

ISSN 0026-8984

Том 57, Номер 2

Март - Апрель 2023



МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 2, 2023

СПЕЦИАЛЬНЫЙ ВЫПУСК,
ПОСВЯЩЕННЫЙ 13-Й МЕЖДУНАРОДНОЙ МУЛЬТИКОНФЕРЕНЦИИ
“БИОИНФОРМАТИКА ГЕНОМНОЙ РЕГУЛЯЦИИ
И СТРУКТУРНОЙ/СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ”, БГРС/СБ-2022

(Редакторы-составители – Н.А. Колчанов, И.Н. Лаврик)

Вступление к специальному выпуску, посвященному 13-й международной
мультиконференции “биоинформатика геномной регуляции
и структурной/системной биологии”, БГРС/СБ-2022
(Multiconference BGRS/Sb-2022, the 13th International Conference
“Bioinformatics of Genome Regulation And Structure/Systems Biology”)

Н. А. Колчанов, И. Н. Лаврик

153

**БИОИНФОРМАТИКА
И СИСТЕМНАЯ КОМПЬЮТЕРНАЯ БИОЛОГИЯ**

Молекулярные механизмы оптимизации элонгации трансляции
существенно различаются у бактерий, имеющих и не имеющих
кластеры генов биосинтеза нерибосомных пептидов

*А. И. Клименко, С. А. Лашин, Н. А. Колчанов,
Д. А. Афонников, Ю. Г. Матушкин*

155

Первичная и вторичная микроРНК-модуляция внешнего пути апоптоза
при гепатоцеллюлярной карциноме

*Т. М. Хлебодарова, П. С. Деменков, Т. В. Иванисенко,
Е. А. Антропова, И. Н. Лаврик, В. А. Иванисенко*

166

Геометрический подход к филогеографическому анализу молекулярных
последовательностей: главные компоненты и дендрограммы

В. М. Ефимов, К. В. Ефимов, В. Ю. Ковалева

178

БИОИНФОРМАТИКА, БИОНЖЕНЕРИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Сравнительный анализ ДНК-полимераз семейства А как инструмент поиска
ферментов с новыми свойствами

А. А. Булыгин, А. А. Кузнецова, О. С. Федорова, Н. А. Кузнецов

185

Генотип-специфические особенности регуляции процесса холодового
осахаривания клубней картофеля

*А. А. Егорова, И. А. Сабоиев, Н. Е. Костина, Д. Д. Куваева,
А. Б. Шербань, С. М. Ибраимова, Е. А. Салина, А. В. Кочетов*

197

Современные подходы белковой инженерии к созданию ферментов
с новыми каталитическими свойствами

Т. Е. Тюгашев, О. С. Федорова, Н. А. Кузнецов

209

СИСТЕМНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ И СОЗДАНИЕ НОВЫХ МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

Влияние производного усниновой кислоты
(ингибитора тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1) на трансплантированные опухоли
in vivo в качестве монотерапии и в сочетании с олапарибом

*Т. Е. Корниенко, А. Л. Захаренко, Е. С. Ильина, А. А. Чепанова, О. Д. Захарова,
Н. С. Дырхеева, Н. А. Попова, В. П. Николин, А. С. Филимонов, О. А. Лузина,
Н. Ф. Салахутдинов, О. И. Лаврик*

220

Об иммунологических исследованиях в научно-технологическом
университете “Сириус”

*И. В. Астраханцева, В. Г. Круть, С. А. Чувпило, Д. В. Шевырев,
А. Н. Шумеев, С. А. Рыбцов, С. А. Недоспасов*

232

Аномальная активность сигнального пути mTOR в расстройствах
аутистического спектра: возможности механизмообоснованной терапии

Е. А. Трифонова, А. А. Котлярова, А. В. Кочетов

243

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ: ОТ РЕПАРАЦИИ ДНК ДО МЕТАБОЛОМИКИ

Поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 и 2: классические функции и взаимодействие
с HPF1 – новым фактором поли(ADP-рибозил)ирования гистонов

Т. А. Кургина, О. И. Лаврик

254

Механизмы специфичности системы CRISPR/Cas9 в геномном редактировании

Л. М. Кулишова, И. П. Вохтанцев, Д. В. Ким, Д. О. Жарков

269

Влияние уровня поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 на статус системы
эксцизионной репарации оснований в клетках человека

*Е. С. Ильина, А. С. Кочеткова, Е. А. Белоусова, М. М. Кутузов,
О. И. Лаврик, С. Н. Ходырева*

285

Изменения уровня мРНК генов *Trp1*, *Trp2*, активности триптофангидроксилазы
и метаболизма серотонина в мозге мышей через 5 суток
после введения липополисахарида

*Д. В. Щербаков, А. Б. Арефьева, П. Д. Комлева, А. Е. Изъюров,
Н. В. Хоцкин, Д. В. Базовкина, А. В. Куликов*

299

Возможности интерферона лямбда как ингибитора SARS-CoV-2

Л. А. Олейник, П. Г. Мадонов, М. Б. Пыхтина

307

Разработка и апробация ДНК-зондов для определения активности ключевых
ферментов пути эксцизионной репарации оснований ДНК в клетках человека

*И. В. Алексеева, А. А. Кузнецова, О. А. Кладова, В. О. Шендер, П. В. Шнайдер,
О. С. Федорова, Н. А. Кузнецов*

316

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

Факторы, влияющие на стабильность тримерной формы 2'-дезоксиридин-5'-
трифосфатнуклеотидгидролазы *Escherichia coli*

*А. В. Юдкина, Е. А. Коваленко, А. В. Ендуткин, Е. П. Панфёрова,
А. А. Кириленко, А. А. Коханенко, Д. О. Жарков*

330

Новые цвиттер-ионные олигонуклеотиды: получение и комплементарное связывание

Д. Э. Патрушев, Е. А. Буракова, С. Н. Бизяев, А. А. Фокина, Д. А. Стеценко

340

ЭВОЛЮЦИОННАЯ, ПОПУЛЯЦИОННАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНОМИКА, ТРАНСКРИПТОМИКА

Повышенные частоты аллелей –174G и –572C гена *IL6* в популяциях коренных народов Сибири по сравнению с русскими

*Л. Э. Табиханова, Л. П. Осипова, Т. В. Чуркина, С. С. Ковалев,
М. Л. Филипенко, Е. Н. Воронина*

350

Профилирование микроРНК (8-мерных), нацеленных на гены, связанные с развитием сахарного диабета типа 2 и гипертрофии сердца

K. Hussain, A. Ishtiaq, I. Mushtaq, I. Murtaza

360

Гены, ассоциированные с повышенной чувствительностью гипертензивных крыс линии НИСАГ к стрессу

Л. А. Федосеева, С. Э. Смоленская, А. Л. Маркель, О. Е. Редина

362

Изменение экспрессии генов, ассоциированных с кальциевыми процессами в гиппокампе мышей, под влиянием хронического социального стресса

М. Б. Павлова, Д. А. Смагин, Н. Н. Кудрявцева, Н. А. Дюжикова

373

R-элемент не оказывает заметного влияния на жизнеспособность *Drosophila simulans*

Л. П. Захаренко, Д. В. Петровский, Р. А. Быков

384

УДК 573.7

**ВСТУПЛЕНИЕ К СПЕЦИАЛЬНОМУ ВЫПУСКУ, ПОСВЯЩЕННОМУ
13-Й МЕЖДУНАРОДНОЙ МУЛЬТИКОНФЕРЕНЦИИ
“БИОИНФОРМАТИКА ГЕНОМНОЙ РЕГУЛЯЦИИ
И СТРУКТУРНОЙ/СИСТЕМНОЙ БИОЛОГИИ”, БГРС/СБ-2022
(MULTICONFERENCE BGRS/SB-2022, THE 13th INTERNATIONAL
CONFERENCE “BIOINFORMATICS OF GENOME REGULATION
AND STRUCTURE/SYSTEMS BIOLOGY”)**

© 2023 г. Н. А. Колчанов^а, И. Н. Лаврик^{а, *}

^аИнститут цитологии и генетики, Сибирское отделение Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: ilav3103@gmail.com

DOI: 10.31857/S0026898423020131, EDN: EGHPPS

Этот специальный выпуск журнала “Молекулярная биология” посвящен и содержит материалы Международной мультиконференции “Биоинформатика геномной регуляции и структурной/системной биологии” (БГРС/СБ), которая на протяжении более 20 лет успешно занимает позицию одного из ведущих форумов по двум передовым направлениям современной науки: биоинформатике и системной биологии.

Так же как любое здание не может быть построено без фундамента, так и понимание механизмов функционирования живых систем невозможно без знания биоинформатических основ функционирования биологических процессов на уровне клетки и организма. Форум БГРС/СБ уже давно вышел за рамки обычной конференции по геномике, транскриптомике и биоинформатике и перерос в мультиконференцию, которая объединяет симпозиумы по ведущим направлениям молекулярной биологии, структурной биологии, фармакологии, эволюционной, популяционной и медицинской геномики, биотехнологии, нейрогеномики, нейродегенерации, иммунологии, репарации ДНК, клеточной гибели, вирусологии, микробиологии и ряду ведущих направлений современной биомедицины.

Актуальность конференции БГРС/СБ и широта рассматривающихся на ней вопросов обусловлены тем, что в генетике произошел информационный взрыв, связанный с появлением эффективных методов расшифровки геномов и снижением при этом стоимости геномного секвенирования более чем на 4 порядка за последние 15 лет. Как результат этого прогресса, науки о жизни стали главным источником больших данных, опередив по темпам роста не только другие

области знаний, но даже социальные сети. Одновременно совершенствовались экспериментальные методы транскриптомного, протеомного, метаболомного и других видов исследований. Все это стало грандиозным вызовом для биоинформатики и системной компьютерной биологии, так как темпы генерации геномных и других типов данных превосходят возможности их компьютерного анализа; а объем и сложность этих данных настолько велики, что их понимание, интерпретация и тем более практическое применение невозможны без внедрения новых информационных технологий, эффективных методов анализа и компьютерного моделирования живых систем.

Следует отметить, что прямо на наших глазах зародилась “новая биология”, ключевая особенность которой заключается в тесной интеграции экспериментальных и компьютерных технологий. По этой причине основная задача мультиконференции состоит в создании биоинформатической основы для понимания ключевых направлений биологических наук и биомедицины с привлечением всех современных знаний по компьютерному и математическому анализу. Следует отметить, что это уникальный форум в мировом научном сообществе, которому, безусловно, нет аналогов во всем мире ни по масштабу, ни по охвату научных направлений.

Биоинформатика и системная компьютерная биология относятся к числу сквозных генетических технологий генерации новых знаний в области наук о жизни, обеспечивающих хранение, обработку и анализ больших данных по геномике, транскриптомике, протеомике, метаболомике и другим новейшим технологиям. Именно этим обстоятельством и определяется междисциплинар-

ный характер конференции БГРС/СБ, в рамках симпозиумов которой помимо алгоритмов и методов анализа генетических данных и математического моделирования живых систем рассматриваются результаты применения методов биоинформатики и системной компьютерной биологии для решения широкого круга прикладных задач в различных областях науки о жизни.

Мультиконференция БГРС/СБ-2022, которая прошла в июле 2022 года, была уже тринадцатой и в ней приняли участие более 650 человек. Все эти годы организатором конференции был Новосибирский институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), а ее руководителем — академик Николай Александрович Колчанов. На конференцию приезжает много ученых со всех уголков России и из-за рубежа. Кроме того, в рамках мультиконференции БГРС/СБ большое внимание уделяется подготовке новых кадров, поэтому ее проведение сопровождается курсом “Школы молодых ученых по биоинформатике и системной биологии”.

Специальный выпуск журнала “Молекулярная биология” отражает структуру Международной мультиконференции БГРС/СБ-2022 и включает как научно-исследовательские статьи, так и обзоры по ключевым направлениям биоинформатики, биологии, биотехнологии и биомедицины. В нем представлены работы как отечественных, так и зарубежных ученых; причем значительная их часть выполнена в ИЦиГ СО РАН, который постоянно является основным организатором конференции, а также в Новосибирском институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН). Кроме того, в подготовке выпуска приняли участие сотрудники Московского физико-технического института, а также Университета “Сириус”.

Следующую мультиконференцию БГРС/СБ планируется провести в 2024 г., как всегда, в Новосибирске, а ее организаторы надеются, что интерес к этому форуму будет неуклонно расти и вдохновлять на новые открытия ее участников.

БИОИНФОРМАТИКА
И СИСТЕМНАЯ КОМПЬЮТЕРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 573.7

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОПТИМИЗАЦИИ ЭЛОНГАЦИИ
ТРАНСЛЯЦИИ СУЩЕСТВЕННО РАЗЛИЧАЮТСЯ У БАКТЕРИЙ,
ИМЕЮЩИХ И НЕ ИМЕЮЩИХ КЛАСТЕРЫ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА
НЕРИБОСОМНЫХ ПЕПТИДОВ

© 2023 г. А. И. Клименко^а, С. А. Лашин^а, Н. А. Колчанов^а, Д. А. Афонников^а, Ю. Г. Матушкин^{а, *}

^аИнститут цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: mat@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 27.07.2022 г.

После доработки 29.08.2022 г.

Принята к публикации 31.08.2022 г.

Нерибосомные пептиды, обладающие широкой биологической активностью, играют важную роль в жизнедеятельности бактерий. В частности, они действуют как антибиотики, токсины, поверхностно-активные вещества, сидерофоры, а также выполняют ряд других специфических функций. Биосинтез этих молекул происходит не на рибосомах, а с помощью специальных ферментов, гены которых образуют кластеры в бактериальных геномах. Мы предположили, что синтез нерибосомных пептидов является специфической особенностью метаболизма бактерий, которая может затрагивать и другие жизненно важные процессы, в том числе и связанные с трансляцией. Нами впервые показана связь между механизмом регуляции трансляции белоккодирующих генов в бактериях, который в значительной степени определяется эффективностью элонгации трансляции, и наличием в геномах кластеров генов биосинтеза нерибосомных пептидов. Проведен биоинформатический анализ эффективности элонгации трансляции белоккодирующих генов 11679 геномов бактерий, часть из которых содержала кластеры генов биосинтеза нерибосомных пептидов, а другая часть — нет. Показано, что бактерии, геномы которых содержат кластеры биосинтетических генов нерибосомных пептидов, и бактерии, которые не содержат кластеры таких генов, имеют значимые различия в молекулярных механизмах, обеспечивающих эффективность трансляции. Так, существенно меньшая часть микроорганизмов, геномы которых содержат кластеры генов нерибосомных пептидных синтетаз, характеризуется оптимизированной регуляцией количества локальных инвертированных повторов, большая же часть имеет геномы, оптимизированные за счет усредненной энергии шпилек инвертированных повторов в мРНК и дополнительно за счет состава кодонов. Полученные нами результаты позволяют предположить, что присутствие путей биосинтеза нерибосомных пептидов может влиять на структуру общего метаболизма бактерий, что выражается и в специфике механизмов рибосомного биосинтеза белков.

Ключевые слова: нерибосомные пептиды, синтетазы нерибосомных пептидов, эффективность элонгации трансляции, бактерии, аннотация генома

DOI: 10.31857/S002689842302012X, EDN: EGGOIC

ВВЕДЕНИЕ

Нерибосомные пептиды (НРП) составляют важную фракцию бактериальных пептидомов. Будучи классом вторичных пептидных метаболитов, НРП обладают чрезвычайно широким спектром биологической активности и фармакологических свойств. Согласно базе данных Norine [1], НРП действуют как антибиотики (61%), токсины (17%), поверхностно-активные вещества (16%),

сидерофоры (11%), противоопухолевые агенты (4%) и модификаторы иммунного ответа (4%); при этом ~25% НРП, включенных в базу данных, обладают несколькими видами активности. Биосинтез НРП является модульным, в его основе лежит использование особых ферментов — синтетаз нерибосомных пептидов (НРПС), которые кодируются кластерами генов в бактериальных геномах [2]. Эти ферменты достаточно хорошо аннотированы, что позволяет выявлять присутствие их генов в геномах бактерий биоинформатическими методами на основе сравнения аминокис-

Сокращения: НРП — нерибосомные пептиды; НРПС — синтетазы нерибосомных пептидов; EEI — индекс эффективности элонгации (Elongation Efficiency Index).

лотных последовательностей с профилями скрытых цепей Маркова (Hidden Markov Models) [3]. Это позволило на основе биоинформатического анализа большого количества геномов провести аннотацию кластеров генов биосинтеза НРП и описать их функциональные особенности [4].

Эффективность экспрессии генов играет решающую роль в синтетической биологии и геномной инженерии. Хотя на экспрессию генов бактерий влияют несколько процессов (транскрипция, трансляция, посттрансляционная модификация и др.), уровень их экспрессии в основном определяется эффективностью элонгации трансляции [5, 6].

Для того чтобы провести необходимые эксперименты по определению уровня экспрессии генов в интересующем организме, нужно затратить немало финансовых и временных ресурсов. Методы биоинформатики позволяют в первом приближении решить эту проблему, оценив уровень экспрессии гена в данном организме на основе анализа его нуклеотидного состава.

Эффективность элонгации трансляции — это характеристика “оптимальности” нуклеотидной последовательности генов: чем активнее происходит экспрессия указанных генов, тем выше индекс эффективности элонгации (EEI — Elongation Efficiency Index) [5, 6]. Оптимизация может проходить по частотам используемых кодонов, минимизации количества и “прочности” потенциальных шпилек на мРНК и комбинации этих параметров. Программа EloE [7, 8] — это инструмент ранжирования генов на основе предполагаемой эффективности элонгации трансляции их мРНК, определяемой по нуклеотидным последовательностям, с учетом таких факторов, как состав кодонов, наличие и стабильность вторичных структур в мРНК [5, 6]. Полученные предсказанные значения коррелируют с экспериментальными данными по экспрессии генов у различных микроорганизмов [7, 8]. Таким образом, EloE — это биоинформатический инструмент для аннотации генома, позволяющий исследователю на основе только нуклеотидных последовательностей всего генома выводить априорные оценки эффективности экспрессии генов. В настоящей работе мы провели оценку значений EEI для генов, кодирующих НРПС.

Анализ эффективности элонгации трансляции мРНК генов НРПС является важным шагом на пути к получению знаний о свойствах бактериального биосинтеза НРП, а также эволюции этих белков в различных организмах.

В нашей работе впервые проведен поиск связи между механизмом регуляции трансляции мРНК белоккодирующих последовательностей в бактериях, которая в значительной степени определяется эффективностью стадии элонгации и присутствием в геномах кластеров генов биосинтеза НРП.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мы провели биоинформатический анализ кластеров биосинтетических генов (BGCs) НРП, полученных из ANTISMASH-DB [9], используя полногеномные последовательности бактериальных геномов, доступные в NCBI GenBank. В основе анализа лежит метод прогнозирования эффективности элонгации трансляции, реализованный в программе EloE [7, 8]. Скрипты статистического и биоинформатического анализа разработаны на языках Python и R с использованием программной библиотеки Biopython и пакета robCompositions [10].

Данные о геномах бактерий, содержащих кластеры генов биосинтеза НРП, взяты из ANTISMASH-DB [9]. В качестве общей выборки бактериальных геномов использовали данные о номерах доступа геномных проектов, содержащихся в базе данных геномов Joint Genome Institute (JGI GOLD) [11] со статусом ‘Complete and Published’. На основе номеров доступа из NCBI GenBank получены полногеномные последовательности геномов бактерий для проведения дальнейшего биоинформатического анализа.

ИНДЕКС ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ EEI

В основе работы лежит алгоритм расчета индекса эффективности элонгации трансляции EEI, разработанный В.А. Лихошваем и Ю.Г. Матушкиным [5, 6]. Этот индекс рассчитывается для каждого гена организма и имеет смысл средней скорости прохождения стадии элонгации трансляции.

Индекс EEI рассчитывается по следующей формуле:

$$EEI(i) = K / (w_1 T_a(i) + w_2 T_e(i)), \quad (1)$$

где i — номер гена, K — нормирующий множитель, обеспечивающий границы индекса от 0 до 10, $w_1 = \{0, 1\}$ и $w_2 = \{0, 1\}$ — индикаторные коэффициенты, определяющие учет слагаемых в значении индекса. Всего имеются три нетривиальные комбинации индикаторных коэффициентов:

а) $w_1 = 1, w_2 = 0$ — учитывается только слагаемое $T_a(i)$, которое имеет смысл среднего времени размещения в А-сайте рибосомы изоакцепторной аминоксил-тРНК;

б) $w_1 = 0, w_2 = 1$ — учитывается только слагаемое $T_e(i)$, которое имеет смысл среднего времени, затрачиваемого рибосомой на стадию транслокации;

в) $w_1 = 1, w_2 = 1$ — учитываются оба слагаемых $T_a(i)$ и $T_e(i)$.

УЧЕТ КОДОННОГО СОСТАВА ГЕНА ПРИ РАСЧЕТЕ ИНДЕКСА ЕЕІ

Первое слагаемое T_a имеет смысл среднего времени размещения в А-сайте рибосомы изоакцепторной аминоксил-тРНК. Чем выше концентрация изоакцепторной аминоксил-тРНК, тем быстрее комплементарная тРНК попадает в А-сайт рибосомы. Концентрации тРНК пропорциональны концентрациям соответствующих кодонов в выборке высокоэкспрессирующихся генов. Параметр T_a вычисляют на основе анализа состава кодонов гена по следующей формуле:

$$T_a(i) = \sum_{j=1}^{n_i} \beta_{\delta(i,j)} / n_i, \quad (2)$$

$$\beta_{\delta(i,j)} = \frac{\sum_{m=1}^C \sqrt{\alpha_m}}{\sqrt{\alpha_{\delta(i,j)}}}, \quad (3)$$

где величину $1/\beta_{\delta(i,j)}$ в простейшем случае интерпретируют как оптимальную относительную концентрацию аминоксил-тРНК, комплементарной j -ому учитываемому кодону, а $\alpha_{\delta(i,j)}$ и α_m имеют смысл частот использования кодонов $\delta(i,j)$ и m в выделенной подвыборке генов, n_i — количество кодонов в гене i , C — общее число кодонов. В качестве выделенной подвыборки генов выступает набор с заранее заданным количеством генов (либо численно, либо в процентах от общего числа генов в геноме организма). Изначально гены выбирают случайно, затем выборка постепенно изменяется в соответствии с рассчитываемыми значениями индекса ЕЕІ, пока не стабилизируется на конкретном оптимальном составе генов [5, 6].

