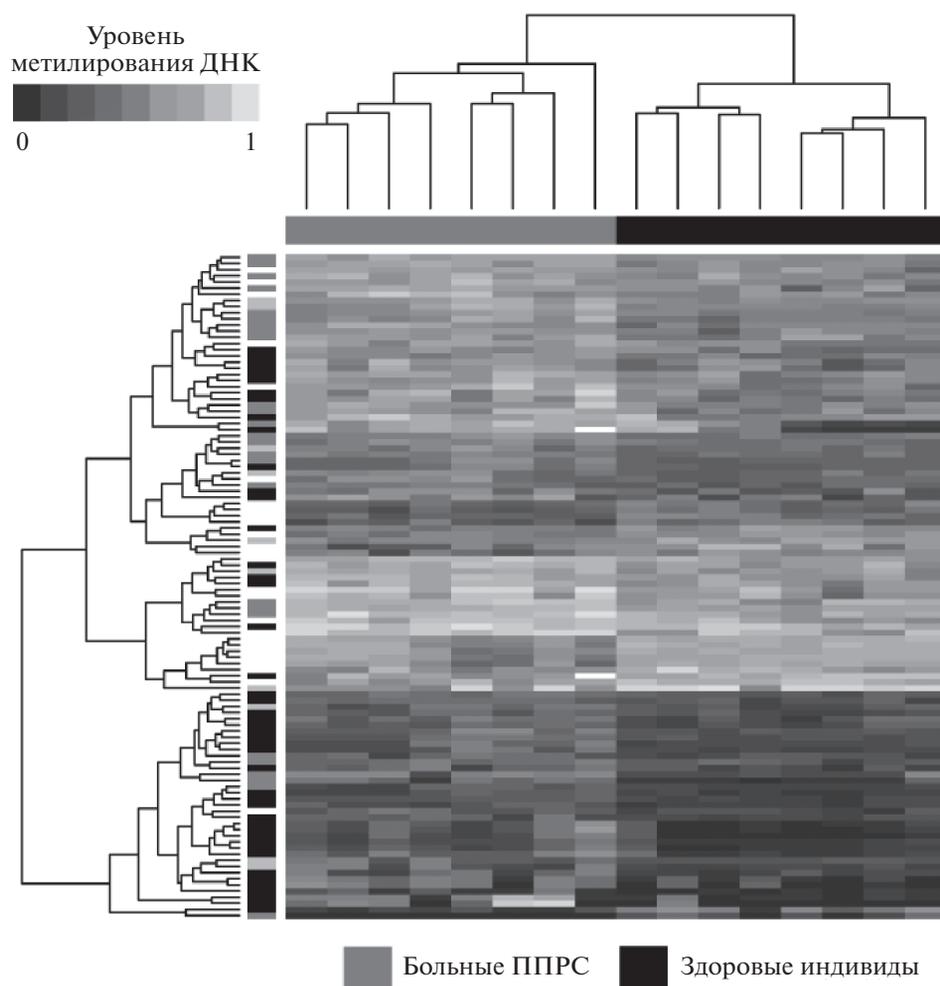


Рис. 1. Карта интенсивности сигналов ДМС генома CD4+ Т-лимфоцитов у больных ППРС и здоровых индивидов. Градиент серого от темного к светлому отражает повышение уровня метилирования ДНК в образцах. Дендрограмма сверху показывает иерархическую кластеризацию образцов: серый цвет – образцы больных ППРС, черный – здоровых индивидов. Слева представлена иерархическая кластеризация ДМС, где черным показана их локализация в CpG-островках (island), темно-серым – в соседних с ними областях (shore), светло-серым – в отдаленных областях (shelf), белым – в прочих областях (sea).

в популяции CD4+ Т-лимфоцитов, ключевой для патогенеза РС, у больных ППРС и здоровых индивидов контрольной группы. Более половины выявленных ДМС находится в области известных генов и входят в состав CpG-островков и соседних с ними областей, что говорит о высокой функциональной значимости этих ДМС в патологическом процессе.

При ППРС наблюдается повышение уровня метилирования ДНК CD4+ Т-лимфоцитов (81% ДМС гиперметилированы), что полностью согласуется с данными, полученными нами ранее при анализе ДНК из МНК (86% ДМС гиперметилированы) [8]. Подобное повышение уровней метилирования ДНК иммунных клеток, по-видимому, отличает ППРС от более распространенного РС, при котором гиперметилированы 43% CpG-сайтов в ДНК МНК [8] и 41–50% – в CD4+ Т-лимфоцитах [9, 19, 20].

Основной областью генома, определяющей наследственную предрасположенность к РС независимо от его клинической формы, признан локус HLA хромосомы 6 [21]. В настоящей работе мы выявили гиперметилирование ДНК трех генов, расположенных в этом локусе: *HLA-DRB5*, кодирующего β-цепь молекул HLA II, псевдогена *HLA-H* и белокнекодирующего гена *HCG4B* с неизвестной функцией. Дифференциальное метилирование генов *HLA-DRB5* и *HCG4B* ранее уже обнаруживали при сравнении уровней метилирования ДНК CD4+ Т-лимфоцитов больных РС и здоровых индивидов [9, 20]. Дифференциальное метилирование различных генов локуса HLA показано ранее и в других популяциях лимфоцитов больных РС [10, 22] и ППРС [8] при сравнении с контрольной группой. В то же время, прямое сравнение не выявило различий в уровнях мети-

Таблица 1. ДМС, выявленные при анализе метилирования ДНК CD4⁺ Т-лимфоцитов, у больных ПППС и здоровых индивидов

Общее количество ДМС	108 (100%)
ДМС, гиперметилированные у больных ПППС	88 (81%)
ДМС в области генов	71 (66%)
Гены, содержащие ДМС	53
Гены, содержащие ДМС, гиперметилированные у больных ПППС	44 (83%)
Белоккодирующие гены, содержащие ДМС	<i>AGA; ASRGL1; C11orf58; C1orf35; CBFA2T3; CCDC172; CCDC85C; CDK11B; CLRN3; CORO1C; CRTAC1; DCLRE1C; ENOSF1; ERICH1(2); FLI1; FYTTD1; HKR1(2); HLA-DRB5; IGDC4; IGF2BP1(3); IGSF9B(2); IMMT; KIAA0513; LCLAT1(2); LIME1; MACROH2A1; NKAIN1; NPAS3(2); OR2L13(8); PLEKHA2; PRTFDC1; PTH1R; RASA3; RHOJ(2); SERPINA11; SIM2; SLC22A16; SLC35E4; SLC46A2; PEA3; PTCF3; SP140(2); SPAG1; TGFBR3; TMEM44; TONSL; TULP2; UBXN7; XKR5</i>
Белокнекодирующие гены, содержащие ДМС	<i>FAM157B; GUSBP4; HCG4B(2); HLA-H(2)*</i>

Примечание. Критерии отбора ДМС: $p < 0.01$, $|\Delta\beta| > 0.1$. Жирным отмечены гены, ДМС в которых имеют пониженный уровень метилирования у больных ПППС. В скобках около названия гена указано число ДМС в гене, если их более 1.

* В гене выявлен один ДМС с повышенным и один с пониженным уровнем метилирования.

Таблица 2. Перепредставленность генов, содержащих ДМС, в известных биологических процессах (по данным базы Gene Ontology)

Процесс (ID в базе Gene Ontology)	Гены, входящие в набор, общее количество	ДМС-содержащие гены, вовлеченные в процесс			Обогащение, %	Значение p
		фактическое количество	ген	ожидаемое количество		
Процессинг и презентация антигена (GO:0019882)	94	2	<i>HLA-DRB5, HLA-H</i>	0.23	8.76	0.023
Развитие иммунной системы (GO:0002520)	665	5	<i>CBFA2T3, DCLRE1C, FLI1, SLC46A2, TGFBR3</i>	1.61	3.1	0.023
Внутриклеточный метаболизм аминокислот (GO:0006520)	276	3	<i>AGA, ASRGL1, ENOSF1</i>	0.67	4.48	0.030
Регуляция удержания в клетке ионов Ca ²⁺ (GO:0051282)	119	2	<i>LIME1, RASA3</i>	0.29	6.92	0.035
Регуляция адгезии клеток к внеклеточному матриксу (GO:0001952)	125	2	<i>CORO1C, PLEKHA2</i>	0.3	6.59	0.038
Транспорт мРНК (GO:0051028)	137	2	<i>FYTTD1, IGF2BP1</i>	0.33	6.01	0.045
Регуляция морфогенеза клеток (GO:0022604)	310	3	<i>CORO1C, PEA3, RHOJ</i>	0.75	3.99	0.040

лирования генов локуса HLA при этих двух формах РС [23]. Это еще раз подтверждает ключевую роль локуса HLA в патогенезе РС независимо от

его формы и указывает на вовлечение эпигенетических механизмов в регуляцию экспрессии генов локуса HLA при развитии заболевания.

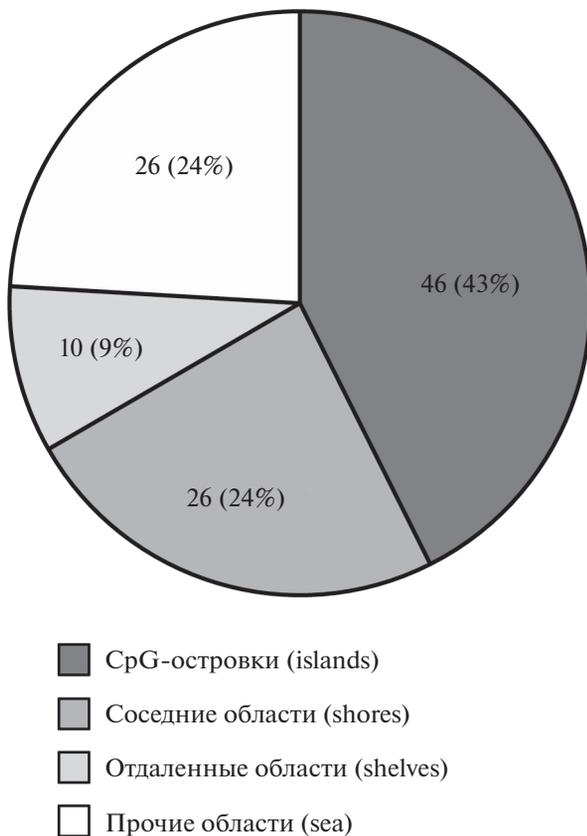


Рис. 2. Локализация ДМС, выявленных при анализе метилирования ДНК CD4+ Т-лимфоцитов больных ППРС и здоровых индивидов, по отношению к функционально значимым скоплениям CpG-сайтов. В секторах диаграммы указано абсолютное число ДМС (% от общего числа ДМС).

Мы сравнили спектры генов, содержащих ППРС-специфические ДМС, впервые полученные методом полногеномного профилирования ДНК из CD4+ Т-лимфоцитов (настоящее исследование), и из МНК [8]. Найдены четыре гена, повышение уровня метилирования которых наблюдали в обоих исследованиях: *OR2L13*, *IGSF9B*, *HKR1* и *TMEM44*.

В промоторной области первого из этих генов, *OR2L13*, обнаружено сразу восемь ДМС (см. табл. 1); несколько из них гиперметилированы более чем на 20%. Этот ген кодирует один из белков обширного семейства обонятельных рецепторов, сопряженных с G-белками. Рецепторы этого семейства широко экспрессируются в самых разных тканях и органах, включая ЦНС, и могут участвовать в выполнении множества различных функций [24]. Хотя ген *OR2L13* к настоящему моменту практически не изучен, обнаружена его связь с несколькими заболеваниями ЦНС. Показано, что при развитии болезни Паркинсона в ЦНС снижается экспрессия *OR2L13* [25], а у больных аутизмом

наблюдается гиперметилирование гена в цельной крови [26].

Продукт второго гена, *IGSF9B*, представляет собой трансмембранный белок с высоким уровнем экспрессии в интернейронах и связанный с регуляцией развития тормозных синапсов [27]. Интересно, что SNP rs10894768, расположенный во втором экзоне, ассоциирован с тяжестью РС, а сам ген *IGSF9B* экспрессируется в астроцитах и макрофагах из хронически активных очагов демиелинизации [28]. Данные о функциях генов *HKR1* и *TMEM44* человека и их связи с аутоиммунными или нейродегенеративными заболеваниями в настоящий момент отсутствуют.

Отдельного упоминания заслуживают гены *ERIC1* и *LCLAT1*. В нашем исследовании уровни метилирования ДМС в областях обоих этих генов у больных ППРС оказались более чем на 20% выше, чем у здоровых индивидов контрольной группы. Интересно, что, напротив, наблюдали снижение уровня метилирования и *ERIC1*, и *LCLAT1* в CD4+ клетках больных РС [9, 20], что может указывать на вовлечение эпигенетической регуляции экспрессии этих генов в формирование клинической формы РС. Функция *ERIC1* остается пока неизученной. Показано участие продукта гена *LCLAT1* в модификации фосфолипидов, в том числе митохондриального кардиолипина. Снижение экспрессии *LCLAT1* коррелирует с повышением продукции активных форм кислорода и индукцией апоптоза [29].

Статистический анализ перепредставленности генов, содержащих ДМС, в основных биологических процессах показал, что часть из них вовлечена в процессинг и презентацию антигена (*HLA-DRB5*, *HLA-H*), развитие иммунной системы (*CBFA2T3*, *DCLRE1C*, *FLI1*, *SLC46A2*, *TGFBR3*), а также в регуляцию адгезии клеток к внеклеточному матриксу (*CORO1C*, *PLEKHA2*), во многом определяющую миграцию лейкоцитов. Остальные гены, содержащие ДМС, по-видимому, участвуют в патогенезе ППРС на уровне общих интегральных систем регуляции жизнедеятельности клетки.

В целом, проведенный нами анализ позволил идентифицировать паттерн метилирования ДНК, характерный для ППРС. Полученные нами данные, после соответствующего подтверждения на независимых выборках, могут помочь в углублении знаний об особенностях патогенеза ППРС, что, в свою очередь, может быть использовано при разработке новых эффективных препаратов для терапии этого заболевания.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ №121040600400-8.

От всех включенных в исследование индивидов получено информированное согласие на участие в

эксперименте. Проведение исследования одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. (2019) Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*. **365**(6460), eaav7188.
- Oksenberg J.R. (2013) Decoding multiple sclerosis: an update on genomics and future directions. *Expert. Rev. Neurother.* **13**(12 Suppl), 11–19.
- Lublin F.D., Reingold S.C., Cohen J.A., Cutter G.R., Sørensen P.S., Thompson A.J., Wolinsky J.S., Balcer L.J., Banwell B., Barkhof F., Bebo B. Jr., Calabresi P.A., Clanet M., Comi G., Fox R.J., Freedman M.S., Goodman A.D., Inglese M., Kappos L., Kieseier B.C., Lincoln J.A., Lubetzki C., Miller A.E., Montalban X., O'Connor P.W., Petkau J., Pozzilli C., Rudick R.A., Sormani M.P., Stüve O., Waubant E., Polman C.H. (2014) Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. **83**(3), 278–286.
- Koch M., Kingwell E., Rieckmann P., Tremlett H. (2009) The natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Neurology*. **73**(23), 1996–2002.
- Correale J., Gaitán M.I., Ysraelit M.C., Fiol M.P. (2017) Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment. *Brain*. **140**(3), 527–546.
- Debouverie M., Pittion-Vouyovitch S., Louis S., Guillemin F., LORSEP Group. (2008) Natural history of multiple sclerosis in a population-based cohort. *Eur. J. Neurol.* **15**(9), 916–921.
- Choy M.K., Movassagh M., Goh H.G., Bennett M.R., Down T.A., Foo R.S. (2010) Genome-wide conserved consensus transcription factor binding motifs are hyper-methylated. *BMC Genomics*. **11**, 519.
- Кулакова О.Г., Кабилов М.Р., Данилова Л.В., Попова Е.В., Батурина О.А., Царева Е.Ю., Баулина Н.М., Киселев И.С., Бойко А.Н., Фаворов А.В., Фаворова О.О., Власов В.В. (2016) Полногеномный анализ метилирования ДНК мононуклеарных клеток крови больных различными формами рассеянного склероза. *Acta Naturae*. **8**(2), 39–47.
- Maltby V.E., Lea R.A., Sanders K.A., White N., Benton M.C., Scott R.J., Lechner-Scott J. (2017) Differential methylation at MHC in CD4+ T cells is associated with multiple sclerosis independently of HLA-DRB1. *Clin. Epigenetics*. **9**, 71.
- Maltby V.E., Graves M.C., Lea R.A., Benton M.C., Sanders K.A., Tajouri L., Scott R.J., Lechner-Scott J. (2015) Genome-wide DNA methylation profiling of CD8+ T cells shows a distinct epigenetic signature to CD4+ T cells in multiple sclerosis patients. *Clin. Epigenetics*. **7**, 118.
- Huynh J.L., Garg P., Thin T.H., Yoo S., Dutta R., Trapp B.D., Haroutunian V., Zhu J., Donovan M.J., Sharp A.J., Casaccia P. (2014) Epigenome-wide differences in pathology-free regions of multiple sclerosis-affected brains. *Nat. Neurosci.* **17**(1), 121–130.
- Marabita F., Almgren M., Sjöholm L.K., Kular L., Liu Y., James T., Kiss N.B., Feinberg A.P., Olsson T., Kockum I., Alfredsson L., Ekström T.J., Jagodic M. (2017) Smoking induces DNA methylation changes in multiple sclerosis patients with exposure-response relationship. *Sci. Rep.* **7**(1), 14589.
- Macartney-Coxson D., Cameron A.M., Clapham J., Benton M.C. (2020) DNA methylation in blood-potential to provide new insights into cell biology. *PLoS One*. **15**(11), e0241367.
- Legroux L., Arbour N. (2015) Multiple sclerosis and T lymphocytes: an entangled story. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **10**(4), 528–546.
- Milo R., Miller A. (2014) Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **13**(4–5), 518–524.
- Davis S., Du P., Bilke S., Triche, Jr. T., Bootwalla M. Methylumi: Handle Illumina methylation data. R package version 2.38.0. <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/methylumi.html> (accessed Sep. 20, 2021).
- Ritchie M.E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C.W., Shi W., Smyth G.K. (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucl. Acids Res.* **43**(7), e47.
- Thomas P.D., Campbell M.J., Kejariwal A., Mi H., Karlak B., Daverman R., Diemer K., Muruganujan A., Narechania A. (2003) PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res.* **13**(9), 2129–2141.
- Bos S.D., Page C.M., Andreassen B.K., Elboudwarej E., Gustavsen M.W., Briggs F., Quach H., Leikfoss I.S., Bjølgerud A., Berge T., Harbo H.F., Barcellos L.F. (2015) Genome-wide DNA methylation profiles indicate CD8+ T cell hypermethylation in multiple sclerosis. *PLoS One*. **10**(3), e0117403.
- Graves M.C., Benton M., Lea R.A., Boyle M., Tajouri L., Macartney-Coxson D., Scott R.J., Lechner-Scott J. (2014) Methylation differences at the HLA-DRB1 locus in CD4+ T-cells are associated with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **20**(8), 1033–1041.
- Hollenbach J.A., Oksenberg J.R. (2015) The immunogenetics of multiple sclerosis: a comprehensive review. *J. Autoimmun.* **64**, 13–25.
- Kular L., Liu Y., Ruhrmann S., Zheleznyakova G., Marabita F., Gomez-Cabrero D., James T., Ewing E., Lindén M., Górnikiewicz B., Aeinehband S., Stridh P., Link J., Andlauer T.F.M., Gasperi C., Wiendl H., Zipp F., Gold R., Tackenberg B., Weber F., Hemmer B., Strauch K., Heilmann-Heimbach S., Rawal R., Schminke U., Schmidt C.O., Kacprowski T., Franke A., Laudes M., Diltthey A.T., Celius E.G., Søndergaard H.B., Tegnér J., Harbo H.F., Oturai A.B., Olafsson S., Eggertsson H.P., Halldorsson B.V., Hjaltason H., Olafsson E., Jonsdóttir I., Stefansson K., Olsson T., Piehl F., Ekström T.J., Kockum I., Feinberg A.P., Jagodic M. (2018) DNA methylation as a mediator of HLA-DRB1*15:01 and a protective variant in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* **9**(1), 2397.
- Handel A.E., De Luca G.C., Morahan J., Handunnetthi L., Sadovnick A.D., Ebers G.C., Ramagopalan S.V. (2010) No evidence for an effect of DNA methylation on multiple sclerosis severity at HLA-DRB1*15 or HLA-DRB5. *J. Neuroimmunol.* **223**(1–2), 120–123.
- Feldmesser E., Olender T., Khen M., Yanai I., Ophir R., Lancet D. (2006) Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes. *BMC Genomics*. **7**, 121.

25. Garcia-Esparcia P., Schlüter A., Carmona M., Moreno J., Ansoleaga B., Torrejón-Escribano B., Gustincich S., Pujol A., Ferrer I. (2013) Functional genomics reveals dysregulation of cortical olfactory receptors in Parkinson disease: novel putative chemoreceptors in the human brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **72**(6), 524–539.
26. Wong C.C., Meaburn E.L., Ronald A., Price T.S., Jeffries A.R., Schalkwyk L.C., Plomin R., Mill J. (2014) Methylomic analysis of monozygotic twins discordant for autism spectrum disorder and related behavioural traits. *Mol. Psychiatry.* **19**(4), 495–503.
27. Woo J., Kwon S.K., Nam J., Choi S., Takahashi H., Krueger D., Park J., Lee Y., Bae J.Y., Lee D., Ko J., Kim H., Kim M.H., Bae Y.C., Chang S., Craig A.M., Kim E. (2013) The adhesion protein IgSF9b is coupled to neuroligin 2 via S-SCAM to promote inhibitory synapse development. *J. Cell. Biol.* **201**(6), 929–944.
28. Gil-Varea E., Urcelay E., Vilariño-Güell C., Costa C., Midaglia L., Matesanz F., Rodríguez-Antigüedad A., Oksenberg J., Espino-Paisan L., Dessa Sadovnick A., Saiz A., Villar L.M., García-Merino J.A., Ramió-Torrentà L., Triviño J.C., Quintana E., Robles R., Sánchez-López A., Arroyo R., Alvarez-Cermeño J.C., Vidal-Jordana A., Malhotra S., Fissolo N., Montalban X., Comabella M. (2018) Exome sequencing study in patients with multiple sclerosis reveals variants associated with disease course. *J. Neuroinflammation.* **15**(1), 265.
29. Huang L.S., Mathew B., Li H., Zhao Y., Ma S.F., Noth I., Reddy S.P., Harijith A., Usatyuk P.V., Berdyshev E.V., Kaminski N., Zhou T., Zhang W., Zhang Y., Rehman J., Kotha S.R., Gurney T.O., Parinandi N.L., Lussier Y.A., Garcia J.G., Natarajan V. (2014) The mitochondrial cardiolipin remodeling enzyme lysocardiolipin acyltransferase is a novel target in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**(11), 1402–1415.

GENOME-WIDE ANALYSIS OF DNA METHYLATION IN CD4+ T-LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH PRIMARY PROGRESSIVE MULTIPLE SCLEROSIS INDICATES THE INVOLVEMENT OF THIS EPIGENETIC PROCESS IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF THE DISEASE

I. S. Kiselev^{1, 2, *}, O. G. Kulakova^{1, 2}, L. V. Danilova^{3, 4}, O. A. Baturina⁵, M. R. Kabilov⁵, E. V. Popova¹, A. N. Boyko^{1, 6}, and O. O. Favorova^{1, 2}

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

² National Medical Research Center for Cardiology, Moscow, 121552 Russia

³ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

⁴ Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD, 21205 USA

⁵ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

⁶ Federal Center for Brain and Neurotechnology, Federal Medical and Biological Agency of the Russian Federation, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: kiselev.ivan.1991@gmail.com

Pathogenesis of multiple sclerosis (MS), a chronic disease of the CNS, includes autoimmune and neurodegenerative components. In most cases, patients develop relapsing-remitting MS, however, 10–15% of patients develop primary progressive MS (PPMS), which differs from relapsing-remitting MS in mechanisms of the pathological process, as well as in a number of demographic and clinical characteristics. These differences may be explained by the peculiarities of the epigenetic regulation of gene expression in PPMS. DNA methylation is one of the key epigenetic processes. The peculiarities of DNA methylation from various cell populations of PPMS patients remain understudied. The aim of this study is to identify differentially methylated CpG-sites (DMSs) of the genome of CD4+ T-lymphocytes characterizing PPMS. The study included eight treatment-naïve PPMS patients and eight healthy controls. Genome-wide analysis of DNA methylation of CD4+ T-lymphocytes was performed using high-density DNA microarrays. We identified 108 DMSs that distinguish PPMS patients from healthy controls. Eighty one percent of these DMSs were hypermethylated in PPMS patients. More than a half of identified DMSs is located in known genes and included in CpG islands and adjacent regions, which indicates a high functional significance of these DMSs in PPMS development. Analysis of the overrepresentation of genes containing DMSs in the main biological processes showed their involvement in the development of the immune response – antigen processing and presentation, development of the immune system, regulation of cell adhesion to the extracellular matrix. Genome-wide analysis of DNA methylation in CD4+ T-lymphocytes of PPMS patients indicates the involvement of this epigenetic process in the immunopathogenesis of the disease. Obtained data may help in better understanding of the pathogenesis of this severe form of MS.

Keywords: multiple sclerosis, primary progressive multiple sclerosis, DNA methylation, epigenetics, genome-wide analysis

**ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА**

УДК 575.8: 575.852

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ, РАЗНООБРАЗИЕ И ЭВОЛЮЦИЯ ДНК-ТРАНСПОЗОНОВ *L18* (DD37E) В ГЕНОМАХ СТРЕКАЮЩИХ (Cnidaria)© 2022 г. М. В. Пузаков^а, *, Л. В. Пузакова^а^аФедеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского”
Российской академии наук, Севастополь, 299011 Россия

*e-mail: puzakov@ngs.ru

Поступила в редакцию 02.10.2021 г.

После доработки 02.11.2021 г.

Принята к публикации 03.11.2021 г.

Мобильные генетические элементы оказывают значительное влияние на структуру и функционирование геномов многоклеточных, а также служат источником новых генов. Изучение разнообразия и эволюции мобильных генетических элементов в различных таксонах необходимо для понимания их роли в геномах. Мобильные элементы *Tc1/mariner* образуют одну из наиболее распространенных и разнообразных групп ДНК-транспозонов. Нами впервые изучены структура, распространение, разнообразие и эволюция элементов *L18* (DD37E) в геномах стрекающих (Cnidaria). Установлено, что группа *L18* является самостоятельным семейством (а не подсемейством семейства *TLE*, как считалось ранее), входящим в суперсемейство *Tc1/mariner*. Потенциально функциональные копии найдены только у четырех элементов из 51. Предполагается, что *L18*-транспозоны имеют древнее происхождение, а элементы, обнаруженные в геномах представителей классов Anthozoa и Hydrozoa, не имеют общего предка внутри типа Cnidaria. У представителей класса Hydrozoa транспозоны *L18* появились в результате горизонтального переноса в более поздний период времени. Внутривидовое сравнение разнообразия элементов *L18* выявляет высокую гомогенность по “старым” транспозонам, которые уже утратили свою активность. В то же время отдаленные популяции, как в случае *Hydra viridissima*, различаются представленностью ДНК-транспозонов и количеством их копий. Полученные данные дополняют знания о разнообразии и эволюции транспозонов *Tc1/mariner* и будут способствовать изучению влияния мобильных генетических элементов на эволюцию многоклеточных.

Ключевые слова: ДНК-транспозоны, *Tc1/mariner*, *L18*, стрекающие, Cnidaria, эволюция геномов**DOI:** 10.31857/S0026898422030120**ВВЕДЕНИЕ**

Распространение и разнообразие мобильных генетических элементов (МГЭ) активно изучается в различных группах организмов, от бактерий до человека. Влияние МГЭ на модификацию и регуляцию генов изучают с момента их открытия (уже более 60 лет). МГЭ, будучи основными детерминантами размера генома [1–4], также вносят значительный вклад в процессы изменчивости, адаптации и эволюции в целом [2, 5, 6]. Известно, что МГЭ – это не только фрагменты ДНК, способные перемещаться в геноме хозяина и увеличивать свою копийность. Внедряясь в геном хозяина, МГЭ могут прицельно встраиваться в наиболее предпочтительные для них геномные локусы [7], проходить определенные этапы своего жизненного цикла [8], взаимодействовать друг с другом по

принципу паразитизм/сотрудничество/конкуренция [9, 10]. Геном же, в свою очередь, способен регулировать активность МГЭ [11–13] и, более того, “использовать” внедрившийся генетический материал в своих целях. Есть данные, свидетельствующие о том, что МГЭ одомашниваются, превращаясь в гены, и участвуют в формировании теломерных концов [14–16], в связывании с центромерами [17, 18], а также в процессах адаптации и стрессового ответа, в формировании устойчивости к вирусным инфекциям и химическим веществам [6, 19].

МГЭ эукариот делят на ретротранспозоны и ДНК-транспозоны, опираясь на механизмы их перемещения. Ретротранспозоны перемещаются по принципу “копирование–вставка”, создавая РНК-посредник, который транскрибируется в кДНК с помощью фермента обратной транскрип-

Сокращения: МГЭ – мобильные генетические элементы; КИП – концевые инвертированные повторы; СИП – субконцевые инвертированные повторы; *TLE* – *Tc1*-подобные элементы (*Tc1*-like elements); *MLE* – *mariner*-подобные элементы (*mariner*-like elements); ОРС – открытая рамка считывания; а.о. – аминокислотный остаток при цифре; м.л.н. – миллионов лет назад.

тазы и интегрируется в геном [20–22]. ДНК-транспозоны перемещаются по принципу “вырезание–вставка”, не создавая посредников, а непосредственно вырезаясь из прежнего места нахождения в геноме и встраиваясь в новое с помощью фермента транспозазы [20–22].

ДНК-транспозоны образуют очень разнообразную и многочисленную группу МГЭ, включающую три подкласса и не менее 17 суперсемейств [21, 23]. Одной из широко распространенных групп ДНК-транспозонов у эукариот является *Tc1/mariner* [24].

Транспозоны *Tc1/mariner* обнаружены у самых различных организмов, таких как коловратки, грибы, растения, рыбы и млекопитающие [23, 25]. Транспозоны *Tc1/mariner* несут, как правило, одну открытую рамку считывания, которая кодирует фермент транспозазу протяженностью от 300 до 400 аминокислотных остатков. С обоих концов от гена транспозазы расположены концевые инвертированные повторы (КИП) длиной в среднем 20–30 п.н. Длина *Tc1/mariner*-транспозонов составляет примерно 1.3–2.4 т.п.н. [26–28].

Транспозаза *Tc1/mariner* содержит ДНК-связывающий (PAIRED) и каталитический (DDE/D) домены [26]. PAIRED-домен расположен в первой половине аминокислотной последовательности транспозазы (N-концевой части) и состоит из шести α -спиралей – первые три – это PAI-субдомен, вторые три – RED-субдомен. Между этими субдоменами располагается GRPR-подобный мотив. Считается, что этот мотив опосредует связывание домена PAIRED с ДНК-мишенью [29]. Вторая половина транспозазы (C-концевая часть) содержит DDE/D-домен, который обладает эндонуклеазной и лигирующей активностью, необходимой для вырезания и вставки МГЭ. Также транспозаза *Tc1/mariner* содержит сигнал ядерной локализации (NLS-сигнал), который, предположительно, способствует транспорту транспозазы через ядерную мембрану [30, 31].

Классификация суперсемейства *Tc1/mariner* с каждым годом меняется и дополняется. На данный момент группа *Tc1/mariner* объединяет несколько семейств: *TLE* (DD34–46E), *MLE* (DD34D), *maT* (DD37D), *Guest* (DD39D), *Visitor* (DD41D) и *mosquito* (DD37E) [26, 27, 32–34].

Группа транспозонов *Tc1/mariner*, названная *L18* и имеющая каталитический домен DD37E, найдена при изучении МГЭ тихоокеанской устрицы *Crassostrea gigas* [35]. Эта группа включена в семейство *Tc1*-подобных элементов [28, 35]. Транспозазы *L18* обнаружены в геномах некоторых двусторчатых, ракообразных, насекомых, клещей, рыб, стрекающих и иглокожих. В настоящий момент структура, распространение, разнообразие и эволюция *L18*-транспозонов детально не изуче-

ны, поскольку проведен только филогенетический анализ последовательностей транспозаз.