ВТОРИЧНЫЕ СТРУКТУРЫ В мРНК

Второе слагаемое $T_e(i)$ имеет смысл среднего времени, затрачиваемого рибосомой на стадию транслокации. Этот параметр вычисляется на основе оценки самокомплементарности i -ой мРНК по следующей формуле:

$$LCII(i) = \frac{\sum_{m=1}^{m_i - s_{\max} - l_{\max}} \left\{ \sum_{s=s_{\min}}^{s_{\max}} \left[\sum_{l=l_{\min}}^{l_{\max}} \zeta(\text{con}(m, m+s+1), \overline{\text{con}(m+s+l-1, m+2s+l-2)}) \right] \right\}}{m_i - 2s_{\max} - l_{\max} + 1}, \quad (8)$$

где $\text{con}(i,j)$ — контекст гена с i -го по j -й нуклеотиды, $\overline{\text{con}(i,j)}$ — комплементарный контекст гена с j -го по i -й нуклеотиды ($i \leq j$). $\zeta(\text{con}_1, \text{con}_2) = 1$, если слова con_1 и con_2 идентичны, иначе $\zeta(\text{con}_1, \text{con}_2) = 0$, $i = 0, \dots, N_{\text{CDS}}$, где N_{CDS} — общее число экстрагированных из генома CDS. Длина совершенного повтора (размер стебля) не меньше $s_{\min} = 3$ и не

$$T_e(i) = t_{\min}(1 - p(i)) + t_{\max}p(i), \quad (4)$$

где $t_{\min}$ — минимальное условное время транслокации, $t_{\max}$ — максимальное условное время транслокации, $p(i)$ — вероятность реализации максимального условного времени транслокации, которая вычисляется по формуле:

$$p(i) = \int_0^{\text{LCI}(i)} \frac{k^{n+1} x^n}{G(n+1)} e^{-kx} dx, \quad (5)$$

$$k = m/s^2, \quad (6)$$

$$n = (m/s)^2, \quad (7)$$

где m и s^2 соответственно, математическое ожидание и дисперсия положительной случайной величины, имеющей плотность распределения

$\frac{k^{n+1} x^n}{G(n+1)} e^{-kx}$, $G(n+1)$ — гамма-функция, $\text{LCI}(i)$ — индекс локальной комплементарности. Следует отметить, что значения $T_e(i)$ существенно не изменяются, если в качестве $p(i)$ выбирать другие формы S-образной зависимости от аргумента $\text{LCI}(i)$ [5, 6].

ИНДЕКС ЛОКАЛЬНОЙ КОМПЛЕМЕНТАРНОСТИ

Индекс локальной комплементарности (LCI) отражает насыщенность нуклеотидной последовательности мРНК вторичными структурами. При расчетах используют два типа индекса LCI: без энергии (LCI1) и с энергией (LCI2). Первый тип основан на предположении, что рибосома последовательно расплетает вторичную структуру независимо от ее свободной энергии. Второй тип предполагает, что время задержки рибосомы перед стабильной вторичной структурой может определяться свободной энергией этой структуры.

Индекс LCI1 (без энергии) рассчитывается по следующей формуле:

больше $s_{\max} = 6$, расстояние между повторами (длина свободной части петли) не меньше $l_{\min} = 3$ и не больше $l_{\max} = 50$. Данные значения параметров, используемые в расчетах, подобраны эмпирически. Значение $\text{LCI1}(i)$ имеет смысл среднего числа комплементарных нуклеотидов, приходящихся на один нуклеотид анализируемой последовательности.

Индекс LCI2 (с энергией) рассчитывается по формуле:

$$LCI2(i) = \frac{\sum_{m=1}^{m_i - s_{\max} - l_{\max}} \left\{ \sum_{s=s_{\min}}^{s_{\max}} \left[\sum_{l=l_{\min}}^{l_{\max}} \psi(\text{con}(m, m+s+1), \text{con}(m+s+l-1, m+2s+l-2)) \right] \right\}}{m_i - 2s_{\max} - l_{\max} + 1}, \quad (9)$$

где ψ — энергия вторичной структуры, которая подсчитывается стандартным образом [12]. Остальные обозначения те же, что и для LCI1. Параметры: $s_{\min} = 3$, $s_{\max} = 6$, $l_{\min} = 3$, $l_{\max} = 50$. Значение LCI2(i) имеет смысл средней энергетической прочности вторичных структур в мРНК.

ПЯТЬ ТИПОВ ЕЕІ

Как отмечено выше, всего имеются три нетривиальные комбинации индикаторных коэффициентов w_1 и w_2 в формуле расчета ЕЕІ. Также в расчетах используются два типа индекса LCI. В итоге получаются пять типов индекса ЕЕІ:

а) ЕЕІ1 = K/T_a — учитывается только кодонный состав гена;

б) ЕЕІ2 = $K/T_e(\text{LCI1})$ — учитывается только количество вторичных структур в мРНК;

в) ЕЕІ3 = $K/T_e(\text{LCI2})$ — учитывается только энергетическая прочность вторичных структур в мРНК;

г) ЕЕІ4 = $K/(T_a + T_e(\text{LCI1}))$ — учитываются и кодонный состав, и количество вторичных структур в мРНК;

д) ЕЕІ5 = $K/(T_a + T_e(\text{LCI2}))$ — учитываются и кодонный состав, и энергетическая прочность вторичных структур в мРНК.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАБОЧЕГО ТИПА ИНДЕКСА ЕЕІ В ОРГАНИЗМЕ

Для определения типа индекса, лучше всего оценивающего эффективность элонгации трансляции алгоритмом EloE [7, 8], в отсортированных списках значений каждого из пяти индексов выделяют гены рибосомных белков и рассчитывают их среднее положение (M) и стандартное отклонение от среднего (R) по формулам:

$$M = \frac{1}{N_{rib}} \sum_{i=1}^{N_{rib}} x_i, \quad (10)$$

$$R = \sqrt{\frac{1}{N_{rib}} \sum_{i=1}^{N_{rib}} (M - x_i)^2}, \quad (11)$$

где N_{rib} — количество рибосомных генов, x_i — ранг рибосомного гена в отсортированном по увеличению индекса ЕЕІ списке генов. Для удобства параметры M и R нормируют таким образом, чтобы их значения лежали в интервалах $[-100; 100]$ и $[0; 100]$ соответственно.

Гены рибосомных белков выбраны в качестве маркеров высокоэкспрессирующихся генов, так как известно, что рибосомные гены большинства одноклеточных организмов характеризуются высоким уровнем экспрессии. В частности, в работе [13], где введены индексы: RSCU (Relative Synonymous Codon Usage), отражающий частоту использования синонимичных кодонов в эталонной выборке, и CAI (Codon Adaptation Index), отражающий степень неравномерности кодонного состава гена. Эталонная выборка включала специально выбранные гены с заведомо высоким уровнем экспрессии (рибосомные белки, белки внешнего мембранного слоя и др.).

Основным для каждого организма считается тот тип индекса ЕЕІ, у которого параметр M принимает наибольшее значение, а параметр R — наименьшее, т.е. рибосомные гены больше смещены в сторону высокоэкспрессирующихся генов и расположены плотнее. Например, у *Herpetosiphon aurantiacus* DSM 785 основным является 1-ый тип индекса ЕЕІ, так как он показывает более высокий уровень экспрессии рибосомных генов, чем остальные четыре (рис. 1).

РАСЧЕТЫ ЕЕІ ДЛЯ ГЕНОВ СИНТЕТАЗ НЕРИБОСОМНЫХ ПЕПТИДОВ

Нами изучены особенности трансляции генов, кодирующих НРПС. Мы оценивали эффективность элонгации трансляции мРНК этих генов на основе индекса ЕЕІ. Величины ЕЕІ позволяют оценить важность экспрессии белоккодирующих генов для жизнедеятельности микроорганизма: чем выше этот индекс, тем активнее происходит экспрессия гена [5, 6]. Для расчета ЕЕІ по нуклеотидной последовательности в геноме используется комплекс программ EloE [7, 8]. Индекс рассчитывают на основе частот встречаемости кодонов в гене и локальной вторичной структуры мРНК. Однако не выявлено никаких характерных особенностей значений ЕЕІ для этих генов на фоне остальных генов микроорганизмов.

Мы провели анализ типов индексов ЕЕІ и оценили закономерности их распределения в бактериях, которые содержат/не содержат кластеры генов НРПС. Программа EloE [7, 8] на основе анализа полного набора генов в геноме бактерии определяет индекс, оптимальный для этого организма, один из пяти возможных (ЕЕІ1, ЕЕІ2, ЕЕІ3, ЕЕІ4, ЕЕІ5). Каждый из этих типов харак-

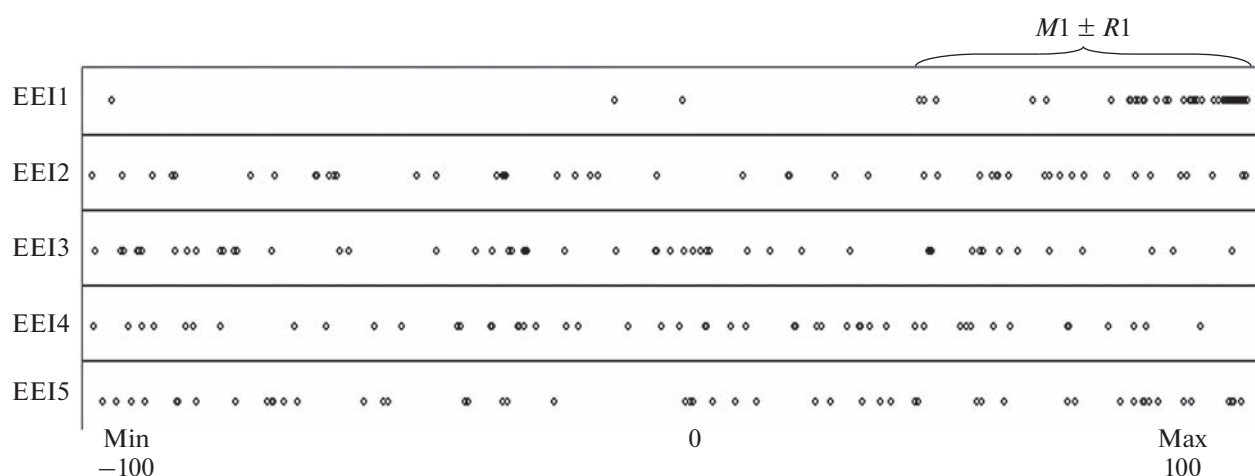


Рис. 1. Схема расположения рибосомных генов (черные кружки) среди других генов (белые кружки, не все отмечены) *Herpetosiphon aurantiacus* DSM 785, упорядоченных по увеличению индекса EEI.

теризует связанные с трансляцией процессы в геноме: EEI1 учитывает только кодонный состав рамки трансляции, влияние локальной вторичной структуры мало; EEI2 — эффективность трансляции определяется присутствием локальных инвертированных повторов; EEI3 — учитывает усредненную энергию повторов, в которых энергетически возможно образование шпильки; EEI4 — комбинация вкладов EEI1, EEI2; EEI5 — комбинация вкладов EEI1, EEI3.

Для оценки связи между кластерами генов, кодирующих НРПС, в геноме бактерий и типом оптимизации элонгации трансляции использовали 2191 геном бактерий, содержащих НРП (5676 кластеров). Предварительный статистический анализ показал, что большое число (>90) генов в кластерах часто встречается в геномах представителей рода *Streptomyces* (шесть кластеров), большое число кластеров (>2) найдено в геномах представителей родов *Mycobacterium* (12), *Streptomyces* (12), *Mycococcus* (5), *Paenibacillus* (5), *Xenorhabdus* (4), *Nocardia* (3) и *Rhodococcus* (3).

В процессе анализа оказалось, что у ряда геномов один из определяющих параметров алгоритма выбора оптимального индекса эффективности элонгации трансляции — средний ранг генов рибосомных белков (M -значение) — оказался низким, т.е. смещение генов рибосомных белков в сторону высоких значений EEI относительно других генов было незначительным. Это не позволяет с уверенностью отнести данные геномы к одному из пяти типов и может сказываться на значимости результатов поиска связи между EEI и наличием кластеров генов НРПС. Поэтому, чтобы исключить влияние таких геномов на оценку EEI и обеспечить устойчивость проведенного анализа, мы пересчитали результаты, полученные на предыдущем этапе, отфильтровав геномы с низким индексом, т.е. эти геномы не бра-

ли в дальнейшие расчеты. Были рассмотрены два порога качества — базовый ($M \geq 50$) и более строгий ($M \geq 75$), для которых произвели пересчет полученных результатов. После фильтрации по базовому порогу качества ($M \geq 50$) было взято 1855 геномов, содержащих гены НРПС, из 10111, прошедших фильтрацию и проанализированных EloE. Также взято 8256 геномов бактерий без генов НРПС. После фильтрации по строгому порогу качества ($M \geq 75$) в анализ взяли 1473 генома с генами НРПС. Геномов бактерий без генов НРПС взяли 5960.

Выборки организмов с генами синтетаз НРП и без НРП анализировали методом главных компонент для композиционных данных [14], полученных в ходе процедуры генерации повторных выборок (ресэмплинга) организмов из групп двух типов — содержащих НРП и не содержащих НРП — и представляющих собой композицию частот оптимальных типов индексов элонгации трансляции в этих выборках. Результаты отображаются в виде диаграммы распределения выборок в пространстве главных компонент.

Общая схема обработки данных представлена на рис. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основе данных об аннотированных геномах мы провели анализ оптимальных индексов эффективности элонгации трансляции (EEI) и оценили распределение геномов по типам оптимального индекса в группах бактерий, которые содержат/не содержат кластеры генов НРПС. Полученные результаты свидетельствуют, что организмы, геномы которых кодируют/не кодируют НРПС, имеют существенно различные частоты встречаемости оптимальных типов элонгации трансляции EEI2, EEI5 и EEI3 (см. рис. 3).

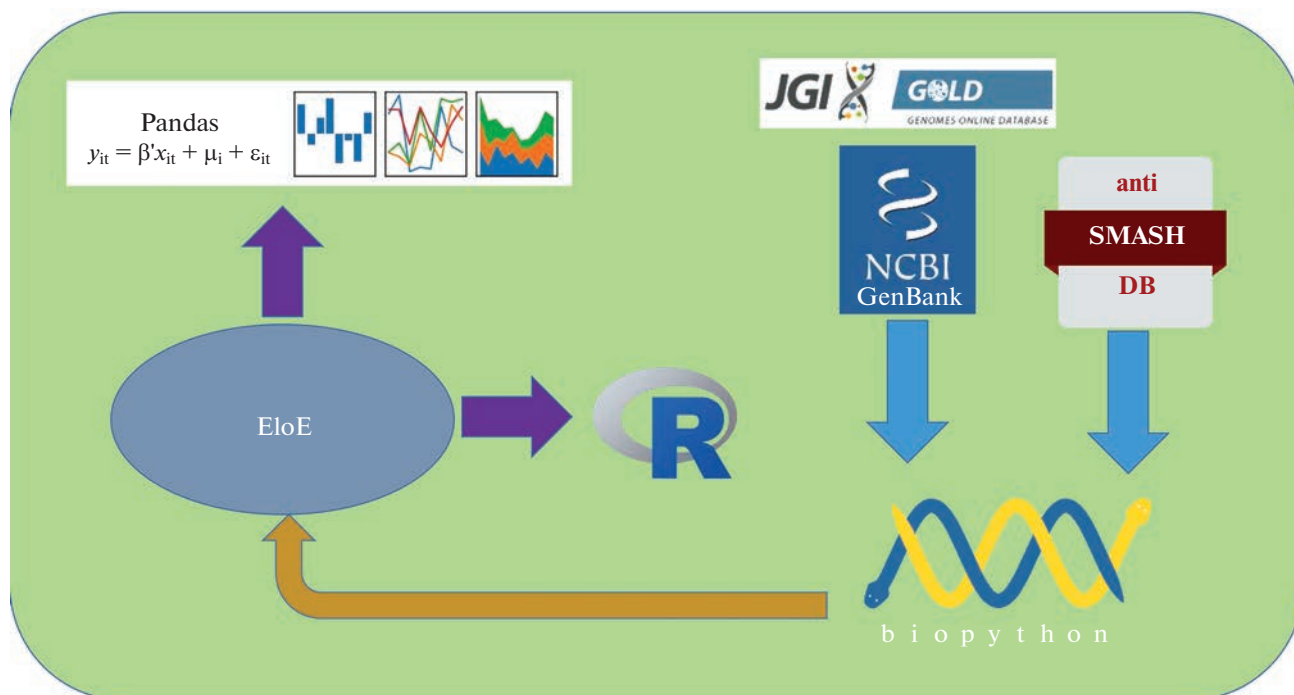


Рис. 2. Общая схема биоинформатического анализа. По данным из ANTISMASH-DB о кластерах НРПС из NCBI GenBank с использованием библиотеки Biopython были загружены последовательности кластеров и геномы соответствующих видов бактерий, а также проведен предварительный статистический анализ. Далее с помощью Eloe теоретически оценена эффективность элонгации трансляции всех генов из геномов бактерий как содержащих кластеры НРПС, так и без этих кластеров, и проведен статистический анализ с использованием библиотеки Pandas языка программирования Python и библиотеки robCompositions статистического пакета R.

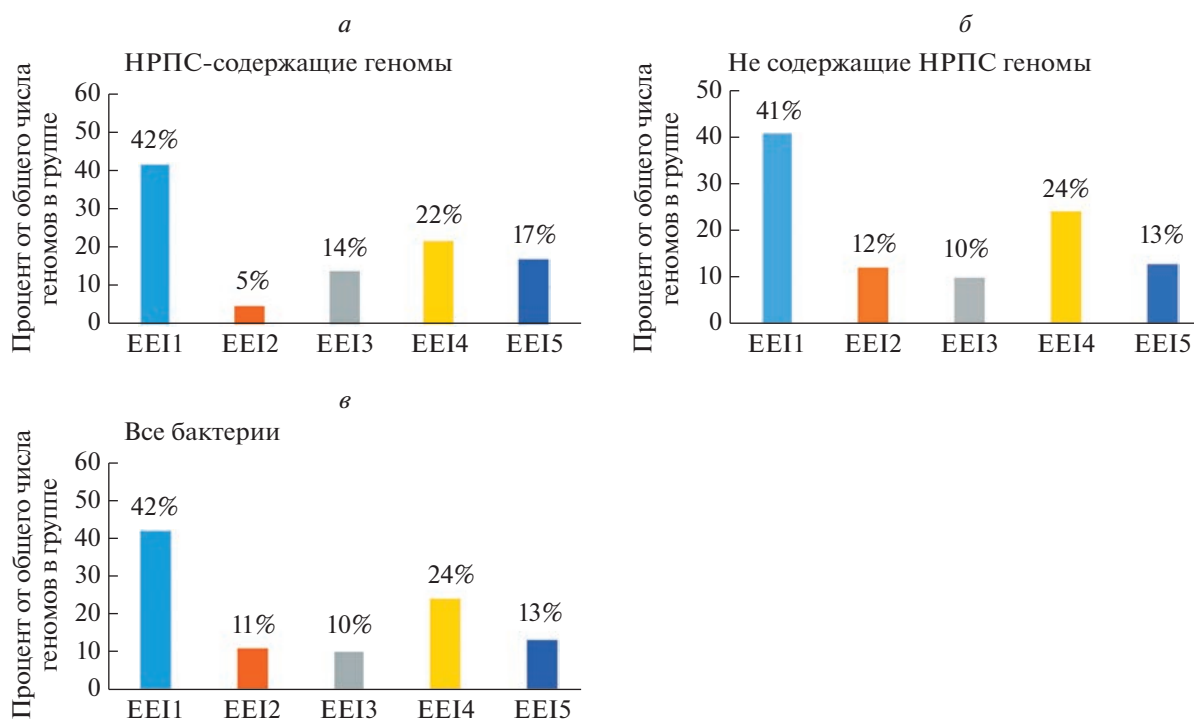


Рис. 3. Сравнение разных групп геномов бактерий по композициям типов EEI. *а* – Геномы, содержащие кластеры генов нерибосомных пептидсинтетаз (НРПС), согласно информации из ANTISMASH-DB; *б* – геномы, не содержащие кластеры генов НРПС, согласно информации из ANTISMASH-DB. *в* – Все геномы бактерий, геномные проекты которых имеют статус “Complete and Published” согласно JGI GOLD.