Нами изучены *L18*-транспозоны стрекающих. Стрекающие, или Cnidaria – тип многоклеточных животных, обитающих в водной среде и имеющих стрекательные клетки. Тип Cnidaria появился около 741 миллионов лет назад (м.л.н.) (<http://www.time-tree.org>), он включает шесть классов – Anthozoa, Cubozoa, Hydrozoa, Muxozoa, Scyphozoa, Staurozoa, а также две клады, филогенетические отношения которых не прояснены, и носящих временные названия (<https://www.marinespecies.org>). Помимо изучения распространения, разнообразия и эволюции *L18*-транспозонов в геномах стрекающих, наша работа дает новое видение их филогенетического положения и, следовательно, классификации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Поиск *L18*-транспозонов. Поиск *L18*-транспозонов (DD37E) мы проводили с помощью tBLASTn со стандартными настройками (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В качестве образца использовали аминокислотную последовательность транспозазы элемента *Mariner-18_CGi* устрицы *C. gigas* [35].

Полногеномные нуклеотидные последовательности представителей типа Cnidaria получены из базы данных NCBI Assembly (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/>). Полный список проанализированных сборок геномов представлен в табл. 1.

Для поиска КИП и выявления полноразмерных элементов последовательности, гомологичные транспозазе *Mariner-18_CGi*, были взяты из соответствующих скаффолдов вместе с фланкирующими участками длиной 3000 п.н. Нуклеотидные последовательности ДНК полноразмерных элементов (или наиболее протяженных фрагментов) далее использовали для поиска и подсчета числа копий *L18*-транспозонов, присутствующих в геноме. При подсчете общего числа копий учитывали гомологичные фрагменты длиной 10–100% от длины полноразмерного элемента. Фрагменты длиной менее 10% не учитывали. Кроме того, отдельно оценивали количество потенциально функциональных копий. Полноразмерными мы считали элементы длиной более 95% от длины интактного элемента, которые содержали оба КИП и транспозазу, состоящую не менее чем из 300 аминокислотных остатков.

Анализ структуры последовательностей. КИП выявляли с помощью BLASTn-анализа нуклеотидных последовательностей [36]. Границы гипотетических ОРС определяли с помощью ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) и уточняли визуально. Локализацию GRPR-подобного мотива и маркерных аминокислотных остатков: аспартат (D), аспартаг (D) и глутамат (E) ката-

Таблица 1. Сборки геномов представителей типа Cnidaria, использованные в работе

Вид	Идентификатор GenBank	Вид	Идентификатор GenBank
<i>Acropora acuminata</i>	GCA_014633975.1	<i>A. awi</i>	GCA_014634005.1
<i>A. cytherea</i>	GCA_014634045.1	<i>A. digitifera</i>	GCA_000222465.2
<i>A. digitifera</i>	GCA_014634065.1	<i>A. echinata</i>	GCA_014634105.1
<i>A. florida</i>	GCA_014634605.1	<i>A. gemmifera</i>	GCA_014634125.1
<i>A. hyacinthus</i>	GCA_020536085.1	<i>A. hyacinthus</i>	GCA_014634145.1
<i>A. intermedia</i>	GCA_014634585.1	<i>A. microphthalma</i>	GCA_014634165.1
<i>A. millepora</i>	GCA_013753865.1	<i>A. millepora</i>	GCA_004143615.1
<i>A. muricata</i>	GCA_014634545.1	<i>A. nasuta</i>	GCA_014634205.1
<i>A. selago</i>	GCA_014634525.1	<i>A. tenuis</i>	GCA_014633955.1
<i>A. yongei</i>	GCA_014634225.1	<i>Ac. equina</i>	GCA_011057435.1
<i>Actinia tenebrosa</i>	GCA_009602425.1	<i>Alatina alata</i>	GCA_008930755.1
<i>Alatinidae sp.</i>	GCA_010016025.1	<i>Anemonia viridis</i>	GCA_900234385.1
<i>Anthopleura sola</i>	GCA_016068315.1	<i>Astreopora myriophthalma</i>	GCA_014634185.1
<i>Aurelia aurita</i>	GCA_004194415.1	<i>Au. aurita complex sp.</i>	GCA_004194395.1
<i>Au. coerulea</i>	GCA_011634815.1	<i>Calvadosia cruxmelitensis</i>	GCA_900245855.1
<i>Carybdea marsupialis</i>	GCA_010016065.1	<i>C. andromeda</i>	GCA_018155075.1
<i>Cassiopea xamachana</i>	GCA_900291935.1	<i>Ch. achlyos</i>	GCA_015164055.1
<i>Chrysaora chesapeakei</i>	GCA_011763395.1	<i>Ch. fuscescens</i>	GCA_009936425.1
<i>Ch. quinquecirrha</i>	GCA_014526335.1	<i>Ch. quinquecirrha</i>	GCA_012295145.1
<i>Clytia hemisphaerica</i>	GCA_902728285.1	<i>Craspedacusta sowerbii</i>	GCA_003687565.1
<i>Dendronephthya gigantea</i>	GCA_004324835.1	<i>Enteromyxum leei</i>	GCA_001455295.2
<i>Exaiptasia diaphana</i>	GCA_001417965.1	<i>Haliclystus octoradiatus</i>	GCA_916610825.1
<i>Heteractis crispa</i>	GCA_015164035.1	<i>Henneguya salminicola</i>	GCA_009887335.1
<i>Hydra oligactis</i>	GCA_004118135.1	<i>He. magnifica</i>	GCA_011763375.1
<i>H. viridissima</i>	GCA_004118115.1	<i>H. viridissima</i>	GCA_014706445.1
<i>H. vulgaris</i>	GCA_000219015.1	<i>H. vulgaris</i>	GCA_000004095.1
<i>Kudoa iwatai</i>	GCA_001407335.1	<i>K. iwatai</i>	GCA_001407235.2
<i>Montipora capitata</i>	GCA_006542545.1	<i>M. cactus</i>	GCA_014634245.1
<i>Morbakka virulenta</i>	GCA_003991215.1	<i>M. efflorescens</i>	GCA_014634505.1
<i>Nematostella vectensis</i>	GCA_000209225.1	<i>Myxobolus squamalis</i>	GCA_010108815.1
<i>Orbicella faveolata</i>	GCA_002042975.1	<i>Nemopilema nomurai</i>	GCA_003864495.1
<i>Pachyseris speciosa</i>	GCA_016490735.1	<i>O. faveolata</i>	GCA_001896105.1
<i>Platygyra sinensis</i>	GCA_019787425.1	<i>Phymanthus crucifer</i>	GCA_009858155.1
<i>Pocillopora verrucosa</i>	GCA_014529365.1	<i>P. damicornis</i>	GCA_003704095.1
<i>Renilla reniformis</i>	GCA_900177555.1	<i>Porites rus</i>	GCA_900290455.1
<i>Sanderia malayensis</i>	GCA_013076295.1	<i>Rhopilema esculentum</i>	GCA_013076305.1
<i>Stichodactyla helianthus</i>	GCA_015163945.1	<i>Sphaeromyxa zaharoni</i>	GCA_001455285.1
<i>Stylophora pistillata</i>	GCA_002571385.1	<i>St. mertensii</i>	GCA_011800005.1
<i>Trachythela sp.</i>	GCA_016169945.1	<i>Thelohanellus kitauei</i>	GCA_000827895.1

литического домена идентифицировали визуально по гомологии. Для выявления ДНК-связывающего домена PAIRED анализировали вторичную структуру транспозазы, предсказанную с помощью

PSIPRED v4.0 [37]. Последовательность сигнала ядерной локализации (NLS) определяли с помощью программы PSORT (<https://www.gen-script.com/psort.html>).

Филогенетический анализ. Филогенетический анализ проводили с использованием аминокислотных последовательностей транспозаз, относящихся к разным группам транспозонов *Tc1/mariner*, транспозаз, обнаруженных у *Cnidaria*, и *IS630*-транспозазы в качестве внешней группы. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей выполнено с помощью MUSCLE [38] и стандартных настроек. Филогенетический анализ проводили с использованием пакета программ MEGAX [38]. Для построения дендрограммы применяли метод максимального правдоподобия. Достоверность топологии оценивали с использованием бутстреп-теста (1000 репликаций).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Семейство *L18*-транспозонов у *Cnidaria*

При поиске транспозонов *L18* *Cnidaria* в качестве образца мы использовали аминокислотную последовательность транспозазы элемента *Mariner-18_CGi* устрицы *C. gigas*, первого обнаруженного представителя группы *L18* [35]. При анализе результатов, полученных с помощью tBLASTn, мы выбирали гомологичные последовательности с наилучшим сочетанием длины покрытия с процентом идентичности и расстоянием между вторым (аспартат) и третьим (глутамат) маркерными аминокислотными остатками каталитического домена DDE, равным 37 а.о. (DD37E). В некоторых случаях в анализ брали последовательности с высокой идентичностью к транспозазе *Mariner-18_CGi*, но с паттерном каталитического домена, отличным от DD37E. Встречались транспозазы, у которых в DDE-доме вместо глутамата в третьей позиции находился глутамин (Q), аспартат (D), аргинин (R) или лизин (K) (табл. 2).

В результате анализа 78 полногеномных последовательностей 35 организмов (30 видов) нами идентифицирован 51 элемент *L18* при этом полноразмерные копии обнаружены только у 10 из них. В качестве образцов для дополнительного поиска гомологичных МГЭ использовали транспозазы полноразмерных элементов.

Структурные особенности *L18*-транспозонов *Cnidaria*

Длина обнаруженных полноразмерных элементов *L18* колебалась от 1341 до 1993 п.н. Длина транспозаз составляла 315–387 а.о. КИП найдены у 30 элементов, их длина колебалась от 20 до 60 п.н. и лишь у одного элемента – *L18-1_HVul/GCA_000004095.1* – достигала 163 п.н. Субконцевые инвертированные повторы (СИП) не обнаружены (табл. 2).

Если сравнить *L18* и родственные группы элементов *MLE* и *TLE*, длина которых не превышает

1300–1400 п.н., длина КИП равна примерно 30 п.н., а длина транспозазы около 340–360 а.о. [39, 40], то заметны некоторые различия. Общая длина элементов *L18* и длина транспозазы соответствуют длинам в семействах *MLE* и *TLE*, лишь у отдельных элементов эти цифры незначительно отличаются (табл. 2). Длина КИП у большинства элементов *L18* соответствует длине КИП *MLE* и *TLE*, однако у отдельных элементов, например, у *L18-1_HVul/GCA_000004095.1*, *L18-1_AYon* и *L18-1_AHyu*, встречаются значительно более длинные КИП (табл. 2). Длина элементов *L18*, имеющих делеции, варьировала от 123 до 2951 п.н. (табл. 2). Подобное увеличение общей длины – 2198 и 2951 п.н. у поврежденных элементов *L18-1_AIn* и *L18-1_AAwi*, объясняется тем, что они содержат, по всей видимости, вставки в некодирующие части, в то время как их ОРС укорочена.

Наличие и целостность PAIRED-домена, GRPR-подобного мотива, NLS и каталитического домена DDE могут свидетельствовать о сохранении функциональности транспозазы. Мы изучали структурные особенности транспозазы у всех полноразмерных элементов, так как нас интересовала их потенциальная функциональность. В анализ мы включили также полноразмерные элементы, имеющие стоп-кодоны в ОРС, чтобы иметь больше последовательностей для сравнения, хотя их потенциальная функциональность в данном случае исключалась.

PAIRED-домен в полном или урезанном виде представлен во всех изученных нами транспозазах. Первые три альфа-спирали отсутствовали только в транспозазе элемента *L18-1_NVes*, в которой эта часть белка оказалась делетированной. Третья альфа-спираль была фрагментирована в *L18-1_HVul/GCA_000004095.1*, *L18-1_HVul/GCA_000219015.1* и *L18-1_MCas*. Вторые три альфа-спирали имеют четкие границы в транспозазах элементов *L18-1_HVul/GCA_000004095.1*, *L18-1_HVul/GCA_000219015.1* и *L18-1_MCap*. В остальных случаях альфа-спирали домена RED не имеют четкого рисунка, они фрагментированы, укорочены, слиты или отсутствуют (рис. 1). GRPR-подобный мотив в семи транспозазах из восьми имел последовательность GRPT/S, в транспозазе элемента *L18-1_Prus* он был малоузнаваемым, а в белках элементов *L18-1_MCas* и *L18-1_NVes* не обнаружен вовсе. Расположение мотива было типичным – между первой и второй триадами альфа-спиралей (рис. 1). NLS-последовательность обнаружена в транспозазах пяти элементов *L18*, в двух из них найдено по два NLS, но наиболее типичным было расположение NLS между PAIRED-домом и каталитическим доменом DDE (рис. 1).

Каталитический домен DD37E обнаружен у всех исследованных полноразмерных элементов

Таблица 2. ДНК-транспозоны *L18* Cnidaria

Таксон	Организм	Транспозон	Длина элемента, п.н.	Длина КИП, п.н.	Транспоза, а.о.	Всего копий	Полноразмерные копии	Потенциально функциональные копии	DDE/D-домен
Cnidaria/ Hydrozoa	<i>H. viridissima</i>	<i>L18-1_HVir/GCA_014706445.1</i>	1778	30/30	356	20	2	1	D93D35E
		<i>L18-1_HVir/GCA_004118115.1</i>	525	—	174	8	0	0	D64D37E
	<i>H. vulgaris</i>	<i>L18-1_HVir/GCA_000004095.1</i>	1993	163/163	374	47	7	1	D102D37E
		<i>L18-1_HVir/GCA_000219015.1</i>	1723	28/28	374	137	46	2	D102D37E
Cnidaria/ Anthozoa	<i>Trachythela sp</i>	<i>L18-1_TSp</i>	1360	31/31	230	2	0	0	D103D37E
		<i>L18-1_PSpe</i>	1453	31/31	357	56	35	0	D103D37E
	<i>A. acuminata</i>	<i>L18-1_AAcu</i>	543	—	181	5	0	0	A99D37Q
		<i>L18-2_AAcu</i>	615	—	204	8	0	0	I04D37E
	<i>A. awi</i>	<i>L18-1_AAw1</i>	2951	23/23	96	4	0	0	?E37E
		<i>L18-2_AAw1</i>	642	—	213	7	0	0	D96D37E
	<i>A. cytherea</i>	<i>L18-1_ACyt</i>	577	—	176	5	0	0	D84E37E
		<i>L18-2_ACyt</i>	1006	24/24	226	7	0	0	G102E37E
	<i>A. digitifera</i>	<i>L18-1_ADig/GCA_014634065.1</i>	723	29/29	131	6	0	0	?E37D
		<i>L18-1_ADig/GCA_000222465.2</i>	321	—	106	8	0	0	?E37E
		<i>L18-2_ADig/GCA_014634065.1</i>	1002	23/23	225	6	0	0	G101D32R
		<i>L18-2_ADig/GCA_000222465.2</i>	582	—	193	5	0	0	D97D32R
	<i>A. echinata</i>	<i>L18-1_AEch</i>	1470	36/36	288	6	0	0	D96E37E
		<i>L18-1_AFlo</i>	321	—	106	6	0	0	?E37E
	<i>A. gemmifera</i>	<i>L18-2_AFlo</i>	1006	24/24	235	11	0	0	G102E37E
		<i>L18-1_AGem</i>	759	—	252	81	0	0	D84D37E
<i>A. hyacinthus</i>	<i>L18-2_AGem</i>	516	—	171	5	0	0	?D37E	
	<i>L18-1_AHya</i>	1959	44/45	106	257	0	0	?E37E	
	<i>L18-1_AInt</i>	2198	38/39	106	406	0	0	?E37E	
	<i>L18-2_AInt</i>	516	—	171	6	0	0	?D37E	
<i>A. microphthalmia</i>	<i>L18-1_AMic</i>	1534	31/31	56	4	0	0	?D37E	
	<i>L18-2_AMic</i>	480	—	160	3	0	0	?D37E	
<i>A. muricata</i>	<i>L18-1_AMur</i>	321	—	106	6	0	0	?E37E	
	<i>L18-2_AMur</i>	597	—	199	5	0	0	*I04D37E	

Таблица 2. Продолжение

Таксон	Организм	Транспозон	Длина элемента, п.н.	Длина КИП, п.н.	Транспозаза, а.о.	Всего копий	Полноразмерные копии	Потенциально функциональные копии	DDE/D-домен
Cnidaria/ Anthozoa	<i>Astreopora myriophthalma</i>	L18-1_AMyr	1465	31/31	387	47	22	1	D103E37E
	<i>A. nasuta</i>	L18-1_ANas	1478	36/36	292	7	0	0	D99E37E
		L18-2_ANas	408	—	136	5	0	0	?D32K
	<i>A. selago</i>	L18-1_ASel	1980	35/36	106	358	0	0	?E37E
		L18-2_ASel	1005	22/22	241	8	0	0	G103E37E
	<i>A. tenuis</i>	L18-1_ATen	480	—	160	6	0	0	D103D37E
		L18-2_ATen	996	31/32	167	8	0	0	G102D?
	<i>A. yongei</i>	L18-1_AYon	1520	56/60	211	11	0	0	D102D37E
		L18-2_AYon	477	—	159	8	0	0	?D37E
	<i>Montipora cactus</i>	L18-1_MCac	1458	32/36	329	19	4	0	D105D37E
	<i>M. efflorescens</i>	L18-1_MEff	1443	29/33	327	17	3	0	D103D37E
	<i>A. millepora</i>	L18-1_AMil/GCA_013753865.1	168	—	56	7	0	0	?E37E
		L18-1_AMil/GCA_004143615.1	1818	36/36	180	5	0	0	D96E37E
		L18-2_AMil/GCA_004143615.1	1019	29/30	210	9	0	0	D102D38E
		L18-2_AMil/GCA_013753865.1	648	—	215	9	0	0	E104D38E
	<i>Porites rus</i>	L18-1_P Rus	1467	29/29	353	177	6	0	D139D37E
	<i>Orbicella faveolata</i>	L18-1_OFav/GCA_001896105.1	1167	29/29	295	8	0	0	D103D37E
		L18-1_OFav/GCA_002042975.1	1167	29/29	294	8	0	0	D103D37E
<i>Montipora capitata</i>	L18-1_MCap	1402	33/33	334	63	1	0	Q104D37E	
<i>Pocillopora damicornis</i>	L18-1_PDam	210	—	70	2	0	0	н/о	
<i>Stylophora pistillata</i>	L18-1_S Pis	123	—	41	1	0	0	н/о	
<i>P. verrucosa</i>	L18-1_PVer	1664	20/21	70	3	0	0	н/о	
<i>Nematostella vectensis</i>	L18-1_NVec	1341	34/34	315	18	2	0	D102D37E	

Примечание. н/о — не обнаружены; “?” — неизвестная последовательность.

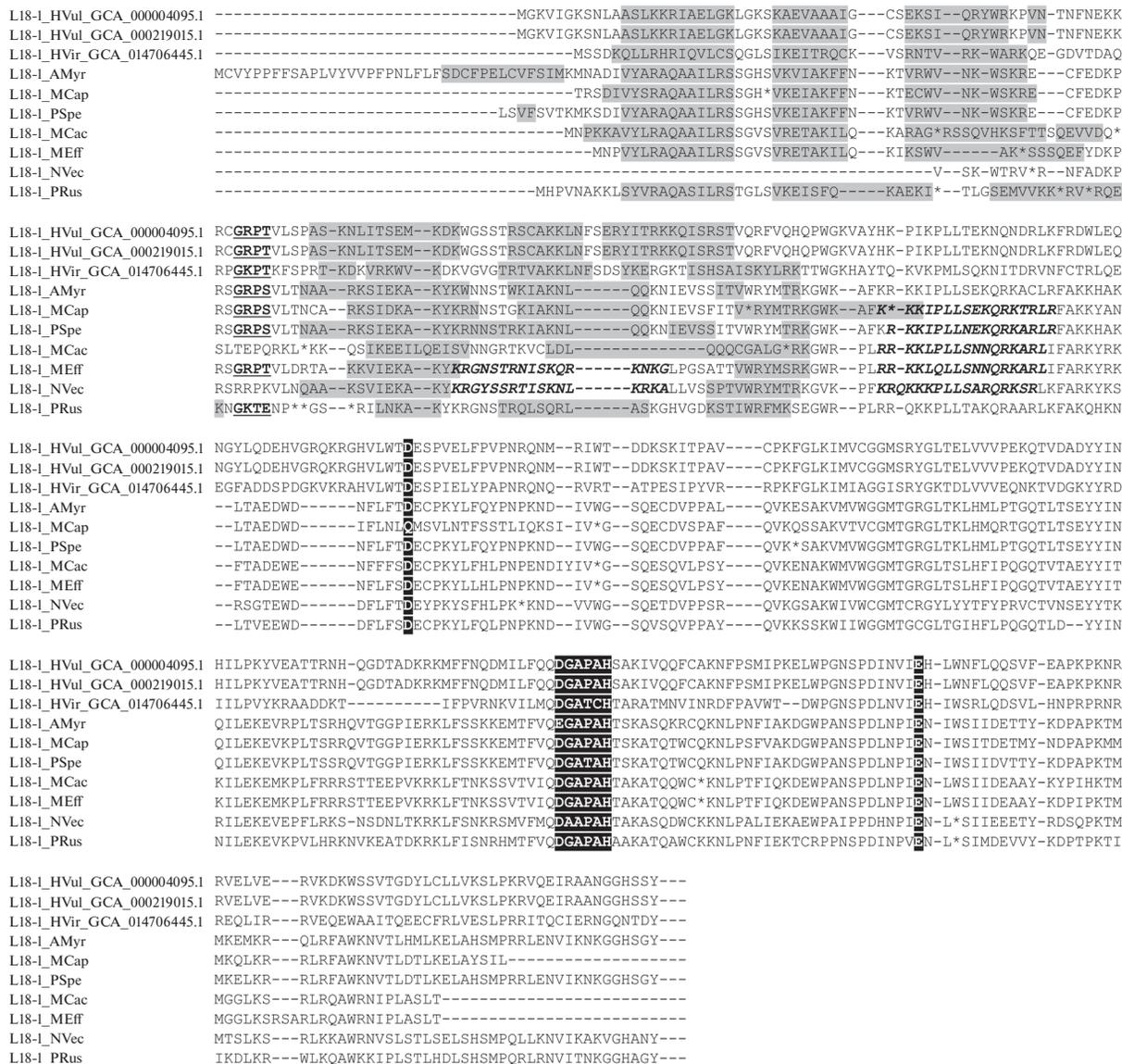


Рис. 1. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей *L18*-транспозаз. Серым выделены шесть α -спиралей, формирующих PAIRED-домен; жирным обозначен гипотетический сигнал ядерной локализации (NLS); выделен жирным и подчеркнут GRPR-подобный мотив; черным показаны маркерные локусы DD37E-домена.

L18 (рис. 1), но в аминокислотной последовательности транспозазы элемента *L18-1_MCap* первый аспарат в домене DDE заменен на глутамин (Q), а расстояние между D и E в каталитическом домене элемента *L18-1_HVir/GCA_014706445.1* равно 35 а.о. (табл. 2).

Анализ структуры белка и строения элементов *L18* позволяет заключить, что функциональной активностью потенциально обладают только четыре элемента — *L18-1_HVul/GCA_000004095.1*, *L18-1_HVul/GCA_000219015.1*, *L18-1_HVir/GCA_014706445.1* и *L18-1_AMyr*, при этом один из них — *L18-1_HVul/GCA_000219015.1* — представлен двумя копиями, остальные — только одной (табл. 2). Столь малое число потенциально функциональ-

ных элементов *L18*, обнаруженных у Cnidaria, вполне согласуется с данными других исследований, которые также показывают, что наряду со значительным общим пулом элементов, имеющих делеции, потенциально функциональные элементы встречаются в единичном количестве [41–44].

Филогенетический анализ *L18*-транспозонов Cnidaria

Филогенетический анализ, в который вошли транспозазы всех обнаруженных нами *L18*-транспозонов стрекающих и некоторые *L18*-транспозазы иглокожих, моллюсков и рыб [35], а также транспозазы, представляющие семейство *TLE*

(*Intruder, Incomer, Traveler, TLEWI, Tc1, Zvezda, TRT, ctmTLE*) и семейство *MLE* (в качестве внешней группы) [40, 45–49], показал, что группа элементов *L18* не является подсемейством группы *TLE*, как считалось ранее [35] (рис. 2). *L18*-транспозоны с достаточно высокой значимостью (значение бутстреп-теста 67%) формируют единую кладу, тогда как их объединение с другими группами семейства *TLE* недостоверно (значение бутстреп-теста менее 50%). Таким образом, мы полагаем, что *L18*-транспозоны – это отдельное монофилетическое семейство внутри суперсемейства *Tc1/mariner*.

Филогенетическое исследование *L18*-транспозонов позволило выделить внутри семейства четыре кластера (A, B, C, D) (рис. 2). В кластеры мы объединили элементы, которые формируют группы, включающие более двух *L18*-транспозонов и имеющие значение бутстреп-теста более 50%. В кластеры A, B и C вошли транспозоны, обнаруженные у представителей класса Anthozoa. При этом в кластер C объединяют преимущественно элементы, обозначенные нами как *L18-2*. Эти элементы обнаружены также у представителей класса Anthozoa в качестве второго, альтернативного элемента *L18*. Кластер D содержал только транспозоны *L18* класса Hydrozoa.

Внутривидовое разнообразие

Поскольку на момент исследования в NCBI были депонированы по две сборки геномов пяти видов Cnidaria: *H. viridissima*, *H. vulgaris*, *A. digitifera*, *A. millepora* и *Orbicella faveolata* (табл. 3), мы получили возможность изучить внутривидовое разнообразие МГЭ.

ДНК *H. viridissima* была выделена из образцов, представляющих различные популяции – из лабораторной линии (Европа) и природной популяции (Австралия). Элементы *L18-1_HVir/GCA_014706445.1* и *L18-1_HVir/GCA_004118115.1* существенно различаются, перекрытие нуклеотидных последовательностей этих двух транспозонов равно 4%, идентичность транспозаз этих элементов также была низкой – 32.51% (табл. 3). Такой уровень сходства белков транспозазы характерен для отдаленных видов. Элемент *L18-1_HVir/GCA_014706445.1* считается потенциально активным, тогда как *L18-1_HVir/GCA_004118115.1* сильно укорочен и содержит стоп-кодона, а длина транспозазы равна 174 а.о. По всей видимости, эволюция элемента *L18* в этих двух популяциях из-за их географической удаленности проходила по-разному – в лабораторной линии элемент подвергся деградации, а в природной популяции сохранил свою активность.

Обе сборки генома *H. vulgaris* получены из лабораторной линии 105. Обнаруженные в них транс-

позоны *L18* идентичны, что, вероятно, обусловлено высокой гомогенностью особей внутри лабораторной линии (табл. 3).

Секвенированные геномы *A. digitifera* принадлежали особям, выловленным на побережье Японии с интервалом 7 лет (табл. 3). В обеих сборках обнаружены по два элемента *L18* (табл. 2). Сходство между первой и второй парой элементов довольно высокое как на уровне нуклеотидной (88–89%), так и аминокислотной (75–79%) последовательности. Транспозоны относятся к достаточно быстро мутирующим элементам генома, поскольку на них не действует стабилизирующий (очищающий) отбор. Поэтому идентичность нуклеотидных последовательностей различных копий одного и того же ДНК-транспозона внутри одного генома может варьировать от 80 до 100%, а в некоторых случаях достигать 70% [35]. По всей вероятности, столь высокую идентичность транспозонов можно объяснить тем, что образцы принадлежат к одной и той же популяции.

Две особи *A. millepora* собраны в Индонезии и Австралии с интервалом 18 лет. В каждой сборке генома этого вида также обнаружено по два элемента *L18*. Выявлена очень высокая идентичность обоих элементов на уровне нуклеотидной и аминокислотной последовательностей (табл. 3). Обращает на себя внимание низкая перекрытаемость (%) элементов *L18-1*, но это объясняется тем, что самая протяженная копия (*L18-1_AMil/GCA_013753865.1*) кодирует фрагмент транспозазы длиной всего 56 а.о. Высокая идентичность элементов может объясняться географической близостью Индонезии и Австралии и высокой вероятностью того, что образцы принадлежат к одной популяции. Сходная ситуация наблюдается и у образцов *O. faveolata* (табл. 3), собранных во Флориде (США) и государстве Панама. Очень высокая идентичность нуклеотидных последовательностей этих элементов (95%) также может объясняться географической близостью Флориды и Панамы.

В общем, можно сделать вывод о довольно высокой гомогенности одной и той же популяции по “старым” транспозонам, которые уже утратили свою активность. В разобщенных популяциях, как в случае *H. viridissima*, транспозоны сильно различаются.

Жизненный цикл *L18*-транспозонов

Степень активности элементов *L18* в геномах Cnidaria, а также давность их вторжения мы попытались оценить по их копииности в геномах стреккающих. У пяти элементов общее число копий было очень высоким – от 137 до 406. Еще у пяти элементов общее число копий оказалось достаточно высоким – 47–81. У оставшегося большинства элементов количество копий не превы-

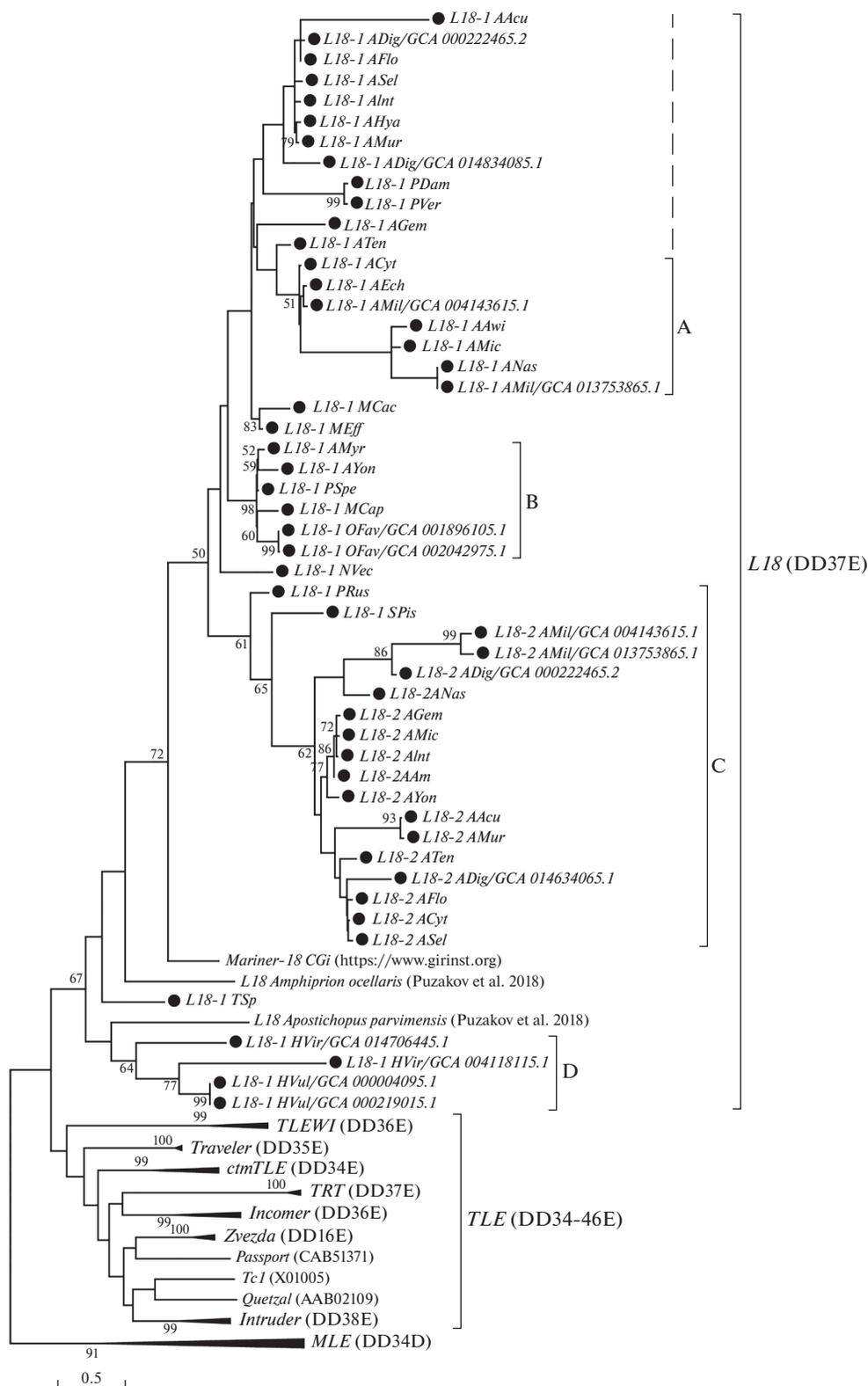


Рис. 2. Эволюционные взаимоотношения транспозонов *L18* и *TLE*. Черными кругами обозначены ДНК-транспозоны, обнаруженные в этой работе. Филогенетический анализ выполнен в программе MEGA X с помощью метода максимального правдоподобия. Используемая модель WAG+G. Достоверность топологии оценивали с использованием бутстреп-теста (1000 репликаций). Значения коэффициентов поддержки бутстреп-теста менее 50% не показаны.