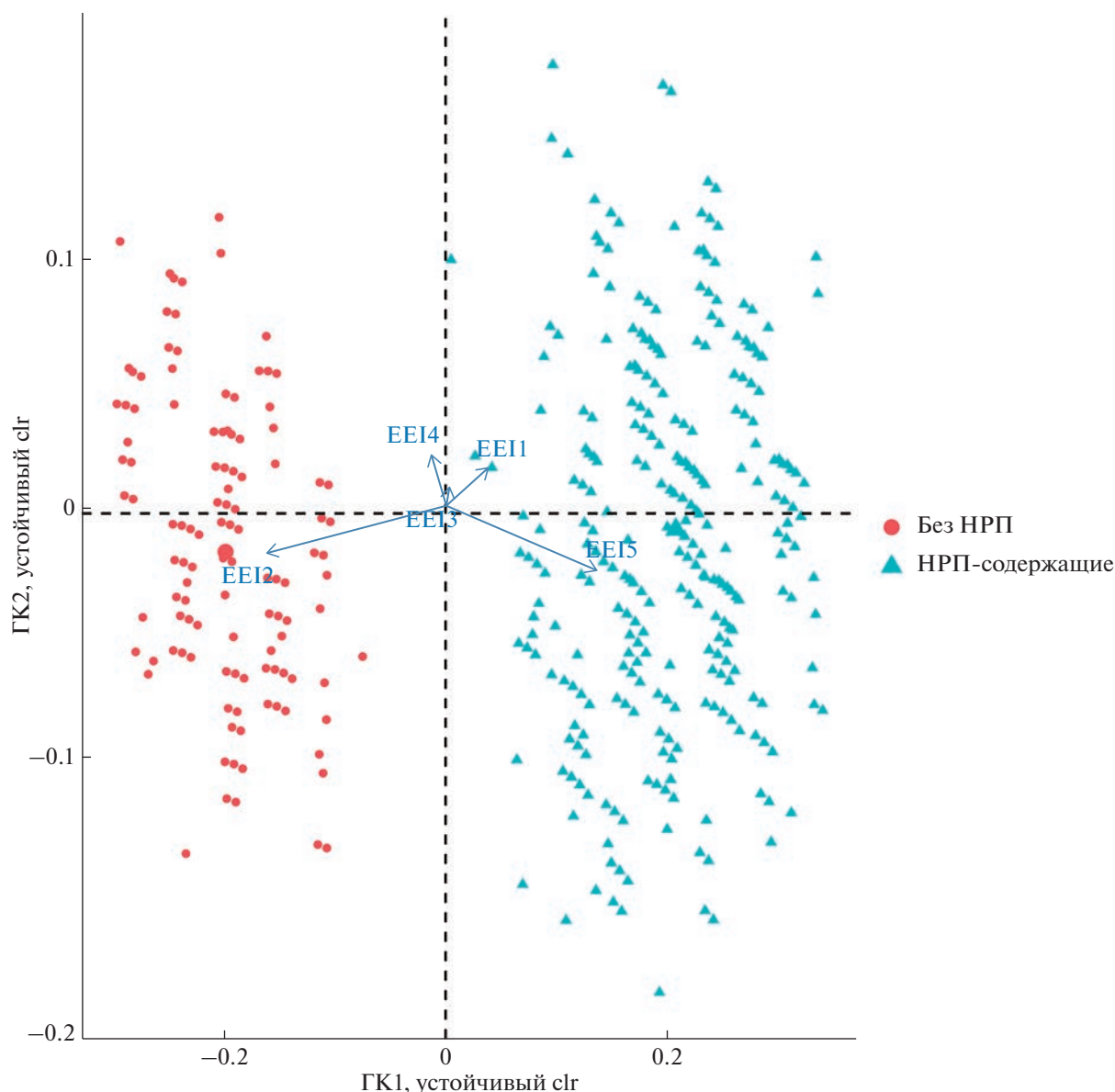


Рис. 4. Результаты анализа методом главных компонент (ГК) для композиционных данных (устойчивый, с обратным преобразованием счетов в пространство c/g — центрированных отношений логарифмов) [14] множества композиций по типам EEI, полученного в результате ресэмплинга. Кругочками отмечены случайные выборки геномов из родов, принадлежащих к группе геномов, содержащих кластеры генов НРПС, а треугольниками — случайные выборки геномов из родов, принадлежащих к группе геномов, не содержащих НРП.

Как видно из диаграмм, выборка организмов, которые содержат кластеры генов НРПС, существенно отличается от выборки без кластеров НРПС по EEI2 (5% с НРПС против 12% без НРП), EEI3 (14% с НРПС против 10% без НРПС) и EEI5 (17% с НРПС и 13% без НРП). Таким образом, можно сделать вывод, что среди геномов, содержащих кластеры генов НРПС, эффективность трансляции в меньшей степени обуславливается процессами, связанными с ролью инвертированных повторов (EEI2), в то же время большую роль в контроле эффективности трансляции играют

процессы, связанные со стабильностью локальной вторичной структуры мРНК (EEI3 и EEI5).

Эти результаты подтверждаются анализом выборок организмов с/без НРП методом главных компонент для композиционных данных [14]. Этот метод основан на генерации повторных выборок из организмов двух типов — содержащих НРП и не содержащих НРП — и анализу частот индексов в этих выборках. Результаты представлены на рис. 4, где каждый круг — выборка геномов, не содержащих НРП, треугольник — выборка геномов, содержащих НРП (выборки сгенери-

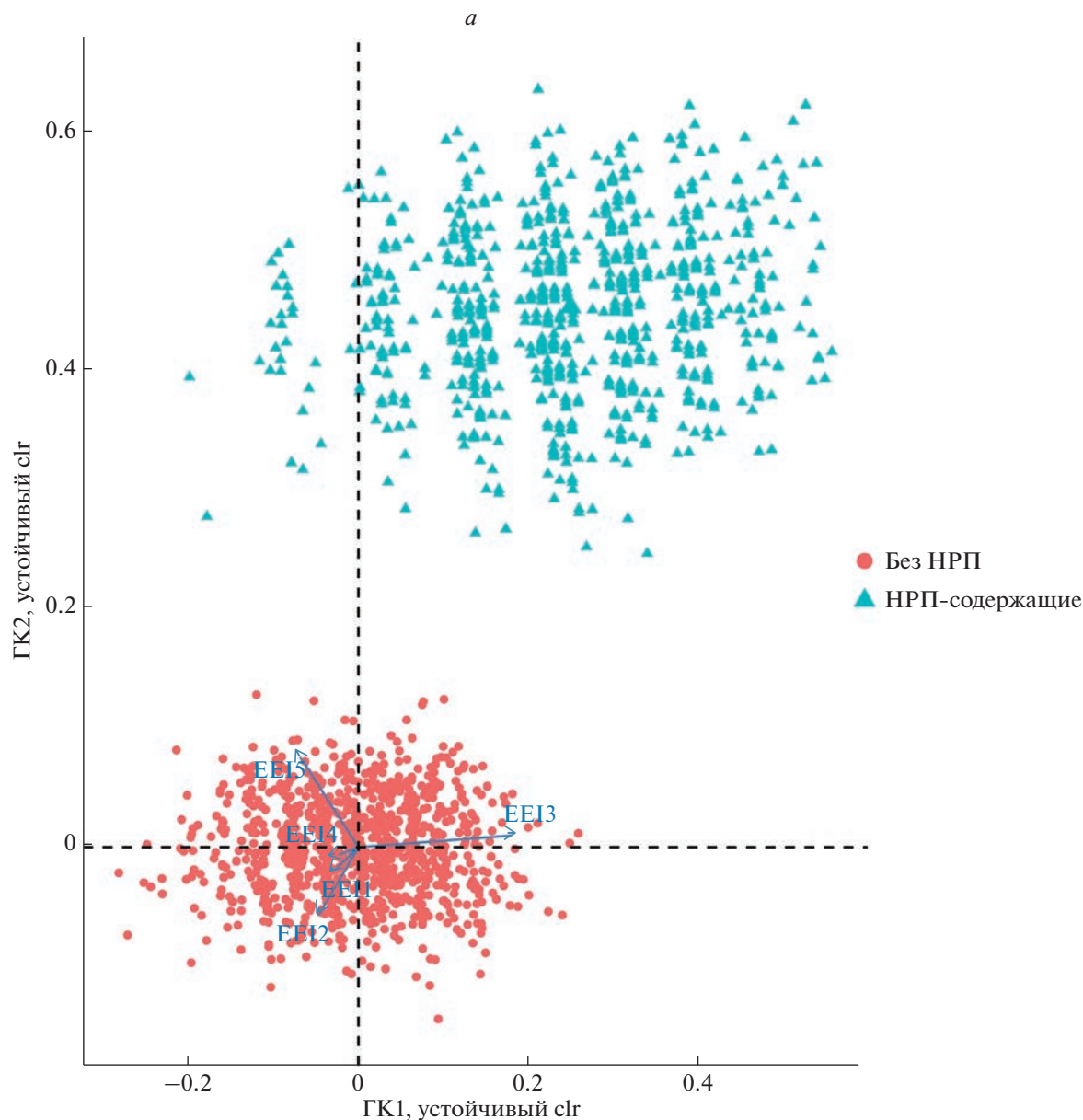


Рис. 5. Результаты анализа методом главных компонент (ГК) для композиционных данных (устойчивый, с обратным преобразованием счетов в пространство clr – центрированных отношений логарифмов) множества композиций по типам EEI, полученного путем ресэмплинга. Кружками отмечены случайные выборки геномов из родов, принадлежащих к группе геномов, НЕ содержащих кластеров генов НРПС, а треугольниками отмечены случайные выборки геномов из родов, принадлежащих к группе геномов, содержащих кластеры генов НРПС. *a* – Фильтрация по базовому порогу ($M \geq 50$); *б* – фильтрация по строгому порогу ($M \geq 75$).

рованы случайным независимым образом из исходной выборки геномов бактерий). Видно, что выборки с кластерами генов НРПС и без них существенно расходятся по компонентам, связанным с индексами EEI2 и EEI5.

Мы проверили устойчивость полученных ранее результатов с использованием фильтрации геномов, для которых оптимальный индекс EEI не может быть установлен с заданным порогом качества. Как указано в разделе “Расчеты EEI для

генов синтетаз нерибосомных пептидов”, средний ранг генов рибосомных белков (M -значение) оказался низким. Поэтому мы рассмотрели два пороговых значения этого параметра, $M \geq 50$ и более строгий – $M \geq 75$. Геномы, не удовлетворяющие этому критерию, были исключены из анализа.

Результаты анализа для двух порогов фильтрации представлены на рис. 5*a, б*. Каждый кружок – это выборка геномов, не содержащих НРП, а

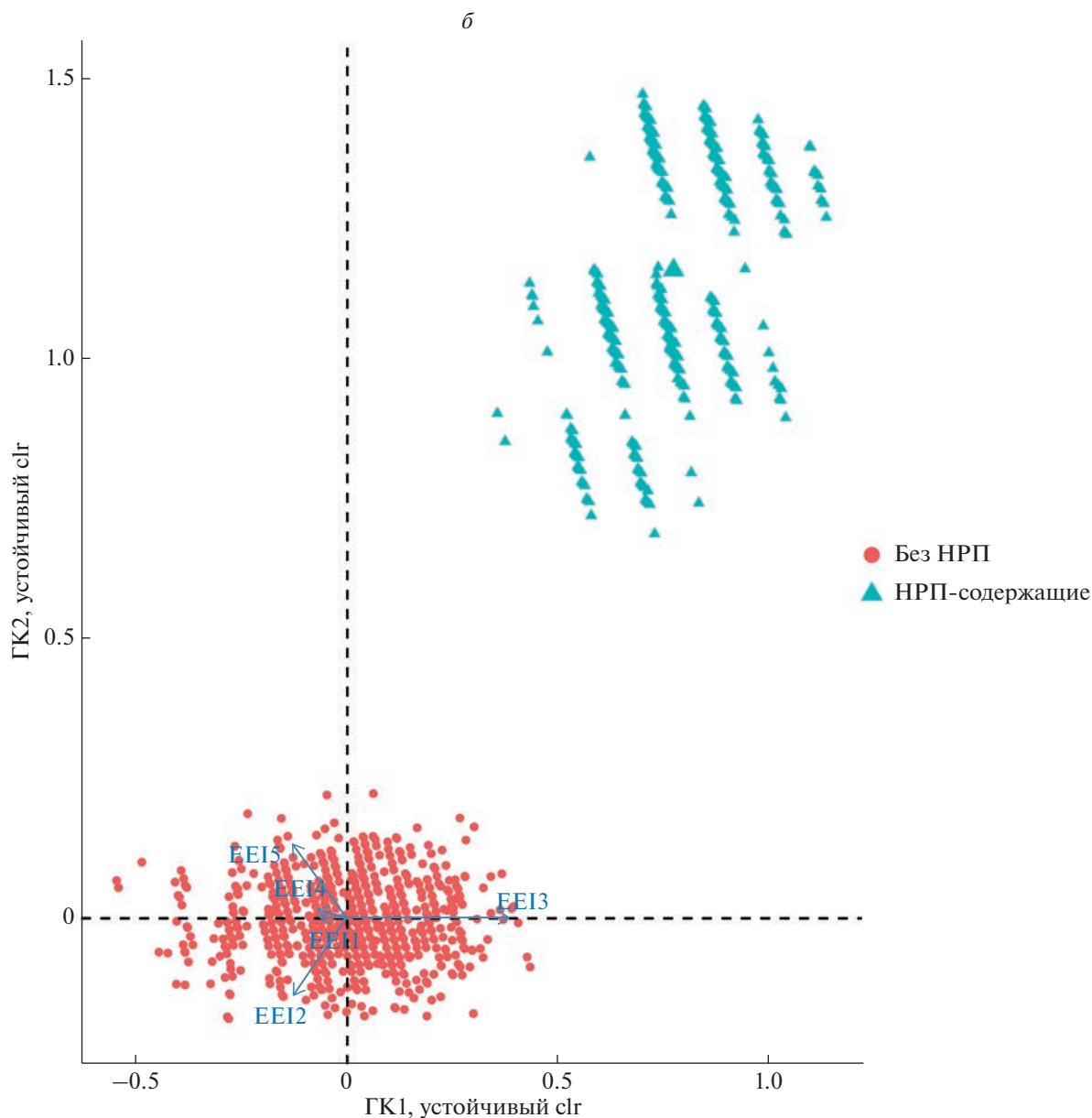


Рис. 5. Окончание.

каждый треугольник — выборка геномов, содержащих НРП. Видно, что эти выборки существенно расходятся по компонентам, связанным с индексами EEI2, EEI5 и EEI3.

В пространстве первых двух главных компонент группы так же четко кластеризуются (см. рис. 4), как и до фильтрации. Однако стоит отметить, что при фильтрации по базовому ($M \geq 50$) и строгому порогу ($M \geq 75$) изменяются сами главные компоненты. Если без фильтрации львиная доля (94%) объясненной дисперсии приходилась на первую главную компоненту, складывающуюся преимущественно из долей EEI2 и EEI5, то после фильтрации по строгому порогу ($M \geq 75$) на

главную компоненту 1 приходится 76% объясненной дисперсии, а на главную компоненту 2, которая преимущественно и различает наши кластеры (и все так же объясняется соотношениями между EEI2 и EEI5) — 14%. Т.е. возросла роль доли геномов с оптимальным типом индекса EEI3 в дисперсии общей выборки.

Наши результаты показывают, что в группах бактерий, различающихся по физиологическому типу (в нашем случае это наличие или отсутствие кластеров генов НРПС), распределение типов EEI может существенно различаться. Эти результаты получены впервые и, по-видимому, свидетельствуют о различиях в метаболизме бактерий,

геномы которых кодируют НРПС, и бактерий, которые их не кодируют. Эти различия могут быть связаны с энергетическими процессами (оптимизацией метаболизма), лежащими в основе трансляции РНК и биосинтеза белков.

Гены синтетаз, которые участвуют в синтезе НРП, могут быть связаны с рядом специфических молекулярных процессов, которые отсутствуют у бактерий, не способных синтезировать НРП. Т.е. способность синтезировать НРП сопровождается увеличением доли геномов, оптимизирующих метаболизм с учетом как частот кодонов, так и минимизации количества и прочности шпилек. Поскольку синтез НРП несет энергетические издержки для бактерий, это приводит к необходимости оптимизировать процесс трансляции на уровне всего генома бактерий данной группы.

Проведенный биоинформатический анализ предоставил информацию о распределении кластеров генов биосинтеза НРПС бактерий (а также самих генов), полученном на основе предсказания эффективности элонгации трансляции. Эти распределения могут существенно различаться у разных таксонов. Выделенные кластеры могут служить объектом дальнейшего изучения функциональной роли НРПС, экспрессия которых обеспечивается данными кластерами.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (17-00-00470 (К) и 17-00-00462). Данные обрабатывали с использованием вычислительных ресурсов ЦКП “Биоинформатика” при поддержке бюджетного проекта № FWNR-2022-0020.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Caboche S., Pupin M., Leclère V., Fontaine A., Jacques P., Kuchero G. (2008) NORINE: a database of nonribosomal peptides. *Nucl. Acids Res.* **36**, 326–331. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm792>
2. Süssmuth R.D., Mainz A. (2017) Nonribosomal peptide synthesis – principles and prospects. *Angew. Chemie – Int. Ed.* **56**, 3770–3821.
3. Kim H.U., Blin K., Lee S.Y., Weber T. (2017) Recent development of computational resources for new antibiotics discovery. *Curr. Opin. Microbiol.* **39**, 113–120.
4. Blin K., Shaw S., Kautsar S.A., Medema M.H., Weber T. (2021) The antiSMASH database version 3: increased taxonomic coverage and new query features for modular enzymes. *Nucl. Acids Res.* **49**(D1), D639–D643.
5. Лихошвай В.А., Матушкин Ю.Г. (2000) Предсказание эффективности экспрессии генов по их нуклеотидному составу. *Молекуляр. биология.* **34**, 406–412.
6. Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G. (2002) Differentiation of single-cell organisms according to elongation stages crucial for gene expression efficacy. *FEBS Lett.* **516**, 87–92.
7. Соколов В.С., Зураев Б.С., Лашин С.А., Матушкин Ю.Г. (2014) EloE – веб-приложение для оценки эффективности элонгации трансляции генов. *Вавиловский журн. генетики и селекции.* **18**, 904–909.
8. Korenskaia A.E., Matushkin Y.G., Lashin S.A., Klimenko A.I. (2022). Bioinformatic assessment of factors affecting the correlation between protein abundance and elongation efficiency in Prokaryotes. *Internat. J. Mol. Sci.* **23**(19), 11996. <https://doi.org/10.3390/ijms231911996>
9. Blin K., Medema M.H., Kottmann R., Lee S.Y., Weber T. (2017) The antiSMASH database, a comprehensive database of microbial secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Nucl. Acids Res.* **45**, D555–D559. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw9601>
10. Filzmoser P., Hron K., Templ M. (2018) Applied compositional data analysis. with worked examples. In: Statistics. Springer Ser., Nature Switzerland AG, Cham, Switzerland. ISBN 978-3-319-96420-1
11. Mukherjee S., Stamatis D., Bertsch J., Ovchinnikova G., Katta H.Y., Mojica A., Chen I.M.A., Kyrpides N.C., Reddy T.B.K. (2019) Genomes OnLine database (GOLD) v.7: Updates and new features. *Nucl. Acids Res.* **47**(D1), D649–D659. <https://doi.org/10.1093/nar/gky977>
12. Turner D.H., Sugimoto N. (1988) RNA structure prediction. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17**, 167–192.
13. Sharp P.M., Li W.H. (1987) The codon adaptation index – a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucl. Acids Res.* **15**, 1281–1295.
14. Filzmoser P., Hron K., Reimann C. (2007) Principal component analysis for compositional data with outliers. *Environmetrics.* **20**, 621–632.

Molecular Mechanisms to Optimize Gene Translation Elongation Differ Significantly in Bacteria with and without Non-Ribosomal Peptides

A. I. Klimenko¹, S. A. Lashin¹, N. A. Kolchanov¹, D. A. Afonnikov¹, and Yu. G. Matushkin¹, *

¹Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: mat@bionet.nsc.ru

Non-ribosomal peptides play an important role in the vital activity of bacteria and have an extremely broad field of biological activity. In particular, they act as antibiotics, toxins, surfactants, siderophores, and also perform a number of other specific functions. Biosynthesis of these molecules does not occur on ribosomes but

by special enzymes that form gene clusters in bacterial genomes. We hypothesized that the presence of non-ribosomal peptide synthesis pathways is a specific feature of bacterial metabolism, which may affect other vital processes of the cell, including translational ones. This work was the first to show the relationship between the translation regulation mechanism of protein-coding genes in bacteria, which is largely determined by the efficiency of translation elongation, and the presence of gene clusters in the genomes for the biosynthesis of non-ribosomal peptides. Bioinformatic analysis of the translation elongation efficiency of protein-coding genes was performed in 11679 bacterial genomes, some of which contained gene clusters of non-ribosomal peptide biosynthesis and some of which did not. The analysis showed that bacteria whose genomes contained clusters of non-ribosomal peptide biosynthetic genes and those without such gene clusters differ significantly in the molecular mechanisms that ensure translation efficiency. Thus, among microorganisms whose genomes contain gene clusters of non-ribosomal peptide synthetases, a significantly smaller part of them is characterized by optimized regulation of the number of local inverted repeats, while most of them have genomes optimized by the averaged energy of inverted repeats studs in mRNA and additionally by codon composition. Our results suggest that the presence of non-ribosomal peptide biosynthetic pathways in bacteria may influence the structure of the overall bacterial metabolism, which is also expressed in the specific mechanisms of ribosomal protein biosynthesis.

Keywords: non-ribosomal peptides, non-ribosomal peptide synthetases, translation elongation efficiency, bacteria, genome annotation

БИОИНФОРМАТИКА И СИСТЕМНАЯ КОМПЬЮТЕРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.218

ПЕРВИЧНАЯ И ВТОРИЧНАЯ микроРНК-МОДУЛЯЦИЯ ВНЕШНЕГО ПУТИ АПОПТОЗА ПРИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЕ

© 2023 г. Т. М. Хлебодарова^{a, b}, П. С. Деменков^{a, b}, Т. В. Иванисенко^{a, b}, Е. А. Антропова^a, И. Н. Лаврик^c, В. А. Иванисенко^{a, b, *}

^aИнститут цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

^bКурчатовский геномный центр, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

^cTranslational Inflammation Research, Medical Faculty, Otto von Guericke University Magdeburg, Magdeburg, 39106 Germany

*e-mail: salix@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 27.08.2022 г.

После доработки 09.09.2022 г.

Принята к публикации 09.09.2022 г.

Гепатоцеллюлярная карцинома — распространенное злокачественное заболевание печени, имеющее высокий уровень рецидивов и низкую пятилетнюю выживаемость. Диагностику гепатоцеллюлярной карциномы, а также прогнозирование течения и ответа на лечение существенно затрудняет структурная и межиндивидуальная неоднородность опухолей, поэтому важным становится пациент-ориентированный подход, определяющим при котором может быть применение миметиков и ингибиторов микроРНК (миРНК), вовлеченных в патогенез заболевания. С этой точки зрения интерес представляют миРНК, aberrantная экспрессия которых ассоциируется с плохим прогнозом и связана с прогрессией опухоли из-за нарушения механизмов регуляции процесса программируемой клеточной гибели (апоптоза). Однако влияние миРНК на развитие опухоли зависит не только от ее прямого воздействия на первичные мишени, но и на вторичные мишени, опосредованные регуляторными путями. И если первичные мишени активно изучаются, то роль вторичных мишеней этих миРНК в модуляции апоптоза до сих пор не ясна. В настоящей работе суммированы данные о миРНК, первичными мишенями которых являются ключевые гены внешнего пути апоптоза. Их aberrantная экспрессия ассоциирована с ранним рецидивом заболевания и его неблагоприятным исходом. С помощью программного комплекса ANDSystem реконструированы пути регуляции экспрессии вторичных мишеней этих миРНК, проведен анализ их влияния на активность внешнего пути апоптоза. Показано, что потенциальный эффект миРНК, опосредованный действием на вторичные мишени, отрицательно коррелирует с числом их первичных мишеней. При поиске маркеров гепатоцеллюлярной карциномы приоритет отдается hsa-miR-373, hsa-miR-106b и hsa-miR-96, действие которых на вторичные мишени усиливает их антиапоптотический эффект.

Ключевые слова: микроРНК, первичные и вторичные мишени, ANDSystem, гепатоцеллюлярная карцинома, программируемая клеточная гибель, внешний путь апоптоза, регуляторные пути

DOI: 10.31857/S0026898423020118, **EDN:** EGEKQP

ВВЕДЕНИЕ

МикроРНК (миРНК) — это класс малых эндогенных одноцепочечных некодирующих РНК длиной ~18–25 нуклеотидов, которые регулируют экспрессию своих генов-мишеней с использованием различных механизмов, включая деградацию мРНК и ингибирование трансляции посредством как прямого связывания с комплементарной последовательностью в 3'-нетранслируемой области (3'UTR) мРНК [1–5], так и регуляции экспрессии генов, опосредованной регуляторными путями. МикроРНК участвуют в регуляции

многих процессов, включая развитие, дифференцировку, выживание клеток, функционирование иммунной системы [6–8]. В базе данных hsa-miR-TarBase (<https://miRTarBase.cuhk.edu.cn/>) представлены экспериментальные данные об участии более 4000 различных миРНК в регуляции активности более 27 тысяч генов-мишеней у 37 видов организмов [9]. У человека нарушения экспрессии миРНК связаны с различными заболеваниями — аллергическими, сердечно-сосудистыми, респираторными, в том числе с сахарным диабетом, бронхиальной астмой [10–14], и онкологическими [15–17].

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) — наиболее распространенный вид первичного рака печени. Ежегодно во всем мире от ГЦК умирает около 750 тыс. человек [18]. ГЦК, имеющая высокий уровень рецидивов и низкую пятилетнюю выживаемость, отличается значительной структурной и межиндивидуальной неоднородностью, что затрудняет диагностику, прогноз и ответ на лечение. В этой связи важным становится индивидуальный, пациент-ориентированный подход. Определяющим при таком подходе может быть использование миметиков и ингибиторов миРНК, играющих существенную роль в регуляции экспрессии генов-мишеней, вовлеченных в патогенез ГЦК [19–22]. С этой точки зрения наибольший интерес представляют миРНК, высокая или низкая экспрессия которых связана с пролиферацией опухоли. Необходимо отметить, что в контексте развития и прогрессирования злокачественных опухолей миРНК, нацеленные на опухолевые гены-супрессоры, функционируют как онкогены. Если aberrantная экспрессия таких онко-миРНК ассоциирована с ранним рецидивом ГЦК и плохим исходом для пациента, то эти миРНК представляют интерес для использования в качестве биомаркеров и терапевтических мишеней.

В качестве перспективной мишени для разработки новых противоопухолевых средств интерес представляет внешний путь апоптоза, индуцируемый через клеточные рецепторы смерти — отдельной подгруппе семейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNF, tumor necrosis factor) (см. обзор [23]). Наиболее хорошо изучен рецептор CD95 (Fas/APO-1). Активацию этого пути связывают, в том числе, с повреждениями ДНК и репликативным стрессом, ведущими к нарушению регуляции клеточного деления и развитию ГЦК. Реализуется этот путь через взаимодействие белков FADD (Fas-associated DD-protein), cFLIP (cellular FLICE inhibitory protein) и прокаспазы-8, ведущему к формированию макромолекулярного комплекса DISC (Death Inducing Signaling Complex), обеспечивающего активацию внешнего сигнального пути апоптоза через образование активной формы каспазы-8 [23–26] и дальнейшей активации каспазного каскада с участием каспаз-3 и -7. Данные о миРНК, aberrantная экспрессия которых при ГЦК напрямую связана с нарушением активности внешнего пути апоптоза и с плохим прогнозом, суммированы в настоящей работе. Однако эффект миРНК на развитие опухоли зависит не только от их прямого влияния на первичные мишени — экспрессию генов внешнего пути апоптоза, но и на вторичные мишени, опосредованные регуляторными путями. Механизмы модуляции внешнего пути апоптоза при ГЦК посредством действия миРНК на первичные мишени активно изучаются, тогда как о роли вторичных мишеней известно не слишком много. Для

решения этого вопроса мы использовали разработанную нами ранее программно-информационную систему ANDSystem, предназначенную для реконструкции генных сетей на основе информации, извлеченной из фактографических баз данных, или полученной путем автоматического анализа текстов научных публикаций [27–30]. ANDSystem широко применяется для реконструкции и анализа генных сетей. В частности, с использованием ANDSystem осуществлена реконструкция ассоциомы преэклампсии [31], идентифицированы новые гены, связанные с восприимчивостью к туберкулезу [32], реконструирован и проанализирован интерактом вируса гепатита С [33], проведен поиск новых генов-кандидатов, потенциально ассоциированных с коморбидностью астмы и гипертензии [34], проанализирована программируемая клеточная гибель при заражении SARS-CoV-2 [35].

В настоящей работе с помощью ANDSystem проведена реконструкция и анализ регуляторных путей, описывающих действие онко-миРНК на активность ключевых генов внешнего пути апоптоза, которые являются одновременно и первичными мишенями одних, и вторичными мишенями других миРНК. Оказалось, что ожидаемый модулирующий антиапоптотический эффект данных миРНК на первичные мишени может быть как усилен, так и ослаблен их действием на вторичные мишени согласно реконструированным регуляторным путям. Показано, что ожидаемый потенциальный эффект не прямой модуляции внешнего пути апоптоза за счет регуляции экспрессии вторичных мишеней, отрицательно коррелирует с числом первичных мишеней миРНК — чем больше первичных мишеней у миРНК, тем слабее суммарный антиапоптотический эффект от действия на вторичные мишени.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реконструкция молекулярно-генетических путей. Молекулярно-генетические пути для описания влияния миРНК на экспрессию генов-вторичных мишеней реконструировали с помощью программно-информационной системы ANDSystem [26–29]. ANDSystem содержит глобальную генную сеть, описывающую взаимодействия между объектами онтологии ANDSystem, для формирования которой проведен массовый анализ текстов абстрактов PubMed и полнотекстовых статей PubMed Central. Всего в ANDSystem представлено 13 типов разных объектов (белки, гены, метаболиты, заболевания, миРНК и т.д.) и 24 типа различных взаимодействий (физические взаимодействия, регуляция экспрессии, регуляция активности, регуляция стабильности и т.д.). Программный модуль ANDVisio обеспечивает графический интерфейс для пользовательского доступа

к базе знаний, который позволяет реконструировать целевые геновые сети, а также с помощью шаблонов проводить поиск регуляторных путей в глобальной геновой сети. Шаблоны представляют собой линейную цепочку объектов и связей между ними. Объекты могут быть заданы списком конкретных имен/идентификаторов, либо только типом объекта. В первом случае при поиске путей будут рассматриваться только эти конкретные объекты, а во втором, все объекты заданного типа.

Программа осуществляет поиск в глобальной сети путей, которые удовлетворяют требованиям шаблона. В данной работе использован шаблон, включающий четыре участника: (1) миРНК; (2) белок, являющийся первичной мишенью миРНК; (3) ген — вторичная мишень миРНК, экспрессия которого может регулироваться белком — первичной мишенью 2; и (4) белок — продукт экспрессии гена 3. Участники 1 и 4 задавались списком соответствующих идентификаторов из баз данных miRbase (<https://www.miRbase.org/>) [36] и Swiss-Prot (<https://www.expasy.org/resources/uniprotkb-swiss-prot>) [37]. Участники 2 и 3 задавались только типом объекта, “gene” и “protein” соотв. Разрешенные типы взаимодействий в цепочке пути заданы следующими: между участниками 1 и 2 — “microRNA regulation”; между участниками 2 и 3 — “expression regulation”, “expression upregulation”, “expression downregulation”, “interaction” (при работе программы между указанными типами взаимодействий применяется логическое ИЛИ); между участниками 3 и 4 — “expression” (экспрессия гена).

Потенциальный антиапоптотический эффект миРНК. Потенциальный антиапоптотический эффект миРНК при их действии на экспрессию генов-вторичных мишеней оценивали по следующей формуле:

$$Ea = \delta \left(\sum_{g \in AAP} Eg - \sum_{g \in PAP} Eg \right), \quad (1)$$

где AAP — множество антиапоптотических генов, PAP — множество проапоптотических генов, $\delta = 1$, если экспрессия миРНК при ГЦК повышена, $\delta = -1$, если снижена.

$$Eg = N_1 - N_2, \quad (2)$$

где Eg — суммарный эффект миРНК на экспрессию гена-вторичной мишени, N_1 — число регуляторных путей с положительной регуляцией экспрессии (тип связи “expression upregulation” между участниками 2 и 3 в шаблоне), N_2 — число регуляторных путей с отрицательной регуляцией экспрессии (тип связи “expression downregulation” между участниками 2 и 3 в шаблоне). Значение Eg характеризует только эффект действия миРНК на экспрессию гена-мишени, а не на апоптоз. Чем больше значение Eg , тем больше регу-

ляторных путей обеспечивают активацию экспрессии гена-мишени. Про- и антиапоптотический эффект миРНК в зависимости от значений Eg определяется принадлежностью гена-мишени к множеству про- и антиапоптотических генов.

Согласно уравнению (1), суммарный антиапоптотический эффект (Ea) миРНК на активность процесса оценивали с помощью разности суммарных вкладов (Eg) генов-регуляторов в экспрессию анти- и проапоптотических генов, являющихся вторичными мишенями миРНК. При такой оценке эффекта положительные значения Ea характеризуют повышенную супрессию апоптоза (онкогенная активность), а отрицательные значения — повышенную индукцию апоптоза (онкосупрессорная активность).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Регуляция внешнего пути активации программируемой гибели клеток при гепатоцеллюлярной карциноме, опосредованная действием миРНК на первичные мишени

На рис. 1 приведена схема процесса программируемой клеточной гибели, который реализуется через рецепторы смерти (CD95, DR4/5; внешний путь апоптоза). Компонентами этого пути являются белки FADD, cFLIP и прокаспазы-8, взаимодействие которых ведет к формированию макромолекулярного комплекса DISC, обеспечивающего процесс активации внешнего пути апоптоза через образование активной формы каспазы-8 [23–26]. Одновременно активируется и внутренний (митохондриальный) путь апоптоза, медиатором которого является белок BID (BH3 interacting domain death agonist). Активация BID связана с его расщеплением каспазой-8 с последующей ассоциацией с внешней митохондриальной мембраной, что приводит к образованию митохондриальных пор и индукции апоптоза [38–40]. Указаны миРНК, участвующие в регуляции ключевых генов этого пути через прямое (физическое) взаимодействие с их мРНК, экспрессия которых нарушена при ГЦК.

Данные о миРНК, aberrантная экспрессия которых при ГЦК связана с нарушением активности внешнего пути апоптоза и ассоциирована с плохим прогнозом, получены из результатов анализа пациент-специфических данных по дифференциальной экспрессии миРНК в ГЦК, представленных в научной литературе. Эти данные суммированы на рис. 1 и в табл. 1.

Анализ этих данных показал, что с ранним рецидивом ГЦК и плохим исходом заболевания коррелирует высокий уровень экспрессии hsa-miR-21-5p и hsa-miR-106b [41, 42], действие которых направлено на гены лиганда Fas рецептора смерти FASLG и рецептора смерти DR-4, соот-

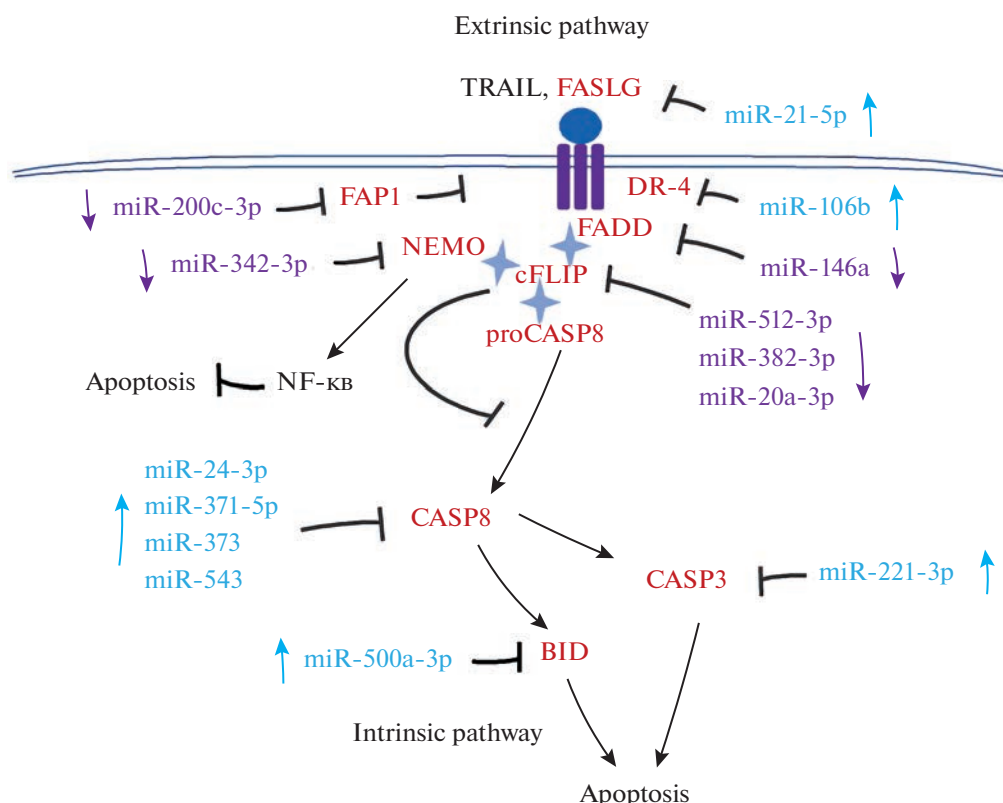


Рис. 1. Схема компонентов внешнего пути апоптоза и микроРНК, участвующих в его регуляции при ГЦК. Обозначения: BID (Bcl-2 homolog (BH)3-only protein, BH3 interacting domain death agonist), CD95/Fas/APO-1 (Death receptor), CASP-3, -8 (caspase-3, -8), cFLIP / CFLAR (cellular FADD-like interleukin-1b-converting enzyme (FLICE)-inhibitory protein/CASP8 and FADD like apoptosis regulator), DR-4 (death receptor 4), FADD (Fas associated via death domain), FAP1 (Fas-associated phosphatase-1), FASLG (FAS ligand), NF-κB (Nuclear factor kappa-B), NEMO (NF-κB essential modulator/IκB kinase γ), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Apoptosis – апоптоз, Extrinsic pathway – внешний путь апоптоза, Intrinsic pathway – внутренний путь апоптоза. Черные стрелки – активация функции соответствующего белка или экспрессии его гена, стрелки с тупым концом – блокирование. Красным отмечены белки, экспрессия генов которых контролируется микроРНК, голубым выделены онко-микроРНК, фиолетовым – супрессоры. Цветные стрелки, направленные вверх, указывают на повышенный уровень экспрессии соответствующих микроРНК при ГЦК, направленные вниз – на пониженный. Значок + указывает на взаимодействие между отмеченными белками.

ветственно, а также целого набора микроРНК, блокирующих экспрессию генов каспаз-8 и -3 (рис. 1) [43, 44].

В то же время, при ГЦК снижен уровень микроРНК hsa-miR-200c [45], регулирующей экспрессию гена *Fap-1* Fas-ассоциированной фосфатазы [46] – ингибитора CD95 рецептора [47, 48], hsa-miR-146a, контролирующей экспрессию гена белка FADD [49, 50], участвующего в формировании макромолекулярного комплекса DISC [25, 26, 51], а также hsa-miR-512-3p, hsa-miR-382-3p и hsa-miR-20a-3p, блокирующих экспрессию гена белка cFLIP, негативно влияющего на активацию прокаспазы-8 [52, 53] (рис. 1). Известно, что изменение количественного соотношения FADD и FLIP и прокаспазы-8 определяет баланс между апоптотической гибелью и выживанием клеток [54, 55].

Белок c-FLIP в составе комплекса DISC также вовлечен в активацию антиапоптотического сигнального пути NF-κB. Особую роль в этом про-

цессе играет белок-белковое взаимодействие c-FLIP с белком NEMO (NF-κB essential modulator, известный как IKKγ, IκB kinase γ) – ключевым активатором сигнального пути NF-κB [56–58]. Одним из механизмов повышения пролиферации опухолевых клеток при ГЦК может быть активация сигнального пути NF-κB через взаимодействие белков c-FLIP/NEMO. Такая возможность подтверждается снижением уровня микроРНК hsa-miR-342-3p [59], ведущим к активации экспрессии гена белка NEMO и увеличением его количества в клетках гепатомы.

Таким образом, при ГЦК микроРНК часто блокируют первые этапы сигнального пути, связанные с активацией рецепторов смерти на мембране клетки, и сам каспазный каскад через ингибирование экспрессии гена иницирующей каспазы-8 и эффекторной каспазы-3. При этом изменение уровня всех описанных микроРНК, контролирующей активность компонентов внешнего пути

Таблица 1. Список миРНК, участвующих в регуляции внешнего пути апоптоза, экспрессия которых нарушена при гепатоцеллюлярной карциноме

миРНК	Нуклеотидная последовательность*	Изменение экспрессии	Мишень	Ссылка
miR-21-5p	5'-UUGUAACCCAUUGUUAUUCGAU	↑	FASLG	[42]
miR-106b	3'-UAGACGUGACAGUCGUGAAAU-5'	↑	DR-4	[41]
miR-200c	3'-AGGUAGUAAUGGGCCGUCUAAU-5'	↓	Fap-1	[45, 46]
miR-146a	3'-UAGUCAGACUUAUUCGAU-5'	То же	FADD	[49, 50]
miR-20a-3p	3'-GAAAUUCACGAGAUUACGUCA-5'	“_”	c-FLIP	[60]
miR-512-3p	3'-CUGGAGUCGAUACUGUCGUGAA-5'	“_”	c-FLIP	[61]
miR-382-3p	3'-UUCACAACAGGCACUUAACUAA-5'	“_”	c-FLIP	[62]
miR-342-3p	3'-UGCCACGCUAAAGACACACUCU-5'	“_”	NEMO (IKK γ)	[59]
miR-24-3p	3'-GACAAGGACGACUUGACUCGGU-5'	↑	Каспаза-8	[43]
miR-543	3'-UUCUUCACGUGGCGCUUACAAA-5'	То же	То же	[44]
miR-371-5p	3'-UCACGGGGGUGUCAAAACUCA-5'	“_”	“_”	
miR-373	3'-UGUGGGGUUUUAGCUUCGUGAAG-5'	“_”	“_”	
miR-96-5p	3'-UCGUUUUUACACGAUCACGGUUU-5'	“_”	Каспаза-9	[63]
miR-221-3p	3'-CUUUGGGUCGUCUGUUACAUCGA-5'	“_”	Каспаза-3	[43]

*Жирным выделен сайт связывания миРНК с мРНК гена-мишени;

↓ — снижение экспрессии;

↑ — повышение экспрессии.

апоптоза, логично связаны с его блокированием в клетках гепатомы.

С другой стороны, необходимо отметить, что в гетерогенных опухолях, таких как ГЦК, эффект каждой миРНК может быть связан и с другими ее мишенями, способными не только модулировать активность апоптоза, но и влиять на прогрессию опухоли, используя другие механизмы. В качестве примера можно рассмотреть вторичные мишени hsa-miR-24, hsa-miR-21, hsa-miR-200c и hsa-miR-373. Оказалось, что мишенью hsa-miR-24, помимо гена каспазы-8 (инициирующей каспазы внешнего пути апоптоза), является ген белка p53 — ключевого регулятора митохондриального пути апоптоза [64]. Таким образом, повышение уровня этой миРНК при ГЦК приводит к блокированию обоих путей апоптоза и способствует усилению прогрессии опухоли.

В число мишеней hsa-miR-21, помимо гена Fas лиганда, активатора внешнего пути апоптоза, входят ген *PDCD4* (programmed cell death factor 4), кодирующий негативный регулятор антиапоптотических белков внутреннего пути апоптоза Bcl-x_L и XIAP [65], и ген фосфатазы PTEN — негативного регулятора сигнального пути PI3K/АКТ [66–68]. В рассмотренном примере повышенный уровень этой миРНК при ГЦК способствует не только блокированию внешнего и внутреннего путей апоптоза, но также пролиферации клеток опухоли через активацию сигнального пути PI3K/АКТ и его эффекторов [69, 70]. В обоих случаях миРНК действуют как онкогены.

миРНК hsa-miR-200c в целом действует как онкосупрессор и низкий уровень ее экспрессии

при ГЦК ассоциирован с неблагоприятным прогнозом заболевания. Ее мишенями, помимо гена Fas-ассоциированной фосфатазы 1 — ингибитора рецептора CD95 внешнего пути апоптоза, служат гены циклина E2, киназы RIP2 (Receptor-interacting protein 2) и проапоптотического белка Noxa [46, 71–73]. Таким образом, низкий уровень этой миРНК при ГЦК способствует активации Noxa и внутреннего пути апоптоза, при этом он, однако, ассоциирован с плохим исходом заболевания [45], что, по-видимому, связано с действием этой миРНК на другие гены-мишени, активация которых способствует пролиферации клеток опухоли, развитию воспалительного процесса в печени и блокированию внешнего пути апоптоза [74–77]. Не исключено, что существуют и другие причины плохого прогноза при ГЦК, связанные с низким уровнем миРНК hsa-miR-200c.