Таблица 3. Внутривидовое разнообразие *L18*-транспозонов у Cnidaria

Организм	Место сбора	Время сбора	Элемент/Сборка	Перекрытие/ идентичность гена транс- позазы, %	Перекрытие/ идентичность транспозазы, %
<i>H. viridissima</i>	Австралия	2014-04-15	<i>L18-1_HVir/ GCA_014706445.1</i>	4/76.60	75/32.51
	Лабораторная линия Европа	Нет данных	<i>L18-1_HVir/ GCA_004118115.1</i>		
<i>H. vulgaris</i>	Лабораторная линия № 105	Нет данных	<i>L18-1_HVul/ GCA_000004095.1</i>	100/100	100/100
	Лабораторная линия № 105	Нет данных	<i>L18-1_HVul/ GCA_000219015.1</i>		
<i>A. digitifera</i>	Япония	2015-05	<i>L18-1_ADig/ GCA_014634065.1</i>	80/89.72	74/79.59
	Кунигами, Окинава, Япония	2008	<i>L18-1_ADig/ GCA_000222465.2</i>		
	Япония	2015-05	<i>L18-2_ADig/ GCA_014634065.1</i>	87/88.11	74/75.60
	Кунигами, Окинава, Япония	2008	<i>L18-2_ADig/ GCA_000222465.2</i>		
<i>A. millepora</i>	Индонезия	2017	<i>L18-1_AMil/ GCA_013753865.1</i>	30/97.62	31/96.43
	Магнетик-Айленд, Австралия	1999-10-28	<i>L18-1_AMil/ GCA_004143615.1</i>		
	Индонезия	2017	<i>L18-2_AMil/ GCA_004143615.1</i>	95/93.36	100/86.05
	Магнетик-Айленд, Австралия	1999-10-28	<i>L18-2_AMil/ GCA_013753865.1</i>		
<i>Orbicella faveolata</i>	Флорида, США	2011-08	<i>L18-1_OFav/ GCA_001896105.1</i>	100/95.73	99/95.24
	Панама	2013-08	<i>L18-1_OFav/ GCA_002042975.1</i>		

шало 20. Число полноразмерных копий 10 элементов *L18* распределялось таким образом: семь имели не более 10 копий и только у трех элементов количество полноразмерных копий было умеренно высоким – 22, 35 и 46 (табл. 2). Подобное распределение позволяет предположить, что элементы *L18-1_HVul/GCA_000219015.1* и *L18-1_AMur* могут быть активными в геномах данных организмов в настоящее время, поскольку они имеют много полноразмерных копий (46 и 22), в том числе и одну–две потенциально функциональных. Элементы *L18-1_PSpe* могли быть активными в недавнем прошлом, поскольку на фоне довольно высокого общего числа копий (56) обнаружено много (35) их полноразмерных копий, но ни одной потенциально функциональной. Общее вы-

сокое число копий и отсутствие полноразмерных копий, как, например, у элементов *L18-1_AHya*, *L18-1_AInt*, *L18-1_ASel*, может свидетельствовать о высокой активности этих элементов в прошлом, что привело к их амплификации, но в настоящее время наблюдается элиминация этих элементов из геномов хозяина. Низкое общее число копий и отсутствие полноразмерных копий, которое встречается в большинстве случаев (табл. 2), может свидетельствовать о том, что эти элементы завершают свой жизненный цикл в геноме данных хозяев и большая их часть уже элиминирована. Это согласуется с данными, приведенными в работе [50], в которой выдвинута гипотеза о том, что активное заселение видов МГЭ осталось в далеком прошлом, сегодня же мы наблюдаем лишь завершаю-

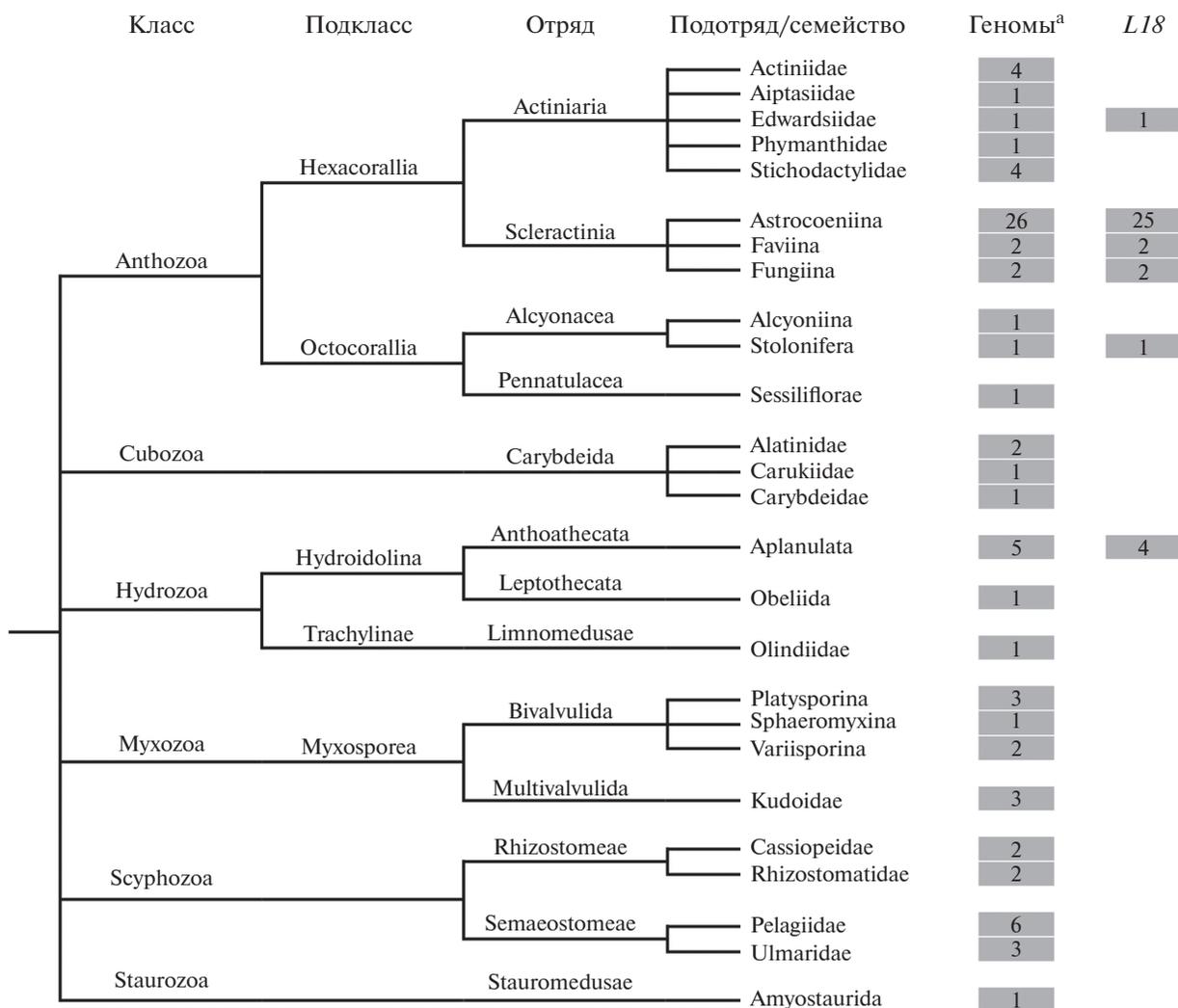


Рис. 3. Представленность элементов *L18* у представителей стрекающих. На таксономическом дереве приведены только те группы организмов, геномы представителей которых секвенированы. В столбцах (в серых прямоугольниках) указано количество доступных для анализа полногеномных последовательностей и число геномов, в которых обнаружены соответствующие группы ДНК-транспозонов.

щую стадию жизненного цикла подавляющего большинства элементов.

Эволюция элементов *L18*

Элементы семейства *L18* обнаружены только в двух из шести классов стрекающих (полные геномы которых представлены в NCBI): Hydrozoa и Anthozoa (рис. 3). Наибольшее их число (в 29 из 30 геномов) выявлено у организмов отряда Scleractinia (подкласс Hexacorallia; класс Anthozoa), при этом у 16 представителей подотряда Astrocoeniina найдены по два различных МГЭ группы *L18* (рис. 2, табл. 1). В другом отряде (Actiniaria) того же подкласса в исследованных 9 геномах *L18*-транспозон обнаружен только в одном семействе (Edwardsiidae). В подклассе Octocorallia у трех орга-

низмов также обнаружен только один *L18*-транспозон (подотряд Stolonifera; отряд Alcyonacea). МГЭ группы *L18* идентифицированы также в четырех геномах (из семи) представителей класса Hydrozoa (подотряд Aplanulata). Элементы семейства *L18* представителей Hydrozoa входят в кластер D и имеют большую идентичность с *L18*-транспозоном иглокожих, тогда как элементы представителей Anthozoa с достаточно высокой значимостью (бутстреп 50%) формируют отдельную группу, включающую кластеры А, В и С (рис. 2). Сопоставление результатов филогенетического анализа и распространенности *L18* среди представителей Cnidaria дает основания полагать, что имели место несколько инвазий *L18*-транспозонов в геномы древних стрекающих. Горизонтальный пе-

ренос *Tc1/mariner*-элементов встречается относительно часто [51–53].

Согласно данным TimeTree (<http://www.timetree.org/>), дивергенция представителей класса Anthozoa и представителей классов Hydrozoa, Cubozoa и Scyphozoa произошла в диапазоне от 540 до 667 м.л.н. Поскольку *L18*-транспозоны обнаружены в обоих подклассах, то инвазия предкового транспозона могла произойти в этот период. С другой стороны, в подклассе Octocorallia обнаружен только один *L18*-транспозон (*L18-1_TSp*) – в кладе Stolonifera (рис. 3). При этом на филогенетическом дереве он занял обособленное место, не войдя ни в один из кластеров (рис. 2) других Anthozoa. Кластеры А, В и С оказались ближе к элементу моллюсков (*Mariner-18_CGi*), чем к *L18-1_TSp*. Данные о времени возникновения клады Stolonifera отсутствуют, тогда как отряд Alcyonacea (включающий эту кладу) дивергировал 368 м.л.н. (TimeTree, <http://www.timetree.org/>). По-видимому, предок *L18-1_TSp* вторгся в геном организма позднее 368 м.л.н. Эти временные оценки согласуются с тем, что данный элемент представлен всего двумя достаточно сильно поврежденными копиями. Нельзя исключить как более ранней инвазии элемента и полной элиминации из геномов других представителей Octocorallia, так и более поздней инвазии, слабой транспозиционной активности и быстрой деградации. Более точные заключения можно будет сделать с появлением новых данных.

L18-транспозоны подкласса Hexacorallia представлены тремя кластерами А, В и С. Если эти элементы являются потомками одного транспозона, то предположительное время инвазии – 540–667 м.л.н. С другой стороны, каждый кластер может быть результатом независимых событий горизонтального переноса. Но поскольку в кластерах присутствуют элементы различных таксонов подкласса Hexacorallia, то вероятно, что горизонтальные переносы происходили в рамках этой группы животных, тогда время этих событий оценить затруднительно.

В классе Hydrozoa *L18*-транспозоны выявлены только в отряде Anthoathecata, который обособился 440–459 м.л.н. (TimeTree, <http://www.timetree.org/>). Виды *H. viridissima* и *H. vulgaris* дивергировали около 193 м.л.н. (TimeTree, <http://www.timetree.org/>). Таким образом, мы предполагаем, что *L18*-транспозоны появились у организмов этой группы в результате горизонтального переноса в промежутке от 193 до 459 м.л.н. Однако, опираясь на то, что у обоих видов гидр сохранились потенциально функциональные копии *L18*, и они, соответственно, являются относительно молодыми, мы полагаем время инвазии ближе к 193 м.л.н. Более точные оценки можно будет дать после того, как будут секвенированы и станут до-

ступными для анализа геномы представителей других подотрядов Anthoathecata.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые описаны структура, распространение, разнообразие и эволюция элементов *L18* (DD37E) в геномах стрекающих. В результате филогенетического анализа установлено, что группа *L18* – это самостоятельное семейство (а не подсемейство группы *TLE*, как считалось ранее), входящее в суперсемейство *Tc1/mariner*. Среди 44 представителей Anthozoa обнаружен только один МГЭ, имеющий потенциально функциональную копию (*L18-1_AMyr*), тогда как среди семи представителей Hydrozoa выявлены четыре потенциально функциональные копии трех элементов: *L18-1_HVul/GCA_000004095.1*, *L18-1_HVul/GCA_000219015.1*, *L18-1_HVir/GCA_014706445.1*. В связи с этим предполагается, что элементы *L18* имеют древнее происхождение, а у *L18*-транспозонов, обнаруженных в геномах организмов классов Anthozoa и Hydrozoa, нет общего предка внутри типа Cnidaria. Возможно, в геномах организмов подотряда Aplanulata (класс Hydrozoa) *L18*-транспозоны появились в результате горизонтального переноса в более поздний период времени. Сравнение внутривидового разнообразия элементов *L18* показывает высокую гомогенность по “старым” транспозонам, которые уже утратили свою активность. В то же время, отдаленные популяции, как в случае *H. viridissima*, могут различаться представленностью ДНК-транспозонов и количеством их копий. Полученные данные дополняют знания о разнообразии и эволюции *Tc1/mariner*-транспозонов и будут способствовать изучению влияния МГЭ на эволюцию многоклеточных.

Данное исследование проведено в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом”, номер гос. регистрации 121041400077-1.

Настоящая статья не содержит исследований с использованием животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arkhipova I.R., Yushenova I.A. (2019) Giant transposons in eukaryotes: is bigger better? *Genome Biol. Evol.* **11**, 906–918. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz041>
2. Bourque G., Burns K.H., Gehring M., Gorbunova V., Seluanov A., Hammell M., Imbeault M., Izsvak Z., Levin H.L., Macfarlan T.S., Mager D.L., Feschotte C.

- (2018) Ten things you should know about transposable elements. *Genome Biol.* **19**, 199.
<https://doi.org/10.1186/s13059-018-1577-z>
3. Gao B., Shen D., Xue S., Chen C., Cui H., Song C. (2016) The contribution of transposable elements to size variations between four teleost genomes. *Mob. DNA.* **7**, 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s13100-016-0059-7>
 4. Petrov D.A. (2001) Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genet.* **17**, 23–28.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02157-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02157-0)
 5. Sotero-Caio C.G., Platt R.N., Suh A., Ray D.A. (2017) Evolution and diversity of transposable elements in vertebrate genomes. *Genome Biol. Evol.* **9**, 161–177.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evw264>
 6. Casacuberta E., González J. (2013) The impact of transposable elements in environmental adaptation. *Mol. Ecol.* **22**, 1503–1517.
<https://doi.org/10.1111/mec.12170>
 7. Sultana T., Zamborlini A., Cristofari G., Lesage P. (2017) Integration site selection by retroviruses and transposable elements in eukaryotes. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 292–308.
 8. Blumenstiel J.P. (2019) Birth, school, work, death, and resurrection: the life stages and dynamics of transposable element proliferation. *Genes* (Basel). **10**, 336.
<https://doi.org/10.3390/genes10050336>
 9. Venner S., Feschotte C., Biéumont C. (2009) Dynamics of transposable elements: towards a community ecology of the genome. *Trends Genet.* **25**, 317–323.
 10. Robillard É., Rouzic A.L., Zhang Z., Capy P., Hua-Van A. (2016) Experimental evolution reveals hyperparasitic interactions among transposable elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**, 14763–14768.
 11. Sienski G., Dönertas D., Brennecke J. (2012) Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell.* **151**, 964–980.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.040>
 12. Brennecke J., Aravin A.A., Stark A., Dus M., Kellis M., Sachidanandam R., Hannon G.J. (2007) Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell.* **128**, 1089–1103.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.043>
 13. Teixeira F.K., Okuniewska M., Malone C.D., Coux R.X., Rio D.C., Lehmann R. (2017) piRNA-mediated regulation of transposon alternative splicing in the soma and germ line. *Nature.* **552**, 268–272.
<https://doi.org/10.1038/nature25018>
 14. Casacuberta E. (2017) *Drosophila*: retrotransposons making up telomeres. *Viruses.* **9**, 192.
<https://doi.org/10.3390/v9070192>
 15. Belfort M., Curcio M.J., Lue N.F. (2011) Telomerase and retrotransposons: reverse transcriptases that shaped genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 20304–20310.
 16. Fulcher N., Derboven E., Valuchova S., Riha K. (2014) If the cap fits, wear it: an overview of telomeric structures over evolution. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 847–865.
 17. Casola C., Hucks D., Feschotte C. (2007) Convergent domestication of *pogo*-like transposases into centromere-binding proteins in fission yeast and mammals. *Mol. Biol. Evol.* **25**, 29–41.
 18. Kursel L.E., Malik H.S. (2016) Centromeres. *Curr. Biol.* **26**, 487–490.
 19. Чересиз С.В., Юрченко Н.Н., Иванников А.В., Захаров И.К. (2008) Мобильные элементы и стресс. *Информ. вестник ВОГУС.* **12**, 217–242.
 20. Kojima K.K. (2020) Structural and sequence diversity of eukaryotic transposable elements. *Genes Genet. Syst.* **94**, 233–252.
<https://doi.org/10.1266/ggs.18-00024>
 21. Kapitonov V.V., Jurka J. (2008) A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 411–412.
<https://doi.org/10.1038/nrg2165-c1>
 22. Wicker T., Sabot F., Hua-Van A., Bennetzen J.L., Capy P., Chalhoub B., Flavell A., Leroy P., Morgante M., Panaud O., Paux E., SanMiguel P., Schulman A.H. (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 973–982.
<https://doi.org/10.1038/nrg2165>
 23. Yuan Y.W., Wessler S.R. (2011) The catalytic domain of all eukaryotic cut-and-paste transposase superfamilies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 7884–7889.
 24. Feschotte C., Pritham E.J. (2007) DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes. *Annu. Rev. Genet.* **41**, 331–368.
 25. Muñoz-López M., García-Pérez J.L. (2010) DNA transposons: nature and applications in genomics. *Curr. Genomics.* **11**, 115–128.
<https://doi.org/10.2174/138920210790886871>
 26. Tellier M., Bouuaert C.C., Chalmers R. (2015) *Mariner* and the *ITm* superfamily of transposons. *Microbiol. Spectr.* **3**, MDNA3-0033-2014.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0033-2014>
 27. Wang S., Diaby M., Puzakov M., Ullah N., Wang Y., Danley P., Chen C., Wang X., Gao B., Song C. (2021) Divergent evolution profiles of DD37D and DD39D families of *Tc1/mariner* transposons in eukaryotes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **161**, 107143.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107143>
 28. Dupeyron M., Baril T., Bass C., Hayward A. (2020) Phylogenetic analysis of the *Tc1/mariner* superfamily reveals the unexplored diversity of *pogo*-like elements. *Mob. DNA.* **11**, 21.
<https://doi.org/10.1186/s13100-020-00212-0>
 29. Ivics Z., Izsvák Z. (2015) *Sleeping Beauty* transposition. *Microbiol. Spectr.* **3**, MDNA3-0042-2014.
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0042-2014>
 30. Ivics Z., Hackett P.B., Plasterk R.H., Izsvák Z. (1997) Molecular reconstruction of *Sleeping Beauty*, a *Tc1*-like transposon from fish, and its transposition in human cells *Cell.* **91**, 501–510.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80436-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80436-5)
 31. Plasterk R.H., Izsvák Z., Ivics Z. (1999) Resident aliens: the *Tc1/mariner* superfamily of transposable elements. *Trends Genet.* **15**, 326–332.
[https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01777-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01777-1)
 32. Shao H., Tu Z. (2001) Expanding the diversity of the *IS630-Tc1-mariner* superfamily: discovery of a unique

- DD37E transposon and reclassification of the DD37D and DD39D transposons. *Genetics*. **159**, 1103–1115.
33. Zhang H.H., Shen Y.H., Xiong X.M., Han M.J., Zhang X.G. (2016) Identification and evolutionary history of the DD41D transposons in insect. *Genes Genom.* **38**, 109–117.
 34. Shen D., Gao B., Miskey C., Chen C., Sang Y., Zong W., Wang S., Wang Y., Wang X., Ivics Z., Song C. (2020) Multiple invasions of *Visitor*, a DD41D family of *Tc1/mariner* transposons, throughout the evolution of vertebrates. *Genome Biol. Evol.* **12**, 1060–1073. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa135>
 35. Puzakov M.V., Puzakova L.V., Cheresiz S.V. (2018) An analysis of *IS630/Tc1/mariner* transposons in the genome of a pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Mol. Evol.* **86**, 566–580. <https://doi.org/10.1007/s00239-018-9868-2>
 36. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
 37. Buchan D.W.A., Jones D.T. (2019) The PSIPRED protein analysis workbench: 20 years on. *Nucl. Acids Res.* **47**, 402–407. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz297>
 38. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547–1549.
 39. Jacobson J.W., Medhora M.M., Hartl D.L. (1986) Molecular structure of a somatically unstable transposable element in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**, 8684–8688.
 40. Puzakov M.V., Puzakova L.V., Cheresiz S.V., Sang Y. (2021) The *IS630/Tc1/mariner* transposons in three Ctenophore genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* **163**, 107231. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107231>
 41. Langin T., Capy P., Daboussi M.J. (1995) The transposable element *impala*, a fungal member of the *Tc1-mariner* superfamily. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 19–28.
 42. Clark K.J., Carlson D.F., Leaver M.J., Foster L.K., Fahrenkrug S.C. (2009) *Passport*, a native *Tc1* transposon from flatfish, is functionally active in vertebrate cells. *Nucl. Acids Res.* **37**, 1239–1247.
 43. Emmons S.W., Yesner L., Ruan K., Katzenberg D. (1983) Evidence for a transposon in *Caenorhabditis elegans*. *Cell*. **32**, 55–65.
 44. Franz G., Savakis C. (1991) *Minos*, a new transposable element from *Drosophila hydei*, is a member of the *Tc1*-like family of transposons. *Nucl. Acids Res.* **19**, 6646.
 45. Puzakov M.V., Puzakova L.V., Cheresiz S.V. (2020) The *Tc1*-like elements with the spliceosomal introns in mollusk genomes. *Mol. Genet. Genomics*. **295**, 621–633.
 46. Zong W., Gao B., Diaby M., Shen D., Wang S., Wang Y., Sang Y., Chen C., Wang X., Song C. (2020) *Traveler*, a new DD35E family of *Tc1/mariner* transposons, invaded vertebrates very recently. *Genome Biol. Evol.* **12**, 66–76.
 47. Sang Y., Gao B., Diaby M., Zong W., Chen C., Shen D., Wang S., Wang Y., Ivics Z., Song C. (2019) *Incomer*, a DD36E family of *Tc1/mariner* transposons newly discovered in animals. *Mobile DNA*. **10**, 45.
 48. Gao B., Zong W., Miskey C., Ullah N., Diaby M., Chen C., Wang X., Ivics Z., Song C. (2020) *Intruder* (DD38E), a recently evolved sibling family of DD34E/*Tc1* transposons in animals. *Mobile DNA*. **11**, 32.
 49. Zhang H.H., Li G.Y., Xiong X.M., Han M.J., Zhang X.G., Dai F.Y. (2016) *TRT*, a vertebrate and protozoan *Tc1*-like transposon: current activity and horizontal transfer. *Genome Biol. Evol.* **8**, 2994–3005.
 50. Schaack S., Gilbert C., Feschotte C. (2010) Promiscuous DNA: horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution. *Trends Ecol. Evol.* **25**, 537–546.
 51. Filee J., Rouault J.-D., Harry M., Hua-Van A. (2015) *Mariner* transposons are sailing in the genome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *BMC Genomics*. **16**, 1061. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2060-9>
 52. Sanlloriente O., Vela J., Mora P., Ruiz-Mena A., Torres M.I., Lorite P., Palomeque T., (2020) Complex evolutionary history of *mboumar*, a *mariner* element widely represented in ant genomes. *Sci. Rept.* **10**, 2610. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59422-4>
 53. Maruyama K., Hartl D.L. (1991) Evidence for inter-specific transfer of the transposable element *mariner* between *Drosophila* and *Zaprionus*. *J. Mol. Evol.* **33**, 514–524. <https://doi.org/10.1007/BF02102804>

PREVALENCE, DIVERSITY AND EVOLUTION OF L18 (DD37E) TRANSPOSONS IN THE GENOMES OF CNIDARIANS

M. V. Puzakov¹, * and L. V. Puzakova¹

¹ Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, 299011 Russia

*e-mail: puzakov@ngs.ru

Transposable elements have a significant impact on the structure and functioning of multicellular genomes, and also serve as a source of new genes. Studying the diversity and evolution of transposable elements in different taxa is necessary for a fundamental understanding of their role in genomes. *Tc1/mariner* elements represent one of the most widespread and diverse groups of DNA transposons. In this work, the structure, distribution, diversity, and evolution of *L18* (DD37E) elements in the genomes of cnidarians (Cnidaria) were

studied for the first time. As a result, it was found that the *L18* group is an independent family (and not a sub-family of the *TLE* family, as previously thought) in the *Tc1/mariner* superfamily. Of the 51 detected elements, only four had potentially functional copies. It is assumed that the *L18* transposons are of ancient origin, and, in addition, the elements found in the genomes of organisms of the Anthozoa and Hydrozoa classes do not come from a common ancestral transposon within the phylum Cnidaria. In organisms of the class Hydrozoa, *L18* transposons appeared as a result of horizontal transfer at a later time period. An intraspecific comparison of the diversity of the *L18* elements demonstrates high homogeneity with respect to “old” transposons, which have already lost their activity. At the same time, distant populations, as in the case of *Hydra viridissima*, have differences in the representation of DNA transposons and the number of their copies. The data obtained supplement the knowledge about the diversity and evolution of *Tc1/mariner* transposons and will contribute to the study of the influence of mobile genetic elements on the evolution of multicellular organisms.

Keywords: DNA transposons, *Tc1/mariner*, *L18*, cnidarians, Cnidaria, genome evolution

УДК 575.224.46:577.21

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЕЙ мРНК ГЕНОВ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ, ОБРАБОТАННЫХ МИТОМИЦИНОМ

© 2022 г. М. Ю. Синицкий^{а,*}, А. В. Синицкая^а, Д. К. Шишкова^а,
А. Г. Кутихин^а, В. И. Минина^б, А. В. Понасенко^а

^аНаучно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний,
Кемерово, 650002 Россия

^бКемеровский государственный университет, Кемерово, 650000 Россия

*e-mail: max-sinitsky@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.08.2021 г.

После доработки 07.10.2021 г.

Принята к публикации 18.10.2021 г.

ДНК-метилтрансферазы катализируют метилирование остатков цитозина в CpG-сайтах ДНК, что играет важную роль в регуляции транскрипции, стабильности хромосом и других процессах. Показано, что уровень метилирования ДНК изменяется под действием генотоксического стресса, вызванного различными кластогенными агентами. Генотоксический стресс, в свою очередь, является одним из триггеров эндотелиальной дисфункции. С помощью количественной полимеразной цепной реакции мы оценили изменения уровней мРНК генов *DNMT1*, *DNMT3A* и *DNMT3B* в линиях эндотелиальных клеток коронарной (НСАЕС) и внутренней грудной (НТАЕС) артерий человека, экспонированных алкилирующим мутагеном – митомицином С. Установлено, что непосредственно после мутагенного воздействия уровень мРНК гена *DNMT1* в культурах клеток НСАЕС повышается в 1.7 раза по сравнению с контролем. После удаления мутагена из культуральной среды и последующего культивирования клеток НСАЕС в “чистой” среде в течение 1 суток уровень мРНК гена *DNMT3B* в культурах, обработанных митомицином С, возрос в 2 раза по сравнению с контролем. Одновременно с этим не обнаружено изменения уровней мРНК генов изученных ДНК-метилтрансфераз в экспонированных мутагеном культурах НТАЕС. По-видимому, изменения уровней мРНК генов ДНК-метилтрансфераз могут вносить вклад в формирование эндотелиальной дисфункции в ответ на мутагенную нагрузку в эксперименте *in vitro*.

Ключевые слова: эндотелиальные клетки, ДНК-метилтрансферазы, митомицин С, мутагенез, метилирование, эндотелиальная дисфункция

DOI: 10.31857/S0026898422030156

ВВЕДЕНИЕ

ДНК-метилтрансферазы, катализирующие перенос метильных групп с S-аденозилметионина на остатки цитозина в ДНК, играют важную роль в развитии млекопитающих [1]. Семейство ДНК-метилтрансфераз человека состоит из четырех членов – *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* и *DNMT3L*, из которых только последний не обладает выраженной ферментативной активностью [2]. *DNMT1*, *DNMT3A* и *DNMT3B* играют важную роль в поддержании стабильности генетического аппарата, нарушение которой приводит к повреждению хромосом, генотоксическому стрессу и канцерогенезу. Роль генов семейства *DNMT* в развитии различных онкопатологий изучена достаточно хорошо в экспериментах *in vivo*, в то время как возможные изменения их экспрессии в клеточных культурах (в том числе в эндотелиоцитах), обработанных различными генотоксическими и канцерогенными агента-

ми, не изучены [3]. Известно также, что метилирование промоторных участков генов, катализируемое ДНК-метилтрансферазами, приводит к нарушению транскрипции и вносит вклад в развитие атеросклероза [4–6].

На сегодняшний день установлено, что генотоксический стресс (как и классические факторы риска – курение, сахарный диабет, дислипидемия и другие) служит триггером эндотелиальной дисфункции, считающейся первым этапом атерогенеза [7–9]. Недавно обнаружены изменения экспрессии генов-маркеров эндотелиальной дисфункции, вовлеченных в атерогенез, в эндотелиальных клетках человека, обработанных мутагеном алкилирующего механизма действия – митомицином С (ММС) [10, 11]. Вместе с тем, механизмы развития эндотелиальной дисфункции, индуцированной мутагенным воздействием, остаются неизученными. Учитывая высокий уровень заболе-

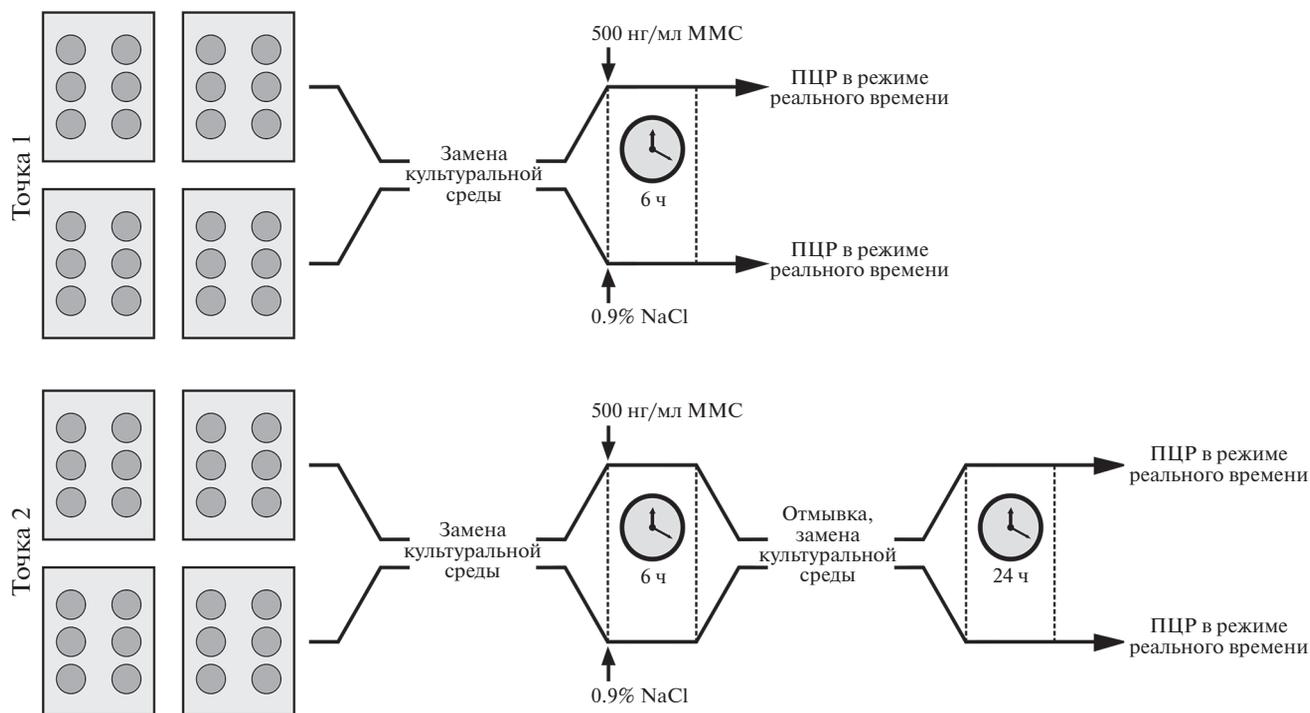


Рис. 1. Дизайн эксперимента (ММС – митомицин С).