Исключением из этого ряда выглядит hsa-miR-373, которая в одних исследованиях позиционируется как онко-миРНК, уровень которой повышен в злокачественных опухолях, включая ГЦК [44, 78], а в других — как супрессор опухоли с пониженным уровнем в клетках ГЦК [79]. В первом случае hsa-miR-373 влияет на активность генов каспазы-8 [44] и CD44, маркера опухолевых стволовых клеток [78], тогда как во втором — действие этой миРНК направлено на фактор транскрипции TFAP4 (transcription factor activating enhancer binding protein 4), активация экспрессии которого при ГЦК способствует пролиферации клеток опухоли и блокированию апоптоза через сигнальный путь PI3K/АКТ [79]. Таким образом, нарушение экспрессии hsa-miR-373

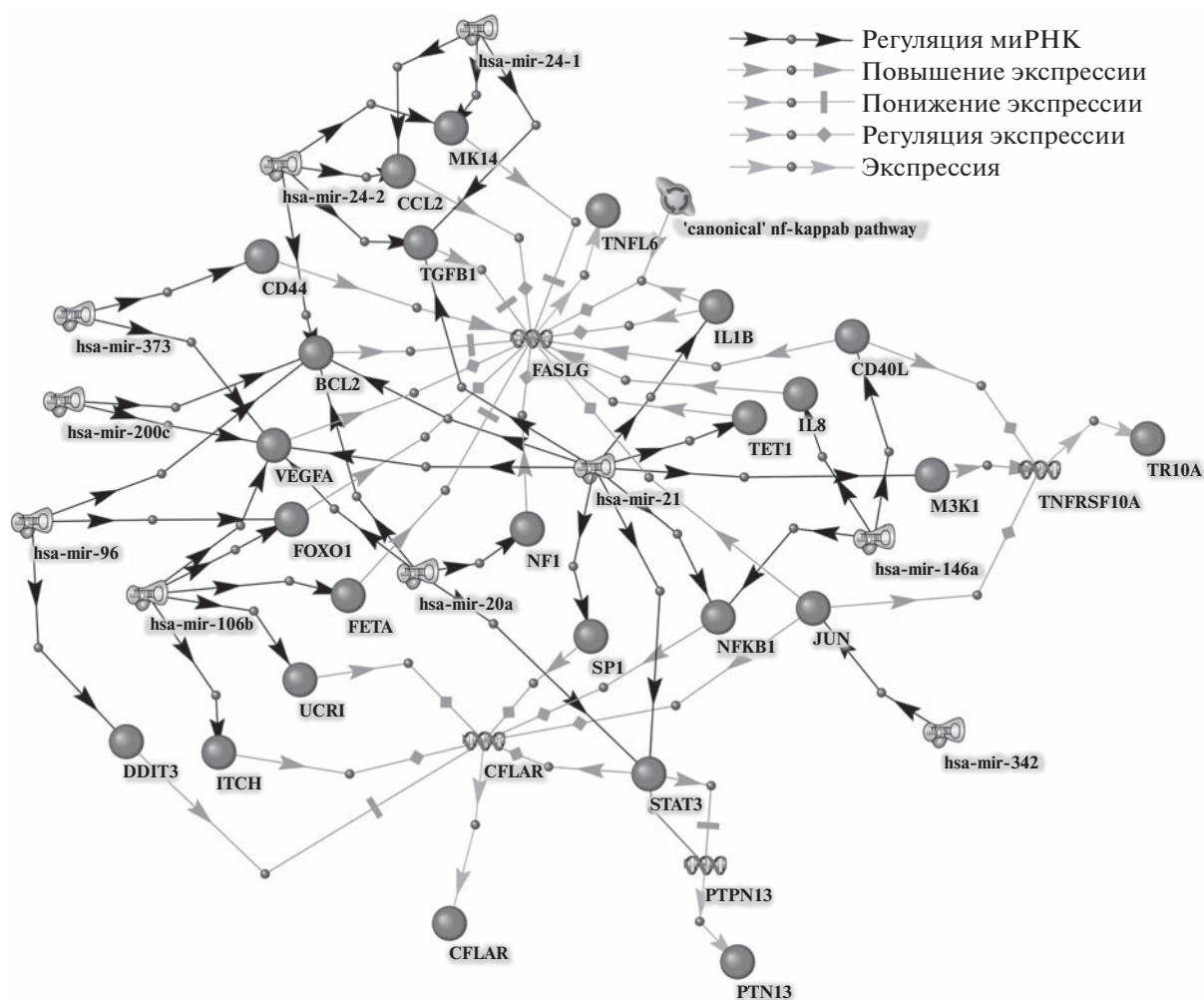


Рис. 2. Регуляторные пути экспрессии генов вторичных мишеней микроРНК, построенные с использованием ANDSsystem. Обозначения: BCL2 (B-cell lymphoma 2), CCL2 (C-C Motif Chemokine Ligand 2), CD (Crohn's disease, receptor), CD40L (CD40 ligand), CFLAR (CASP8 and FADD like apoptosis regulator), DDIT3 (DNA damage induced transcript 3), FASLG (FAS ligand), FETA (α -fetoprotein), FOXO1 (Forkhead box O protein 1), IL1B/8 (Interleukin 1B/8), ITCH (Itchy E3 ubiquitin-protein ligase), JUN (proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit), M3K1 (Mitogen-activated protein kinase kinase 1), MK14 (Mitogen-activated protein kinase 14), hsa-miR (microRNA *Homo sapiens*), NF1 (Nuclear factor 1), NFKB1 (Nuclear factor kappa-B 1), PTPN13/PTN13 (Tyrosine-protein phosphatase nonreceptor type 13), SP1 (Specificity protein 1, transcription factor), STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), TGFB1 (Transforming growth factor beta 1), TET1 (Ten-eleven translocation 1), TNFRSF10A/TR10A (Tumor necrosis factor receptor superfamily 10A), UCRI (Ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunits), VEGFA (Vascular endothelial growth factor receptor), 'canonical' nf-kappab pathway – Канонический путь NF-kB.

в злокачественных опухолях не зависит от того, действует она, как онкоген или как опухолевый супрессор, а конкретное проявление ее эффекта зависит от набора генов-мишеней, участвующих в этом ответе [80].

В целом, это означает, что при выборе маркера, связанного с неблагоприятным прогнозом развития ГЦК, необходим дополнительный анализ всего спектра мишеней интересующей микроРНК. Такого рода анализ проведен для микроРНК, aberrantная экспрессия которых при ГЦК блокирует ключевые гены внешнего пути апоптоза и ассоциирована с плохим прогнозом заболевания (см. табл. 1).

Регуляция внешнего пути активации программируемой гибели клеток при гепатоцеллюлярной карциноме, опосредованная действием микроРНК на вторичные мишени

На этом этапе исследования проведен поиск вторичных мишеней микроРНК, представленных в табл. 1, aberrantная экспрессия которых при ГЦК негативно влияет на активность внешнего пути апоптоза. Оценено потенциальное влияние микроРНК на внешний путь апоптоза через данные мишени. Пространство поиска вторичных мишеней было ограничено первичными мишенями. Мы предположили, что первичная мишень одной микроРНК может оказаться вторичной мишенью

Таблица 2. Регуляция экспрессии миРНК генов-мишеней внешнего пути апоптоза при гепатоцеллюлярной карциноме посредством регуляторных путей

миРНК	Экспрессия	Первичные мишени, общее число	Вторичные мишени	Регуляторные пути, число		E_g	E_a
				N_1	N_2		
hsa-miR-373	↑	60	<i>FASLG</i>	0	2	–2	2
hsa-miR-106b	То же	203	<i>FASLG</i> <i>CFLAR (c-FLIP)</i>	1 1	2 1	–1 0	1
hsa-miR-96	“–”	74	<i>FASLG</i> <i>CFLAR (c-FLIP)</i>	1 1	1 0	0 1	1
hsa-miR-24-1 (miR-24-3p)	“–”	249	<i>FASLG</i>	2	1	1	–1
hsa-miR-24-2 (miR-24-3p)	“–”	249	<i>FASLG</i>	3	1	2	–2
hsa-miR-21-5p	“–”	398	<i>FASLG</i> <i>CFLAR (c-FLIP)</i> <i>PTN13 (Fap-1)</i> <i>TNFRSF10A (DR4)</i>	3 0 1 0	2 3 0 1	1 –3 1 –1	–2
hsa-miR-200c	↓	44	<i>FASLG</i>	1	1	0	0
hsa-miR-342	То же	91	<i>FASLG</i> <i>CFLAR (c-FLIP)</i> <i>TNFRSF10A (DR4)</i>	0 0 0	1 1 1	–1 –1 –1	–1
hsa-miR-20a	“–”	155	<i>CFLAR (c-FLIP)</i> <i>PTN13 (Fap-1)</i> <i>FASLG</i>	0 1 1	1 0 2	–1 1 –1	–1
hsa-miR-146a	“–”	52	<i>FASLG</i> <i>CFLAR (c-FLIP)</i> <i>TNFRSF10A (DR4)</i>	0 0 0	2 1 1	–2 –1 –1	–2

N_1 – число регуляторных путей с положительной регуляцией экспрессии; N_2 – число регуляторных путей с отрицательной регуляцией экспрессии; E_g – влияние миРНК на экспрессию гена-вторичной мишени; E_a – суммарный антиапоптотический эффект миРНК при действии на экспрессию всех генов-вторичных мишеней; ↓ – экспрессия снижена, ↑ – экспрессия повышена.

другой миРНК. Очевидно, что такое сетевое взаимодействие разных миРНК может приводить к усилению или ослаблению их действия на свои мишени и, как результат, к модуляции внешнего пути апоптоза.

С помощью системы ANDSystem для каждой миРНК по заданному шаблону реконструированы регуляторные пути, посредством которых миРНК потенциально может влиять на экспрессию генов из набора первичных мишеней других миРНК (рис. 2).

Как мы и ожидали, многие миРНК используют в качестве вторичных мишеней несколько первичных мишеней других миРНК (табл. 2). Однако не все миРНК способны регулировать экспрессию первичных мишеней других миРНК. Оказалось, что регуляторные пути найдены толь-

ко для 10 из 14 онко-миРНК (табл. 2). В этих регуляторных путях представлены только четыре из семи генов-первичных мишеней. В их числе оказались два проапоптотических гена – *FASLG* (FAS-лиганд) и *TNFRSF10A* (рецептор DR-4), а также два антиапоптотических гена – *PTN13* (Fas-ассоциированная фосфатаза 1) и *CFLAR* (негативный регулятор каспазы-8 – белок c-FLIP).

Модулирующий эффект миРНК на внешний путь апоптоза вторичных мишеней оценивали, суммируя потенциальные вклады каждой вторичной мишени согласно уравнению (1). Показано, что действие миРНК на вторичные мишени потенциально может вести как к усилению, так и к ослаблению антиапоптотического эффекта.

Например, показатель антиапоптотического эффекта ($E_a = 2$), опосредованного действием

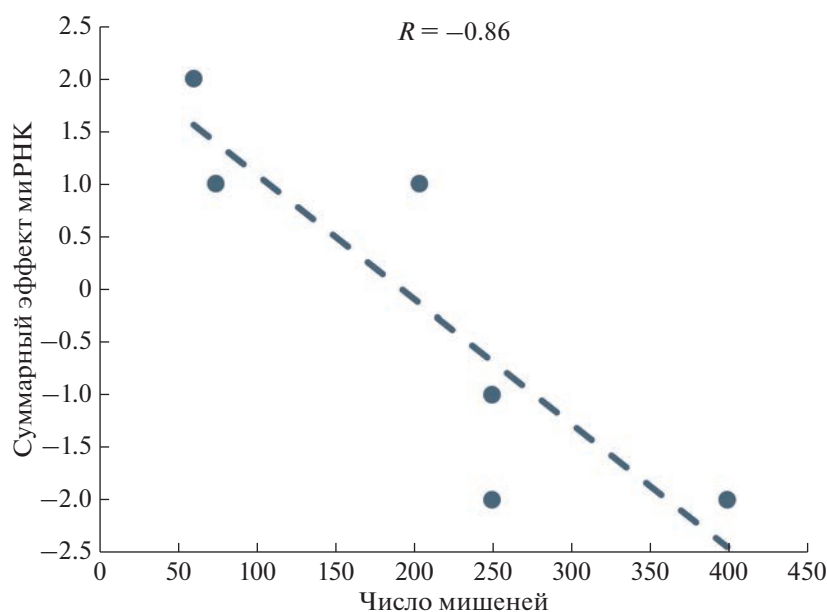


Рис. 3. Зависимость между числом мишеней микроРНК, экспрессия которых повышена при ГЦК, и их суммарным эффектом (E_a) на внешний путь апоптоза посредством регуляторных путей. Парный коэффициент корреляции R составил -0.86 ($P = 0.025$).

вторичных мишеней, был наибольшим у микроРНК hsa-miR-373 (табл. 2). Первичной мишенью этой микроРНК, непосредственно связанной с внешним путем апоптоза, является каспаза-8 (табл. 1). Согласно данным ANDSystem, эта микроРНК имеет еще 59 других первичных мишеней. Как видно из рис. 2, две из этих мишеней (белки VEGFA и CD44) могут осуществлять положительную регуляцию экспрессии гена *FASLG*, что ведет к активации апоптоза [81, 82]. Таким образом, подавляя экспрессию белков VEGFA и CD44, hsa-miR-373 может снижать экспрессию своей вторичной мишени — гена *FASLG*, что, в свою очередь, дает эффект отрицательной модуляции внешнего пути апоптоза или повышенного антиапоптотического эффекта. Однако следует особо отметить, что все реконструированные регуляторные пути представляют собой описание потенциальных молекулярно-генетических событий в клетке и требуют дальнейшего экспериментального подтверждения.

Величина антиапоптотического эффекта микроРНК, экспрессия которых увеличена при ГЦК (табл. 2), отрицательно коррелировала с общим числом их первичных мишеней (рис. 3). Эта зависимость хорошо согласуется с наблюдениями, согласно которым высокая полифункциональность генов или белков может приводить к интерференции регуляторных путей [83]. Интересно, что микроРНК, экспрессия которых подавлена при ГЦК, не показали ни положительной, ни отрицательной корреляции. Этот результат может быть связан с тем, что отсутствие активного действия микроРНК с подавленной экспрессией на первич-

ные и вторичные мишени можно рассматривать как некий пассивный сигнал. Можно предположить, что закономерности распространения таких пассивных сигналов по регуляторным путям имеют свои особенности. Однако использование нами очень ограниченной выборки микроРНК не позволяет сделать каких-либо уверенных выводов. Для проведения такого анализа следует использовать большие наборы данных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенный нами анализ пациент/тканеспецифической экспрессии микроРНК, дифференциально экспрессирующихся в клетках ГЦК, показал, что практически все компоненты рецепторопосредованного (внешнего) пути программируемой клеточной гибели подвержены регуляции со стороны микроРНК, причем изменение уровня их экспрессии при ГЦК логично связано с блокированием активности апоптоза. Все выявленные микроРНК тесно связаны с неблагоприятным прогнозом и активно обсуждаются как маркеры ГЦК.

Анализ эффектов вторичных мишеней рассмотренных микроРНК показал, что потенциальный эффект модулирования внешнего пути апоптоза через вторичные мишени микроРНК отрицательно коррелирует с числом их первичных мишеней — антиапоптотический эффект снижается с увеличением числа мишеней. Эта закономерность хорошо объясняется тем, что с увеличением числа мишеней неизбежно увеличивается число связанных с ними регуляторных путей в глобальной

генной сети, что, в свою очередь, увеличивает вероятность их интерференции. Проблема потенциальных конфликтов между отдельными функциями полифункциональных макромолекул носит широкий характер.

Таким образом, спектр первичных и вторичных мишеней некоторых миРНК при ГЦК может быть связан с регуляцией процессов, вносящих как однонаправленный, так и разнонаправленный вклад в прогрессию заболевания.

Полученные результаты могут помочь при выборе мишеней для снижения агрессивности опухоли, а анализ вторичных мишеней позволяет рассматривать как приоритетные hsa-miR-373, hsa-miR-106b и hsa-miR-96, действие которых на вторичные мишени усиливает их антиапоптотический эффект.

Работа выполнена в рамках проекта ERA-NET “Target identification and drug development in liver cancer (TAIGA)” (соглашение с Минобрнаукой России No 075-15-2021-944).

В работе не использовали людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fabian M.R., Sonenberg N., Filipowicz W. (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 351–379.
2. Vasudevan S. (2012) Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley. Interdiscip. Rev. RNA*. **3**, 311–330.
3. Saliminejad K., Khorram Khorshid H.R., Soleymani Fard S., Ghaffari S.H. (2019) An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J. Cell. Physiol.* **234**, 5451–5465.
4. Hill M., Tran N. hsa-miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. (2021) *Dis. Model. Mech.* **14**, dmm047662.
5. Leitão A.L., Enguita F.J. (2022) A structural view of hsa-miRNA biogenesis and function. *Noncoding RNA*. **8**, 10.
6. Shivdasani R.A. (2006) MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood*. **108**, 3646–3653.
7. Gracias D.T., Katsikis P.D. (2011) MicroRNAs: key components of immune regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **780**, 15–26.
8. Mens M.M.J., Ghanbari M. (2018). Cell cycle regulation of stem cells by microRNAs. *Stem. Cell. Rev. Rep.* **14**, 309–322.
9. Huang H.Y., Lin Y.C., Cui S., Huang Y., Tang Y., Xu J., Bao J., Li Y., Wen J., Zuo H., Wang W., Li J., Ni J., Ruan Y., Li L., Chen Y., Xie Y., Zhu Z., Cai X., Chen X., Yao L., Chen Y., Luo Y., LuXu S., Luo M., Chiu C.M., Ma K., Zhu L., Cheng G.J., Bai C., Chiang Y.C., Wang L., Wei F., Lee T.Y., Huang H.D. (2022) hsa-miRTarBase update 2022: an informative resource for experimentally validated hsa-miRNA-target interactions. *Nucl. Acids Res.* **50**, D222–D230.
10. Nazari-Jahantigh M., Egea V., Schober A., Weber C. (2015) MicroRNA-specific regulatory mechanisms in atherosclerosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **89**, 35–41.
11. Aghabozorgi A.S., Ahangari N., Eftekhari T.E., Torbati P.N., Bahiraei A., Ebrahimi R., Pasdar A. (2019) Circulating exosomal hsa-miRNAs in cardiovascular disease pathogenesis: New emerging hopes. *J. Cell. Physiol.* **234**, 21796–21809.
12. He X., Kuang G., Wu Y., Ou C. (2021) Emerging roles of exosomal hsa-miRNAs in diabetes mellitus. *Clin. Transl. Med.* **11**, e468.
13. Weidner J., Bartel S., Kılıç A., Zissler U.M., Renz H., Schwarze J., Schmidt-Weber C.B., Maes T., Rebane A., Krauss-Etschmann S., Rådinger M. (2021) Spotlight on microRNAs in allergy and asthma. *Allergy*. **76**, 1661–1678.
14. Zhang L., Zhang J., Qin Z., Liu N., Zhang Z., Lu Y., Xu Y., Zhang J., Tang J. (2022) Diagnostic and predictive values of circulating extracellular vesicle-carried microRNAs in ischemic heart disease patients with type 2 diabetes mellitus. *Front. Cardiovasc. Med.* **9**, 813310.
15. Xie Y., Dang W., Zhang S., Yue W., Yang L., Zhai X., Yan Q., Lu J. (2019) The role of exosomal noncoding RNAs in cancer. *Mol. Cancer*. **18**, 37.
16. Ali Syeda Z., Langden S.S.S., Munkhzul C., Lee M., Song S.J. (2020) Regulatory mechanism of microRNA expression in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1723.
17. Humphries B., Wang Z., Yang C. (2021) MicroRNA regulation of breast cancer stemness. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3756.
18. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre LA., Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **68**, 394–424.
19. Tsoulfas G. (2014) Role of microRNA in the diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma: a new frontier. *Microna*. **3**, 137–143.
20. Morishita A., Masaki T. hsa-miRNA in hepatocellular carcinoma. (2015) *Hepatol. Res.* **45**, 128–141.
21. Morishita A., Oura K., Tadokoro T., Fujita K., Tani J., Masaki T. (2021) MicroRNAs in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma: a review. *Cancers (Basel)*. **13**, 514.
22. Oura K., Morishita A., Masaki T. (2020) Molecular and functional roles of microRNAs in the progression of hepatocellular carcinoma – a review. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 8362.
23. Ivanisenko N.V., Seyrek K., Hillert-Richter L.K., König C., Espe J., Bose K., Lavrik I.N. (2022) Regulation of extrinsic apoptotic signaling by c-FLIP: towards targeting cancer networks. *Trends Cancer*. **8**, 190–209.
24. Schleich K., Buchbinder J.H., Pietkiewicz S., Kähne T., Warnken U., Öztürk S., Schnölzer M., Naumann M., Krammer P.H., Lavrik I.N. (2016) Molecular architecture of the DED chains at the DISC: regulation of procaspase-8 activation by short DED proteins c-FLIP and procaspase-8 prodomain. *Cell. Death. Differ.* **23**, 681–694.