ваемости и смертности от сердечно-сосудистых заболеваний (в частности, от атеросклероза) [12], понимание молекулярных механизмов развития эндотелиальной дисфункции в ответ на генотоксический стресс представляется чрезвычайно важным как для фундаментальной, так и прикладной науки.

В нашей работе проведен анализ изменений уровней мРНК генов *DNMT1*, *DNMT3A* и *DNMT3B* в первичных эндотелиальных клетках человека, обработанных алкилирующим мутагеном ММС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование эндотелиальных клеток. Исследование выполнено на коммерческих культурах эндотелиальных клеток коронарной (Human Coronary Artery Endothelial Cells, HCAEC) и внутренней грудной (Human Internal Thoracic Artery Endothelial Cells, HITAEC) артерий человека ("Cell Applications Inc.", США).

Все работы с клеточными культурами проводили в асептических условиях. Клетки культивировали в культуральных флаконах T-75, содержащих 15 мл среды Human MesoEndo Cell Growth Medium ("Cell Applications Inc."), при температуре 37°C, 5% CO₂ и повышенной влажности до достижения 90% конфлюентности. После четырех пассажей клетки снимали смесью трипсин/EDTA ("Cell Applications Inc."), 2 × 10⁵ клеток пересевали в 6-луночные планшеты (восемь планшетов на

каждую клеточную культуру HCAEC и HITAEC), в каждую лунку добавляли 2 мл среды Human MesoEndo Cell Growth Medium и культивировали планшеты в стандартных условиях в течение еще 24 ч. По истечении этого времени старую среду удаляли, в каждую лунку планшета приливали 2 мл свежей среды, содержащей 500 нг/мл ММС ("AppliChem", Испания) (экспериментальная группа), либо 0.9%-ный раствор NaCl (контрольная группа). После 6 ч культивирования четыре планшета с клетками каждой линии (два экспериментальных и два контрольных) выводили из эксперимента (точка 1), в оставшихся четырех планшетах культуральную среду заменяли чистой средой (без добавления каких-либо агентов) и культивировали планшеты в течение еще 1 суток, после чего выводили из эксперимента (точка 2). Дизайн исследования представлен на рис. 1. Концентрацию ММС и схему культивирования выбирали с учетом рекомендаций по моделированию мутагенеза в экспериментах *in vitro* [13, 14] и полученных нами ранее результатов [10].

Выделение РНК. Из каждой лунки 6-луночного планшета после окончания культивирования удаляли культуральную среду, клетки отмывали 2 раза холодным фосфатно-солевым буфером и лизировали 1 мл реagenta QIAzol® Lysis Reagent ("Qiagen", Германия). Выделение суммарной РНК из клеток и ее очистку от геномной ДНК осуществляли с помощью набора RNeasy® Plus Universal Mini Kit ("Qiagen") согласно протоколу производителя. Вы-

деленную РНК хранили при температуре -80°C . Все рабочие поверхности и оборудование, использованное для выделения РНК, обрабатывали ингибитором РНКаз RNaseZap™ RNase Decontamination Solution (“Invitrogen”, США). Целостность РНК оценивали по величине индекса RIQ (RNA Integrity and Quality), который определяли с использованием набора реагентов Qubit RNA IQ Assay Kit (“Invitrogen”) и флуориметра Qubit 4 (“Invitrogen”). Концентрацию и чистоту РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop™ 2000 (“Thermo Scientific, США).

Синтез кДНК. кДНК синтезировали с помощью коммерческих наборов High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (“Applied Biosystems”, США), согласно рекомендациям производителя. В качестве матрицы использовали 10 мкл раствора суммарной РНК (100 нг/мкл). Полученную кДНК хранили при температуре -20°C .

Оценка изменений уровня мРНК генов DNMT. Уровень мРНК генов *DNMT1*, *DNMT3A* и *DNMT3B* определяли в образцах эндотелиальных клеток (точки 1 и 2) с помощью количественной ПЦР на амплификаторе ViiA7 (“Applied Biosystems”) с использованием праймеров с флуоресцентным красителем SYBR Green (“Евроген”, Москва) (табл. 1). ПЦР проводили в 96-луночной планшете, содержащем 26 анализируемых образцов, пять стандартов (кДНК с известной концентрацией) с двукратным разведением и отрицательный контроль (реакционная смесь без кДНК). Каждый образец, стандарт и отрицательный контроль анализировали в трех технических повторностях. Для каждого образца готовили 10 мкл реакционной смеси, включающей 5 мкл мастер-микса PowerUp SYBR Green Master Mix (“Applied Biosystems”), по 500 нМ прямого и обратного праймеров (“Евроген”) и образец кДНК в конечной концентрации

10 нг/мкл. Амплификацию проводили по следующей схеме: 50°C , 2 мин; 95°C , 2 мин; затем 40 циклов – 95°C , 15 с и 60°C , 60 с. Результаты ПЦР нормировали на среднее геометрическое значение *Ct* трех референсных генов *HPRT1*, *GAPDH* и *B2M* (“Евроген”) в соответствии с имеющимися рекомендациями [15] (табл. 1).

Уровни мРНК генов *DNMT1*, *DNMT3A* и *DNMT3B* рассчитывали по методу ΔCt (Уровень транскрипции = $2^{\text{Ct [референсные гены]} - \text{Ct [ген интереса]}}$). Качество амплификации оценивали с использованием кривых амплификации и стандартных кривых в программе QuantStudio™ Real-Time PCR Software v.1.3 (“Applied Biosystems”). Амплификацию считали успешной при эффективности 90–110%, значении $R^2 > 0.990$ и отсутствии реакции в отрицательном контроле. Все работы по определению уровня транскрипции генов выполнены в соответствии с международными стандартами MIQE [16].

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 8. Рассчитывали медиану (*m*) и межквартильный размах (IQR) количественных показателей. Различия между группами оценивали с помощью рангового U-критерия Манна–Уитни и считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для оценки уровней мРНК генов *DNMT* использовали препараты суммарной РНК с концентрацией 260.4–601.8 нг/мкл, достаточной чистотой ($A_{260/280}$ и $A_{260/230}$ составили 2.05–2.09 и 1.82–2.25 соответственно) и целостностью (индекс RIQ больше 93%), выделенные из эндотелиальных клеток. На основе выделенной РНК синтезировано от 1512.6 до 1861.2 нг/мкл кДНК.

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных в эксперименте

Ген	Праймер
<i>DNMT1</i>	F:CTGGTCCGCATGGGCTATCA R:TCCGGGAACAGAGGGAGCTT
<i>DNMT3A</i>	F:ACCCTGTTTGCCTCCCTGAG R:ACAATCACCCAGCCCTCTCC
<i>DNMT3B</i>	F:AACTGGAGCCACGACGTAACA R:GGCATCCGTTCATCTTTCAGC
<i>HPRT1</i>	F:TTGCTTTCCTTGGTTCAGGCA R:TCGTGGGGTCCSTTTTACCA
<i>GAPDH</i>	F:AGCCACATCGCTCAGACAC R:GCCCAATACGACCAATCC
<i>B2M</i>	F:TCCATCCGACATTGAAGTTG R:CGGCAGGCATACTCATCTT

Примечание: F – прямой праймер; R – обратный праймер.

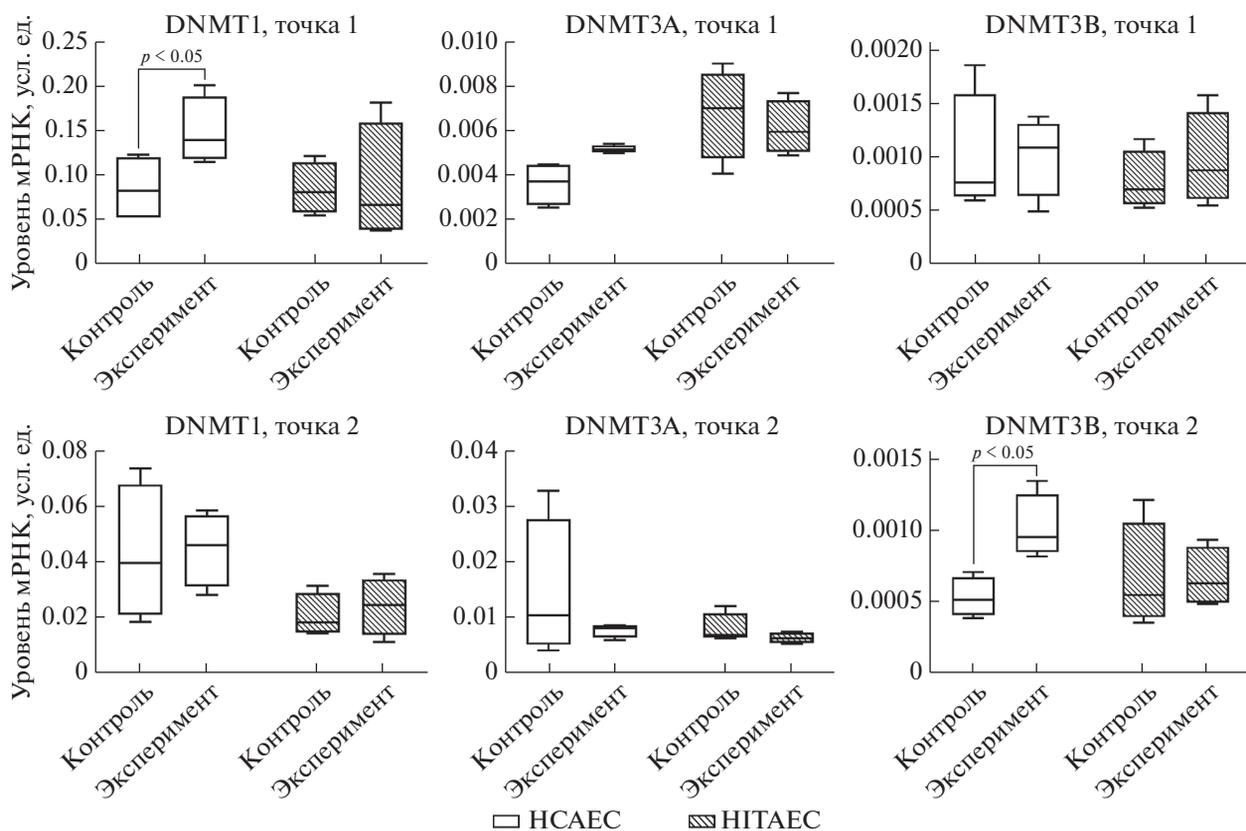


Рис. 2. Уровни мРНК генов *DNMT* в эндотелиальных клетках (HSAEC – эндотелиальные клетки коронарной артерии; HITAEC – эндотелиальные клетки внутренней грудной артерии).

В результате проведения количественной ПЦР установлено, что в точке 1 (непосредственно после обработки клеток ММС) в культурах HSAEC статистически значимо ($p = 0.014$) повышен уровень мРНК гена *DNMT1* по сравнению с контролем (0.1384 ± 0.0542 и 0.0816 ± 0.0653 усл. ед. соотв.) (рис. 2). После удаления мутагена (точка 2) в экспонированных ММС образцах HSAEC выявлено статистически значимое ($p = 0.021$) двукратное увеличение уровня мРНК гена *DNMT3B* (0.0010 ± 0.0003 против 0.0005 ± 0.0002 усл. ед. в контрольной группе) (рис. 2). Кратность измене-

ний уровней мРНК изученных генов в экспонированных мутагеном культурах по сравнению с неэкспонированным контролем приведена в табл. 2.

В клеточных культурах HITAEC не обнаружено статистически значимых изменений уровней мРНК ни одного из генов ДНК-метилтрансфераз (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что ДНК-метилтрансфераза DNMT1 наиболее активно метилирует полуметилированные CpG-сайты ДНК [17]. Фермент может проявлять аномальную метилирующую активность, в частности, метилировать CpG-пары в области петли оцДНК, уже содержащей метилированные сайты CpG. Известно, что инактивация гена *DNMT1* приводит к значительному (до 70%) уменьшению метилирования генома, что делает этот ген одним из наиболее важных в регуляции уровня метилирования ДНК у млекопитающих [18]. Кроме того, DNMT1, благодаря своей способности рекрутироваться в область двойных разрывов ДНК, может участвовать в процессах репарации поврежденного ДНК напрямую, посредством механизма, не связанного с метилированием (в частности, путем

Таблица 2. Относительные уровни мРНК генов *DNMT* в эндотелиальных клетках, экспонированных ММС, в сравнении с контролем (кратность изменения)

Ген	Точка 1		Точка 2	
	HSAEC	HITAEC	HSAEC	HITAEC
<i>DNMT1</i>	1.70*	0.82	1.16	1.34
<i>DNMT3A</i>	1.37	0.85	0.78	0.93
<i>DNMT3B</i>	1.38	1.29	2.00*	1.20

* Значимое увеличение уровня мРНК по сравнению с контролем.

модуляции функции протеинкиназы СНК1 и поддержания активности сенсорных киназ АТМ и АТР, вовлеченных в репарацию повреждений генетического аппарата) [19–21]. ДНК-метилтрансфераза DNMT3B метилирует полуметилированные и неметилированные CpG-сайты, в частности, сателлитные повторы в области центрального линкера [22].

Показано, что метилирование ДНК и клеточный ответ на повреждения ДНК, вызванные как экзогенными, так и эндогенными агентами, связаны друг с другом. Это подтверждается, главным образом, гиперметилированием промоторов и подавлением экспрессии генов репарации ДНК при различных онкологических заболеваниях [23]. DNMT1 рекрутируется в области двойных разрывов ДНК (вызванных, в том числе, и действием ММС) посредством взаимодействия с ядерным антигеном пролиферирующих клеток (PCNA) [20]. Известно, что гиперметилирование промоторных CpG-сайтов вызывает значительное подавление транскрипции, что инактивирует клеточные пути, приводя к эффектам, сходным с эффектами генетических мутаций [23]. Так, гиперметилирование промоторов таких генов репарации ДНК, как *MLH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6* (мисматч-репарация), *MBD4*, *TDG*, *OGG1*, *XPC*, *XRCC1*, *RAD23B* (эксцизионная репарация нуклеотидов), *BRCA1*, *BRCA2*, *FANCA* (гомологичная рекомбинация) и ряда других приводит к снижению их экспрессии, уменьшению активности синтезируемых ферментов репарации ДНК и, как следствие, снижению эффективности репарации повреждений генетического аппарата [3]. Кроме подавления активности отдельных генов, гиперметилирование ДНК нарушает процесс активации сенсорных киназ АТМ и АТР, распознающих повреждения ДНК [24], что приводит к снижению эффективности репарации двойных разрывов ДНК, образующихся, главным образом, в результате воздействия алкилирующих мутагенов (к числу которых относится и ММС, использованный нами). Однако следует отметить, что в подавляющем большинстве случаев связь метилирования ДНК с повреждением генетического материала изучали при различных онкологических заболеваниях, поэтому естественно, что основной интерес вызвала роль генов семейства *DNMT* в развитии рака [3].

Опубликованы данные о снижении уровня маркеров окислительного стресса в микрососудах сетчатки глаза крысы при ингибировании генов семейства *Dnmt* [25]; культивирование клеток эпителия легкого человека A549 в присутствии ингибиторов ДНК-метилтрансфераз существенно снижало уровень радиационно-индуцированных повреждений ДНК, радиочувствительности этих клеток и повышало уровень экспрессии генов репарации ДНК *FANCA*, *BRCA1* и *RAD51C* [26]. При этом

нам не удалось найти публикаций, в которых изучали ассоциацию экспрессии генов семейства *DNMT* со степенью проявления генотоксических эффектов и уровнем повреждения ДНК в эндотелиальных клетках, обработанных мутагеном. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в клеточных культурах НСАЕС, в которых повышен уровень транскрипции генов *DNMT1* и *DNMT3B*, повышен также уровень повреждений ДНК [27], что может быть связано с усилением метилирования генов репарации.

Помимо участия метилирования ДНК в формировании ответа клеток на генотоксический стресс, этот эпигенетический механизм вовлечен в формирование эндотелиальной дисфункции и в атерогенез [4–6]. Так, известно, что осцилляторный режим эндотелиального напряжения сдвига (ЭНС), ассоциированный с повышенным риском развития атерогенных эффектов, может повышать уровень транскрипции генов *DNMT1* и *DNMT3*, что, в свою очередь, увеличивает риск развития эндотелиальной дисфункции, воспаления и подавляет синтез оксида азота эндотелиальными клетками [6]. Одновременно с этим пульсирующий режим ЭНС не вызывает изменения уровня экспрессии генов ДНК-метилтрансфераз и характеризуется атеропротективным эффектом [28]. Полученные нами результаты полностью согласуются с опубликованными данными – повышенный уровень экспрессии генов ДНК-метилтрансфераз выявлен в эндотелиальных клетках коронарной артерии (осцилляторный режим ЭНС), характеризующихся более выраженным повышением экспрессии молекулярных маркеров эндотелиальной дисфункции в ответ на мутагенную нагрузку (по сравнению с клетками внутренней грудной артерии, крайне редко поражаемой атеросклерозом за счет своих гемодинамических и физиологических особенностей) [11].

Таким образом, можно предположить, что усиление транскрипции генов ДНК-метилтрансфераз может быть одним из молекулярных механизмов, лежащих в основе формирования эндотелиальной дисфункции в ответ на мутагенную нагрузку в эксперименте *in vitro*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 21-75-10052 “Молекулярные механизмы развития эндотелиальной дисфункции в ответ на генотоксический стресс”, <https://rscf.ru/project/21-75-10052/>).

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

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Robertson K.D. (2005) DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet.* **6**(8), 597–610.
- Kareta M.S., Botello Z.M., Ennis J.J., Chou C., Chédin F. (2006) Reconstitution and mechanism of the stimulation of *de novo* methylation by human DNMT3L. *J. Biol. Chem.* **281**(36), 25893–25902.
- Jin B., Robertson K.D. (2013) DNA methyltransferases, DNA damage repair, and cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **754**, 3–29.
- Dunn J., Thabet S., Jo H. (2015) Flow-dependent epigenetic DNA methylation in endothelial gene expression and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**(7), 1562–1569.
- Lyko F. (2018) The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat. Rev. Genet.* **19**(2), 81–92.
- Lee D.Y., Chiu J.J. (2019) Atherosclerosis and flow: roles of epigenetic modulation in vascular endothelium. *J. Biomed. Sci.* **26**(1), 56.
- Gray K., Bennett M. (2011) Role of DNA damage in atherosclerosis – bystander or participant? *Biochem. Pharmacol.* **82**(7), 693–700.
- Shah N.R., Mahmoudi M. (2015) The role of DNA damage and repair in atherosclerosis: a review. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **86**, 147–157.
- Кутихин А.Г., Синицкий М.Ю., Понасенко А.В. (2017) Роль мутагенеза в развитии атеросклероза. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* **6**, 92–101.
- Sinitsky M.Y., Kutikhin A.G., Tsepokina A.V., Shishkova D.K., Asanov M.A., Yuzhalin A.E., Minina V.I., Ponasenko A.V. (2020) Mitomycin C induced genotoxic stress in endothelial cells is associated with differential expression of proinflammatory cytokines. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **858–860**, 503252.
- Синицкий М.Ю., Цепокина А.В., Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Понасенко А.В. (2021) Профиль генной экспрессии в эндотелиальных клетках, культивируемых в присутствии митомицина С. *Биомед. химия.* **67**(2), 130–136.
- GBD 2017 Causes of Death Collaborators (2018) Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* **392**(10159), 1736–1788.
- Lorge E., Thybaud V., Aardema M.J., Oliver J., Wakata A., Lorenzon G., Marzin D. (2006) SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutat. Res.* **607**(1), 13–36.
- OECD, Guidelines for the Testing of Chemicals no. 487: *In vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test (Mnvt), OECD, Paris, France, 2016.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paere A., Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**(7), RESEARCH0034.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**(4), 611–622.
- Bronner C., Alhosin M., Hamiche A., Mousli M. (2019). Coordinated dialogue between UHRF1 and DNMT1 to ensure faithful inheritance of methylated DNA patterns. *Genes* (Basel). **10**(1), 65. <https://doi.org/10.3390/genes10010065>
- Adam S., Anteneh H., Hornisch M., Wagner V., Lu, J., Radde N.E., Bashtrykov P., Song J., Jeltsch A. (2020) DNA sequence-dependent activity and base flipping mechanisms of DNMT1 regulate genome-wide DNA methylation. *Nat. Commun.* **11**(1), 3723.
- Unterberger A., Andrews S.D., Weaver I.C., Szyf M. (2006) DNA methyltransferase 1 knockdown activates a replication stress checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* **26**(20), 7575–7586.
- Ha K., Lee G.E., Pali S.S., Brown K.D., Takeda Y., Liu K., Bhalla K.N., Robertson, K.D. (2011) Rapid and transient recruitment of DNMT1 to DNA double-strand breaks is mediated by its interaction with multiple components of the DNA damage response machinery. *Hum. Mol. Genet.* **20**(1), 126–140.
- Loughery J.E., Dunne P.D., O'Neill K.M., Meehan R.R., McDaid J.R., Walsh C.P. (2011) DNMT1 deficiency triggers mismatch repair defects in human cells through depletion of repair protein levels in a process involving the DNA damage response. *Hum. Mol. Genet.* **20**(16), 3241–3255.
- Gagliardi M., Strazzullo M., Matarazzo M.R. (2018) DNMT3B functions: novel insights from human disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **6**, 140.
- Jacinto F.V., Esteller M. (2007) Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer. *Mutagenesis.* **22**(4), 247–253.
- Williams L.H., Choong D., Johnson S.A., Campbell I.G. (2006) Genetic and epigenetic analysis of CHEK2 in sporadic breast, colon, and ovarian cancers. *Clin. Cancer Res.* **12**(23), 6967–6972.
- Duraisamy A.J., Mishra M., Kowluru A., Kowluru R.A. (2018) Epigenetics and regulation of oxidative stress in diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **59**(12), 4831–4840.
- Kang H.C., Chie E.K., Kim H.J., Kim J.H., Kim I.H., Kim K., Shin B.S., Ma E. (2019) A phthalimidoalkana-mide derived novel DNMT inhibitor enhanced radio-sensitivity of A549 cells by inhibition of homologous recombination of DNA damage. *Invest. New Drugs.* **37**(6), 1158–1165.
- Синицкий М.Ю., Кутихин А.Г., Шишкова Д.К., Асанов М.А., Понасенко А.В. (2020) Оценка цитотоксических и генотоксических эффектов митомицина С в культурах эндотелиальных клеток человека. *Гены и Клетки.* **15**(1), 45–49.
- Zhang Y.P., Huang Y.T., Huang T.S., Pang W., Zhu J.J., Liu Y.F., Tang R.Z., Zhao C.R., Yao W.J., Li Y.S., Chien S., Zhou J. (2017) The mammalian target of rapamycin and DNA methyltransferase 1 axis mediates vascular endothelial dysfunction in response to disturbed flow. *Sci. Rep.* **7**(1), 14996.

TRANSCRIPTION OF DNA-METHYLTRANSFERASES IN ENDOTHELIAL CELLS EXPOSED TO MITOMYCIN C

M. Yu. Sinitsky^{1, *}, A. V. Sinitskaya¹, D. K. Shishkova¹, A. G. Kutikhin¹,
V. I. Minina², and A. V. Ponasenko¹

¹ *Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, 650002 Russia*

² *Kemerovo State University, Kemerovo, 650000 Russia*

**e-mail: max-sinitsky@rambler.ru*

DNA-methyltransferases catalyze DNA methylation in the CpG sites, which play an important role in the maintaining of genome stability. The association between DNA methylation and genotoxic stress resulting to the action of various clastogens has been shown. Genotoxic stress is one of the triggers of endothelial dysfunction. In this study, the transcription of *DNMT1*, *DNMT3A* and *DNMT3B* genes in coronary (HCAEC) and internal thoracic (HITAEC) artery endothelial cells exposed to alkylating mutagen mitomycin C were studied using quantitative polymerase chain reaction. In HCAEC exposed to mitomycin C, the *DNMT1* transcription is 1.7-fold higher compared to the unexposed control. After elimination of the mutagen from the cultures following by 24-hours cultivation, a 2-fold increased transcription of *DNMT3B* in HCAEC exposed to mitomycin C compared to the control was observed. At the same time, no changes in transcription of the studied DNA-methyltransferases were found in the HITAEC exposed to the mutagen. Thus, an increased transcription of DNA-methyltransferase can be a possible molecular mechanism underlying endothelial dysfunction in response to mutagenic load in an *in vitro* experiment.

Keywords: endothelial cells, DNA-methyltransferases, mitomycin C, mutagenesis, methylation, endothelial dysfunction

УДК 575.113.5:575.117.2

СУПЕРЭНХАНСЕР *KLF6* РЕГУЛИРУЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК ГЕПАТОМЫ ЧЕЛОВЕКА, РЕКРУТИРУЯ *GATA2* И *SOX10*¹© 2022 г. Kum Chol Ri^{a, b, *}, Myong Ryong Ri^a, Kwang Hun Kim^c, Sun Il Choe^d, Ju Hua Ri^a, Ji Hyon Kim^a, Jong Ho Ri^a^a*Life Science Department, University of Science, Pyongyang, 999095 Democratic People's Republic of Korea*^b*School of Management, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang, 150001 China*^c*Department of Engineering Machine, Pyongyang University of Mechanical Engineering, Pyongyang, 950003 Democratic People's Republic of Korea*^d*Life Science Department, Kim Il Sung University, Pyongyang, 999093 Democratic People's Republic of Korea***e-mail: RKCHIT@hit.edu.cn*

Поступила в редакцию 01.09.2021 г.

После доработки 11.11.2021 г.

Принята к публикации 16.11.2021 г.

Суперэнхансеры состоят из большого кластера транскрипционных энхансеров, которые регулируют экспрессию генов, играющих важную роль в росте и развитии злокачественных опухолей. Функции суперэнхансеров в опухолевых клетках не установлены, несмотря на попытки их идентификации. В настоящей работе изучены функциональные свойства суперэнхансера гена *KLF6*, связанные с регуляцией роста клеток HerG2 и с взаимодействием с факторами транскрипции. С использованием системы CRISPR/Cas9 и малых интерферирующих РНК идентифицированы некоторые факторы транскрипции, определяющие свойства суперэнхансера *KLF6*. Оценено действие этих факторов транскрипции на экспрессию генов-мишеней *KLF6*. С помощью МТТ-метода определено их влияние на пролиферацию опухолевых клеток. Показано, что активные энхансеры *KLF6* рекрутируют факторы транскрипции *GATA2* и *SOX10* для контроля экспрессии гена-мишени *KLF6*, что регулирует пролиферацию клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что активность суперэнхансера *KLF6* регулируется двумя факторами транскрипции (*GATA2* и *SOX10*), воздействие на которые может быть потенциальной терапевтической стратегией при раке печени.

Ключевые слова: суперэнхансер (SE), ген *KLF6*, CRISPR/Cas9, *GATA2*, *SOX10*, siPHK**DOI:** 10.31857/S0026898422030144***KLF6* SUPER-ENHANCER REGULATES CELL PROLIFERATION BY RECRUITING *GATA2* AND *SOX10* IN HUMAN HEPATOMA CELLS**Kum Chol Ri^{1, 2,*}, Myong Ryong Ri¹, Kwang Hun Kim³, Sun Il Choe⁴, Ju Hua Ri¹, Ji Hyon Kim¹, and Jong Ho Ri¹¹*Life Science Department, University of Science, Pyongyang, 999095 Democratic People's Republic of Korea*²*School of Management, Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang, 150001 China*³*Department of Engineering Machine, Pyongyang University of Mechanical Engineering, Pyongyang, 950003 Democratic People's Republic of Korea*⁴*Life Science Department, Kim Il Sung University, Pyongyang, 999093 Democratic People's Republic of Korea***e-mail: RKCHIT@hit.edu.cn*

Super-enhancer consists of a large cluster of transcription enhancers that regulates the expression of genes playing an important role in the growth and development of malignant tumors. Recently, several attempts for the identification of super-enhancers have been made, but their functional role in tumor cells remains unclear. This paper aims at elucidating the functional properties of *KLF6* super-enhancer related to the growth

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

regulation of HepG2 cells, in relation to transcription factors (TFs). First, some TFs specifying *KLF6* super enhancer were identified using CRISPR/Cas9 system and siRNA. Then, their effects on the expression of the target gene *KLF6* were assessed. Last, their influence on the proliferation of tumor cells was considered using the MTT method. The study shows that the active enhancers of *KLF6* super-enhancer recruit GATA2 and SOX10 TFs to control the expression of the target gene, *KLF6*. Our findings suggest that the activity of *KLF6* super-enhancer is regulated by two TFs (GATA2 and SOX10), and its targeting may be a potential therapeutic strategy for the liver cancer therapy.

Keywords: super-enhancer, *KLF6*, CRISPR/Cas9, GATA2, SOX10, siRNA

УДК 57.085:57.086.8

МУЛЬТИМОДАЛЬНАЯ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ И ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В МОЗГ¹

© 2022 г. Y. C. Zhang^{a, b}, J. W. Wang^{b, c}, Y. Wu^{b, c}, Q. Tao^d, F. F. Wang^{b, c}, N. Wang^{a, b},
X. R. Ji^{a, b}, Y. G. Li^d, S. Yu^{a, b, *}, J. Z. Zhang^{a, b, c, e, **}

^aUniversity of Science and Technology of China, Hefei, 230026 P.R. China

^bSuzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, 215163 P.R. China

^cZhengzhou Institute of Engineering and Technology Affiliated with SIBET, Zhengzhou, 450001 P.R. China

^dDepartment of Radiology, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, 215100 P.R. China

^eTianjin Guokeyigong Science and Technology Development Company Limited, Tianjin, 300399 P.R. China

*e-mail: yush@sibet.ac.cn

**e-mail: zhangjz@sibet.ac.cn

Поступила в редакцию 27.09.2021 г.

После доработки 11.11.2021 г.

Принята к публикации 25.11.2021 г.

Понимание характеристик пересаженных клеток, таких как выживание, рост и распределение, необходимо для оптимизации клеточной терапии, а мультимодальная визуализация на анатомическом и молекулярном уровнях предназначена для достижения этой цели. Нами сконструирован лентивирусный вектор, несущий гены тяжелой цепи-1 ферритина (*FTH1*), флуоресцентного белка ближнего инфракрасного диапазона (*iRFP*) и усиленного зеленого флуоресцентного белка (*egfp*). Создана культура индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSCs), стабильно экспрессирующих эти три репортерных гена. Эти iPSCs флуоресцировали в зеленой и ближней инфракрасной области спектра, а также обладали способностью поглощать железо *in vitro*. После трансплантации меченых iPSCs в мозг крысы прижившиеся клетки можно было до 60 суток визуализировать *in vivo* с помощью магнитно-резонансной (MRI) и флуоресцентной спектроскопии в ближней инфракрасной области (NIF) на анатомическом уровне. Кроме того, эти клетки можно было обнаружить с помощью иммуноокрашивания EGFP и окрашивания берлинской лазурью. Разработанную нами технологию можно рассматривать как новый инструмент для изучения поведения трансплантированных клеток мультимодальным способом, что важно при оценке эффективности и безопасности клеточной терапии.

Ключевые слова: мультимодальная визуализация, магнитно-резонансная визуализация, флуоресцентная визуализация, клеточная терапия, мозг

DOI: 10.31857/S002689842203020X

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Balistreri C.R., Falco E.D., Bordin A., Maslova O., Koliada A., Vaiserman A. (2020) Stem cell therapy: old challenges and new solutions. *Mol. Biol. Rep.* **47**, 3117–3131.
2. Singh S.P., Rahman M.F., Murty U.S., Mahboob M., Grover P. (2013) Comparative study of genotoxicity and tissue distribution of nano and micron sized iron oxide in rats after acute oral treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **266**, 56–66.
3. Naumova A.V., Balu N., Yarnykh V.L., Reinecke H., Murry C.E., Yuan C. (2014) Magnetic resonance imaging tracking of graft survival in the infarcted heart: iron oxide particles versus ferritin overexpression approach. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **19**, 358–367.
4. Li M., Wang Y., Liu M., Lan X. (2018) Multimodality reporter gene imaging: construction strategies and application. *Theranostics*. **8**, 2954–2973.
5. Lippincott-Schwartz J., Patterson G.H. (2003) Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*. **300**, 87–91.

¹ Статья представлена авторами на английском языке

6. Gu E., Chen W.Y., Gu J., Burridge P., Wu J.C. (2012) Molecular imaging of stem cells: tracking survival, bio-distribution, tumorigenicity, and immunogenicity. *Theranostics*. **2**, 335–345.
7. Walter A., Paul-Gilloteaux P., Plochberger B., Plochberger B., Sefc L., Verkade P., Mannheim J.G., Slezak P., Unterhuber A., Marchetti-Deschmann M., Ogris M., Bühler K., Fixler D., Geyer S.H., Weninger W.J., Glösmann M., Handschuh S., Wanek T. (2020) Correlated multimodal imaging in life sciences: expanding the biomedical horizon. *Front. Phys.* **8**, 47.
8. Zhang W., Zhang S., Xu W., Zhang M., Zhou Q., Chen W. (2017) The function and magnetic resonance imaging of immature dendritic cells under ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO)-labeling. *Bio-technol. Lett.* **39**, 1079–1089.
9. Ngen E.J., Artemov D. (2017) Advances in monitoring cell-based therapies with magnetic resonance imaging: future perspectives. *J. Int. Mol. Sci.* **18**, 198.
10. Chen Q., Wang F., Zhang Y., Liu Y., An L., Ma Z., Zhang J., Yu S. (2020) Neonatal DEX exposure leads to hyperanxious and depressive-like behaviors as well as a persistent reduction of BDNF expression in developmental stages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **527**, 311–316.
11. Hockemeyer D., Jaenisch R. (2016) Induced pluripotent stem cells meet genome editing. *Cell Stem Cell*. **18**, 573–586.
12. Ahmadian-Moghadam H., Sadat-Shirazi M.S., Zar-rindast M.R. (2020) Therapeutic potential of stem cells for treatment of neurodegenerative diseases. *Biotechnol. Lett.* **42**, 1073–1101.
13. Nguyen P.K., Lan F., Wang Y., Wu J.C. (2011) Imaging: guiding the clinical translation of cardiac stem cell therapy. *Circ. Res.* **109**, 962–979.
14. Palfi S., Gurruchaga J.M., Lepetit H., Howard K., Ralph G.S., Mason S., Gouello G., Domenech P., Buttery P.C., Hantraye P., Tuckwell N.J., Barker R.A., Mitrophanous K.A. (2018) Long-term follow-up of a phase I/II study of ProSavin, a lentiviral vector gene therapy for Parkinson's Disease. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* **29**, 148–155.
15. Chiou B., Neely E.B., Mcdevitt D.S., Simpson I.A., Connor J.R. (2020) Transferrin and H-ferritin involvement in brain iron acquisition during postnatal development: impact of sex and genotype. *J. Neurochem.* **152**, 381–396.
16. Dai H., He R., Zhang Y., Wu R.H., Xiao Y.Y. (2017) Adenoviral vector mediated ferritin over-expression in mesenchymal stem cells detected by 7T MRI *in vitro*. *PLoS One*. **12**, e0185260.
17. Ansari A.M., Ahmed A.K., Matsangos A.E., Lay F., Born L.J., Marti G., Harmon J.W., Sun Z. (2016) Cellular GFP toxicity and immunogenicity: potential confounders in *in vivo* cell tracking experiments. *Stem. Cell. Rev. Rep.* **12**, 553–559.
18. Rogers O.C., Johnson D.M., Firnberg E. (2019) mRhubarb: Engineering of monomeric, red-shifted, and brighter variants of iRFP using structure-guided multi-site mutagenesis. *Sci. Rep.* **9**, 15653.
19. Lütje S., Rijpkema M., Helfrich W., Oyen W.J., Boerman O.C. (2014) Targeted radionuclide and fluorescence dual-modality imaging of cancer: preclinical advances and clinical translation. *Mol. Imaging. Biol.* **16**, 747–755.
20. Kim H.S., Cho H.R., Choi S.H., Woo J.S., Moon W.K. (2010) *In vivo* imaging of tumor transduced with bimodal lentiviral vector encoding human ferritin and green fluorescent protein on a 1.5T clinical magnetic resonance scanner. *Cancer. Res.* **70**, 7315–7324.
21. Vocht N.D., Bergwerf I., Vanhoutte G., Daans J., Vis-scher G.D., Chatterjee S., Pauwels P., Berneman Z., Ponsaerts P., Van der Linden A. (2011) Labeling of luciferase/eGFP-expressing bone marrow-derived stromal cells with fluorescent micron-sized iron oxide particles improves quantitative and qualitative multimodal imaging of cellular grafts *in vivo*. *Mol. Imaging. Biol.* **13**, 1133–1145.

MULTIMODAL MAGNETIC RESONANCE AND FLUORESCENCE IMAGING OF THE INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL TRANSPLANTATION IN THE BRAIN

Y. C. Zhang^{1, 2}, J. W. Wang^{2, 3}, Y. Wu^{2, 3}, Q. Tao⁴, F. F. Wang^{2, 3}, N. Wang^{1, 2}, X. R. Ji^{1, 2}, Y. G. Li⁴, S. Yu^{1, 2, *}, and J. Z. Zhang^{1, 2, 3, 5, **}

¹ University of Science and Technology of China, Hefei, 230026 P.R. China

² Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, 215163 P.R. China

³ Zhengzhou Institute of Engineering and Technology Affiliated with SIBET, Zhengzhou, 450001 P.R. China

⁴ Department of Radiology, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, 215100 P.R. China

⁵ Tianjin Guokeyingong Science and Technology Development Company Limited, Tianjin, 300399 P.R. China

*e-mail: yush@sibet.ac.cn

**e-mail: zhangjz@sibet.ac.cn

The understanding of the engrafted cell behaviors such as the survival, growth and distribution is the prerequisite to optimize cell therapy, and a multimodal imaging at both anatomical and molecular levels is designed to achieve this goal. We constructed a lentiviral vector carrying genes of ferritin heavy chain 1 (*FTH1*), near-infrared fluorescent protein (*iRFP*) and enhanced green fluorescent protein (*egfp*), and established the induced pluripotent stem cells (iPSCs) culture stably expressing these three reporter genes. These iPSCs

showed green and near-infrared fluorescence as well as the iron uptake capacity *in vitro*. After transplanted the labeled iPSCs into the rat brain, the engrafted cells could be *in vivo* imaged using magnetic resonance imaging (MRI) and near-infrared fluorescent imaging (NIF) up to 60 days at the anatomical level. Moreover, these cells could be detected using EGFP immunostaining and Prussian blue stain at the cellular level. The developed approach provides a novel tool to study behaviors of the transplanted cells in a multimodal way, which will be valuable for the effectiveness and safety evaluation of cell therapy.

Keywords: multimodal imaging, magnetic resonance imaging, fluorescent imaging, cell therapy, brain

УДК 577.29:578.23

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА LAMP1 ЧЕЛОВЕКА ПОВЫШАЕТ ПРОДУКЦИЮ ВИРУСОВ SARS-CoV-1 И SARS-CoV-2 В ТРАНСГЕННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ НА ОСНОВЕ Vero

© 2022 г. А. А. Дольский^а, И. В. Грищенко^а, С. А. Боднев^а, А. А. Назаренко^а, А. М. Смирнова^а, А. К. Матвеева^а, Л. Е. Бульчев^а, А. С. Овчинникова^а, Т. В. Трегубчак^а, А. В. Зайковская^а, И. Р. Иматдинов^а, О. В. Пьянков^а, Е. В. Гаврилова^а, Р. А. Максютлов^а, Д. В. Юдкин^а, *

^аГосударственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий, Кольцово, Новосибирская область, 630559 Россия

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

Поступила в редакцию 22.11.2021 г.

После доработки 13.12.2021 г.

Принята к публикации 13.12.2021 г.

Coronaviridae – семейство вирусов с одноцепочечной РНК (оцРНК). Некоторые из них вызывают серьезные инфекционные заболевания у человека. Например, коронавирус-1 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-1) и коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) стали причиной вспышек с высокими показателями смертности в 2002–2003 гг. и 2012 году соответственно. Новая коронавирусная инфекция, COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, появилась в 2019 году в городе Ухань (Китай) и уже привела более чем к 5 млн смертей по всему миру. Проникновение SARS-CoV-2 внутрь клетки происходит за счет взаимодействия вирусного белка шипа (S) с белком на поверхности клетки – ангиотензинконвертирующим ферментом-2 (ACE2). В инфицированных клетках сборка вируса происходит в эндосомах, отделяющихся от аппарата Гольджи. Высвобождаются вирусные частицы посредством экзоцитоза. Одним из возможных участников этого процесса считается ассоциированный с лизосомами мембранный белок-1 (LAMP1). Нами созданы трансгенные клеточные линии на основе клеток Vero с повышенной экспрессией гена *LAMP1* человека, проанализирована их чувствительность к заражению и репликативная активность SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2. Обнаружено повышение продукции обоих вирусов в трансгенных клетках по сравнению с исходной клеточной культурой, особенно при заражении клеток в присутствии трипсина. На основании полученных данных можно предположить, что LAMP1 способствует репликации SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 за счет усиления экзоцитоза.

Ключевые слова: SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, LAMP1, COVID-19, Vero, трансгенные клетки

DOI: 10.31857/S0026898422030053

Коронавирусы (CoV) относятся к семейству Coronaviridae отряда Nidovirales. Это вирусы, содержащие одноцепочечную плюс-цепь РНК (оцРНК), некоторые из них вызывают серьезные респираторные и кишечные инфекции у человека и животных [1]. В XX веке представители этого семейства стали причиной двух вспышек серьезных заболеваний человека: тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) в 2002–2003 гг. и ближневосточного респираторного синдрома (MERS) в 2012 году – и продолжающейся уже третий год пандемии коронавирусного инфекционного заболевания COVID-19. В первом случае был идентифицирован коронавирус, получивший название SARS-CoV (по современной терминологии SARS-CoV-1), а в 2012 году – MERS-CoV. В ре-

зультате этих вспышек в общей сложности погибло 1398 человек [2]. В конце декабря 2019 года в городе Ухань (Китай) появился новый вид коронавируса – SARS-CoV-2, – который стал причиной пандемии COVID-19 [3], быстро распространившейся по всему миру и продолжающейся до сих пор. На сегодняшний день зарегистрировано более 5 млн летальных исходов, вызванных COVID-19 (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>, данные на 08.12.2021).

Геном коронавируса представляет собой (+)оцРНК размером примерно 30 тыс.н. с 5'-кепом и 3'-поли(А)-хвостом. Геномная РНК кодирует полипротеины и служит матрицей для синтеза субгеномной РНК. Анализ последовательно-

сти генома SARS-CoV-2 выявил высокое сходство с геномами других инфекционных агентов из рода *Betacoronavirus*: bat-SARS-like (SL) ZC45, bat-SL ZXC21, SARS-CoV-1 и MERS-CoV [4]. Вероятным природным резервуаром этого патогена считаются летучие мыши и пальмовые цвететты. Проникновение вируса в клетки опосредовано связыванием гликопротеина шипа (S), находящегося на поверхности вириона, с его рецептором на хозяйской клетке. В качестве основного клеточного рецептора SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 идентифицирован ангиотензинконвертирующий фермент-2 (ACE2). Во взаимодействии с клеточным рецептором вовлечен рецепторсвязывающий домен (RBD) S-белка. Уже показано, что SARS-CoV-2 распознает ACE2 некоторых видов животных [1, 5].

Кроме того, показано, что SARS-CoV-2 использует сериновую протеазу TMPRSS2 для праймирования S-белка при проникновении в клетку, а механизм этого процесса аналогичен таковому для SARS-CoV-1 [6, 7]. Сообщалось, что RBD SARS-CoV-2 обладает более сильным сродством к ACE2 по сравнению с SARS-CoV-1 [8]. Протеолитическая активация S-белка – один из важнейших этапов жизненного цикла коронавируса. В дополнение к праймированию посредством TMPRSS2 S-белок может расщепляться также протеазами хозяина (катепсин, фурин, трипсин) по различным сайтам. В случае заражения клеток линий Vero или Vero E6 в лабораторных условиях добавление трипсина приводило к такому же эффекту, как и в присутствии катепсина [9].

Стандартной клеточной линией для вирусологических исследований, в том числе для культивирования и изучения коронавирусов, считается линия Vero, полученная из клеток почки африканской зеленой мартышки. К важным характеристикам этих клеток относится их неспособность продуцировать интерферон – важный компонент клеточного иммунного ответа [10]. Часто используют линию Vero E6, которая представляет собой клон-вариант культуры Vero с контактным ингибированием – торможением деления клеточной массы при контакте с соседними клетками. Ранее показано, что SARS-CoV-1 вызывает литическую инфекцию при заражении ряда клеточных культур, включая Vero и Vero E6. Так, через 12 ч после заражения клеток Vero E6 средняя инфекционная доза (CCID₅₀/мл) вируса составляла 5.2×10^3 [11, 12].

С помощью электронной микроскопии показано, что вирусные частицы SARS-CoV-1 прикрепляются к поверхности клеток Vero E6 и через 7 ч после инфицирования в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи появляются вирусные нуклеокапсиды, заключенные в эндосомы. В пузырьках аппарата Гольджи

происходит гликозилирование вирусных белков S, M (мембранный белок) и E (белок оболочки), что необходимо для корректной сборки вирусных частиц, а также сама сборка [13]. Заключительная стадия инфекционного цикла – перенос лизосом, содержащих вирусные частицы, на клеточную мембрану и их высвобождение посредством экзоцитоза. Ранее обнаружена колокализация аксессуарного белка ORF6 SARS-CoV-1 с белком LAMP1 в инфицированных клетках Vero E6 [14]. LAMP1 – ассоциированный с лизосомами мембранный белок, который участвует в экзоцитозе [15]. Известно, что гликопротеин (GP) вируса Ласса после проникновения вирионов в клетку связывается с белком LAMP1 [16].

Мы предположили, что увеличение количества LAMP1 в клетке приведет к усилению экзоцитоза, что вызовет повышение продукции вирусов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 инфицированными клетками. С целью проверить эту гипотезу мы создали трансгенные клеточные линии на основе культуры Vero, экспрессирующие ген *LAMP1* человека, и оценили продукцию обоих вирусов в полученных трансгенных линиях и исходной клеточной культуре. В результате проведенного анализа обнаружены различия в продукции вирусов в зависимости от экспрессии *LAMP1* и присутствия/отсутствия трипсина, использованного в качестве сериновой протеазы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение и клонирование открытой рамки считывания (ORF) гена *LAMP1*. РНК выделяли из клеток HEK293A (Клеточное хранилище ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Россия) с помощью реактива TRIzol (“Thermo Fisher Scientific”, США). Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью обратной транскриптазы RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (“Thermo Fisher Scientific”) с использованием специфичного праймера к последовательности ORF *LAMP1*: 5'-GTGCAC-CAGGCTAGATAGTCTG-3' – по следующей программе: снижение температуры с 75 до 55°C (1.5°C/5 с); 3 мин при 55°C и 1 ч при 42°C. Полученную кДНК использовали для амплификации ORF. Реакцию проводили с использованием праймеров: 5'-TAAGCAGAATTCGCCTCGCGCCATG-GCGGC-3' и 5'-TAAGCAGTCTGACGTCGAC-CAGGCTAGATAGTCTGGT-3' – по следующей программе: 11 циклов (3 мин при 94°C, 50 с при 94°C, 1 мин при 56°C, 14 мин при 68°C), 32 цикла (50 с при 94°C, 10 мин 15 с при 61°C) и 10 мин при 68°C.

Синтезированную последовательность секвенировали по Сэнгеру и клонировали под контроль промотора цитомегаловируса (CMV) в плазмиду, полученную из pSBi-GP (#60511, “Addgene”,

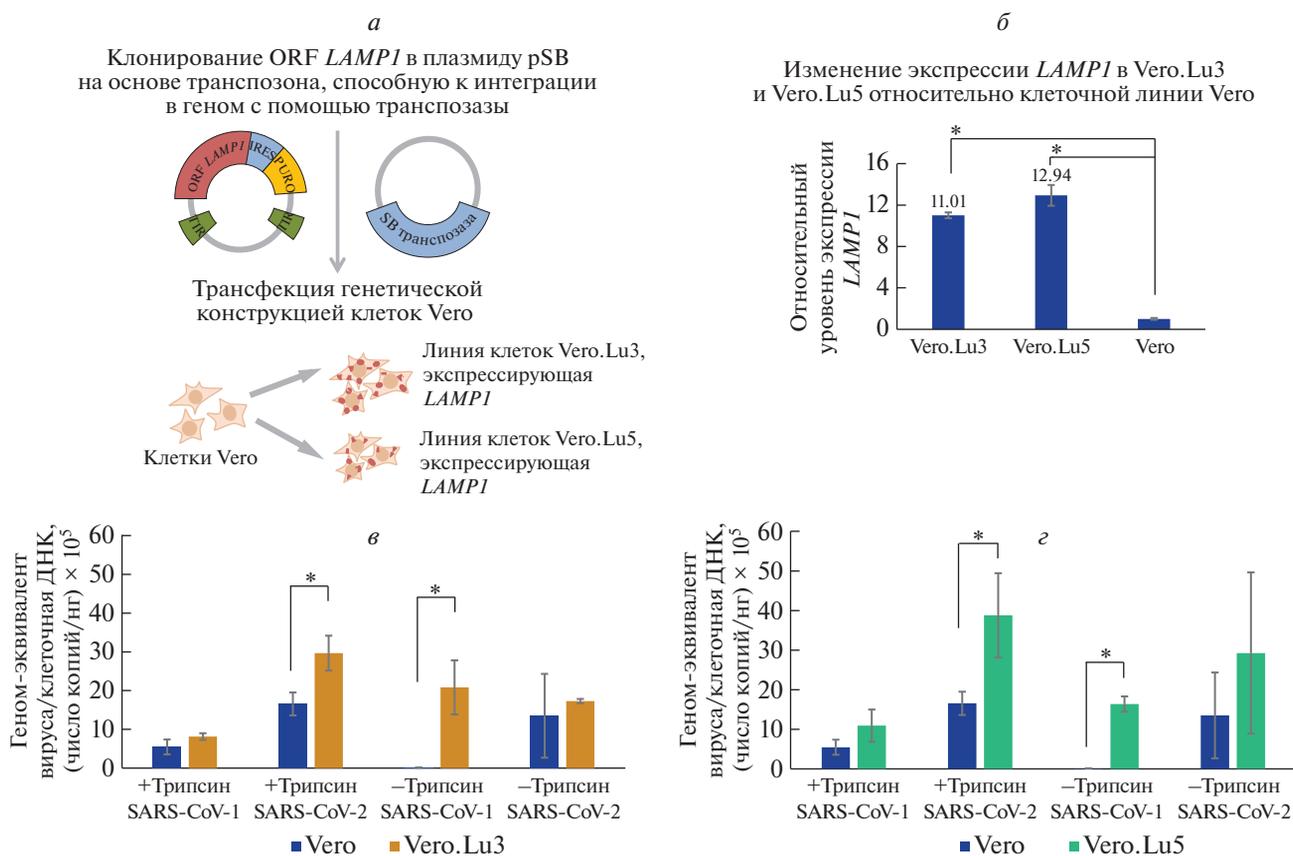


Рис. 1. Схема получения трансгенных клеточных линий и их заражение коронавирусами. Схема конструкций для получения трансгенных клеточных линий Vero.Lu3 и Vero.Lu5 (а) и экспрессия в них гена *LAMP1* (б). Анализ числа геном-эквивалентов вирусов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 на клеточный геном клеток Vero и трансгенных линий Vero.Lu3 (в) и Vero.Lu5 (г) через 48 ч после заражения в присутствии (+) и в отсутствие (-) трипсина. **p* < 0.05.

США). Последовательность IRES с последующим геном пуromицин-*N*-ацетилтрансферазы клонировали после рамки считывания *LAMP1*. Далее клетки Vero (Клеточное хранилище ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Россия) трансфицировали с помощью реагента Lipofectamine 3000 (“Thermo Fisher Scientific”) собранной гено-инженерной конструкцией и плазмидой, содержащей транспозон pCMV (CAT) T7-SB100 (#34879, “Addgene”). Стабильные трансформанты отбирали с помощью селекции на среде DMEM/F12, содержащей антибиотик пуromицин (10 мкг/мл), в течение одной недели с последующим культивированием в среде с пуromицином (5 мкг/мл) в течение 6 недель. Экспрессию *LAMP1* в трансгенной клеточной культуре оценивали методом ПЦР в реальном времени с использованием набора BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (“Биолабмикс”, Россия) и праймеров: 5'-AACTCATGAGCTGGACGCTG-3' и 5'-CTCCTGTG-GAAAAGAGAACAC-3' – к кДНК, полученной с помощью набора OT-M-MuLV-RH (“Биолабмикс”) и вырожденных праймеров. Результаты

нормализовали по экспрессии гена домашнего хозяйства гипоксантинфосфорибозилтрансферазы-1 (*HPRT1*).

Эксперимент по анализу уровня экспрессии мРНК *LAMP1* в клеточной линии Vero проведен в трех технических и четырех биологических повторах. Исходные данные обрабатывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [17]. Графические результаты представлены как средние значения биологических повторов со стандартными отклонениями (SD). Статистические различия между клеточными линиями Vero.Lu3, Vero.Lu5 и Vero определяли методом дисперсионного анализа ANOVA. Достоверность различий оценивали с использованием HSD-теста значимости Тьюки. Различия считали достоверными при значении *p* < 0.05.

Заражение клеточных культур вирусами SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2. Работы с живыми вирусами SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 проводили в соответствии с утвержденными Санитарно-эпидемиологическими правилами работы с патогенами II группы биобезопасности ([МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 56 № 3 2022](https://www.rosпотребнадzor.ru/documents/details.php?ELE-</p>
</div>
<div data-bbox=)

MENT_ID=3552). Клетки высевали в лунки 24-луночного планшета (10^5 клеток/лунка) и инкубировали до достижения 90%-ной конfluence. В экспериментах, предполагающих обработку монослоя клеток трипсином, к 1 мл культуральной среды DMEM/F12 (“Биолот”, Россия), содержащей антибиотики, добавляли трипсин (до 4 мкг/мл), обработанный тозилфенилаланилхлорметилкетон (ТРСК) (“Sigma-Aldrich”, США), и инкубировали в течение 25 мин при комнатной температуре. В экспериментах, не предусматривающих присутствия трипсина, клетки инкубировали в тех же условиях, но без трипсина. В каждую лунку 24-луночного планшета добавляли 100 мкл среды DMEM/F12, содержащей 4.6 Ig ФОЕ/мл (ФОЕ – фокусобразующие единицы) вирусных частиц SARS-CoV-1 (штамм Urbani, Erasmus University Medical Center, Rotterdam; GenBank Acc. No. AY278741.1) или SARS-CoV-2 (штамм SARS-CoV-2/human/AUS/VIC01/2020, GenBank Acc. No. MT007544.1) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывали бессывороточной средой Игла (MEM). В планшеты, предназначенные для культивирования клеточной культуры в присутствии трипсина, добавляли 1 мл раствора трипсина в DMEM/F12 (2 мкг/мл). В планшет, где культивирование происходило без трипсина, добавляли только среду DMEM/F12. Планшеты инкубировали в течение 48 ч при 37°C и 5% CO₂. Для выделения вирусного генетического материала планшеты трижды замораживали и оттаивали с последующим лизисом с помощью набора РИБО-преп (“AmpliSens”, Россия). Каждый эксперимент проводили в трех биологических повторах.

Для определения количества вируса в монослое клеток и культуральной среде по отдельности среду собирали, центрифугировали 5 мин при 1 000 g и замораживали для последующего лизиса, как описано выше. К монослою добавляли свежую среду, после чего лизировали.

ПЦР в реальном времени для определения геном-эквивалентов вируса. Число геном-эквивалентов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 измеряли с помощью диагностического набора для выявления SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР с флуоресцентными зондами Вектор-OneStepПЦР-CoV-RG (ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора, Россия) согласно рекомендациям производителя. Результаты нормировали относительно плазмидной ДНК pJet1.2_SARS, которая содержала фрагмент вирусного генома (последовательность 28670–28826 по штамму MN997409.1). Количество геномной ДНК клеток Vero измеряли с помощью ПЦР в реальном времени методом SYBR Green с использованием реагентов BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (“Биолабмикс”) с использованием

праймеров *vero_chr11-F* (5'-TCCTATGACGGG-GGCTGTTA-3') и *vero_chr11-R* (5'-GGCCCAA-GAGGTCGAATTGT-3'). Поскольку кариотип клеточной линии Vero вариабелен, для амплификации был выбран фрагмент хромосомы 11 (chr11:6570784–6570896), для которого показана стабильность числа копий на геном клетки [18]. Число копий генома определяли с помощью калибровочной кривой путем разбавления геномной ДНК, выделенной из клеток Vero, с известной концентрацией. Для исследования количества вируса на одну клетку использовали следующую формулу:

$$x = \frac{a}{b},$$

где a – общее число эквивалентов вирусного генома, b – общее количество геномной ДНК клеток Vero в каждом образце. Для определения статистической значимости полученных отличий между клеточными культурами использовали три биологических и три технических повтора. Нормальность распределения определяли по тесту Шапиро–Уилка. Для определения статистической значимости полученных различий между клеточными культурами использовали t -критерий Стьюдента для независимых выборок с нормальным распределением. Значения считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Интеграция последовательности LAMP1 в геном клеток Vero

Открытую рамку считывания *LAMP1* амплифицировали с кДНК, полученной из клеток HEK-293A, и клонировали в плазмидную конструкцию на основе транспозона Sleeping Beauty. Стандартную клеточную линию Vero трансфицировали полученной генно-инженерной конструкцией путем липофекции и отбирали стабильные трансформанты путем селекции на пурамицине. Таким образом получили две трансгенные клеточные линии Vero.Lu3 и Vero.Lu5. Экспрессию открытой рамки считывания *LAMP1* оценивали методом ПЦР в реальном времени. В клеточных линиях Vero.Lu3 и Vero.Lu5 обнаружено соответственно 11.01- и 12.94-кратное увеличение экспрессии гена интереса по сравнению с исходной клеточной линией Vero. Различия в уровне экспрессии достоверны при сравнении как Vero.Lu3 и Vero.Lu5, так и относительно исходной клеточной линии Vero ($p < 0.05$). Таким образом, обе трансгенные клеточные линии подходили для дальнейших экспериментов (рис. 1а и 1б).

Репликация вирусной РНК в трансгенных клеточных культурах

Трансгенные клеточные культуры заражали вирусами SARS-CoV-1 или SARS-CoV-2. Инфицированные клетки инкубировали в двух условиях: в присутствии трипсина и без него — по протоколу, описанному ранее [19, 20]. Образцы, содержащие вирусный и клеточный геномный материал, собирали через 48 ч [21]. Определяли число геном-эквивалентов вируса относительно модельной плазмиды, содержащей фрагмент вирусного генома SARS-CoV-1. Результаты представляли в виде числа геном-эквивалентов вируса в образце и числа геном-эквивалентов вируса на единицу массы геномной ДНК клеток Vero. Обнаружено увеличение продукции SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 в клетках Vero.Lu3 и Vero.Lu5 по сравнению с клетками Vero (рис. 1в и 1г соответственно). Достоверная разница в продукции вируса между клетками Vero и трансгенными клетками была более очевидной и значимой в присутствии трипсина в питательной среде при заражении ($p < 0.05$). Так, в клеточных линиях Vero.Lu3 и Vero.Lu5 наблюдали соответственно 5- и 6-кратное увеличение продукции SARS-CoV-1 по сравнению с исходными клетками (рис. 1в и 1г). Для SARS-CoV-2 различия были еще более выражены: продукция вируса увеличилась в 1 236 и 362 раз соответственно. Пересчет числа геном-эквивалентов вируса с поправкой на геномные эквиваленты клеток Vero внес лишь незначительные изменения. В отсутствие трипсина продукция SARS-CoV-1 в трансгенных клетках повышалась всего в 1.3–3.0 раза, а SARS-CoV-2 практически не отличалась от таковой в исходной линии. Преобразование в клеточные геномы привело к аналогичным профилям. Однако все различия в отсутствие трипсина не были достоверными.

Также показано, что через 48 ч после заражения без трипсина количество вируса в монослое клеток выше, чем в питательной среде в 1.6 раза в клетках Vero.Lu3, в 1.4 раза в клетках Vero.Lu5 и в 1.3 раза в исходной линии Vero. При заражении с трипсином эти значения равны 1.5, 1.5 и 1.4 соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе работы исследована продукция вирусов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 в трансгенных клетках Vero, экспрессирующих ген *LAMP1* человека. Проанализировано число геном-эквивалентов вируса, а также число геном-эквивалентов вируса, нормированных на геномный эквивалент клеток Vero. Установленные различия в профилях вирусной продукции между трансгенными линиями и исходными клетками были статистически значимыми. В экспериментах по заражению ис-

пользовали равное число клеток и равное число вирусных частиц. Однако коронавирусы проявляют цитопатическое действие, поэтому может наблюдаться понижение продукции вируса из-за гибели монослоя клеток. Обнаружены различия в продукции вирусных частиц при заражении клеток в присутствии трипсина и без него. Значимая разница выявлена между исходной клеточной культурой Vero и трансгенными линиями клеток, экспрессирующими *LAMP1*, в присутствии трипсина. Ранее показано, что трипсин способствует процессингу и активации S-белка путем его гидролиза с образованием двух субъединиц — S1 и S2. Активированный белок взаимодействует с ACE2 и вирус проникает в клетку [22]. Известно, что зрелые вирионы коронавируса выходят из клетки через 12 ч после заражения [11, 12], что может приводить к вторичному заражению клеточной культуры и увеличению продукции вируса.

Нами показано, что повышенная экспрессия *LAMP1* приводит к увеличению продукции исследованных коронавирусов в обеих линиях трансгенных клеток Vero. Следует заметить, что в исходной клеточной линии Vero продукция SARS-CoV-2 была выше, чем SARS-CoV-1, что может быть связано с его повышенной вирулентностью. Что касается белка *LAMP1*, то его важнейшая функция — регуляция экзоцитоза лизосом [15]. Ранее сообщалось об участии *LAMP1* в жизненном цикле вирусов, использующих эндосомы для проникновения в клетку. Так, этот белок увеличивает общую эффективность заражения клеток вирусом Ласса [23]. *LAMP1* позволяет вирусным частицам выйти из эндоцитарного пути до того, как они столкнутся с более кислой протеолитической средой, что приводит к сохранению жизнеспособности большего числа вирионов.