25. Иванисенко Н.В., Лаврик И.Н. (2019) Механизмы активации прокаспазы-8 при инициации внешнего пути программируемой клеточной гибели. *Молекуляр. биология*. **53**, 830–837.
26. Seyrek K., Ivanisenko N.V., Richter M., Hillert L.K., König C., Lavrik I.N. (2020) Controlling cell death through post-translational modifications of DED proteins. *Trends Cell Biol.* **30**, 354–369.
27. Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. (2012) ANDVisio: a new tool for graphic visualization and analysis of literature mined associative gene networks in the ANDSystem. *In Silico Biol.* **11**, 149–161.
28. Ivanisenko T.V., Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko N.V., Savostianov A.N., Ivanisenko V.A. (2020) ANDDigest: a new web-based module of ANDSystem for the search of knowledge in the scientific literature. *BMC Bioinformatics*. **21**, 228.
29. Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A. (2015) ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. *BMC Syst. Biol.* **9**, S2.
30. Ivanisenko V.A., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Mishchenko E.L., Saik O.V. (2019) A new version of the ANDSystem tool for automatic extraction of knowledge from scientific publications with expanded functionality for reconstruction of associative gene networks by considering tissue-specific gene expression. *BMC Bioinformatics*. **20**, 34.
31. Glotov A.S., Tiys E.S., Vashukova E.S., Pakin V.S., Demenkov P.S., Saik O.V., Ivanisenko T.V., Arzhanova O.N., Mozgovaya E.V., Zainulina M.S., Kolchanov N.A., Baranov V.S., Ivanisenko V.A. (2015) Molecular association of pathogenetic contributors to pre-eclampsia (pre-eclampsia associome). *BMC Syst. Biol.* **9**, S4.
32. Bragina E.Yu., Tiys E.S., Rudko A.A., Ivanisenko V.A., Freidin M.B. (2016) Novel tuberculosis susceptibility candidate genes revealed by the reconstruction and analysis of associative networks. *Infection, Genet. Evol.* **46**, 118–123.
33. Saik O.V., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Ivanisenko V.A. (2016) Interactome of the hepatitis C virus: literature mining with ANDSystem. *Virus Res.* **218**, 40–48.
34. Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Bragina E.Y., Freidin M.B., Goncharova I.A., Dosenko V.E., Zolotareva O.I., Hofstaedt R., Lavrik I.N., Rogaev E.I., Ivanisenko V.A. (2018) Novel candidate genes important for asthma and hypertension comorbidity revealed from associative gene networks. *BMC Med. Genomics*. **11**, 15.
35. Ivanisenko N.V., Seyrek K., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A., Lavrik I.N. (2020) The role of death domain proteins in host response upon SARS-CoV-2 infection: modulation of programmed cell death and translational applications. *Cell. Death. Discov.* **6**, 101.
36. Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. (2019) hsa-miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucl. Acids Res.* **47**, D155–D162.
37. Boutet E., Lieberherr D., Tognolli M., Schneider M., Bairoch A. (2007) UniProtKB/Swiss-Prot. *Methods Mol. Biol.* **406**, 89–112.
38. Kantari C., Walczak H. (2011) Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1813**, 558–563.
39. Schug Z.T., Gonzalez F., Houtkooper R.H., Vaz FM., Gottlieb E. (2011) BID is cleaved by caspase-8 within a native complex on the mitochondrial membrane. *Cell. Death. Differ.* **18**, 538–548.
40. Huang K., Zhang J., O'Neill K.L., Gurumurthy C.B., Quadros R.M., Tu Y., Luo X. (2016) Cleavage by caspase 8 and mitochondrial membrane association activate the BH3-only protein Bid during TRAIL-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **291**, 11843–11851.
41. Xu C., Shi L., Chen W., Fang P., Li J., Jin L., Pan Z., Pan C. (2017) hsa-miR-106b inhibitors sensitize TRAIL-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma through increase of death receptor 4. *Oncotarget*. **8**, 41921–41931.
42. Chen S., Yang C., Sun C., Sun Y., Yang Z., Cheng S., Zhuge B. (2019) hsa-miR-21-5p suppressed the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to cisplatin by targeting FASLG. *DNA Cell. Biol.* **38**, 865–873.
43. Jin X., Cai L., Wang C., Deng X., Yi S., Lei Z., Xiao Q., Xu H., Luo H., Sun J. (2018) CASC2/miR-24/miR-221 modulates the TRAIL resistance of hepatocellular carcinoma cell through caspase-8/caspase-3. *Cell. Death. Dis.* **9**, 318.
44. Visalli M., Bartolotta M., Polito F., Oteri R., Barbera A., Arrigo R., Di Giorgio R.M., Navarra G., Aguenouz M. (2018) hsa-miRNA expression profiling regulates necroptotic cell death in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* **53**, 771–780.
45. Luo C., Pu J., Liu F., Long X., Wang C., Wei H., Tang Q. (2019) MicroRNA-200c expression is decreased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **43**, 715–721.
46. Schickel R., Park S.M., Murmann A.E., Peter M.E. (2010) hsa-miR-200c regulates induction of apoptosis through CD95 by targeting FAP-1. *Mol. Cell.* **38**, 908–915.
47. Lee S.H., Shin M.S., Lee J.Y., Park W.S., Kim S.Y., Jang J.J., Dong S.M., Na E.Y., Kim C.S., Kim S.H., Yoo N.J. (1999) *In vivo* expression of soluble Fas and FAP-1: possible mechanisms of Fas resistance in human hepatoblastomas. *J. Pathol.* **188**, 207–212.
48. Nicolini V., Cassinelli G., Cuccuru G., Bongarzone I., Petrangolini G., Tortoreto M., Mondellini P., Casalini P., Favini E., Zaffaroni N., Zunino F., Lanzi C. (2011) Interplay between Ret and Fap-1 regulates CD95-mediated apoptosis in medullary thyroid cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **82**, 778–788.
49. Barnaba V., Macino G. (2010) An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood*. **115**, 265–273.
50. Rong M., He R., Dang Y., Chen G. (2014) Expression and clinicopathological significance of hsa-miR-146a in hepatocellular carcinoma tissues. *Ups. J. Med. Sci.* **119**, 19–24.

51. Hillert L.K., Ivanisenko N.V., Espe J., König C., Ivanisenko V.A., Kähne T., Lavrik I.N. (2020) Long and short isoforms of c-FLIP act as control checkpoints of DED filament assembly. *Oncogene*. **39**, 1756–1772.
52. Krueger A., Schmitz I., Baumann S., Krammer P.H., Kirchhoff S. (2001) Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 20633–20640.
53. Okano H., Shiraki K., Inoue H., Kawakita T., Yamanka T., Deguchi M., Sugimoto K., Sakai T., Ohmori S., Fujikawa K., Murata K., Nakano T. (2003) Cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein as a principal regulator of cell death and survival in human hepatocellular carcinoma. *Lab. Invest.* **83**, 1033–1043.
54. Dickens L.S., Boyd R.S., Jukes-Jones R., Hughes M.A., Robinson G.L., Fairall L., Schwabe J.W., Cain K., Macfarlane M. (2012) A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death. *Mol. Cell.* **47**, 291–305.
55. Schleich K., Krammer P.H., Lavrik I.N. (2013) The chains of death: a new view on caspase-8 activation at the DISC. *Cell Cycle*. **12**, 193–194.
56. Bagnoli M., Canevari S., Mezzanzanica D. (2010) Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **42**, 210–213.
57. Baratchian M., Davis C.A., Shimizu A., Escors D., Bagnéris C., Barrett T., Collins M.K. (2016) Distinct activation mechanisms of NF- κ B regulator inhibitor of NF- κ B kinase (IKK) by isoforms of the cell death regulator cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP). *J. Biol. Chem.* **291**, 7608–7620.
58. Ivanisenko N.V., Buchbinder J.H., Espe J., Richter M., Bollmann M., Hillert L.K., Ivanisenko V.A., Lavrik I.N. (2019) Delineating the role of c-FLIP/NEMO interaction in the CD95 network via rational design of molecular probes. *BMC Genomics*. **20**, 293.
59. Zhao L., Zhang Y. (2015) hsa-miR-342-3p affects hepatocellular carcinoma cell proliferation via regulating NF- κ B pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **457**, 370–377.
60. Deng L., Wang C., He C., Chen L. (2021) Bone mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles promote TRAIL-related apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via the delivery of microRNA-20a-3p. *Cancer. Biomark.* **30**, 223–235.
61. Chen F., Zhu H.H., Zhou L.F., Wu S.S., Wang J., Chen Z. (2010) Inhibition of c-FLIP expression by hsa-miR-512-3p contributes to taxol-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol. Rep.* **23**, 1457–1462.
62. Chen Z., Zheng Z., Feng L., Huo Z., Huang L., Fu M., Chen Q., Ke Y., Yang J., Hou B. 2020. Overexpression of hsa-miR-382 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to $\gamma\delta$ T cells by inhibiting the expression of c-FLIP. *Mol. Ther. Oncolytics*. **18**, 467–475.
63. Iwai N., Yasui K., Tomie A., Gen Y., Terasaki K., Kitaichi T., Soda T., Yamada N., Dohi O., Seko Y., Umemura A., Nishikawa T., Yamaguchi K., Moriguchi M., Konishi H., Naito Y., Itoh Y. (2018) Oncogenic hsa-miR-96-5p inhibits apoptosis by targeting the caspase-9 gene in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* **53**, 237–245.
64. Chen L., Luo L., Chen W., Xu HX., Chen F., Chen L.Z., Zeng W.T., Chen J.S., Huang X.H. (2016) MicroRNA-24 increases hepatocellular carcinoma cell metastasis and invasion by targeting p53: hsa-miR-24 targeted p53. *Biomed. Pharmacother.* **84**, 1113–1118.
65. Zhu Q., Wang Z., Hu Y., Li J., Li X., Zhou L., Huang Y. (2012) hsa-miR-21 promotes migration and invasion by the hsa-miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* **27**, 1660–1668.
66. Meng F., Henson R., Wehbe-Janek H., Ghoshal K., Jacob S.T., Patel T. (2007) MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. **133**, 647–658.
67. Xia C., Zeng H., Zheng Y. (2020) Low-intensity ultrasound enhances the antitumor effects of doxorubicin on hepatocellular carcinoma cells through the ROS-miR-21-PTEN axis. *Mol. Med. Rep.* **21**, 989–998.
68. He C., Dong X., Zhai B., Jiang X., Dong D., Li B., Jiang H., Xu S., Sun X. (2015) hsa-miR-21 mediates sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting autophagy via the PTEN/AKT pathway. *Oncotarget*. **6**, 28867–28881.
69. Dituri F., Mazzocca A., Lupo L., Edling C.E., Azzariti A., Antonaci S., Falasca M., Giannelli G. (2012) PI3K class IB controls the cell cycle checkpoint promoting cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer*. **130**, 2505–2513.
70. Kunter I., Erdal E., Nart D., Yilmaz F., Karademi R.S., Sagol O., Atabey N. (2014) Active form of AKT controls cell proliferation and response to apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* **31**, 573–580.
71. Lerner M., Haneklaus M., Harada M., Grandér D. (2012) hsa-miR-200c regulates Noxa expression and sensitivity to proteasomal inhibitors. *PLoS One*. **7**, e36490.
72. Cao J., Sun L., An J., Zhang H., He X., Shen H. (2020) [MicroRNA-200c-3p inhibits proliferation of neuroblastoma cells by targeting CCNE2]. *Nan. Fang. Yi. Ke. Da. Xue. Xue. Bao.* **40**, 1246–1252.
73. Zhao L., Liu X., Yang J., Wang X., Liu X., Wu J., Li C., Xu D., Hu Y. (2022) hsa-miR-200c-3p inhibits LPS-induced M1 polarization of BV2 cells by targeting RIP2. *Genes. Genomics*. **44**, 477–486.
74. McCarthy J.V., Ni J., Dixit V.M. (1998) RIP2 is a novel NF- κ B-activating and cell death-inducing kinase. *J. Biol. Chem.* **273**, 16968–16975.
75. Geng Y., Michowski W., Chick J.M., Wang Y.E., Jecrois M.E., Sweeney K.E., Liu L., Han R.C., Ke N., Zagazdzon A., Sicinska E., Bronson R.T., Gygi S.P., Sicinski P. (2018) Kinase-independent function of E-type cyclins in liver cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **115**, 1015–1020.
76. Hofmann S.R., Girschick L., Stein R., Schulze F. (2021) Immune modulating effects of receptor interacting protein 2 (RIP2) in autoinflammation and immunity. *Clin. Immunol.* **223**, 108648.

77. Zhou Y., Hu L., Tang W., Li D., Ma L., Liu H., Zhang S., Zhang X., Dong L., Shen X., Chen S., Xue R., Zhang S. (2021) Hepatic NOD2 promotes hepatocarcinogenesis via a RIP2-mediated proinflammatory response and a novel nuclear autophagy-mediated DNA damage mechanism. *J. Hematol. Oncol.* **14**, 9.
78. Huang Q., GumiReddy K., Schrier M., le Sage C., Nagel R., Nair S., Egan D.A., Li A., Huang G., Klein-Szanto A.J., Gimotty P.A., Katsaros D., Coukos G., Zhang L., Puré E., Agami R. (2008) The microRNAs hsa-miR-373 and hsa-miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat. Cell. Biol.* **10**, 202–210.
79. Li H., Wang N., Xu Y., Chang X., Ke J., Yin J. (2022) Upregulating microRNA-373-3p promotes apoptosis and inhibits metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Bioengineered.* **13**, 1304–1319.
80. Wei F., Cao C., Xu X., Wang J. (2015) Diverse functions of hsa-miR-373 in cancer. *J. Transl. Med.* **13**, 162.
81. Nakano K., Saito K., Mine S., Matsushita S., Tanaka Y. (2007) Engagement of CD44 up-regulates Fas ligand expression on T cells leading to activation-induced cell death. *Apoptosis.* **12**, 45–54.
82. Motz G.T., Santoro. SP., Wang L.P., Garrabrant T., Lastra R.R., Hagemann I.S., Lal P., Feldman M.D., Benencia F., Coukos G. (2014) Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat. Med.* **20**, 607–615.
83. Snaebjornsson M.T., Schulze A. (2018) Non-canonical functions of enzymes facilitate cross-talk between cell metabolic and regulatory pathways. *Exp. Mol. Med.* **50**, 1–16.

Primary and Secondary microRNA Modulation of the Extrinsic Pathway Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma

T. M. Khlebodarova^{1, 2}, P. S. Demenkov^{1, 2}, T. V. Ivanisenko^{1, 2}, E. A. Antropova¹,
I. N. Lavrik³, and V. A. Ivanisenko^{1, 2, *}

¹Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

²Kurchatov Genomic Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

³Translational Inflammation Research, Medical Faculty, Otto von Guericke University Magdeburg, Magdeburg, 39106 Germany

*e-mail: salix@bionet.nsc.ru

One of the most common malignant liver diseases is hepatocellular carcinoma, which has a high recurrence rate and a low five-year survival rate. It is very heterogeneous both in structure and between patients, which complicates diagnosis, prognosis and response to treatment. In this regard, an individualized, patient-centered approach becomes important, in which the use of mimetics and hsa-miRNA inhibitors involved in the pathogenesis of the disease may be determinative. From this point of view hsa-miRNAs are of interest, their aberrant expression is associated with poor prognosis for patients and is associated with tumor progression due to dysregulation of programmed cell death (apoptosis). However, the effect of hsa-miRNA on tumor development depends not only on its direct effect on expression of genes – primary targets, but also on secondary targets mediated by regulatory pathways. And while the former are actively studied, the role of secondary targets of these hsa-miRNAs in modulating apoptosis is still unclear. The present work summarizes data on hsa-miRNAs whose primary targets are key genes of the extrinsic pathway of apoptosis. Their aberrant expression is associated with early disease relapse and poor patient outcome. For these hsa-miRNAs, using the software package ANDSystem, we reconstructed the regulation of the expression of secondary targets and analyzed their impact on the activity of the extrinsic pathway of apoptosis. The potential effect of hsa-miRNAs mediated by the action on secondary targets is shown to negatively correlate with the number of their primary targets. It is also shown that hsa-miR-373, hsa-miR-106b and hsa-miR-96 have the highest priority as the markers of hepatocellular carcinoma, whose action on the secondary targets enhances their anti-apoptotic effect.

Keywords: microRNA, primary and secondary targets, ANDSystem, hepatocellular carcinoma, programmed cell death, extrinsic pathway of apoptosis, regulatory pathways

БИОИНФОРМАТИКА И СИСТЕМНАЯ КОМПЬЮТЕРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.2:599.32

ГЕОМЕТРИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ФИЛОГЕОГРАФИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: ГЛАВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ И ДЕНДРОГРАММЫ

© 2023 г. В. М. Ефимов^{a, b, c, d, *}, К. В. Ефимов^e, В. Ю. Ковалева^b

^aИнститут цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

^bИнститут систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630091 Россия

^cНовосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

^dТомский государственный университет, Томск, 634050 Россия

^eВысшая школа экономики, Москва, 101000 Россия

*e-mail: efimov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 27.07.2022 г.

После доработки 27.07.2022 г.

Принята к публикации 21.08.2022 г.

Поиски проявлений отбора, вызванного влиянием среды, в молекулярных последовательностях обычно проводят внутри близкородственных видов или на внутривидовом уровне, поскольку считается, что на высоких таксономических уровнях такие поиски бесперспективны из-за филогенетического родства. Аминокислотные последовательности цитохрома b 67 видов грызунов и зайцеобразных с известными географическими координатами оцифрованы с использованием базы данных AAindex. На основе более 200 тыс. признаков получены главные компоненты. Использован ранее не применявшийся для таких задач известный статистический метод, позволяющий ортогонально разложить многомерную изменчивость на внутри- и межтаксонную и анализировать их по отдельности. Выбран уровень подсемейства. Найдена корреляция второй главной компоненты (17.05% межтаксонной изменчивости) с широтой ($r = 0.561$; $n = 67$; $p < E-5$). Выявляемое первой главной компонентой (39.48% межтаксонной изменчивости) четкое разделение на две группы, не совпадающее с таксономическим, указывает на возможную физико-химическую подоплеку различий между ними. Это требует дальнейших исследований.

Ключевые слова: Rodentia, цитохром b, евклидовы расстояния, кластерный анализ, ортогональное разложение, географические координаты

DOI: 10.31857/S0026898423020052, **EDN:** EGBWKZ

ВВЕДЕНИЕ

Исторически сложилось так, что положение организмов в системе живой природы определялось их внешним подобием друг другу, прежде всего сходством строения (классический подход). С появлением молекулярной биологии и компьютеров положение организмов стало почти полностью определяться генетическим сходством (молекулярно-биологический подход). Оба подхода оперируют разными типами исходных данных (континуальные морфологические признаки и символьные последовательности соответственно), что предопределило их различное представление при компьютерном анализе, а также характер используемых методов. В классическом подходе — это геометрическое пространство, одномерное или многомерное, осями которого являются признаки, и в которое помещены

объекты. Различия между объектами отображаются расстояниями в этом пространстве. На сегодняшний день основными способами анализа считаются линейные многомерные методы типа главных компонент (PCA, MR, DA, CCA и их PLS-аналоги) и нелинейные — типа неметрического шкалирования (NMDS, t-SNE, UMAP). В молекулярно-биологическом подходе сначала превалировал кластерный анализ на основе матрицы расстояний между последовательностями (UPGMA, NJ, ME), а сейчас чаще используется прямое моделирование филогенетического дерева (MP, ML). В результате всегда получаются дендрограммы, т.е. деревья кластеров. По сути, речь идет о противопоставлении непрерывного и дискретного подходов.

Мы полагаем, что оба подхода не противоречат друг другу и их можно и желательно использо-

вать совместно. Разница в типах исходных данных не является препятствием. Поскольку имеется матрица расстояний, последовательности всегда можно представить точками в многомерном пространстве и, следовательно, описать геометрически. Обязательно нужно учитывать дискретность. На любом шаге кластеризации все объекты разделены на несколько непересекающихся кластеров. Для каждого кластера можно вычислить центроид. Для каждого объекта можно вычислить отклонение от центроида своего кластера. В результате общая изменчивость распадется на межвыборочную и объединенную внутривыборочную изменчивость. Все варианты изменчивости можно исследовать с помощью обоих подходов — и классического (непрерывного, геометрического), и молекулярно-биологического (дискретного, кластерного).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Из GenBank (NCBI) [1] взяты аминокислотные последовательности митохондриального белка цитохрома b (Cytb), по одной для каждого вида млекопитающих отряда Rodentia Северного полушария Старого Света, у которых в описании присутствовала опция “lat_lon”, всего 61 вид. Дополнительно в качестве внешней группы взяты шесть последовательностей семейства Ochotona отряда Lagomorpha. Все 67 последовательностей были выравнены с помощью пакета MEGA 11 [2]. Последняя 380-я позиция из-за неполноты данных удалена. Во избежание разночтений использовали таксономическую принадлежность последовательностей, указанную в GenBank. Кроме того, из базы данных AAindex взяты 553 индекса физико-химических свойств 20 протеиногенных аминокислот (далее AA-индексы) [3].

Методы. Все AA-индексы были предварительно стандартизированы (центрированы и нормированы). Для каждого AA-индекса в матрице аминокислотных последовательностей каждая аминокислота заменена на соответствующее значение физико-химического свойства и по полученной числовой матрице рассчитана матрица квадратов межвидовых евклидовых расстояний размера 67×67 . Все 553 матрицы квадратов расстояний суммированы, и в суммарной матрице из каждого элемента извлечен квадратный корень. Эта процедура эквивалентна вычислению евклидовых расстояний между 67 видами по 209587 (379×553) признакам. Далее по матрице межвидовых евклидовых расстояний методом главных координат вычислены главные компоненты [4]. Для однорангового разбиения на кластеры выбран уровень подсемейств, поскольку даже на родовом уровне молекулярная систематика млекопитающих все еще не устоялась. По

матрице главных компонент вычислены центроиды всех подсемейств и для каждого вида вычислено отклонение от центроида своего подсемейства. Этот способ предложил Фишер в методах ANOVA и MANOVA [5, 6]. Идея состоит в том, что из общей изменчивости вычитается межгрупповая и остается внутригрупповая изменчивость, в которой межгрупповая отсутствует. Обе изменчивости по построению отображаются в пространства, ортогональные друг другу. В нашем случае общая матрица главных компонент раскладывается на межтаксонную и объединенную внутритаксонную (таксоны — подсемейства). Для каждой новой матрицы снова вычислена матрица евклидовых расстояний между видами и ее главные компоненты. Сумма квадратов расстояний между двумя видами в новых матрицах равна квадрату расстояния между ними в общей матрице, а главные компоненты новых матриц в совокупности ортогональны друг другу. Таким образом получается ортогональное разложение общей межвидовой матрицы расстояний на две новые, каждая размером 67×67 . Одна характеризует изменчивость между подсемействами, точнее, между их центроидами, а вторая — изменчивость, которая получится из общей, если совместить центроиды всех 10 подсемейств и собрать вместе их внутривыборочную изменчивость. По всем трем матрицам расстояний методом Варда проведен кластерный анализ, построены дендрограммы и тем самым получено ортогональное разложение общей дендрограммы на две другие, межтаксонную и объединенную внутритаксонную. Точно так же для всех трех матриц главных компонент вычислены корреляции с внешними факторами, в данном случае, широтой и долготой. Расчеты проведены с помощью пакетов MEGA 11 [2], PAST4 [7] и Jacobi4 [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из табл. 1 видно (столбцы Sum, последняя строка), что доля всей межтаксонной изменчивости в общей составляет 68.3% (71.32/104.48). Видно также (столбцы λ), что первые компоненты общей изменчивости почти полностью соответствуют межтаксонной изменчивости. Суммарное число главных компонент не изменилось ($9 + 56 = 65$), но произошло перераспределение дисперсий.

Из табл. 2 видно, что высокую и достоверную корреляцию с широтой ($p < 10^{-5}$; $N = 67$) демонстрируют вторые главные компоненты общей и межтаксонной изменчивости.

Очевидно, что это одна и та же корреляция, но в данном случае мы видим, что она целиком относится именно к межтаксонной изменчивости и никак не проявляет себя во внутритаксонной.