В проведенном исследовании нами показано повышение продукции вирусов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2 в клетках Vero со сверхэкспрессией гена *LAMP1*. Также через 48 ч после заражения обнаружено повышенное количество вируса в клетках относительно его содержания в культуральной среде в трансгенных линиях по сравнению с исходной. На основании полученных данных можно предполагать, что белок *LAMP1* вовлечен в жизненный цикл вирусов SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2, и рассматривать его в качестве потенциальной мишени для терапии коронавирусной инфекции.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cui J., Li F., Shi Z.L. (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 181–192.
- De Wit E., Van Doremalen N., Falzarano D., Munster V.J. (2016) SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 523–534.
- Wu D., Wu T., Liu Q., Yang Z. (2020) The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. *Int. J. Infect. Dis.* **94**, 44–48.
- Chen Y., Liu Q., Guo D. (2020) Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *J. Med. Virol.* **92**, 418–423.
- Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. (2020) Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.* **94**, e00127–20.
- Gierer S., Bertram S., Kaup F., Wrensch F., Heurich A., Kramer-Kuhl A., Welsch K., Winkler M., Meyer B., Drosten C., Dittmer U., von Hahn T., Simmons G., Hofmann H., Pöhlmann S. (2013) The spike protein of the emerging *Betacoronavirus* EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies. *J. Virol.* **87**, 5502–5511.
- Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.H., Nitsche A., Müller M.A., Drosten C., Pöhlmann S. (2020) SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. **181**, 271–280.e8.
- Tai W., He L., Zhang X., Pu J., Voronin D., Jiang S., Zhou Y., Du L. (2020) Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell. Mol. Immunol.* **17**, 613–620.
- Millet J.K., Whittaker G.R. (2012) Host cell proteases: critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res.* **202**, 120–134.
- Desmyter J., Melnick J.L., Rawls W.E. (1968) Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J. Virol.* **2**, 955–961.
- Mossel E.C., Huang C., Narayanan K., Makino S., Tesh R.B., Peters C.J. (2005) Exogenous ACE2 expression allows refractory cell lines to support severe acute respiratory syndrome coronavirus replication. *J. Virol.* **79**, 3846–3850.
- Keyaerts E., Vijgen L., Maes P., Neyts J., Van Ranst M. (2005) Growth kinetics of SARS-coronavirus in Vero E6 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**, 1147–1151.
- Qinfen Z., Jinming C., Xiaojun H., Huanying Z., Jicheng H., Ling F., Kunpeng L., Jingqiang Z. (2004) The life cycle of SARS coronavirus in Vero E6 cells. *J. Med. Virol.* **73**, 332–337.
- Gunalan V., Mirazimi A., Tan Y.J. (2011) A putative diacidic motif in the SARS-CoV ORF6 protein influences its subcellular localization and suppression of expression of co-transfected expression constructs. *BMC Res. Notes.* **4**, 446.
- Yogalingam G., Bonten E.J., van de Vlekkert D., Hu H., Moshiah S., Connell S.A., D’Azzo A. (2008) Neuraminidase 1 is a negative regulator of lysosomal exocytosis. *Dev. Cell.* **15**, 74–86.
- Jae L.T., Raaben M., Herbert A.S., Kuehne A.I., Wirchnianski A.S., Soh T.K., Stubbs S.H., Janssen H., Damme M., Saftig P., Whelan S.P., Dye J.M., Brummelkamp T.R. (2014) Lassa virus entry requires a trigger-induced receptor switch. *Science.* **344**, 1506–1510.
- Chang S., Chen W., Yang J. (2009) Another formula for calculating the gene change rate in real-time RT-PCR. *Mol. Biol. Rep.* **36**, 2165–2168.
- Osada N., Kohara A., Yamaji T., Hirayama N., Kasai F., Sekizuka T., Kuroda M., Hanada K. (2014) The genome landscape of the african green monkey kidney-derived Vero cell line. *DNA Res.* **21**, 673–683.
- Simmons G., Rennekamp A.J., Bates P. (2006) Proteolysis of SARS-associated coronavirus spike glycoprotein. *Adv. Exp. Med. Biol.* **581**, 235–240. https://doi.org/10.1007/978-0-387-33012-9_39
- Harcourt J., Tamin A., Lu X., Kamili S., Sakthivel S.K., Murray J. Queen K., Tao Y., Paden C.R., Zhang J., Li Y., Uehara A., Wang H., Goldsmith C., Bullock H.A., Wang L., Whitaker B., Lynch B., Gautam R., Schindewolf C., Lokugamage K.G., Scharton D., Plante J.A., Mirchandani D., Widen S.G., Narayanan K., Makino S., Ksiazek T.G., Plante, K.S., Weaver S.C., Lindstrom S., Tong S., Menachery V.D., Thornburg N.J. (2020) Isolation and characterization of SARS-CoV-2 from the first US COVID-19 patient. *bioRxiv*. 2020.03.02.972935. <https://doi.org/10.1101/2020.03.02.972935>
- Lokugamage K.G., Hage A., de Vries M., Valero-Jimenez A.M., Schindewolf C., Dittmann M. Rajsbaum R., M., Menachery V.D. (2020) Type I interferon susceptibility distinguishes SARS-CoV-2 from SARS-CoV. *J. Virol.* **94**(23), e01410-20.
- Xia S., Lan Q., Su S., Wang X., Xu W., Liu Z., Zhu Y., Wang Q., Lu L., Jiang S. (2020) The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, 92. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0184-0>
- Hulseberg C.E., Fénéant L., Szymańska K.M., White J.M. (2018) Lamp1 increases the efficiency of Lassa virus infection by promoting fusion in less acidic endosomal compartments. *mBio.* **9**(1), e01818-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01818-17>

INCREASED *LAMP1* EXPRESSION ENHANCES SARS-CoV-1 AND SARS-CoV-2 PRODUCTION IN Vero-DERIVED TRANSGENIC CELL LINES

A. A. Dolskiy¹, I. V. Grishchenko¹, S. A. Bodnev¹, A. A. Nazarenko¹, A. M. Smirnova¹,
A. K. Matveeva¹, L. E. Bulychev¹, A. S. Ovchinnikova¹, T. V. Tregubchak¹,
A. V. Zaykovskaya¹, I. R. Imatdinov¹, O. V. Pyankov¹, E. V. Gavrilova¹,
R. A. Maksyutov¹, and D. V. Yudkin^{1,*}

¹State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Rosпотребнадзор, World-Class Genomic Research Center for Biological Safety and Technological Independence, Federal Scientific and Technical Program on the Development of Genetic Technologies, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

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

Coronaviridae is a family of viruses with single-stranded RNA that could cause diseases with high mortality rates. SARS-CoV-1 and MERS-CoV appeared in 2002–2003 and 2012, respectively. A novel coronavirus, SARS-CoV-2, emerged in 2019 in Wuhan (China) and has caused more than 5 million of deaths in worldwide. SARS-CoV-1 entry into the cell is due to the interaction of the viral spike (S) protein and the cell protein angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). After infection, virus assembly occurs in Golgi apparatus-derived vesicles during exocytosis. One of the possible participants in this process is LAMP1 protein. We established transgenic Vero cell lines with increased expression of human *LAMP1* gene and evaluated SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 production. An increase in the production of both viruses in the *LAMP1*-expressing cells compared with Vero cells was observed, especially in the presence of trypsin during infection. On the base results obtained one supposes that LAMP1 promote SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 production due to enhanced exocytosis.

Keywords: SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, LAMP1, COVID-19, Vero, transgenic cells

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ**

УДК 577.113.3

**НОВЫЕ АНАЛОГИ УРИДИНА КАК ВОЗМОЖНЫЕ ПРОТИВОВИРУСНЫЕ
АГЕНТЫ, СПЕЦИФИЧНЫЕ К SARS-CoV-2**© 2022 г. А. А. Маслова^{а, *}, Е. С. Матюгина^а, Е. Ю. Шустова^б, В. П. Волок^б,
Л. И. Козловская^{б, с}, С. Н. Кочетков^а, А. Л. Хандажинская^а^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия^бФедеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова
Российской академии наук (Институт полиомиелита), Москва, 108819 Россия^сПервый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, 119435 Россия

*e-mail: maslova_anna94@mail.ru

Поступила в редакцию 24.11.2021 г.

После доработки 06.12.2021 г.

Принята к публикации 07.12.2021 г.

Разработка лекарственных средств против SARS-CoV-2 – важнейшая задача, стоящая перед мировой наукой и здравоохранением. На сегодняшний день основным подходом к созданию средств, эффективных при COVID-19, остается репозиционирование, т.е. перепрофилирование препаратов, допущенных к клиническому применению, например, Ремдесивира (препарат против лихорадки Эбола), Фавипиравира (против гриппа) и др. Однако очевидно, что эти препараты недостаточно специфичны и эффективны. Другой перспективный подход предполагает создание новых молекул, однако нужно отметить, что реализация этого подхода требует гораздо больше времени и затрат. Тем не менее, продолжается поиск новых противовирусных агентов, специфичных к SARS-CoV-2. Цель нашей работы состояла в получении новых 5-замещенных производных уридина – потенциальных ингибиторов РНК-зависимой РНК-полимеразы коронавируса. Такие вещества получены с высоким выходом по реакции Сузуки–Мияуры и охарактеризованы с помощью современных физико-химических методов. Однако тестирование антивирусной активности этих веществ в отношении SARS-CoV-2 не выявило существенного ингибиторного эффекта.

Ключевые слова: коронавирус, SARS-CoV-2, аналоги нуклеозидов, флексимеры, реакция Сузуки–Мияура

DOI: 10.31857/S0026898422030107**ВВЕДЕНИЕ**

COVID-19 – высококонтагиозное респираторное заболевание, вызываемое бетакоронавирусом SARS-CoV-2. После того, как в конце декабря 2019 года в Китае были зарегистрированы первые случаи заболевания, SARS-CoV-2 быстро распространился по миру, что привело к развитию пандемии, в результате которой количество умерших приближается к 5 млн. человек [1]. Несмотря на многочисленные исследования, которые позволили лучше понять механизмы патогенеза SARS-CoV-2, этот вирус остается общемировой проблемой. Наблюдаются новые вспышки этого заболевания, обусловленные появлением и распространением мутантных вариантов вируса.

Структура и жизненный цикл SARS-CoV-2 хорошо изучены [2, 3]. Главный фермент репликации вируса – РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp, nsp12), функционирует в составе репликально-транскриптазного комплекса (RTC), кон-

тролирующего синтез вирусной РНК [3]. Ключевая роль RdRp в репликации SARS-CoV-2 делает этот фермент привлекательной терапевтической мишенью, а отсутствие ее аналогов в клетках млекопитающих предполагает высокую селективность ингибирования. В настоящее время интенсивно разрабатываются ингибиторы RdRp, которые потенциально могут обладать выраженной противовирусной активностью. Существующие в настоящее время ингибиторы RdRp делятся на два основных класса – нуклеозидные (НИ) и ненуклеозидные ингибиторы (ННИ), связывающиеся в активном центре и аллостерическом сайте соответственно [4].

Создание НИ считается перспективной стратегией, направленной на остановку репликации вирусной РНК, обусловленной высокой степенью консервативности активных сайтов RdRp и относительно низкой скоростью мутаций в этих областях, что обеспечит широкую противовирус-

ную активность и высокий порог резистентности. Основным механизмом действия нуклеозидных аналогов включает их внутриклеточное превращение в соответствующие трифосфаты, конкурируя с трифосфатами природных нуклеозидов, становятся терминаторными субстратами вирусных полимераз. Для эффективного ингибирования репликации вирусной РНК нуклеотидный аналог, встроенный в растущую цепь, не должен выщепляться за счет корректирующей активности, характерной для значительной доли полимераз, либо скорость его включения должна многократно превышать скорость выщепления. Противовирусные НИ делятся на три типа: облигатные терминаторы цепи, необлигатные терминаторы цепи и мутагенные. Облигатные терминаторы цепи не содержат 3'-гидроксильную группу в рибозидной части молекулы, что делает невозможным дальнейшее удлинение нуклеотидной цепи. Необлигатные терминаторы цепи содержат природное основание и 3'-гидроксил на остатке сахара, но они имеют дополнительный заместитель в положениях С-1' или С-2' рибозного кольца, блокируя последующее образование фосфодиэфирной связи с подходящим нуклеозидтрифосфатом [5]. Механизм летального мутагенеза заключается в неспособности распознавать аналоги нуклеозидов в качестве обычных нуклеотидных оснований, что вызывает несоответствие в спаривании оснований и увеличение количества мутаций, и приводит в конечном итоге к появлению нежизнеспособных геномов.

Оценена способность многих препаратов, первоначально нацеленных на RdRp других РНК-вирусов, таких как Ремдесивир (вирус Эбола), Фавипиравир (вирус гриппа), NHD EIDD-2801 (широкий спектр действия) и Софосбувир (вирус гепатита С), ингибировать SARS-CoV-2 [6]. Софосбувир – высокоактивный уридиновый нуклеотид, специфично ингибирующий репликацию вируса гепатита С. Сходство циклов репликации вируса гепатита С и коронавируса позволило предположить, что Софосбувир можно будет применять в терапии COVID-19 [7]. Первым специфическим противовирусным препаратом, одобренным Ассоциацией университетов Европы для лечения пациентов с тяжелым течением COVID-19, стал Ремдесивир. Один из основных недостатков Ремдесивира – необходимость внутривенного введения, ограничивает широкое применение этого препарата и вынуждает использовать его в условиях больничного стационара. Для изменения ситуации создана ингаляционная форма, которая в настоящее время проходит I фазу клинических испытаний. Ряд клинических исследований показал эффективность Фавипиравира в терапии COVID-19, однако эксперименты на животных выявили потенциальную тератогенную активность этого препарата [8]. Тем не менее, Фавипи-

равир одобрен к применению в ряде стран. Молнупиравир (EIDD-2801) представляет собой пероральное биодоступное пролекарство – аналог нуклеозида β -D-N⁴-гидроксицитидина, действующего по механизму летального мутагенеза с широким спектром действия. Показано, что N⁴-гидроксицитидин более чем в 100 раз активен, чем Рибавирин или Фавипиравир в отношении коронавируса SARS-CoV-2, причем его противовирусная активность коррелирует с уровнем мутагенеза в вирусной РНК. Молнупиравир оказался безопасным в I фазе клинических испытаний, в настоящее время продолжаются его клинические испытания. Однако показана также способность N⁴-гидроксицитидина вызывать геномные мутации в клетках человека *in vitro* [9].

Таким образом, в настоящий момент отсутствует высокоэффективное и специфичное лекарственное средство против SARS-CoV-2, поэтому создание новых агентов, нацеленных на ингибирование активности RdRp коронавируса, представляется крайне важным и требующим незамедлительного решения. В нашей работе описан синтез и определение противовирусной активности шести 5-замещенных производных уридина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 5-бромуридин (“Sigma”, США), бороновые кислоты и растворители высокой степени чистоты (“Acros”, Бельгия). Колонную хроматографию проводили на обращенно-фазовом носителе LiChroPrep RP-18, элюировали водой. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре AMX III-400 (“Bruker”, США) с рабочей частотой 400 МГц для ¹H (Me₄Si в качестве внутреннего стандарта для органических растворителей и 3-(триметилсилил)-1-пропансульфонат натрия ((DSS) для D₂O) и 100.6 МГц для ¹³C-ЯМР (с подавлением углерод-протонного взаимодействия). Контроль за ходом реакций осуществляли методом ТСХ на пластинах Кизельгель 60 F254 (“Merck”, Германия), элюировали системой диоксан-25% водный NH₃ (4 : 1).

Общая методика получения соединений 1a–g. К 5-бромуридину, растворенному в смеси воды (4 мл) и метанола (2 мл), приливали раствор бороната (1 экв) в тетрагидрофуране (ТГФ) (4 мл), продували аргоном. Добавляли катализатор тетраци(трифенилфосфин)палладий (0.1 экв) и гидроксид натрия (10 экв). Реакционную массу кипятили в течение 7 ч, затем упаривали, растворяли в хлороформе (15 мл) и экстрагировали водой (15 мл). Водную фракцию промывали хлороформом (2 × 5 мл), концентрировали и выделяли целевое вещество колоночной хроматографией на RP-18, элюировали водой. Выход продуктов **1a–g** составил 37–59%.

1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидрокси-метил)тетрагидрофуран-2-ил)-5-(пиридин-2-ил)пиримидин-2,4(1H,3H)-дион (1a) светло-желтые кристаллы, 41% ^1H ЯМР (CD_3OD): 3.76–3.95 (2H, м, H1), 4.08–4.06 (5'H, м, H4'), 4.25–4.28 (2H, м, H3', H2'), 5.98–5.99 (1H, д, H1'), 7.43–7.47 (1H, м, H5 Py), 8.06–8.10 (1H, м, H4 Py), 8.44–8.46 (1H, д, H6 Py), 8.49 (1H, с, H6), 8.77–8.78 (1H, д, H2 Py). ^{13}C ЯМР (D_2O): 60.13, 68.90, 74.08, 83.73, 90.03, 112.46, 123.94, 130.12, 137.44, 139.19, 147.62, 147.98, 155.05, 169.10.

5-(3-аминофенил)-1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидрокси-метил)тетрагидрофуран-2-ил)пиримидин-2,4(1H,3H)-дион (1b) серые кристаллы, 37% ^1H NMR (CD_3OD): 3.77–3.87 (2H, м, H5'), 4.02–4.04 (1H, м, H4'), 4.19–4.27 (2H, м, H3', H2'), 5.96–5.98 (1H, д, H1'), 6.63–6.67 (1H, м, Ph), 6.89–6.96 (2H, м, Ph), 7.06–7.11 (1H, д, Ph), 7.92 (1H, с, H6). ^{13}C ЯМР (D_2O): 60.52, 69.24, 73.91, 83.65, 89.93, 115.55, 116.35, 116.54, 129.41, 135.44, 138.07, 146.09, 157.63, 172.64.

5-(4-аминофенил)-1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидрокси-метил)тетрагидрофуран-2-ил)пиримидин-2,4(1H,3H)-дион (1c) бежевые кристаллы, 39% ^1H ЯМР (CD_3OD): 3.71–3.90 (2H, м, H5'), 4.00–4.02 (1H, м, H4'), 4.18–4.27 (2H, м, H3', H2'), 5.95–5.97 (1H, д, H1'), 6.72–6.75 (2H, м, Ph), 7.28–7.33 (2H, м, Ph), 7.82 (1H, с, H6). ^{13}C ЯМР (CD_3OD): 60.38, 69.26, 74.00, 83.81, 90.15, 114.39 \times 2, 122.53, 128.55 \times 2, 130.78, 135.88, 148.32, 150.88, 165.91.

4-(1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидрокси-метил)тетрагидрофуран-2-ил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)бензамид (1d) желтые кристаллы, 53% ^1H ЯМР (D_2O): 3.72–3.91 (2H, м, H5'), 4.06–4.10 (1H, м, H4'), 4.20–4.24 (1H, т, H3'), 4.30–4.33 (1H, т, H2'), 5.93–5.94 (1H, д, H1'), 7.52–7.56 (2H, м, Ph), 7.77–7.80 (2H, м, Ph), 7.92 (1H, с, H6). ^{13}C ЯМР (D_2O): 56.95, 59.84, 66.08, 73.54, 83.07, 89.60, 114.88, 127.01, 128.33, 130.84 \times 2, 138.32, 138.45, 157.62, 163.24, 172.51.

N-(4-(1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидрокси-метил)тетрагидрофуран-2-ил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)фенил)ацетамид (1e) белые кристаллы, 57% ^1H ЯМР (D_2O): 2.13 (3H, с, CH_3), 3.71–3.88 (2H, м, H5'), 4.04–4.08 (1H, м, H4'), 4.18–4.22 (1H, т, H3'), 4.29–4.32 (1H, т, H2'), 5.92–5.94 (1H, д, H1'), 7.39 (4H, с, Ph), 7.78 (1H, с, H6). ^{13}C ЯМР (D_2O): 22.34, 56.93, 60.00, 68.70, 73.40, 83.08, 89.46, 115.41, 121.28, 128.25, 128.87, 129.25, 135.52, 137.57, 158.13, 165.77, 172.49.

4-(1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-дигидрокси-5-(гидрокси-метил)тетрагидрофуран-2-ил)-2,4-диоксо-1,2,3,4-тетрагидропиримидин-5-ил)-N-метилбензамид (1g) белые кристаллы, 54% ^1H ЯМР (D_2O): 2.91 (3H, с, CH_3), 3.73–3.92 (2H, м, H5'), 4.06–4.11

(1H, м, H4'), 4.21–4.25 (1H, т, H3'), 4.31–4.34 (1H, т, H2'), 5.94–5.95 (1H, д, H1'), 7.51–7.55 (2H, м, Ph), 7.71–7.73 (2H, м, Ph), 7.91 (1H, с, H6). ^{13}C ЯМР (D_2O): 26.39, 48.90, 60.31, 69.05, 74.05, 83.57, 90.08, 115.38, 127.01, 127.52, 128.84, 138.25, 138.79, 157.81, 163.24, 171.13, 172.67.

Исследование противовирусной активности. Стоковые растворы тестируемых соединений в концентрации 5 мкМ готовили в 100% ДМСО.

Противовирусную активность оценивали на штамме ПИК35 вируса SARS-CoV-2 (GISAID ID EPI_ISL_428851). Линия клеток почки зеленой марьшши Vero получена из “Biologicals”, ВОЗ, Швейцария (RCB 10-87). Клетки культивировали в среде ДМЕМ (ФГБНУ “ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН”, Россия) с фетальной сывороткой крупного рогатого скота (“Gibco”, США, 5%), стрептомицином (0.1 мг/мл) и пенициллином (100 ед./мл) (“ПанЭко”, Россия).

Методика оценки противовирусной активности описана ранее [10]. Готовили восемь двукратных разведений стоковых растворов соединений в среде ДМЕМ (“ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН”), которые смешивали с равными объемами вирусной суспензии, содержащей 50–200 ТЦД₅₀ на лунку, инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Далее смеси вирус–соединение добавляли к монослоям клеток Vero в двух повторностях. Цитопатический эффект (ЦПЭ) оценивали микроскопически после 5-дневной инкубации при 37°C. Значения ЕС₅₀ рассчитывали по методу Кербера. Эксперимент повторяли не менее 2 раз с каждым соединением. В качестве положительного контроля использовали N⁴-гидроскицитидин, в качестве отрицательного – ДМСО, дозу вируса контролировали титрованием.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее группой ученых под руководством K. Seley-Radtke был разработан новый тип модифицированных нуклеозидов, несущих гибкие или “расщепленные” аналоги пуриновых оснований, названные флексимерами [10]. Гетероциклические основания флексимеров состоят из имидазольного и пиримидинового колец, связанных одной углерод-углеродной связью, а не сконденсированных, как в обычных пуринах (рис. 1). В результате азотистое основание сохраняет необходимые водородные связи и ароматические свойства, которые требуются для распознавания, получая при этом гибкость для адаптации к сайту связывания фермента и потенциальным мутациям. Показано, что такие соединения способны ингибировать репликацию коронавируса HCoV-NL63 и MERS-CoV в культуре клеток [11, 12]. Идея флексимерных соединений получила развитие в виде синтеза “обратных” флексимеров (рис. 1), в которых каркас

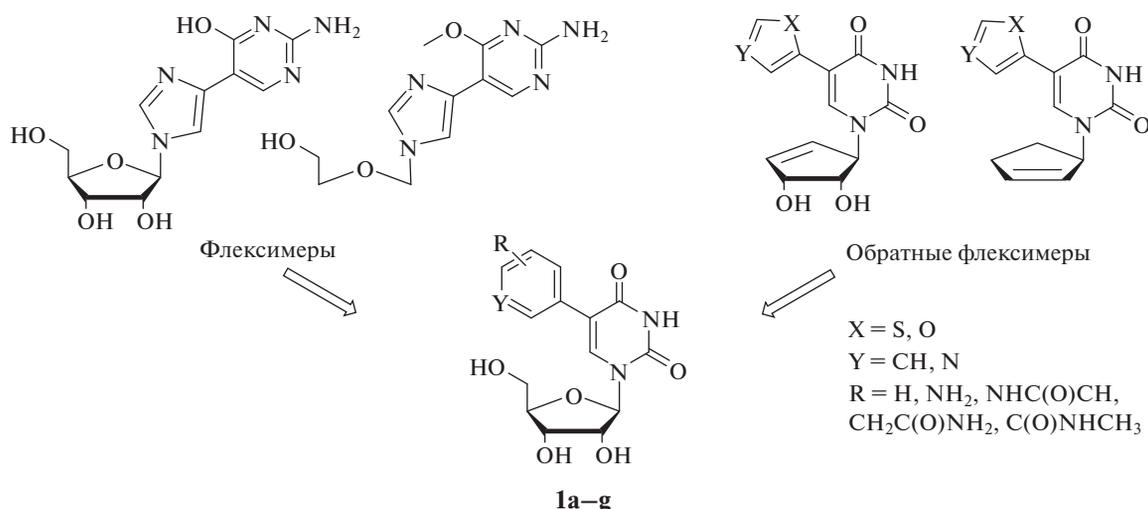


Рис. 1. Примеры структур флексимеров, обратных флексимеров и целевых соединений.

пуринового основания соединен с сахарным фрагментом по N-3 пиримидинового кольца, а не N-9 имидазольного кольца. Это меняет конформацию флексимерного основания, которое также можно рассматривать как C5-замещенный пиримидин [13]. В продолжение этих работ мы решили синтезировать серию 5-замещенных производных уридина (**1a–g**), которые можно рассматривать как обратные флексимеры, в надежде получить вещества, обладающие противовирусной активностью в отношении SARS-CoV-2. Для получения целевых соединений мы рассмотрели различные современные методы создания C–C-связи.

Ключевое место в синтезе сложных органических молекул с помощью реакций кросс-сочетания занимает палладиевый катализ. Многолетний интерес к этой области объясняется двумя основными причинами. Во-первых, такие каталитические системы позволяют легко создавать углерод–углеродные и углерод–азотные связи в устойчивых условиях с отличным выходом. Во-вторых, мягкие условия реакции позволяют осуществить синтез, требующий селективного связывания молекул в определенных положениях без воздействия на другие функциональные группы [14].

Хотя катализируемые палладием реакции кросс-сочетания хорошо известны для широкого диапазона соединений, в случае нуклеозидов возникает ряд трудностей. Помимо проблем, обусловленных перекрестным связыванием многофункциональных гетероциклических субстратов, полярная природа производных нуклеозидов часто приводит к тому, что они плохо растворяются в типичных органических растворителях [15]. Один из распространенных подходов к устранению этого недостатка — защита гидроксильных групп угле-

водного фрагмента с целью получения более гидрофобного субстрата. Этот метод включает две дополнительные стадии синтеза, что приводит к снижению выхода. Более привлекательным представляется использование незащищенных нуклеозидных, нуклеотидных или олигонуклеотидных производных в реакциях кросс-сочетания. Это может быть достигнуто с помощью полярных органических растворителей. Нуклеозиды и производные нуклеотидов эффективно растворяются в воде или в ее сочетании с органическими растворителями, что позволяет проводить реакции в гомогенных условиях без необходимости применения защитных групп [15].

Описаны варианты постановки реакции Сузуки–Мияуры с незащищенными нуклеозидгалогенидами в различных системах из воды и соразтворителей. Так Western E.C. и соавт. [16] арилировали 5-йод-2-деоксиуридин в присутствии катализаторов (три-(4,6-диметил-3-сульфонато-фенил)фосфина и ацетата палладия) в системе растворителей вода–ацетонитрил 2 : 1. Описано также проведение первой стадии синтеза производного уридина с помощью реакции кросс-сочетания Сузуки между 5-йод-2-деоксиуридином и 4-формилфенилбороновой кислотой в смеси метанол–вода 5 : 1 в присутствии катализатора тетраakis(трифенилфосфин)палладия [17]. Несмотря на нерастворимость трифенилфосфина в воде, показано [18], что реакция между арилбороновыми кислотами и 5-йод-2-деоксиуридином в воде в качестве единственного растворителя успешно катализируется Pd(OAc)₂/PPh₃ при 120°C с использованием микроволнового излучения.

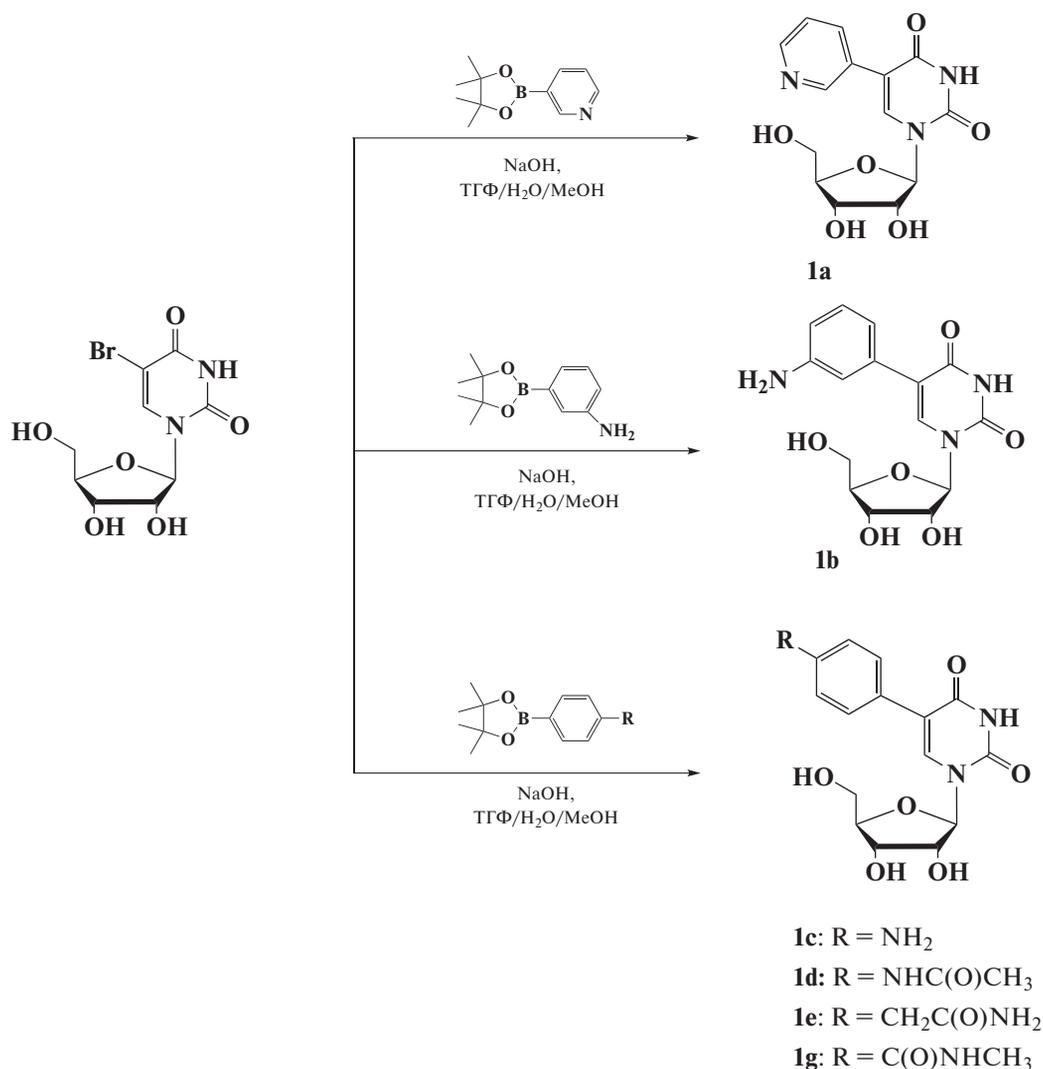


Схема 1. Синтез 5-замещенных производных уридина **1a–g**.

На основании анализа опубликованных данных для проведения реакции Сузуки–Мияуры между 5-бромуридином и различными боронатами (схема 1) была подобрана система растворителей $H_2O/MeOH/THF = 2 : 1 : 2$. После выделения и очистки с помощью ионообменной хроматографии оценена биологическая активность и цитотоксичность синтезированных веществ. Противовирусную активность определяли по способности исследуемых соединений ингибировать гибель клеток Vero, зараженных штаммом ПИК35 SARS-CoV-2. В качестве положительного контроля использовали N⁴-гидроксцитидин ($EC_{50} > 5$ мкМ). Однако соединения **1a–g** не проявили ожидаемого ингибирующего эффекта ($EC_{50} > 100$ мкМ). Очевидно, что для эффективного подавления SARS-CoV-2 требуется модификация структуры соединений. В данный момент изучается активность соединений **1a–g** в отношении других вирусных патогенов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта № 20-04-60414 и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственное задание по теме “Аналоги компонентов нуклеиновых кислот как потенциальные ингибиторы коронавирусов”). Исследование физико-химических свойств продуктов проведено при поддержке РНФ № 19-74-10048.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cascella M., Rajnik M., Aleem A., Dulebohn S., Di Napoli R. (2021). Features, evaluation, and treatment of coronavirus (COVID-19). *StatPearls*.

- Santos I.A., Grosche V.R., Bergamini F.R.G., Sabino-Silva R., Jardim A.C.G. (2020) Antivirals against coronaviruses: candidate drugs for SARS-CoV-2 treatment? *Front. Microbiol.* **11**, 1818.
- Lei T., Qiang T., Liang C., Ren X., Jia M., Zhang J., Li J., Wan M., YuWen X., Li H., Cao W., Liu H. (2021) RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitors: The current landscape and repurposing for the COVID-19 pandemic. *Eur. J. Med. Chem.* **213**, 113201.
- Cannalire R., Cerchia C., Beccari A.R., Di Leva F.S., Summa V. (2020) Targeting SARS-CoV-2 proteases and polymerase for COVID-19 treatment: state of the art and future opportunities. *J. Med. Chem.* acs.jmedchem.0c01140. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01140>
- De Clercq E., Neyts J. (2009) Antiviral agents acting as DNA or RNA chain terminators. *Antiviral Strategies.* **189**, 53–84.
- Buonaguro L., Tagliamonte M., Tornesello M.L., Buonaguro F.M. (2020) SARS-CoV-2 RNA polymerase as target for antiviral therapy. *J. Transl. Med.* **18**(1), 185. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02355-3>
- Ju J., Li X., Kumar S., Jockusch S., Chien M., Tao C., Morozova I., Kalachikov S., Kirchdoerfer R.N., Russo J.J. (2020) Nucleotide analogues as inhibitors of SARS-CoV polymerase. *Pharmacol. Res. Perspect.* **8**(6), e00674.
- Al-Horani R.A., Kar S. (2020) Potential anti-SARS-CoV-2 therapeutics that target the post-entry stages of the viral life cycle: a comprehensive review. *Viruses.* **12**(10), 1092–1134.
- Zhou S., Hill C.S., Sarkar S., Tse L.V., Woodburn B.M.D., Schinazi R.F., Sheahan T.P., Baric R.S., Heise M.T., Swanstrom R. (2021). β -DN 4-hydroxycytidine (NHC) inhibits SARS-CoV-2 through lethal mutagenesis but is also mutagenic to mammalian cells. *J. Infect. Dis.* **224**(3), 415–419.
- Seley-Radtke K. (2018) Flexibility – not just for yoga anymore! *Antivir. Chem. Chemother.* **26**, 2040206618756788.
- Матюгина Е.С., Новиков М.С., Козловская Л.И., Волок В.П., Шустова Е.Ю., Ишмухаметов А.А., Кочетков С.Н., Хандажинская А.Л. (2021). Оценка противовирусного потенциала модифицированных гетероциклических оснований и 5'-норкарбонциклических аналогов нуклеозидов в отношении SARS-CoV-2. *Acta Naturae*, **13**(4), 51–54.
- Peters H.L., Jochmans D., de Wilde A.H., Posthuma C.C., Snijder E.J., Neyts J., Seley-Radtke K.L. (2015). Design, synthesis and evaluation of a series of acyclic fleximer nucleoside analogues with anti-coronavirus activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**(15), 2923–2926.
- Zimmermann S.C., Sadler J.M., O'Daniel P.I., Kim N.T., Seley-Radtke K.L. (2013) “Reverse” carbocyclic fleximers: synthesis of a new class of adenosine deaminase inhibitors. *Nucleosides, Nucleotides Nucl. Acids.* **32**(3), 137–154.
- Polshettiwar V., Decottignies A., Len C., Fihri A. (2010) Suzuki–Miyaura cross-coupling reactions in aqueous media: green and sustainable syntheses of biaryls. *ChemSusChem: Chemistry & Sustainability Energy & Materials.* **3**(5), 502–522.
- Shaughnessy K.H. (2015). Palladium-catalyzed modification of unprotected nucleosides, nucleotides, and oligonucleotides. *Molecules.* **20**(5), 9419–9454.
- Western E.C., Daft J.R., Johnson E.M. 2nd, Ganett P.M., Shaughnessy K.H. (2003) Efficient one-step Suzuki arylation of unprotected halonucleosides, using water-soluble palladium catalysts. *J. Org. Chem.* **68**(17), 6767–6774.
- Okamoto A., Inasaki T., Saito I. (2005) Synthesis and ESR studies of nitronyl nitroxide-tethered oligodeoxynucleotides. *Tetrahedron Lett.* **46**(5), 791–795.
- Fresneau N., Hiebel M.A., Agrofoglio L.A., Berteina-Raboin S. (2012). Efficient synthesis of unprotected C-5-aryl/heteroaryl-2'-deoxyuridine via a Suzuki–Miyaura reaction in aqueous media. *Molecules.* **17**(12), 14409–14417.

NEW ANALOGUES OF URIDINE AS POSSIBLE ANTI-VIRAL AGENTS SPECIFIC TO SARS-CoV-2

A. A. Maslova^{1, *}, E. S. Matyugina¹, E. Yu. Shustova², V. P. Volok²,
L. I. Kozlovskaya^{2, 3}, S. N. Kochetkov¹, and A. L. Khandzhinskaya¹

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

²Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819 Russia

³Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119435 Russia

*e-mail: maslova_anna94@mail.ru

The development of specific drugs against SARS-CoV-2 infection is a major challenge facing global science and healthcare. Despite numerous attempts to create such remedy, still there are no truly effective drugs. Currently, the main approach to the creation of drugs against COVID-19 is repurposing, i.e. re-profiling of existing drugs approved for medical use, for example, the use of the drug for the treatment of Ebola – Remdesivir, the use of the drug for the treatment of influenza – Favipiravir and others. However, it is already obvious that these drugs are not specific enough and effective enough. Another promising approach is the creation of new molecules, but it should be noted immediately that its implementation requires much more time and costs. However, the search for new SARS-CoV-2 specific antiviral agents continues. The aim of our work was a creation of new 5-substituted uridine derivatives as potential inhibitors of RNA-dependent RNA polymerase of coronavirus. The substances were obtained with high yields by the Suzuki–Miyaura reaction and characterized using modern physicochemical methods. However, testing of the antiviral activity against SARS-CoV-2 did not reveal a significant inhibitory effect.

Keywords: coronavirus, SARS-CoV-2, nucleoside analogs, fleximers, synthesis, Suzuki–Miyaura reaction

УДК 577.2:616_-006

MiR-485-3p И miR-4728-5p КАК СУПРЕССОРЫ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА В ПАТОГЕНЕЗЕ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА^{1, 2}

© 2022 г. Т. Gurer^{a, *}, А. Aytakin^{b, **}, Е. Caki^a, S. Gezici^c^aDepartment of Biology, Faculty of Science and Literature, Gaziantep University, Gaziantep, 27310 Turkey^bDepartment of General Surgery, Faculty of Medicine, Gaziantep University, Gaziantep, 27310 Turkey^cDepartment of Medical Biology and Genetics, Faculty Medicine, Gaziantep University, Gaziantep, 27310 Turkey

*e-mail: turkanayte@hotmail.com

**e-mail: taytekin@gantep.edu.tr

Поступила в редакцию 05.09.2021 г.

После доработки 22.09.2021 г.

Принята к публикации 24.09.2021 г.

МикроРНК – класс малых некодирующих РНК, главные функции которых связаны с развитием и прогрессией колоректального рака (CRC), где они действуют как супрессоры опухолевого роста или онкогены. Изучена роль микроРНК miR-485-3p и miR-4728-5p в патогенезе CRC. Образцы опухолей и прилегающих морфологически нормальных тканей получены от 59 больных CRC (37 образцов рака толстой кишки и 22 образца рака прямой кишки). Профили экспрессии miR-485-3p и miR-4728-5p определяли, используя количественную обратную транскрипцию с последующей полимеразной цепной реакцией. Регуляторные сети факторов транскрипции (TF), связанных с микроРНК, конструировали с использованием TransmiR v2.0. Регулируемые TF гены-мишени определяли, используя Human.mirFFL.DB и TRRUST v2.0, функциональную аннотацию и анализ обогащения с помощью DIANA-mirPath v3.0 и -Tarbase v7.0. Показано значительное снижение уровней экспрессии miR-485-3p, и miR-4728-5p в тканях CRC (кратность изменений составила 0.42 ± 0.70 и 0.59 ± 1.06 соответственно; $p = 0.000$). С другой стороны, более низкие уровни экспрессии miR-485-3p выявлены и в прямой, и в толстой кишке. Более того, снижение уровней экспрессии miR-4728-5p коррелировало с увеличением возраста. Эти различия были статистически незначимыми (FDR-значения p составили 0.126 и 0.168 соответственно). С помощью биоинформатического анализа идентифицированы TF, связанные с miR-485-3p и miR-4728-5p. Некоторые из этих TF, а именно, AR, CREB1, SEBPB, FOXA1, GTF2I, MAZ, NCOR2, NFIC, NRF1, SIN3A, SREBF1, SREBF2, TP53 и YY1, по-видимому, ассоциированные с CRC, выбраны для конструирования потенциальных мишеней сетей микроРНК-TF-ген для ранней диагностики и терапии CRC. Анализ обогащения путей показывает, что сигнальный путь Hippo строго регулируется miR-485-3p. Предполагается, что снижение экспрессии miR-485-3p и miR-4728-5p может быть ассоциировано с развитием CRC.

Ключевые слова: колоректальный рак, микроРНК ОТ-ПЦР, опухолевые супрессоры, факторы транскрипции, биоинформатика

DOI: 10.31857/S0026898422030077

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global Cancer Observatory (Globocan), International Agency for Research on Cancer. (2020) <https://gco.iarc.fr>
2. Rabeneck L., Chiu H.M., Senore C. (2020) International perspective on the burden of colorectal cancer and public health effects. *Gastroenterology*. **158**(2), 447–452.
3. Siegel R.L., Miller K.D., Goding Sauer A., Fedewa S.A., Butterly L.F., Anderson J.C., Cercek A., Smith R.A., Jemal A. (2020) Colorectal cancer statistics, (2020). *CA Cancer J. Clin.* **70**, 145–164. <https://doi.org/10.3322/caac.21601>
4. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021) Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **71**(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
5. Li J., Guo C., Lu X., Tan W. (2019) Anti-colorectal cancer biotargets and biological mechanisms of puer-

¹ Статья представлена авторами на английском языке

² Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898422030077 для авторизованных пользователей.

- arin: Study of molecular networks. *Eur. J. Pharmacol.* **858**, 172483.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172483>
6. Lv Y., Duanmu J., Fu X., Li T., Jiang Q. (2020) Identifying a new microRNA signature as a prognostic biomarker in colon cancer. *PLoS One.* **15**(2), e0228575.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228575>
 7. Yang J., Ma D., Fesler A., Zhai H., Leamnirarnit A., Li W., Wu S., Ju J. (2017) Expression analysis of microRNA as prognostic biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget.* **8**(32), 52403.
 8. Balacescu O., Sur D., Cainap C., Visan S., Cruceriu D., Manzat-Saplacan R., Muresan I.S., Balacescu L., Lisencu C., Irimie A. (2018) The impact of miRNA in colorectal cancer progression and its liver metastases. *Int. J. Mol. Sci.* **19**(12), 3711.
 9. Tang X.J., Wang W., Hann S. (2019) Interactions among lncRNAs, miRNAs and mRNA in colorectal cancer. *Biochimie.* **163**, 58–72.
 10. Wu F., Xing T., Gao X., Liu F. (2019) miR-501-3p promotes colorectal cancer progression via activation of Wnt/ β -catenin signaling. *Int. J. Oncol.* **55**(3), 671–683.
 11. Motoyama K., Inoue H., Takatsuno Y., Tanaka F., Mimori K., Uetake H., Sugihara K., Mori, M. (2009) Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* **34**(4), 1069–1075.
 12. Feng B., Dong T.T., Wang L.L., Zhou H.M., Zhao H.C., Dong F., Zheng M.H. (2012) Colorectal cancer migration and invasion initiated by microRNA-106a. *PLoS One.* **7**(8), e43452.
 13. Nishida N., Yamashita S., Mimori K., Sudo T., Tanaka F., Shibata K., Yamamoto H., Ishii H., Doki Y., Mori M. (2012) MicroRNA-10b is a prognostic indicator in colorectal cancer and confers resistance to the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil in colorectal cancer cells. *Annals Surgical Oncol.* **19**(9), 3065–3071.
 14. Yu Y., Kanwar S.S., Patel B.B., Oh P.S., Nautiyal J., Sarkar F.H., Majumdar A.P. (2012) MicroRNA-21 induces stemness by downregulating transforming growth factor beta receptor 2 (TGF β R2) in colon cancer cells. *Carcinogenesis.* **33**(1), 68–76.
 15. Weissmann-Brenner A., Kushnir M., Lithwick Yanai G., Aharonov R., Gibori H., Purim O., Kundel Y., Morgenstern S., Halperin M., Niv Y., Brenner B. (2012) Tumor microRNA-29a expression and the risk of recurrence in stage II colon cancer. *Int. J. Oncol.* **40**(6), 2097–2103.
 16. Hwang W.L., Jiang J.K., Yang S.H., Huang T.S., Lan H.Y., Teng H.W., Yang C.Y., Tsai Y.P., Lin C.H., Wang H.W., Yang M.H. (2014) MicroRNA-146a directs the symmetric division of Snail-dominant colorectal cancer stem cells. *Nat. Cell Biol.* **16**(3), 268–280.
 17. Zhang W., Zhang T., Jin R., Zhao H., Hu J., Feng, B., Zang L., Zheng M., Wang M. (2014) MicroRNA-301a promotes migration and invasion by targeting TGFBR2 in human colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **33**(1), 113.
 18. Xiao G., Tang H., Wei W., Li J., Ji L., Ge J. (2014) Aberrant expression of microRNA-15a and microRNA-16 synergistically associates with tumor progression and prognosis in patients with colorectal cancer. *Gastroenterol. Res. Prac.* 2014, **364549**.
<https://doi.org/10.1155/2014/364549>
 19. Li T., Lai Q., Wang S., Cai J., Xiao Z., Deng D., He L., Jiao H., Ye Y., Liang L., Ding Y., Liao W. (2016) MicroRNA-224 sustains Wnt/ β -catenin signaling and promotes aggressive phenotype of colorectal cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **35**, 21.
<https://doi.org/10.1186/s13046-016-0287-1>
 20. Zekri A.R.N., Youssef A.S.E.D., Lotfy M.M., Gabr R., Ahmed O.S., Nassar A., Hussein N., Omran D., Medhat E., Eid S., Hussein, M.M., Ismail M.Y., Alenzi F.Q., Bahnassy A.A. (2016) Circulating serum miRNAs as diagnostic markers for colorectal cancer. *PLoS One.* **11**(5), e0154130.
 21. Baltruskeviciene E., Schweigert D., Stankevicius V., Mickys U., Zvirblis T., Bublevic J., Suziedelis K., Aleknavicius E. (2017) Down-regulation of miRNA-148a and miRNA-625-3p in colorectal cancer is associated with tumor budding. *BMC Cancer.* **17**(1), 607.
 22. Danese E., Minicozzi A.M., Benati M., Paviati E., Lima-Oliveira G., Gusella M., Pasini F., Salvagno G.L., Montagnana M., Lippi G. (2017) Reference miRNAs for colorectal cancer: analysis and verification of current data. *Sci. Rep.* **7**(1), 8413.
 23. Yamazaki N., Koga Y., Taniguchi H., Kojima M., Kanemitsu Y., Saito N., Matsumura Y. (2017) High expression of miR-181c as a predictive marker of recurrence in stage II colorectal cancer. *Oncotarget.* **8**(4), 6970.
 24. Zhang Y., Guo L., Li Y., Feng G. H., Teng F., Li W., Zhou Q. (2018) MicroRNA-494 promotes cancer progression and targets adenomatous polyposis coli in colorectal cancer. *Mol. Cancer.* **17**(1), 1–11.
 25. Ashizawa M., Okayama H., Ishigame T., Min A.K.T., Saito K., Ujiiie D., Murakami Y., Kikuchi T., Nakayama Y., Noda M., Tada T., Endo H., Fujita S., Sakamoto W., Saito M., Saze Z., Momma T., Ohki S., Mimura K., Kono K. (2019) miRNA-148a-3p Regulates immunosuppression in DNA mismatch repair-deficient colorectal cancer by targeting PD-L1. *Mol. Cancer Res.* **17**(6), 1403–1413.
 26. Du K., Zhang X., Lou Z., Guo P., Zhang F., Wang B., Chen L., Zhang C. (2018) MicroRNA485-3p negatively regulates the transcriptional co-repressor *CtBP1* to control the oncogenic process in osteosarcoma cells. *Int. J. Biol. Sci.* **14**(11), 1445–1456.
 27. Yang H, Cho M.E., Li T.W., Peng H., Ko K.S., Mato J.M., Lu S.C. (2013) MicroRNAs regulate the expression of methionine adenosyltransferase 1A in hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Res.* **123**(1), 285–298.
 28. Wang Z.Q., Zhang M.Y., Deng M.L., Weng N.Q., Wang H.Y., Wu S.X. (2017) Low serum level of miR-485-3p predicts poor survival in patients with glioblastoma. *PLoS One.* **12**(9), e0184969.
 29. Formosa A., Markert E.K., Lena A.M., Italiano D., Finazzi-Agro E., Levine A.J., Bernardini S., Garabadiu A.V., Melino G., Candi E. (2014) MicroRNAs, miR-154, miR-299-5p, miR-376a, miR-376c, miR-377, miR-381, miR-487b, miR-485-3p, miR-495 and miR-654-3p, mapped to the 14q32. 31 locus, regulate proliferation, apoptosis, migration and invasion in metastatic prostate cancer cells. *Oncogene.* **33**(44), 5173–5182.

30. Wang J., Zhang H., Zhou X., Wang T., Zhang J.Y., Zhu W., Zhu H., Cheng W. (2018) Five serum-based miRNAs were identified as potential diagnostic biomarkers in gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Biomark.* **23**(2), 193–203.
31. Lou C., Xiao M., Cheng S., Lu X., Jia S., Ren Y., Li Z. (2016) MiR-485-3p and miR-485-5p suppress breast cancer cell metastasis by inhibiting PGC-1 α expression. *Cell Death Dis.* **7**(3), e2159.
32. Mizuno K., Mataka H., Arai T., Okato A., Kamikawaji K., Kumamoto T., Hiraki T., Hatanaka K., Inoue H., Seki N. (2017) The microRNA expression signature of small cell lung cancer: tumor suppressors of miR-27a-5p and miR-34b-3p and their targeted oncogenes. *J. Hum. Genet.* **62**(7), 671–678.
33. Zhao Z., Gao D., Ma T., Zhang L. (2019) MicroRNA-141 suppresses growth and metastatic potential of head and neck squamous cell carcinoma. *Aging.* **11**(3), 921–932.
34. Li H., Zhou X., Zhu J., Cheng W., Zhu W., Shu Y., Liu P. (2015) MiR-4728-3p could act as a marker of HER2 status. *Cancer Biomarkers.* **15**(6), 807–814.
35. Schmitt D.C., Madeira da Silva L., Zhang W., Liu Z., Arora R., Lim S., Schuler A.M., McClellan S., Andrews J.F., Kahn A.G., Zhou M., Ahn E.Y., Tan M. (2015) ErbB2-intronic microRNA-4728: a novel tumor suppressor and antagonist of oncogenic MAPK signaling. *Cell Death Dis.* **6**(5), e1742.
36. Jiashi W., Chuang Q., Zhenjun Z., Guangbin W., Bin L., Ming H. (2018) MicroRNA-506-3p inhibits osteosarcoma cell proliferation and metastasis by suppressing RAB3D expression. *Aging.* **10**(6), 1924–1305.
37. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods.* **25**(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
38. Benjamini Y., Hochberg Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B. Methodol.* **57**(1), 289–300.
39. TransmiR v2.0 database. <http://www.cuilab.cn/transmir>
40. Tong Z., Cui Q., Wang J., Zhou Y. (2019) TransmiR v2.0: an updated transcription factor-microRNA regulation database. *Nucleic Acids Res.* **8**(47), D253–D258.
41. Human.mirFFLDB. <http://www.mirffldb.in/human/>
42. TRRUST v2.0 (Transcriptional Regulatory Relationships Unraveled by Sentence-based Text-mining). <https://www.grnpedia.org/trrust/>
43. The human protein atlas. <https://www.proteinatlas.org>
44. DIANA-mirPath v3.0. <http://www.microrna.gr/miR-Pathv2>
45. DIANA-TarBase v7.0. <http://www.microrna.gr/tar-base>
46. Vlachos I.S., Zagganas K., Paraskevopoulou M.D., Georgakilas G., Karagkouni D., Vergoulis T., Dalamagas T., Hatzigeorgiou A.G. (2015) DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* **43**(W1), W460–W466.
47. KEGG pathway database. <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>
48. Hao S., Huo S., Du Z., Yang Q., Ren M., Liu S., Liu T., Zhang G. (2019) MicroRNA-related transcription factor regulatory networks in human colorectal cancer. *Medicine.* **98**(15), e15158. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015158>
49. Huang H.Y., Lin Y.C.D., Li J., Huang K.Y., Shrestha S., Hong H.C., Tang Y., Chen Y.G., Jin C.N., Yu Y., Xu J.T., Li Y.M., Cai X.X., Zhou Z.Y., Chen X.H., Pei Y.Y., Hu L., Su J.J., Cui S.D., Wang F., Xie Y.Y., Ding S.Y., Luo M.F., Chou C.H., Chang N.W., Chen K.W., Cheng Y.H., Wan X.H., Hsu W.L., Lee T.Y., Wei F.X., Huang H.D. (2020) miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA–target interaction database. *Nucleic Acids Res.* **48**(D1), D148–D154.
50. Wang H., Wang N., Zheng X., Wu L., Fan C., Li X., Fan C., Li X., Ye K., Han S. (2021) Circular RNA hsa_circ_0009172 suppresses gastric cancer by regulation of microRNA-485-3p-mediated NTRK3. *Cancer Gene Ther.* **28**(12), 1312–1324.
51. Chiang Y., Song Y., Wang Z., Liu Z., Gao P., Liang J., Zhu J., Xing C., Xu H. (2012) microRNA-192-194 and-215 are frequently downregulated in colorectal cancer. *Exp. Ther. Med.* **3**(3), 560–566.
52. Zhang Y., Sui R., Chen Y., Liang H., Shi J., Piao H. (2019) Downregulation of miR-485-3p promotes glioblastoma cell proliferation and migration via targeting RNF135. *Exp. Ther. Med.* **18**(1), 475–482.
53. Han D.L., Wang L.L., Zhang G.F., Yang W.F., Chai J., Lin H.M., Fu Z., Yu J.M. (2019) MiRNA-485-5p, inhibits esophageal cancer cells proliferation and invasion by down-regulating O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23**(7), 2809–2816.
54. Chen Z., Li Q., Wang S., Zhang J. (2015) miR-485-5p inhibits bladder cancer metastasis by targeting HMGGA2. *Int. J. Mol. Med.* **36**(4), 1136–1142.
55. Taherdangkoo K., Nezhad, S.K., Hajjari M.R., Birgani M.T. (2020) MiR-485-3p suppresses colorectal cancer via targeting TPX2. *Bratisl. Lek. Listy.* **121**(4), 302–307.
56. Chen C.F., He X., Arslan A.D., Mo Y.Y., Reinhold W.C., Pommier Y., Beck W.T. (2011) Novel regulation of nuclear factor-YB by miR-485-3p affects the expression of DNA topoisomerase II α and drug responsiveness. *Mol. Pharmacol.* **79**(4), 735–741.
57. Yao X., Cui X., Wu X., Xu P., Zhu W., Chen X., Zhao T. (2018) Tumor suppressive role of miR-1224-5p in keloid proliferation, apoptosis and invasion via the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **495**, 713–720.
58. Zhou Y., Yuan Y., Li L., Wang X., Quan Y., Liu C., Yu M., Hu X., Meng X., Zhou Z., Zhang C.Y., Chen X., Liu M., Wang C. (2021) HER2-intronic miR-4728-5p facilitates HER2 expression and accelerates cell proliferation and migration by targeting EBP1 in breast cancer. *PLoS One.* **16**(2), e0245832.
59. Ghodssi-Ghassemabadi R., Hajizadeh E., Kamian S., Mahmoudi M. (2019) Clinicopathological features and survival of colorectal cancer patients younger than 50 years: a retrospective comparative study. *J. Egypt. Natl. Cancer Inst.* **31**(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s43046-019-0006-z>

60. Sun M., Song H., Wang S., Zhang C., Zheng L., Chen F., Shi D., Chen Y., Yang C., Xiang Z., Liu Q., Wei C., Xiong B. (2017) Integrated analysis identifies microRNA-195 as a suppressor of Hippo-YAP pathway in colorectal cancer. *J. Hematol. Oncol.* **10**(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0445-8>
61. Qu R., Hao S., Jin X., Shi G., Yu Q., Tong X., Guo D. (2018) MicroRNA-374b reduces the proliferation and invasion of colon cancer cells by regulation of LRH-1/Wnt signaling. *Gene.* **642**, 354–361.
62. Zhang J., Zhang K., Bi M., Jiao X., Zhang D., Dong Q. (2014) Circulating microRNA expressions in colorectal cancer as predictors of response to chemotherapy. *Anti-Cancer Drugs.* **25**(3), 346–352.
63. Poel D., Gootjes E.C., Bakkerus L., Trypsteen W., Dekker H., van der Vliet H.J., van Grieken N.C.T., Verhoef C., Buffart T.E., Verheul H.M. (2020) A specific microRNA profile as predictive biomarker for systemic treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Med.* **9**(20), 7558–7571.
64. Wang Y., Xu X., Maglic D., Dill M.T., Mojumdar K., Ng P.K.S., Jeong K.J., Tsang Y.H., Moreno D., Bhavana V.H., Peng X., Ge Z., Chen H., Li J., Chen Z., Zhang H., Han L., Du D., Creighton C.J., Mills G.B., Cancer Genome Atlas Research Network, Camargo F., Liang H. (2018) Comprehensive molecular characterization of the Hippo signaling pathway in cancer. *Cell Rep.* **25**(5), 1304–1317.
65. Triner D., Castillo C., Hakim J.B., Xue X., Greenson J.K., Nuñez G., Chen G.Y., Colacino J.A., Shah Y.M. (2018) Myc-associated zinc finger protein regulates the proinflammatory response in colitis and colon cancer via STAT3 signaling. *Am. Soc. Microbiol. Mol. Cell. Biol.* **38**(22), e00386–18. <https://doi.org/10.1128/MCB.00386-18>
66. Ye Q., Su L., Chen D., Zheng W., Liu Y. (2017) Astragaloside IV induced miR-134 expression reduces EMT and increases chemotherapeutic sensitivity by suppressing CREB1 signaling in colorectal cancer cell line SW-480. *Cell Physiol. Biochem.* **43**, 1617–1626.
67. Ramos A., Camargo F.D. (2012) The Hippo signaling pathway and stem cell biology. *Trends Cell Biol.* **22**(7), 339–346.
68. Zhou G.X., Li X.Y., Zhang Q., Zhao K., Zhang C.P., Xue C.H., Yang K., Tian Z.B. (2013) Effects of the Hippo signaling pathway in human gastric cancer. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **14**(9), 5199–5205.
69. Hong A.W., Meng Z., Guan K.L. (2016) The Hippo pathway in intestinal regeneration and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 324–337.
70. Liu Y., Wang G., Yang Y., Mei Z., Liang Z., Cui A., Wu T., Liu C.Y., Cui L. (2016) Increased TEAD4 expression and nuclear localization in colorectal cancer promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a YAP-independent manner. *Oncogene.* **35**, 2789–2800.
71. Richter J., Ullah K., Xu P., Alscher V., Blatz A., Peifer C., Halekotte J., Leban J., Vitt D., Holzmann K., Bakulev V., Pinna L.A., Henne-Bruns D., Hillenbrand A., Kornmann M., Leithauser F., Bischof J., Knippschild U. (2015) Effects of altered expression and activity levels of CK1d and E on tumor growth and survival of colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer.* **136**, 2799–2810.
72. Hardy K.M., Booth B.W., Hendrix M.J., Salomon D.S., Strizzi L. (2010) ErbB/EGF signaling and EMT in mammary development and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* **15**(2), 191–199.
73. Catto J.W., Alcaraz A., Bjartell A.S., White R.D.V., Evans C.P., Fussell S., Hamdy F.C., Kallioniemi O., Mengual L., Schlomm T., Visakorpi T. (2011) MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. *Eur. Urol.* **59**(5), 671–681.
74. Harb J., Lin P.J., Hao J. (2019) Recent development of Wnt signaling pathway inhibitors for cancer therapeutics. *Curr. Oncol. Rep.* **21**(2), 12.
75. Rahmani F., Ferns G.A., Talebian S., Nourbakhsh M., Avan A., Shahidsales S. (2020) Role of regulatory miRNAs of the PI3K/AKT signaling pathway in the pathogenesis of breast cancer. *Gene.* **737**, 144459.

miR-485-3p AND miR-4728-5p AS TUMOR SUPPRESSORS IN PATHOGENESIS OF COLORECTAL CANCER

T. Gurer¹*, A. Aytakin²*, E. Caki¹, and S. Gezici³

¹ Department of Biology, Faculty of Science and Literature, Gaziantep University, Gaziantep, 27310 Turkey

² Department of General Surgery, Faculty of Medicine, Gaziantep University, Gaziantep, 27310 Turkey

³ Department of Medical Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Gaziantep University, Gaziantep, 27310 Turkey

*e-mail: turkanayte@hotmail.com

**e-mail: taytekin@gantep.edu.tr

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small noncoding RNAs that have major functions in the development and progression of colorectal cancer (CRC) as tumor suppressors or oncogenes. The aim of the current research was to assess the role of miR-485-3p and miR-4728-5p in the pathogenesis of CRC. In this study, fresh tumor and adjacent non-tumor tissue samples were obtained from a total of 59 CRC patients, 37 from colon and 22 from rectum. The expression profiles of miR-485-3p and miR-4728-5p were determined using qRT-PCR. miRNA-related transcription factor (TF) regulatory networks were constructed using the TransmiR v2.0, TF-regulated target genes were determined using the Human.mirFFL.DB and TRRUST v2.0, functional annotation and pathway enrichment analyses were performed using DIANA-mirPath v3.0 and -Tarbase v7.0. The results demonstrated that the expression levels of both miR-485-3p and miR-4728-5p were

very significantly downregulated in CRC tissues (fold changes = 0.42 ± 0.70 and 0.59 ± 1.06 , respectively; both $p = 0.000$). On the other hand, lower expression levels of miR-485-3p were detected in the both rectum and colon. Moreover, the decrease in the expression levels of miR-4728-5p was correlated with increasing age. However, these differences were not statistically significant according to the FDR-related p -values (0.126 and 0.168, respectively). By bioinformatics analyses, miR-485-3p and miR-4728-5p-related TFs were identified. Some of these TFs, namely, AR, CREB1, CEBPB, FOXA1, GTF2I, MAZ, NCOR2, NFIC, NRF1, SIN3A, SREBF1, SREBF2, p53 and YY1, appeared to be associated with CRC and were, therefore, selected to construct miRNA–TF-gene networks of potential targets for the early diagnosis and treatment of CRC. Pathway enrichment analysis indicated Hippo signaling pathway as heavily regulated by miR-485-3p. It seems that the decrease in expression levels of miR-485-3p and miR-4728-5p might be associated with development of colorectal cancer.