Таблица 1. Дисперсии главных компонент для трех матриц межвидовых расстояний

All	λ	λ , %	Sum	Sum, %	Inter	λ	λ , %	Sum	Sum, %	Intra	λ	λ , %	Sum	Sum, %
PC1	28.33	27.11	28.33	27.11	PC1	28.15	39.48	28.15	39.48	PC1	2.66	8.01	2.66	8.01
PC2	12.35	11.82	40.68	38.94	PC2	12.16	17.05	40.31	56.53	PC2	2.17	6.54	4.83	14.56
PC3	9.08	8.69	49.76	47.63	PC3	8.79	12.32	49.10	68.85	PC3	2.05	6.20	6.88	20.76
PC4	7.53	7.20	57.28	54.83	PC4	7.29	10.22	56.39	79.07	PC4	2.00	6.04	8.89	26.80
PC5	5.43	5.19	62.71	60.02	PC5	4.77	6.68	61.16	85.76	PC5	1.74	5.26	10.63	32.06
PC6	4.33	4.15	67.04	64.17	PC6	4.07	5.71	65.23	91.47	PC6	1.65	4.99	12.28	37.05
PC7	2.72	2.60	69.76	66.77	PC7	2.35	3.29	67.58	94.76	PC7	1.49	4.50	13.78	41.55
...	...	...	...	...	PC8	2.05	2.88	69.63	97.64	...	...	...	...	...
PC65	0.01	0.01	104.48	100.00	PC9	1.68	2.36	71.32	100.00	PC56	0.01	0.04	33.16	100.00

Примечание. All – общая, Inter – межтаксонная, Intra – объединенная внутритаксонная.

Таблица 2. Коэффициенты корреляции ($\times 1000$) с широтой (lat) и долготой (lon) первых 9 главных компонент трех матриц межвидовых расстояний

PC	Corr	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
All	lat	–69	538* ⁵	–11	–220	82	–12	–61	–38	217
	lon	–122	73	118	53	–178	154	–208	219	66
Inter	lat	76	561* ⁵	–11	–263	42	–61	–30	–26	33
	lon	–139	–63	81	–56	–179	–166	278	63	69
Intra	lat	–165	–110	99	81	–309*	–75	–114	92	217
	lon	–78	128	–61	116	180	–114	–194	305*	83

Примечание: All – общая, Inter – межтаксонная, Intra – объединенная внутритаксонная. * $p < 0.05$; ⁵ $p < 10^{-5}$.

Корреляции на первом уровне значимости можно не принимать во внимание.

На рис. 1а–в приведено расположение видов на плоскости главных компонент всех трех вариантов изменчивости. Учитывая, что с широтой коррелирует именно вторая компонента, возможно, что на рис. 1а, б мы наблюдаем последствия давнего отбора под влиянием среды, причем в двух расходящихся направлениях. *Ochotona* расположилась, хотя и близко, но все же за пределами отряда Rodentia. Что касается первой компоненты, на которую приходится более четверти общей межтаксонной изменчивости, то ее содержательный смысл еще предстоит выяснить.

Объединенная внутритаксонная изменчивость (рис. 1в) “размазана” на много компонент с маленькими дисперсиями. Можно предположить, что главное направление изменчивости внутри каждого таксона формируется так, чтобы меньше пересекаться с остальными таксонами, живущими на той же территории. В частности, подсемейство Arvicolinae явно образовало свою собственную компоненту. При этом один вид (*Arvicola amphibius*) вообще отделился от всех в другую сторону.

На рис. 1г четко видна ортогональность внутри- и межтаксонной изменчивости. Показаны только первые компоненты, но такая же картина получается на всех рисунках, на которых противопоставлены внутри- и межтаксонные главные компоненты (не приведено).

Ортогональное разложение общей матрицы расстояний позволяет ортогонально разложить не только главные компоненты на блоки, соответствующие разным вариантам изменчивости, но и дендрограммы (рис. 2а–в). Поскольку по каждой матрице расстояний каким-либо алгоритмом кластерного анализа можно вычислить дендрограмму, мы автоматически получаем ортогональное разложение дендрограммы, отражающей общую изменчивость (1а), на две дендрограммы, отражающие межтаксонную и внутритаксонную изменчивость по отдельности (1б и 1в соответственно).

Очевидно, что на рис. 1а–в отражена та же самая многомерная изменчивость, что и на рис. 2а–в, только первые показывают взаимное расположение видов в пространстве и направления их изменчивости, а вторые – сходство видов и их объединений между собой. Таким образом, главные компоненты и дендрограммы дополняют друг

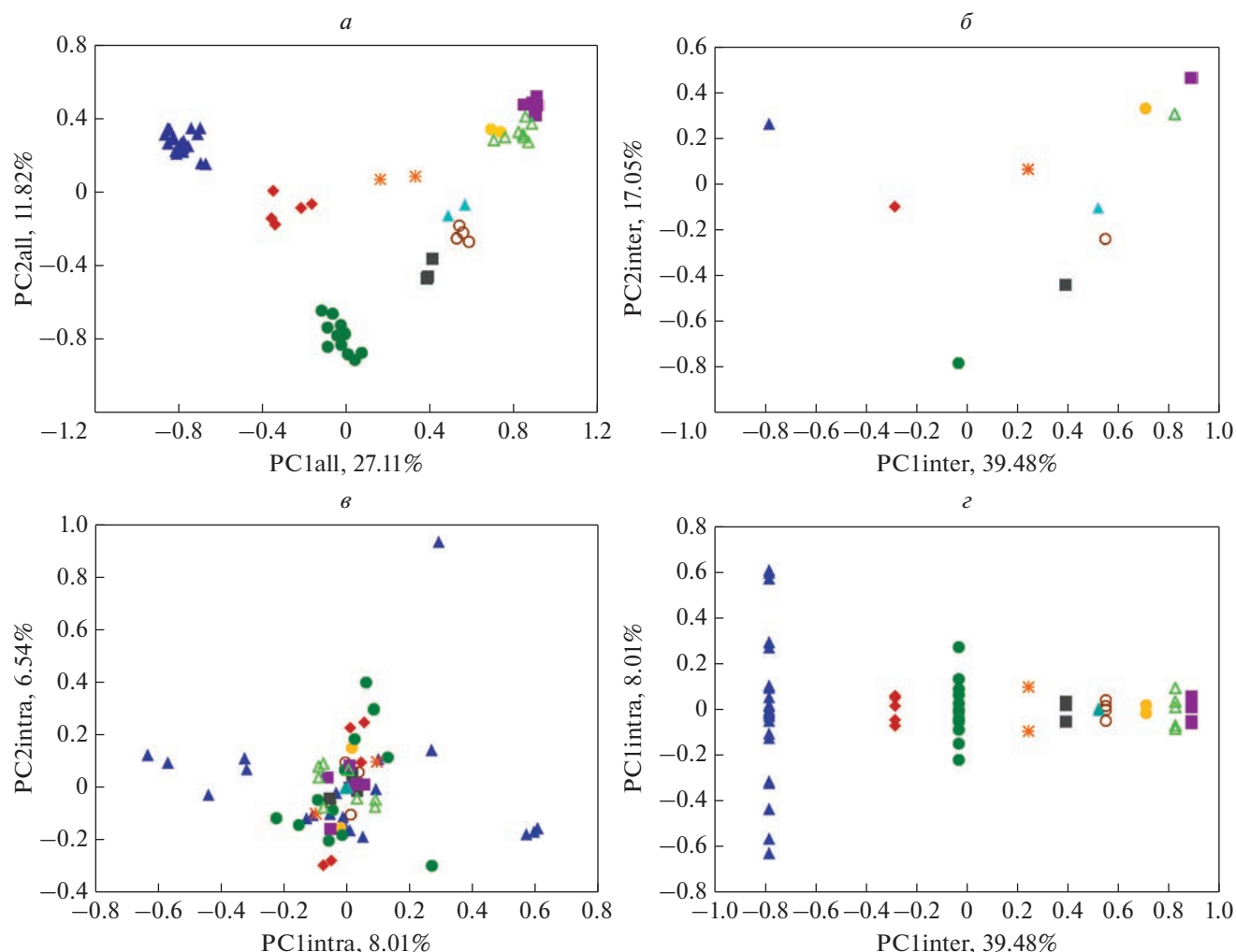


Рис. 1. Расположение видов на плоскости главных компонент. *a* – Первые две компоненты общей изменчивости; *б* – первые две компоненты межтаксонной изменчивости; *в* – первые две компоненты внутритаксонной изменчивости; *г* – первые компоненты межтаксонной и внутритаксонной изменчивости. ○ Allactaginae; ▲ Arvicolinae; ◆ Cricetinae; ■ Dipodinae; ● Leithiinae; ● Murinae; ■ Ochotonidae; ▲ Sicistinae; ✖ Spalacinae; ▲ Xerinae.

друга, позволяя составить более точное представление об изучаемой совокупности объектов. Преимущество дендрограмм заключается в том, что они легко отображают сходство объектов в пространстве любой размерности, просто ее игнорируя, а компоненты, из-за особенностей человеческого восприятия, приходится рассматривать попарно, максимум, по три. С другой стороны, дендрограммы не способны адекватно отобразить корреляцию с внешними факторами, из-за этого приходится наносить кластеры прямо на географические карты. Это наглядно, но непригодно для дальнейшей обработки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основной результат — это высокая статистически значимая корреляция второй главной компо-

ненты (17.05% межтаксонной изменчивости) с широтой и отсутствие этой корреляции у первой главной компоненты со значительно большей дисперсией (39.48%). Безусловно, нужно учитывать, что исследуемый массив признаков, более 200 тыс., строго говоря, не представляет именно молекулярную изменчивость, хотя и получен оцифровкой набора молекулярных последовательностей. Считается, что физико-химические свойства аминокислот по своей природе ближе не столько к структуре, сколько к функции белков, тем более, что цитохром *b* участвует, наряду с другими митохондриальными белками, в самой важной биохимической функции: обеспечении организма энергией.

Митохондриальный ген *cytb* в настоящее время является основой молекулярной таксономии организмов. Долгое время он считался селектив-

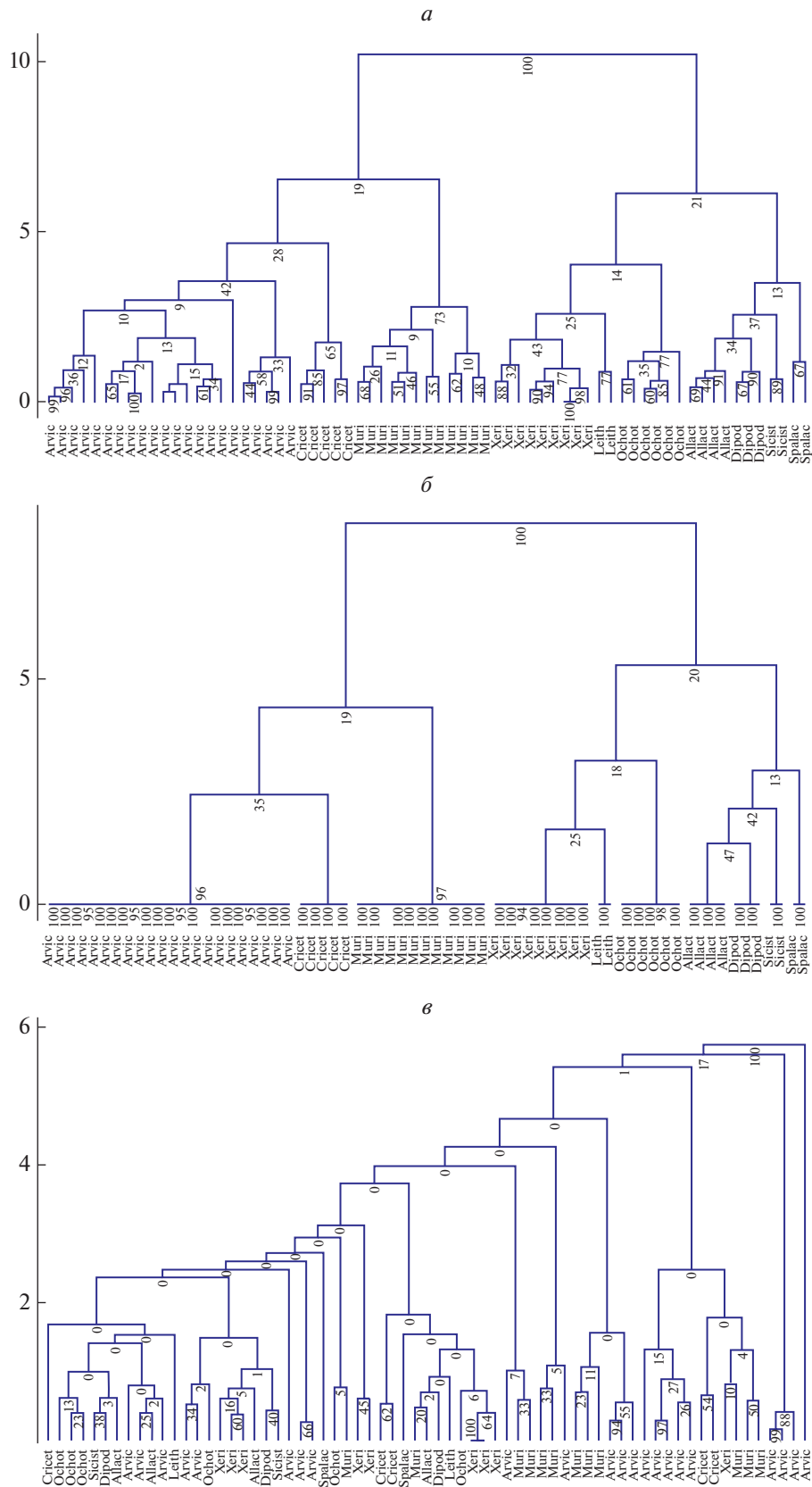


Рис. 2. Ортогональное разложение общей дендрограммы (*a*), характеризующей сходство аминокислотных последовательностей цитохрома b, на межтаксонную (*б*) и объединенную внутритаксонную (*в*) дендрограммы.

но нейтральным. Однако в последнее время это утверждение все чаще подвергается сомнению и выявляются адаптивные компоненты изменчивости кодируемых им аминокислотных последовательностей цитохрома b [9–12].

Несмотря на все разнообразие адаптаций к широкому спектру экологических условий, имеющих в классе млекопитающих, существуют базовые механизмы функционирования организма, общие для всего класса в целом. Из этого следует, что при адаптации к сходным условиям можно ожидать некоторого сходства эволюционных путей в различных группах, например, перестройки энергетического метаболизма системы клеточного дыхания при адаптации к условиям гипотермии. Это сходство может, в частности, проявляться в одних и тех же мутациях в аминокислотных последовательностях разных видов. В таком случае логично ожидать, что такие мутации должны вызывать и сходные изменения физико-химических свойств самих аминокислотных последовательностей. Обычно вычисляют соотношения синонимичных и несинонимичных различий между нуклеотидными последовательностями или анализируют радикальные аминокислотные замены (т.е. замену на аминокислотный остаток с радикально иными физико-химическими свойствами). Для учета внешних факторов, на которые предположительно идет отбор, обычно подбирают пары контрастных условий, например, высокогорье и равнина, подземный и наземный образ жизни, пресноводные и соленые водоемы и т.д. Для общего представления о близости последовательностей практически всегда вычисляют филогенетические деревья либо на основе матрицы расстояний и алгоритмов кластерного анализа, либо прямым моделированием множественных деревьев и выбирают наиболее подходящее методами максимальной парсимонии или максимального правдоподобия. Считается, что поиски проявлений адаптивной эволюции на высоких таксономических уровнях бесперспективны, так как в этом случае и сходство, и различия между видами очевидно определяются, в первую очередь, степенью их филогенетического родства. Поэтому поиски проявлений адаптивной эволюции в молекулярных последовательностях обычно ведутся внутри близкородственных видов или даже на внутривидовом уровне.

Давно известное в классической математической статистике ортогональное разложение общей изменчивости на межвыборочную и внутривыборочную позволяет искать эти проявления на любых таксономических уровнях. То, что корреляция с широтой (а это, безусловно, следствие корреляции со средой) нашлась на уровне подсемейств, подтверждает перспективность подобных поисков. Более того, выявляемое первой главной компонентой четкое разделение на две группы

(рис. 1а, 2а), не совпадающее с таксономическим, указывает на возможную физико-химическую подоплеку различий между ними. Это требует дальнейших исследований.

Работа выполнена в рамках бюджетного проекта Института цитологии и генетики СО РАН FWNR-2022-0019 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Выражаем искреннюю признательность рецензенту и редактору выпуска за полезные замечания.

Процедур с участием людей и животных не было.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. NCBI Resource Coordinators. (2015) Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucl. Acids Res.* **43**, D6–D17.
2. Tamura K., Stecher G., Kumar S. (2021) MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* **38**, 3022–3027.
3. Kawashima S., Pokarowski P., Pokarowska M., Kolinski A., Katayama T., Kanehisa M. (2008) AAindex: amino acid index database progress report 2008. *Nucl. Acids Res.* **36**, D202–D205.
4. Gower J.C. (1966) Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika.* **53**, 325–338.
5. Fisher R.A. (1919) XV. — The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance. *Earth Env. Sci. Transactions Royal Soc. Edinburgh.* **52**, 399–433.
6. Fisher R.A. (1936). The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Ann. Eugenics.* **7**, 179–188.
7. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica.* **4**, 1–9.
8. Polunin D., Shtaiyer I., Efimov V. (2019) JACOBI4 software for multivariate analysis of biological data. *bioRxiv.* 803684.
9. Da Fonseca R.R., Johnson W.E., O'Brien S.J., Ramos M.J., Antunes A. (2008) The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomics.* **9**, 1–22.
10. Abramson N.I., Bodrov S.Y., Bondareva O.V., Genelt-Yanovskiy E.A., Petrova T.V. (2021) A mitochondrial genome phylogeny of voles and lemmings (Rodentia: Arvicolinae): evolutionary and taxonomic implications. *PLoS One.* **16**, e0248198.
11. Bondareva O., Genelt-Yanovskiy E., Petrova T., Bodrov S., Smorkatcheva A., Abramson N. (2021) Signatures of adaptation in mitochondrial genomes of Palearctic subterranean voles (Arvicolinae Rodentia). *Genes.* **12**, 1945.
12. Mori S., Matsunami M. (2018) Signature of positive selection in mitochondrial DNA in Cetartiodactyla. *Genes Genet. Systems.* 17-00015.

Geometric Approach to Phylogeographic Analysis Molecular Genetic Sequences: Principal Components and Dendrograms

V. M. Efimov^{1, 2, 3, 4, *}, K. V. Efimov⁵, and V. Yu. Kovaleva²

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Institute of Animal Systematics and Ecology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630091 Russia*

³*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

⁴*Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia*

⁵*Higher School of Economics, Moscow, 101000 Russia*

*e-mail: efimov@bionet.nsc.ru

Currently, the search for manifestations of selection under the influence of the environment in molecular sequences is usually carried out within closely related species or at the intraspecific level. It is believed that at high taxonomic levels this is unpromising due to phylogenetic relationship. Cytochrome b amino acid sequences of 67 rodent and lagomorph species with known geographic coordinates were digitized using the AAindex database. Based on more than 200 thousand features, the main components were obtained. A well-known statistical method, which has not previously been used for such problems, was used, which makes it possible to orthogonally decompose multidimensional variability into intra- and intertaxon variability and analyze them separately. Subfamily level selected. For the second principal component (17.05% of intertaxon variability), a correlation with latitude was found ($r = 0.561$; $n = 67$; $p < E-5$). The clear division into two groups revealed by the first principal component (39.48% of intertaxon variability), which does not coincide with the taxonomic one, indicates a possible physicochemical underlying reason for the differences between them. This requires further research.

Keywords: Rodentia, cytochrome b, Euclidean distances, cluster analysis, orthogonal decomposition, geographic coordinates

БИОНФОРМАТИКА,
БИОНЖЕНЕРИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 577.151.45

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ СЕМЕЙСТВА А
КАК ИНСТРУМЕНТ ПОИСКА ФЕРМЕНТОВ С НОВЫМИ СВОЙСТВАМИ

© 2023 г. А. А. Булыгин^{а, б, 1}, А. А. Кузнецова^{а, 1}, [О. С. Федорова]^а, Н. А. Кузнецов^{а, б, *}

^аИнститут химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

^бНовосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 21.07.2022 г.

После доработки 07.09.2022 г.

Принята к публикации 07.09.2022 г.

ДНК-полимеразы катализируют синтез ДНК при репликации, репарации и рекомбинации ДНК. Ряд ДНК-полимераз, например полимеразы Таq из *Thermus aquaticus*, нашли применение в различных приложениях молекулярной биологии и биотехнологии, в частности, в качестве инструментов амплификации ДНК. Однако эффективность этих ферментов зависит от таких факторов, как происхождение ДНК, состав праймера, длина и GC-содержание матрицы, способность формировать стабильные вторичные структуры. Подобные ограничения делают актуальным поиск новых ферментов с улучшенными свойствами. В нашем обзоре рассмотрены основные структурные и молекулярно-кинетические особенности функционирования ДНК-полимераз, принадлежащих к структурному семейству А, включая Таq-полимеразу. Филогенетический анализ этих ферментов позволил установить высококонсервативный консенсусный “слепок”, содержащий 62 аминокислотных остатка, распределенных по структуре фермента. Сравнительный анализ этих аминокислотных остатков у малоизученных ДНК-полимераз позволил выявить семь ферментов, потенциально обладающих свойствами, необходимыми для их использования в амплификации ДНК.

Ключевые слова: белково-нуклеиновые взаимодействия, ДНК-полимераза, структурное семейство, каталитический механизм, активный центр, кинетика

DOI: 10.31857/S0026898423020040, EDN: EGAVKM

ВВЕДЕНИЕ

ДНК-полимеразы играют ключевую роль в сохранении стабильности генома. Ферменты этого класса катализируют полимеризацию 2'-дезоксирибонуклеотидмонофосфатов вдоль цепи ДНК, которую фермент “читает” и использует в качестве матрицы. Тип нового нуклеотида определяется по принципу комплементарности с нуклеотидом, расположенным в матрице, с которой ведется считывание. Таким образом, вновь синтезируемая молекула полностью комплементарна матричной цепи и идентична одной из цепей двойной спирали ДНК.

ДНК-полимеразы играют важную роль не только в ряде процессов, необходимых для жизни клеток, например, в процессах репликации и репарации ДНК, но используются и в различных приложениях молекулярной биологии и биотехнологии, в частности, в методе полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР является быстрым,

специфичным и чувствительным методом амплификации нуклеотидных последовательностей, который широко используется в научных исследованиях и клинической практике. Для проведения ПЦР необходимы термостабильные полимеразы, обладающие (в зависимости от решаемой задачи) определенным набором дополнительных свойств, таких как высокая точность, 5'–3'- и 3'–5'-экзонуклеазные активности, высокая скорость работы, создание тупых или липких концов у синтезируемых цепей ДНК [1].

Необходимо отметить, что в ПЦР используются в основном ДНК-полимеразы, принадлежащие к двум из семи известных структурных семейств, а именно, семействам А и Б. Наиболее известные представители этих семейств — полимеразы Таq из *Thermus aquaticus* и Pfu из *Pyrococcus furiosus*. Для получения ферментов с улучшенными каталитическими свойствами природные варианты этих ферментов и их гомологи модифицировали с использованием технологий белковой инженерии.