Keywords: colorectal cancer, qRT-PCR, microRNA, tumor suppressor, transcription factor, bioinformatics

УДК 577.113.4; 577.15.08

НОВЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ТРИФОСФАТОВ ДЕЗОКСИНУКЛЕОЗИДОВ НА ИЗМЕНЕНИЕ СОСТАВА КОМБИНАТОРНЫХ БИБЛИОТЕК ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ SELEX

© 2022 г. С. А. Лапа^а, *, О. С. Антипова^а, А. В. Чудинов^а^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: lapa@biochip.ru

Поступила в редакцию 21.12.2021 г.

После доработки 13.01.2022 г.

Принята к публикации 13.01.2022 г.

Предложен новый способ оценки субстратной эффективности дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP), содержащих функциональные группы, для селекции модифицированных аптамеров (mod-SELEX). Метод предполагает проведение трех последовательных раундов ПЦР с комбинаторной библиотекой и модифицированным dNTP – кандидатом для проведения mod-SELEX. Вывод о применимости конкретного производного dNTP основан на характере изменения амплификационной кривой в течение трех раундов ПЦР в режиме реального времени и не требует проведения раундов селекции аптамеров. Если в процессе амплификации библиотека вырождается (становится менее представительной), значит, конкретная модификация dNTP не может использоваться с выбранной полимеразой и другими выбранными условиями амплификации библиотеки, поскольку приводит к конкурентной амплификации. В случае, когда характер амплификационной кривой не меняется, делается вывод, что используемый модифицированный трифосфат дезоксинуклеозида не влияет на распределение олигонуклеотидов с различными последовательностями в составе библиотеки, т.е. не приводит к изменению ее состава с точки зрения применяемого метода детекции. Именно такие производные могут использоваться в выбранных условиях проведения селекции аптамеров. Метод применим для быстрой оценки субстратной пригодности модифицированных dNTP для проведения mod-SELEX и будет полезен при отборе аптамеров для клинической диагностики и научных исследований.

Ключевые слова: модифицированные dNTP, субстратная эффективность, ПЦР в режиме реального времени, mod-SELEX, аптамеры

DOI: 10.31857/S0026898422030090

ВВЕДЕНИЕ

Аптамеры – нуклеиновые аналоги моноклональных антител, обладающие рядом важных преимуществ. В настоящий момент аптамеры применяются как самостоятельные диагностические инструменты для выявления заболеваний различной этиологии, так и в качестве средств терапии. В последовательность аптамеров для увеличения их сродства к мишеням вводят модификации. Отбор модифицированных аптамеров к белковым мишеням (mod-SELEX) – сложный и трудоемкий процесс [1, 2]. Из-за низкой совместимости модифицированных dNTP с используемой ДНК-полимеразой ПЦР часто либо ингибируется, либо происходит конкурентная амплификация с обогащением исходной ДНК-библиотеки не аптамерами с высоким сродством к мишени, а легко амплифицируемыми последовательностями (конкурентная амплификация) [3, 4].

В настоящее время для контроля обогащения библиотек применяется ряд методических подходов: секвенирование методом NGS комбинаторных библиотек, начиная с определенного раунда селекции [5, 6], анализ кривых плавления комплексов библиотека–лиганд [7], ЯМР [8, 9], ВЭЖХ [10] и другие [11]. В случае cell-SELEX предложено секвенирование после каждого шага селекции [12], что весьма трудозатратно и дорого.

Все описанные методы основаны на контроле библиотек в процессе проведения SELEX. Однако при применении модификаций более рациональным подходом может стать предварительная проверка совместимости модифицированных субстратов (dNTP) с используемой ДНК-полимеразой и оценка “нецелевого” обогащения модифицированной библиотеки, обусловленного конкурентной амплификацией, до проведения селекции аптамеров. Несмотря на ряд работ по субстратной совместимости модифицированных dNTP с

ДНК-полимеразами [1, 2, 13, 14], до настоящего времени не разработан экспресс-метод оценки применимости различных модифицированных dNTP в селекции аптамеров без проведения раундов SELEX. Субстратная несовместимость в случае комбинаторных библиотек может не детектироваться методом ПЦР в режиме реального времени, поскольку быстрая кинетика накопления сигнала при амплификации может быть обусловлена конкурентной амплификацией “в обход” сложных последовательностей. Так происходит накопление сигнала за счет “нецелевого” обогащения библиотеки (конкурентная амплификация). Это приводит к необходимости использования сложных процедур проверки, осуществляемых не до, а уже в процессе mod-SELEX. Учитывая многостадийность и трудозатратность процедуры селекции с модифицированными dNTP, особенно в случае cell-SELEX [12, 15, 16], где требуется проведение трудоемких дополнительных процедур (наращивание культур чистых клеточных линий, мягкие методы создания комплексов для предотвращения разрушения клеточных стенок, повышенные требования к специфичности амплификации библиотек из-за присутствия нецелевых ДНК и РНК), разработка такого метода весьма актуальна.

Нами представлен новый метод определения субстратной эффективности модифицированных дезоксирибонуклеозидов в применении к селекции аптамеров, осуществляемый до начала процедуры SELEX.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Модифицированные аналоги трифосфатов дезоксирибидина. Все использованные в работе соединения синтезированы в ИМБ РАН. Синтез модифицированных dUTP подробно описан в [17]. Химические структуры соединений приведены в табл. 1.

Комбинаторная ДНК-библиотека и праймеры для ее амплификации. В качестве матрицы использовали комбинаторную библиотеку Matrix_1f 5'-CTGT-CAGCTCCATACTGGTAGCC-(N)₄₀-GCGTTC-GAATCTAGACGGTACGA-3' длиной 86 н. и праймеры для ее амплификации: Forw_A CTGT-CAGCTCCATACTGGTAGCC и Rev_A TCGTACC-GTCTAGATTCCGAACGC, описанные впервые в [18].

ПЦР в режиме реального времени. Реакционная смесь содержала природные dATP, dCTP и dGTP в концентрации 0.2 мМ каждого, а также различные модифицированные dUTP, структуры которых указаны в табл. 1 (при полной замене природного dTTP на один из модифицированных аналогов), также в концентрации 0.2 мМ; 1.5 U Taq- либо 0.5 U Vent (exo-) ДНК-полимеразы (реакционный буфер соответствовал примененной полимеразе); прай-

меры; комбинаторную библиотеку в начальной концентрации 10⁵ копий на реакционный объем (20 мкл). Для мониторинга амплификации в реакционную смесь добавляли краситель EvaGreen (“Biotium”, Россия). Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе IQ5 (“Bio-Rad”, США) по следующей программе: предварительная денатурация при 95°C в течение 3 мин, за которой следовали 50 циклов (95°C, 30 с; 65°C, 30 с; 72°C, 40 с). После 50-го цикла проводили инкубацию при 72°C в течение 5 мин.

После первого раунда амплификации отбирали 1 мкл реакционного объема и использовали его в качестве матрицы для проведения второго раунда ПЦР. После второго раунда также отбирали 1 мкл реакционного объема для проведения третьего раунда амплификации.

Контроль продуктов реакции. Контроль продуктов реакции осуществляли с помощью ПЦР указанного выше состава (проводили отбор из того же мастер-микса) по тому же температурно-временному профилю за исключением того, что число циклов ПЦР сокращали до 32 во избежание появления артефактов и побочных продуктов амплификации ДНК. Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе MiniCycler (“MJ Research”, США).

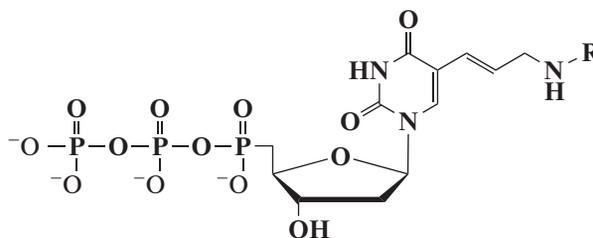
Проводили электрофорез ПЦР-продуктов в денатурирующих условиях. Образцы прогревали в течение 1 мин при 90°C в присутствии 75%-ого формамида и наносили на полиакриламидный гель ($T = 15\%$, $C = 7\%$), содержащий 20 М формамида. Электрофорез проводили в TBE-буфере. Гели окрашивали красителем SYBR Green. Контроль полноразмерных целевых продуктов осуществляли визуально после электрофореза.

Интерпретация результатов ПЦР в режиме реального времени. При анализе процесса амплификации комбинаторных библиотек (рис. 1) визуально разделяли несколько типов характеристических амплификационных кривых: классическую сигмоиду, кривую с одним максимумом, кривую с двумя максимумами, кривую “затухающей” амплификации (характеризуется низким выходом продукта и невыраженной формой, стремящейся к прямой линии с низкими значениями тангенса угла наклона). Характеристические типы кривых схематично представлены в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние субстрата (модифицированного dNTP) на поведение кривой амплификации комбинаторной ДНК-библиотеки оценивали, проводя три последовательных раунда ПЦР в режиме реального времени (без стадий селекции аптамеров). В качестве матрицы для каждого следующего этапа брали 1 мкл реакционной смеси из пробирки предыдущего этапа.

Таблица 1. Эффективность амплификации комбинаторной ДНК-библиотеки, выход целевого продукта и характер изменения амплификационных кривых в течение трех последовательных раундов амплификации для различных mod-dUTP при полном замещении природного dTTP



mod-dUTP [2]	R	Полимераза*				Полимераза**					
		Taq		Vent (exo-)		Taq			Vent (exo-)		
		E	η	E	η	1	2	3	1	2	3
dU2		1.76	0.79	1.94	1.03						
dU8		1.75	0.68	1.91	0.77						
dU9		1.62	0.19	1.79	0.68						
dU10		1.61	0.54	1.82	0.68						
dU13		1.67	0.32	1.62	0.55						
dT (K+)	-H	1.76	1.00	1.85	1.00						

* Эффективность амплификации и выход продукта (по данным [2]). В качестве матрицы использована комбинаторная составная ДНК-библиотека (длина 86 н.). *E* – эффективность амплификации ($E = 10^{\text{tg}\alpha}$, где E – эффективность амплификации, $\text{tg}\alpha$ – тангенс угла наклона прямого участка сигмоидной кривой накопления флуоресцентного сигнала, представленной в логарифмическом масштабе [19]), η – выход продукта, нормированный на выход немодифицированной ДНК (ПЦР с использованием природного dTTP). K+ – положительный контроль (природный dTTP). Нумерация модифицированных dUTP по [2].

** Характер амплификационных кривых (по данным настоящего исследования). 1, 2, 3 – последовательные раунды ПЦР. Приведены схематичные кривые накопления сигнала амплификации для каждого раунда ПЦР.

Наблюдали несколько типов амплификационных кривых, форма которых зависела от степени влияния конкретного модифицированного dNTP на процесс амплификации библиотеки. На рис. 1 приведены результаты проведения трех раундов ПЦР с различными производными дезоксиуридинтрифосфата с полимеразы Taq и Vent (exo-). Из рис. 1 видно, что кривая амплификации может

сохранять свою форму на протяжении всех трех раундов ПЦР, может постепенно приходить к каноническому виду сигмоиды, характерной для фиксированных нуклеотидных последовательностей матрицы либо вырожденных (обогащенных) комбинаторных библиотек, также может наблюдаться ингибирование ПЦР с постепенным затуханием амплификации. В качестве контроля ис-

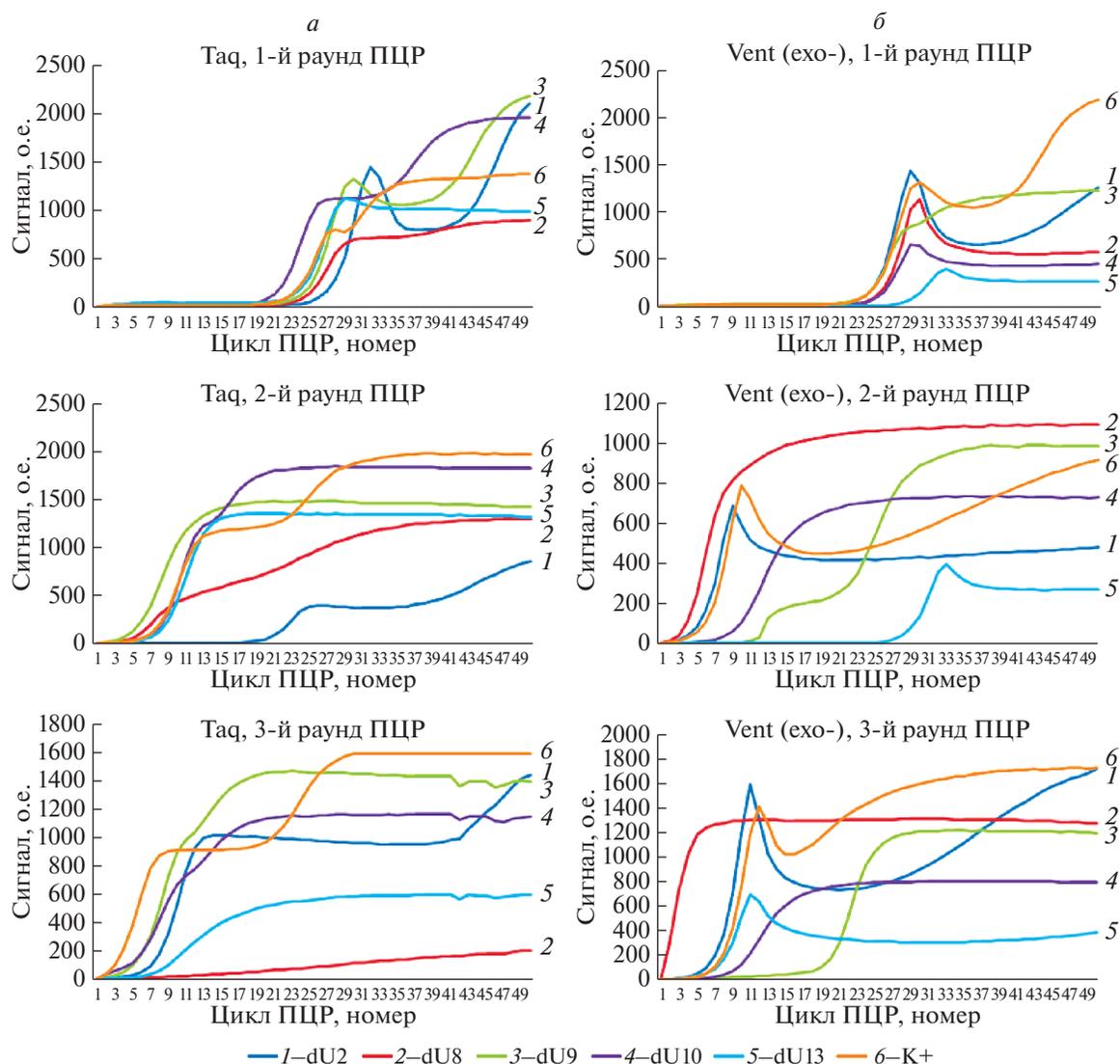


Рис. 1. Кривые амплификации с модифицированными dUTP и ДНК-полимеразы. *a* – Taq; *б* – Vent (exo-). Основные характеристики процесса, а также характеристические типы амплификационных кривых приведены в табл. 1.

пользовали образец, не содержащий модифицированных дезоксирибонуклеозидов.

В табл. 1 приведены структуры использованных в работе дезоксиридинтрифосфатов с различными функциональными группами-заместителями и показатели их субстратной эффективности. В правой части таблицы схематично показаны основные характеристические формы кривых амплификации, наблюдаемые в зависимости от использованного модифицированного дезоксиридинтрифосфата и ДНК-полимеразы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для успешного отбора модифицированных аптамеров (mod-SELEX) требуется субстратная совместимость модифицированных dNTP с выбран-

ной полимеразой. При их недостаточной совместимости возможна конкурентная амплификация последовательностей исходной ДНК-библиотеки, содержащих меньшее количество нуклеотидов или их повторов, комплементарных модифицированному dNTP. Часто низкая эффективность встраивания модификаций остается незамеченной в процессе проведения mod-SELEX. В результате библиотека будет обеднена модифицированными аптамерами.

Кривые амплификации исходных комбинаторных библиотек отличаются от кривых, характерных для амплификации матриц с фиксированными последовательностями. Различие заключается в том, что кривая накопления сигнала при амплификации фиксированной последовательности имеет сигмоидную форму, а в случае ком-

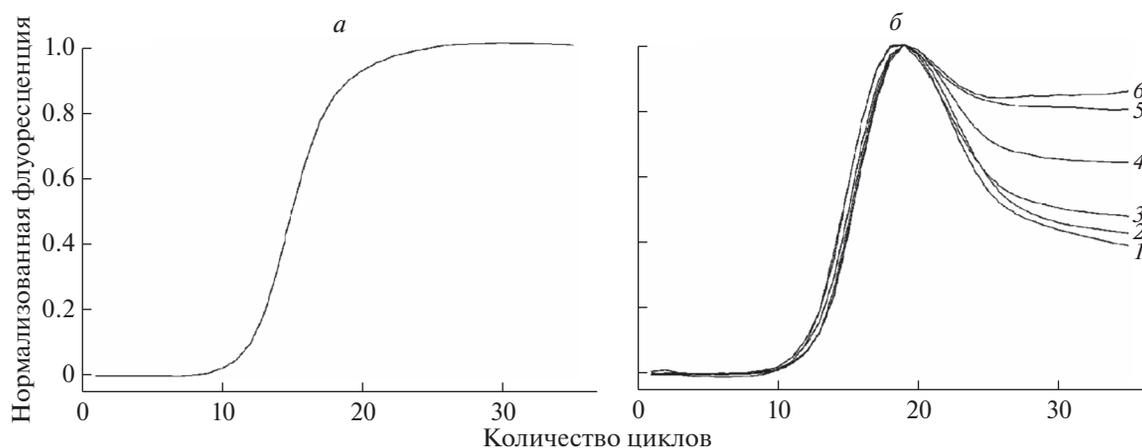


Рис. 2. Амплификационные кривые, получаемые при использовании в ПЦР различных матриц. *а* – Матрица с фиксированной последовательностью; кривая имеет канонический сигмоидный вид. *б* – Вырожденная комбинаторная библиотека (1–6 – стадии обогащения библиотеки, в процессе которых амплификационная кривая постепенно приобретает канонический сигмоидный вид). По данным [20].

бинаторной библиотеки проходит через один или более максимумов. По всей видимости, это связано с тем, что после определенного цикла ПЦР и распределения амплифицированных продуктов по реакционному объему образуются локальные очаги, в которых велика концентрация дуплексов с некомплементарной внутренней частью. Это приводит к временному замедлению амплификации и снижению наблюдаемого накопления сигнала. Однако по мере образования новых комплементарных дуплексов – продуктов амплификации – кривая проходит через максимум. По-видимому, этот процесс может приводить к появлению более чем одного максимума, что и наблюдается при амплификации комбинаторных библиотек (рис. 1).

Ранее было показано, что в процессе обогащения ДНК-библиотеки кривая ее амплификации в режиме реального времени с каждым следующим раундом приближается по форме к канонической сигмоидной кривой, характерной для фиксированной последовательности ДНК [7, 20]. Это служит показателем обогащения библиотеки специфичными к мишени олигонуклеотидами (рис. 2), т.е., в процессе обогащения постепенно ослабевают факторы, указанные выше (образование дуплексов с некомплементарными внутренними частями олигонуклеотидов библиотеки).

Однако библиотека может обогащаться не специфичными, а наиболее легко амплифицируемыми последовательностями [3]. Наиболее актуальной эта проблема становится при использовании модифицированных dNTP, которые служат, как правило, плохими субстратами для полимераз, характеризуются медленной кинетикой встраивания и/или в той или иной степени ингибируют ПЦР.

Из табл. 1 видно, что характер амплификационных кривых зависит как от использованного

модифицированного dNTP, так и от полимеразы. Taq-полимераза оказалась способной амплифицировать библиотеки с применением модифицированного dUTP с линейным алкановым заместителем (dU2). Это подтверждается как показателями эффективности ПЦР “*E*” и значением выхода целевого продукта “ η ”, так и относительно неизменным характером кривой амплификации. При этом гетероциклические производные оказываются для нее сложными субстратами, что приводит к изменению формы кривой амплификации – за три цикла ПЦР она либо становится сигмоидной, либо ингибируется (как в случае dU8). При этом может наблюдаться как быстрая кинетика накопления сигнала, так и высокий выход полноразмерного продукта, т.е. эти показатели не подходят для оценки влияния модифицированных dNTP на поведение комбинаторных библиотек в процессе mod-SELEX.

В случае производных с бензильным заместителем наблюдали независимое от длины используемого линкера вырождение библиотек и сигмоидный характер кривой амплификации после третьего раунда ПЦР. Причем это было характерно и при применении Vent (exo-)-полимеразы. Интересно, но производное dU13 с конденсированным гетероциклом незначительно влияло на характер кривой амплификации при использовании Vent (exo-)-полимеразы, хотя показатели эффективности амплификации и выхода были низкими.

При изменении характера кривой амплификации делали вывод о неприменимости конкретного модифицированного dNTP в выбранных условиях, которые могут содержать несколько значимых факторов (используемая полимеразы, условия ам-

плификации, комбинаторная библиотека и праймеры для ее амплификации и др.).

Из табл. 1 видно, что при использовании “плохих” модифицированных субстратов характер кривой менялся на протяжении трех циклов амплификации, при отсутствии детектируемого влияния модификаций он оставался неизменным. Если характер кривой амплификации не менялся на протяжении трех раундов ПЦР, делали вывод о том, что влияние модификации dUTP на распределение последовательностей внутри комбинаторной библиотеки минимально (либо отсутствует), т.е. такое производное не приводит к вырождению библиотеки при амплификации и может быть применено для проведения mod-SELEX.

ВЫВОДЫ

Нами разработан метод быстрой оценки применимости модифицированных dNTP в mod-SELEX.

Метод позволяет за три загрузки амплификатора проверить весь необходимый набор трифосфатов – кандидатов для планируемого mod-SELEX.

Следует заметить, что предлагаемый подход не исключает контроля обогащения библиотек в процессе селекции, но в случае mod-SELEX позволяет предсказать влияние модификаций на обогащение библиотек и избежать неудач в последующем процессе отбора модифицированных аптамеров.

Исследование поддержано грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 18-29-09151).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rohloff J.C., Gelinas A.D., Jarvis T.C., Ochsner U.A., Schneider D.J., Gold L., Janjic N. (2014) Nucleic acid ligands with protein-like side chains: modified aptamers and their use as diagnostic and therapeutic agents. *Mol. Ther. Nucl. Acids*. **3**, e201.
- Лапа С.А., Павлов А.С., Кузнецова В.Е., Шершов В.Е., Спицын М.А., Гусейнов Т.О., Радько С.П., Заседателев А.С., Лисица А.В., Чудинов А.В. (2019) Ферментативное получение модифицированных ДНК: изучение кинетики ПЦР в режиме реального времени. *Молекуляр. биология*. **53**, 513–523.
- Tolle F., Wilke J., Wengel J., Mayer G. (2014) By-product formation in repetitive PCR amplification of DNA libraries during SELEX. *PLoS One*. **9**, e114693.
- Shao K., Shi X., Zhu X., Cui L., Shao Q., Ma D. (2017) Construction and optimization of an efficient amplification method of a random ssDNA library by asymmetric emulsion PCR. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **64**, 239–243.
- Schütze T., Wilhelm B., Greiner N., Braun H., Peter F., Mörl M., Erdmann V.A., Lehrach H., Konthur Z., Menger M., Arndt P.F., Glökler J. (2011) Probing the SELEX process with next-generation sequencing. *PLoS One*. **6**, e29604.
- Kolm C., Cervenka I., Aschl U.J., Baumann N., Jakwerth S., Krska R., Mach R.L., Sommer R., DeRosa M.C., Kirschner A.K.T., Farnleitner A.H., Reischer G.H. (2020) DNA aptamers against bacterial cells can be efficiently selected by a SELEX process using state-of-the-art qPCR and ultra-deep sequencing. *Sci. Rept.* **10**, 20917.
- Luo Z., He L., Wang J., Fang X., Zhang L. (2017) Developing a combined strategy for monitoring the progress of aptamer selection. *Analyst*. **142**, 3136–3139.
- Sanchez J.C., Zhang L., Evoli S., Schnicker N.J., Nunez-Hernandez M., Yu L., Wereszczynski J., Puffall M.A., Musselman C.A. (2020) The molecular basis of selective DNA binding by the BRG1 AT-hook and bromodomain. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **1863**, 194566.
- Amano R., Aoki K., Miyakawa S., Nakamura Y., Kozu T., Kawai G., Sakamoto T. (2017) NMR monitoring of the SELEX process to confirm enrichment of structured RNA. *Sci. Rep.* **7**, 283.
- Müller J., El-Maarri O., Oldenburg J., Pötzsch B., Mayer G. (2008) Monitoring the progression of the *in vitro* selection of nucleic acid aptamers by denaturing high-performance liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 1033–1037.
- Thevendran R., Citartan M. (2022) Assays to estimate the binding affinity of aptamers. *Talanta*. **238**, 122971.
- Gooch J., Tungsirirup S., Costanzo H., Napier R., Frascione N. (2021) Generating aptamers towards human sperm cells using massively parallel sequencing. *Anal. Bioanal. Chem.* **413**, 5821–5834.
- Чудинов А.В., Шершов В.Е., Павлов А.С., Волкова О.С., Кузнецова В.Е., Заседателев А.С., Лапа С.А. (2020) Одновременное встраивание модифицированных производных dU и dC в растущую цепь ДНК в реакции удлинения праймера и ПЦР. *Биоорг. химия*. **46**, 546–549.
- Лапа С.А., Волкова О.С., Кузнецова В.Е., Заседателев А.С., Чудинов А.В. (2022) Изучение множественного ферментативного встраивания модифицированных нуклеотидов пуриновой и пиримидиновой природы в растущую цепь ДНК. *Молекуляр. биология*. **56**, 157–167.
- Rahimizadeh K., AlShamaileh H., Fratini M., Chakravarthy M., Stephen M., Shigdar S., Veedu R.N. (2017) Development of cell-specific aptamers: recent advances and insight into the selection procedures. *Molecules*. **22**, 2070.
- Sefah K., Shanguan D., Xiong X., O'Donoghue M.B., Tan W. (2010) Development of DNA aptamers using cell-SELEX. *Nat. Protoc.* **5**, 1169–1185.
- Чудинов А.В., Киселева Я.Ю., Кузнецова В.Е., Шершов В.Е., Спицын М.А., Гусейнов Т.О., Ла-

- па С.А., Тимофеев Э.Н., Арчаков А.И., Лисица А.В., Радько С.П., Заседателев А.С. (2017) Ферментативный синтез ДНК с высокой степенью модификации. *Молекуляр. биология*. **51**, 534–544.
18. Лапа С.А., Ромашова К.С., Спицын М.А., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Гусейнов Т.О., Заседателева О.А., Радько С.П., Тимофеев Э.Н., Лисица А.В., Чудинов А.В. (2018) Получение модифицированных комбинаторных ДНК-библиотек методом ПЦР в обратной эмульсии с последующим разделением цепей. *Молекуляр. биология*. **52**, 984–996.
19. Ramakers C., Ruijter J.M., Deprez R.H., Moorman A.F. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **339**, 62–66.
20. Радько С.П., Лапа С.А., Чудинов А.В., Хмельова С.А., Маннанова М.М., Курбатов Л.К., Киселёва Я.Ю., Заседателев А.С., Лисица А.В. (2019) Оценка разнообразия комбинаторных ДНК-библиотек на основе анализа формы амплификационных кривых для мониторинга эффективности селекции аптамеров. *Биомед. хим.* **65**, 477–484.

NEW METHOD FOR EVALUATING THE SUBSTRATE EFFICIENCY OF MODIFIED DEOXYNUCLEOSIDE TRIPHOSPHATES FOR SELEX

S. A. Lapa¹*, O. S. Antipova¹, and A. V. Chudinov¹

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

*e-mail: lapa@biochip.ru

A new method for evaluating the substrate efficiency of deoxynucleoside triphosphates containing functional groups for the selection of modified aptamers (mod-SELEX) is proposed. The method involves conducting three consecutive rounds of PCR with a combinatorial library and a modified dNTP candidate for mod-SELEX. The conclusion about the applicability of a specific dNTP derivative is made by the nature of the change in the amplification curve during three rounds of PCR in real time and does not require SELEX rounds. If the library degenerates during amplification (becomes less representative), it means that a specific modification of dNTP cannot be used with the selected polymerase and other selected library amplification conditions, since it leads to competitive amplification. In the case when the nature of the signal accumulation curve does not change, it is concluded that the modified triphosphate used does not affect the distribution of oligonucleotides with different sequences in the library, that is, it does not affect the change in its composition. It is precisely such derivatives that can be applied in the selected conditions for the selection of aptamers. The method is applicable for a quick assessment of the substrate suitability of modifications introduced into deoxynucleoside triphosphates for mod-SELEX and will be useful in the selection of aptamers for clinical diagnostics, medicine and scientific research.

Keywords: substrate efficiency of modified dNTPs, real-time PCR, mod-SELEX, aptamers

ПАМЯТИ ВЕРНАТЫ ВИКТОРОВНЫ ГРЕЧКО (06.02.1930–06.12.2021 гг.)

DOI: 10.31857/S0026898422030119



6 декабря 2021 г. ушла из жизни профессор, доктор биологических наук Верната Викторовна Гречко, проработавшая в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН более 55 лет. В.В. Гречко родилась в Москве 6 февраля 1930 г. В 1952 г. она окончила кафедру биохимии животных биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Затем училась в аспирантуре на кафедре биофизики того же факультета, по окончании которой защитила кандидатскую диссертацию, посвященную доказательству того, что дипептид карнозин мышечной ткани не является продуктом распада белков, а синтезируется из бета-аланина и гистидина. В 1959 г. Верната Викторовна пришла на работу в ИМБ РАН, т.е. пришла в Институт вскоре после его организации. Она начала работать в Лаборатории изотопных методов под руководством профессора Я.М. Варшавского, занималась изучением свойств молекул ДНК, а позднее и РНК фага MS2, с использованием тяжелой водородной воды, эндонуклеаз и красителей, специфичных к вторичной структуре нуклеиновых кислот. В 1974–1980 гг. В.В. Гречко с сотрудниками опубликовала большой цикл статей, посвященных выделению и изучению мРНК, кодирующей легкую цепь иммуноглобулинов в клетках плазматомы мыши.

В 1992 г. Верната Викторовна в совместной работе с сотрудниками Института молекулярной генетики РАН разработала оригинальный метод анализа, позволяющий выявлять различия в ДНК организмов разных видов. С помощью этого метода, названного ДНК-таксопринт, можно было оценивать степень родства между видами. Метод основывается на том, что видообразованию обычно сопутствуют изменения повторяющихся последовательностей геномов, в первую очередь, сателлитной ДНК. В последующие годы В.В. Гречко и ее сотрудники методом ДНК-таксопринта, а также путем секвенирования сателлитной ДНК проделали большую работу по филогении однополых и двуполых видов скальных ящериц Кавказа из рода *Darevskia*. Эти работы подтвердили гипотезу о гибридном происхождении этих видов ящериц, размножающихся партеногенетическим путем. В 2000 г. В.В. Гречко защитила диссертацию на соискание степени доктора биологических наук на тему “Молекулярные маркеры в проблеме партеногенеза и филогении ящериц сем. Lacertidae”. В последующие годы группа В.В. Гречко продолжала развивать эту тематику, а кроме того описала рассеянные по геномам ящериц короткие повторяющиеся последовательности (так называемым SINE), которые также представляют интерес в отношении изучения филогении рептилий отряда Squamata.

В.В. Гречко много сил и энергии отдала работе в журнале “Молекулярная биология” — в течение 25 лет была ответственным секретарем редколлегии, почти 50 лет трудилась в качестве научного редактора.

В годы молодости и зрелости Верната Викторовна принимала активное участие в научной, общественной и культурной жизни ИМБ РАН. Она была одной из тех, кто повлиял на дух и традиции этого Института.

Верната Викторовна была ярким ученым и человеком с широким кругом интересов, обладавшим многими способностями. Будучи уже на заслуженном отдыхе (с 2015 г.), она написала и опубликовала замечательные многотомные воспоминания о своей жизни и жизни своего родного и любимого Института. Верната Викторовна надолго останется в памяти всех, кто ее знал и любил, кто с ней работал.