Наибольшие трудности возникают при попытках амплификации ДНК, находящихся в клеточ-

¹ Эти авторы внесли равный вклад в написание данного обзора.

ных экстрактах, крови, образцах “древней ДНК” и других природных материалах. В подобных случаях возникают проблемы, обусловленные присутствием различных ингибиторов полимераз, большой долей поврежденной ДНК и малым количеством ДНК в целом. Кроме того, амплификация протяженных фрагментов ДНК сталкивается с ограничениями, связанными с процессивными свойствами конкретной ДНК-полимеразы. Более того, в ДНК могут встречаться особо сложные последовательности, например GC-богатые, или участки, формирующие прочные вторичные структуры, которые существенно снижают процессивность ДНК-полимераз. На данный момент не обнаружено и не создано “универсальной” ДНК-полимеразы, способной преодолевать все описанные препятствия при проведении ПЦР как в научных исследованиях, так и в диагностических целях. Выбор конкретной полимеразы зависит от нескольких факторов: происхождения ДНК, структуры праймеров, длины матрицы, содержания GC-богатых участков [2]. На работу полимераз влияют также концентрации солей, катионов металлов и 2'-дезоксирибонуклеотидтрифосфатов [3].

В нашем обзоре рассмотрены основные структурные и молекулярно-кинетические особенности функционирования ДНК-полимераз, принадлежащих к структурному семейству А. Филогенетический анализ этих ферментов позволил установить консенсусный “слепок”, включающий 62 высококонсервативных аминокислотных остатка, распределенных в структуре фермента. Проведение сравнительного анализа остатков, входящих в “функциональный слепок”, у малоизученных ДНК-полимераз позволило выявить семь ферментов, потенциально обладающих свойствами, необходимыми для использования в биотехнологии.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ СВОЙСТВА ДНК-ПОЛИМЕРАЗ СЕМЕЙСТВА А

ДНК-полимеразы семейства А обладают репликативной и репарационной активностями. 3' → 5'-Экзонуклеазная активность выполняет корректирующую функцию, позволяя в случае ошибки удалять присоединенный некомплементарный нуклеотид, и таким образом повышает точность синтеза ДНК. При этом 5' → 3'-экзонуклеазная активность позволяет удалять РНК-праймеры. Полимеразы этого семейства обнаружены у эукариот (Pol γ , Pol θ , Pol ν), бактерий (Pol I) и вирусов (T7 DNA pol) [4–6].

Первые термостабильные полимеразы семейства А были выделены из бактерий рода *Thermus*, оптимальная температура роста которых близка к 70°C, при этом некоторые виды могут выживать и при 80°C [7]. Кроме нуклеотидилтрансферазной

активности, ДНК-полимеразы этих организмов обладают 5'–3'-экзонуклеазной активностью, однако у них нет 3'–5'-экзонуклеазной активности, значительно повышающей точность синтеза ДНК за счет удаления ошибочно присоединенных нуклеотидов [8–10]. Точность синтеза ДНК этими ферментами зависит от pH и концентрации ионов Mg^{2+} . Кроме того, на ошибочность синтеза влияет концентрация dNTP, причем оптимальным является равенство концентраций различных нуклеозидтрифосфатов. Эти полимеразы добавляют также 3'-адениновый “хвост” к синтезированной цепи.

Наиболее известным и хорошо изученным представителем бактериальных полимераз семейства А является Taq-полимераза из *T. aquaticus* [11]. Это первая термостабильная ДНК-полимераза, использованная в ПЦР [12] и ставшая одним из самых важных инструментов молекулярной биологии. Оптимальная температура работы Taq находится в промежутке 75–80°C; для ее работы необходимы ионы Mg^{2+} [9]. Время полужизни полимеразы составляет около 40 мин при 95°C, что с момента открытия архейных термостабильных полимераз считается низким.

В настоящее время Taq в основном применяется, когда требуется амплифицировать короткие последовательности ДНК – до 1 т.п.н., так как уже при такой длине (и при 50%-ном GC-содержании) эффективность синтеза составляет около 80% и сильно падает при дальнейшем увеличении длины [13]. Taq легко ингибируется компонентами плазмы крови, включая гемоглобин, лактоферрин и Ca^{2+} , поэтому при проведении клинических анализов в смесь добавляют бычий сывороточный альбумин, увеличивающий выход реакции [14]. В других случаях используют специальный буфер, повышающий точность синтеза вплоть до 3.3×10^{-6} ошибок на пару оснований, что считается приемлемым, но все еще уступает показателям ДНК-полимераз семейства Б [15–17].

Помимо Taq-полимеразы применяют и другие ферменты. Tfi из *T. flavus* является практически полной копией Taq по характеристикам [18], Tth из *T. thermophilus* [19] и Tfi из *T. filiformis* [8] имеют сходные с Taq характеристики кроме немного сниженной термостабильности. Кроме того, найдены более термостабильные варианты полимераз: Tbr из *T. Brockianus*, Tsa из *Thermophilus caldophilus* [10] и несколько полимераз из бактерий рода *Thermotoga*, живущих при температурах вплоть до 90°C [20].

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ

Молекулярный механизм добавления нуклеотидов ДНК-полимеразами был предложен по аналогии с практически идентичным механиз-

мом 3'-5'-экзонуклеазной реакции, катализируемой ДНК-полимеразой I [21, 22], получившим название "two metal ion mechanism". После связывания полимеразы на стыке дуплекса праймер-матрица входящий нуклеотид связывается и позиционируется в активном сайте с помощью Уотсон-Криковских взаимодействий с основанием матрицы, межмолекулярных контактов с аминокислотными остатками активного центра и координацией ионами двухвалентных металлов. Один ион металла связывается между концевым атомом О3' праймера и α -фосфатом входящего dNTP и часто упоминается как металл А (M_A), или каталитический ион металла (рис. 1). Второй ион металла координируется входящим dNTP через немостиговые атомы кислорода α -, β - и γ -фосфатов и часто упоминается как металл В, или нуклеотидсвязывающий ион металла (M_B) (рис. 1). Во время катализа M_A служит кислотой Льюиса для снижения рКа 3'-ОН-группы праймера для отщепления и последующей прямой нуклеофильной атаки на α -фосфат dNTP с образованием тригонально-бипирамидального пентакоординированного переходного состояния, которое стабилизируется за счет координации ионов металлов с кислородами β - γ -фосфатных групп. Этот этап приводит к инверсии стереоконфигурации α -фосфата и согласованному высвобождению уходящего пирофосфата, координированного M_B . Ион M_B ориентирует трифосфатную часть связанного нуклеотида в пригодное для катализа состояние и дестабилизирует тройной комплекс полимеразы. После нуклеофильной атаки M_B стабилизирует пентакоординированное переходное состояние и нейтрализует отрицательный заряд на уходящей группе PPi (рис. 1).

При взаимодействии с ферментом дуплекс матрица-праймер связывается в неглубокой щели между "большим пальцем" и 3'-экзодоменом. При этом значительная часть контактов с фосфатным остовом обеспечивается α -спиралью "большого пальца" (рис. 2) [23, 24]. В бинарном комплексе полимеразы-ДНК концевая пара оснований праймера примыкает к области, образованной субдоменом пальцев. Эта граница активного центра образована преимущественно длинной α -спиралью (О-спираль) и проходит по всей длине субдомена пальцев; она содержит на поверхности группу важных и высококонсервативных аминокислотных остатков, ориентированных внутрь щели. На С-конце О-спирали находится боковая цепь Туг. Остаток тирозина находится в стекинге с концевой парой оснований. При связывании корректного dNTP образуется тройной комплекс полимеразы-ДНК-dNTP, при этом полимеразы претерпевают значительные конформационные изменения. При переходе от открытой (бинарный комплекс) к закрытой (трой-

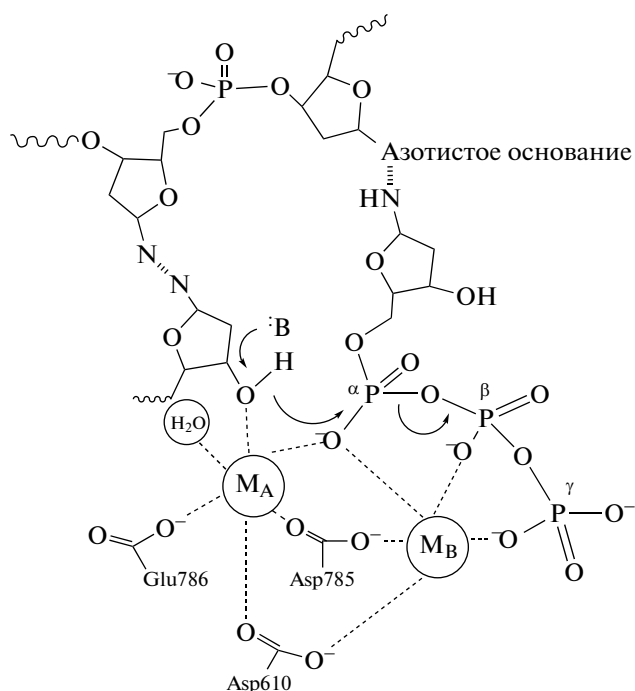


Рис. 1. Предполагаемый механизм реакции полимеризации ДНК, катализируемой ДНК-полимеразой. Катализ опосредуется двумя ионами двухвалентных металлов, координированными в ДНК-полимеразе Pol I из *T. aquaticus* аминокислотными остатками Asp610, Asp785, Glu786.

ной комплекс) конформации боковая цепь Туг на С-конце О-спирали перемещается в активный центр. Конформационная динамика вносит важный вклад в высокую точность ДНК-полимераз, поскольку после начального распознавания канонической структуры входящего основания в структуре фермента происходят более значительные конформационные изменения.

Кинетическая схема включения нуклеотидов в растущую цепь праймера ДНК под действием ДНК-полимераз протекает с участием иона двухвалентного металла и предполагает упорядоченное добавление субстратов (рис. 3). На первом этапе происходит связывание дуплекса праймер-матрица с образованием бинарного комплекса $E \cdot \text{ДНК}_n$. Правильное позиционирование 3'-конца праймера создает необходимое пространство для связывания входящего dNTP на следующем этапе. Этот этап включает также связывание иона металла в сайте связывания В (M_B) и, возможно, в сайте связывания А (M_A). После образования "открытого" тройного комплекса $E \cdot \text{ДНК}_n \cdot \text{dNTP}$ многие полимеразы претерпевают конформационные изменения, что приводит к образованию "закрытого" тройного комплекса $E' \cdot \text{ДНК}_n \cdot \text{dNTP}$. Каталитически компетентное состояние $E'' \cdot \text{ДНК}_n \cdot \text{dNTP}$ образуется после второго конформационного измене-

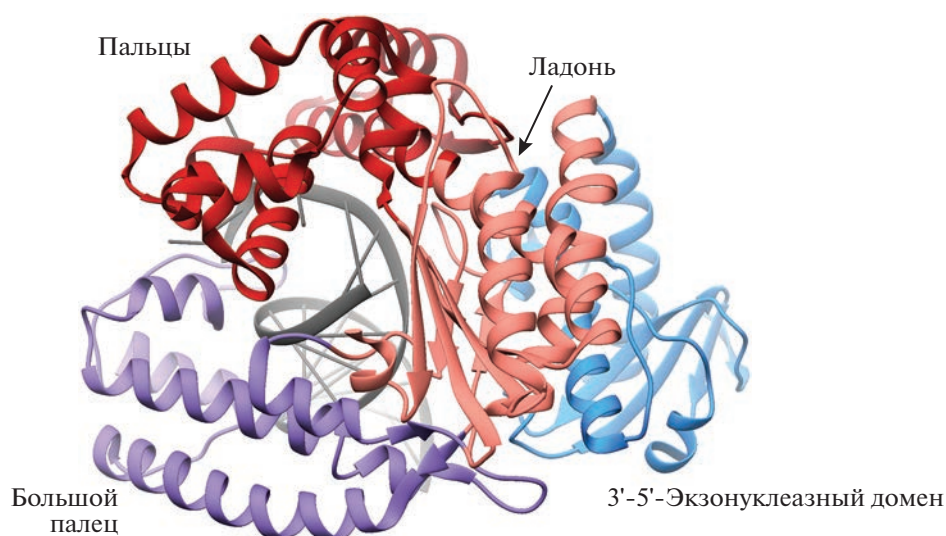


Рис. 2. Структура комплекса KlenTaq (фрагмент Кленова Taq-полимеразы) с ДНК (PDB ID: 3RTV). Домены большого пальца, пальцев и ладони располагаются в форме правой руки, типичной для большинства известных полимераз.

ния в активном центре полимеразы. Реакционно-способные группы, включая ионы двухвалентных металлов, каталитические карбоксилатные остатки, 3'-ОН-цепь праймера и α -фосфат связанного нуклеотида выравниваются должным образом для последующего переноса нуклеотида. В результате протекает химическая стадия и происходит удлинение цепи праймера на один нуклеотид с образованием комплекса $E'' \cdot \text{ДНК}_{n+1} \cdot \text{PPi}$. После химической стадии фермент возвращается в исходное состояние и происходит высвобождение пирофосфата PPi из активного сайта полимеразы. Далее процесс может протекать по двум путям. Полимераза может транслоцироваться на одну пару оснований вдоль ДНК для осуществления последующего цикла включения нуклеотида (процессивный синтез ДНК), либо возможна диссоциация двойного комплекса (дистрибутивный синтез ДНК). Конкретные детали данной модели могут варьировать в зависимости от ДНК-полимеразы или системы. Включение и порядок элементарных стадий, представленных на рис. 3, подтверждаются кинетическими, структурными и/или биофизическими данными [6, 23, 26, 27].

АРХИТЕКТУРА БЕЛКОВОЙ ГЛОБУЛЫ И ИНЖЕНЕРИЯ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ СЕМЕЙСТВА A

Первой изученной ДНК-полимеразой семейства A стала Pol I из *Escherichia coli*. Анализ кинетических и рентгеноструктурных данных изучения фрагмента Кленова и его гомологов из бактериофага T7 и термофилов *T. aquaticus* и *Bacillus stearothermophilus* позволил обосновать механизм реакции, катализируемый ДНК-полимеразой, а

также предложить “two metal ion mechanism” [21, 22, 28].

Во второй половине 1990-х гг. было получено большое количество структур полимераз семейства A, включая Taq [23]. Эти полимеразы имеют 5'-3'-экзонуклеазный, 3'-5'-экзонуклеазный и 5'-3'-полимеразный домены. Полимеразный домен, в свою очередь, подразделяется на домены большого пальца, пальцев и ладони. Полимераза без 5'-3'-экзонуклеазного домена называется фрагментом Кленова и именно в таком виде обычно используется в ПЦР, чтобы исключить деградацию праймеров. 3'-5'-Экзонуклеазный домен не работает в полимеразах некоторых организмов, включая род *Thermus*, поскольку не содержит специальные мотивы ExoI, ExoII и ExoIII.

За связывание с дуплексом матрица-праймер отвечает домен большого пальца. Он обхватывает ДНК со стороны малой бороздки и заставляет ее слегка изогнуться. В этом домене обнаружены несколько аминокислотных остатков, замены которых влияют на свойства полимеразы. В одной из работ показано, что замена Ser543Asn в молекуле Taq-полимеразы приводит к увеличению эффективности полимеразы на GC-богатых участках [29]. Кроме того, замены Arg660Thr, Arg487Val, Lys508Trp, Arg536Lys и Arg587Ile повышают точность синтеза ДНК-полимеразой [30]. При этом замены Arg487Val и Lys508Trp значительно снижали скорость работы фермента. Следует отметить, что двойные и тройные мутанты по точности синтеза не превосходили мутантную форму Arg660Thr, поэтому именно эта мутантная форма Taq признана наиболее перспективной [30]. Получена также мутантная форма [31], содержащая сра-

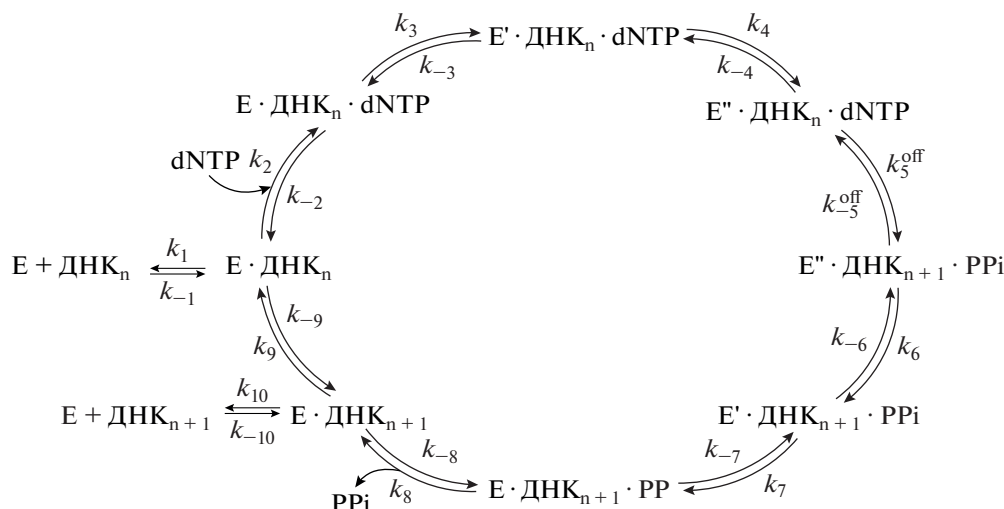


Рис. 3. Кинетический механизм включения корректного dNTP в ДНК-праймер под действием полимеразы.

зу восемь замен (Asn483Lys, Glu507Lys, Ser515Asn, Lys540Gly, Ala570Glu, Asp578Gly, Val586Gly, Phe614Met), которая отличается от фермента дикого типа более высокой точностью синтеза. Примечательно, что этот набор из восьми аминокислотных остатков не перекрывается с набором из пяти остатков, полученным в [30].

С одноцепочечным фрагментом ДНК-матрицы и dNTP связывается домен пальцев. В нем выделяют две α -спирали: первая (аминокислотные остатки 737–756) взаимодействует с нуклеотидами матрицы на границе дуплекса, вторая (656–671) взаимодействует с dNTP. Показано, что остатки Glu742 и Ala743 α -спирали 737–756 полимеразы Taq расположены в непосредственной близости от нуклеотида, идущего следом за стоящим напротив входящего dNTP, и сильно влияют на сродство полимеразы к ДНК. Установлено также, что замены Glu742Ala или Ala743Arg/Lys/His заметно увеличивают процессивность фермента [32]. Важную роль играет и Asn750 (нумерация согласно Taq), замена которого на Ala, наоборот, ухудшает свойства полимеразы из *E. coli* [33]. Интересный результат получен при изучении химерной Taq с дополнительными девятью остатками в петле после Arg736 — эта химерная полимеразы работала быстрее и имела в целом большую производительность [34].

Для взаимодействия с dNTP важны высококонсервативные остатки Arg659, Lys663, Phe667 и Tyr671. Первые два связывают трифосфатную часть, Phe667 взаимодействует с азотистым основанием dNTP. До связывания dNTP в активном сайте фермента Tyr671 взаимодействует с основанием первого нуклеотида дуплексной части матрицы, а после связывания dNTP на место Tyr671 встает нуклеотид одноцепочечного фрагмента

ДНК-матрицы, который до этого находился в вывернутом из спирали ДНК состоянии [35]. Замена этих аминокислотных остатков приводит к снижению точности синтеза [36]. Интересно, что замена Phe667Tyr приводит к лучшему связыванию ddNTP, что может быть полезным при секвенировании по методу Сэнгера.

Аминокислотные остатки, ответственные за катализ, располагаются в домене ладони. В Taq-полимеразе консервативные остатки Asp610, Asp785 и Glu786 связывают два иона металла. Кроме этих трех остатков один ион координирует 3'-ОН и α -фосфатную группы dNTP, и две молекулы воды, а второй ион — три фосфатных группы и карбонильный кислород Tyr611 [25]. Предполагаемый механизм реакции полимеризации ДНК, катализируемой ДНК-полимеразами, представлен на рис. 1.

За исправление ошибок синтеза отвечает 3'-5'-экзонуклеазный домен. Установлено, что работа этого домена максимально эффективна, когда его последовательность содержит три мотива: ExoI, ExoII и ExoIII [37]. Основу экзонуклеазного активного центра полимеразы *E. coli* составляют остатки Asp355, Glu357, Asp424 и Asp501. У полимераз из бактерий рода *Thermus* в соответствующих позициях нет ни одного остатка с боковой карбоксильной группой. Введение четырех аналогичных остатков в Taq-полимеразу (Gly308Asp, Val310Glu, Leu356Asp, Arg405Asp) приводит к восстановлению экзонуклеазной активности, но снижает частоту ошибок всего в 2 раза [38].

Еще один интересный пример удачной инженерии — химера Taq и Tth [39]. В данной работе решили объединить по два домена от каждого фермента: экзонуклеазный с большим пальцем из Tth-полимеразы (остатки до 600-го) и ладонь с

пальцами из Taq-полимеразы (остатки после 600-го). В итоге получился фермент, обладающий объединенными плюсами полимераз Taq и Tth. Химера отличалась производительностью в 5 раз большей, чем у Taq-полимеразы и была в 6 раз более чувствительной к некоплементарности в праймере, чем Tth-полимераза, равняясь по этому показателю с полимеразой Taq. Также химерный фермент обладал повышенной способностью реплицировать длинные последовательности.

Таким образом, проведена значительная работа по улучшению свойств полимераз семейства A. Получены ферменты, в несколько раз превосходящие Taq-полимеразу по всем параметрам. Тем не менее, даже в таком виде полученные ферменты далеки от требований, предъявляемых современной биотехнологией, поэтому продолжается поиск новых полимераз с улучшенными свойствами. В данном обзоре под термином “новые ДНК-полимеразы” подразумеваются любые неохарактеризованные ДНК-полимеразы, последовательности которых значительно отличаются от последовательностей охарактеризованных ферментов.

ОТБОР МИКРООРГАНИЗМОВ С НОВЫМИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ

Одно из ключевых свойств ДНК-полимеразы, применяемой в ПЦР, — термостабильность. На данный момент понимание причин природной термостабильности остается довольно скудным. Поэтому главный критерий, по которому отбирают организмы с надеждой найти новые термостабильные ферменты, это их термофильность, т.е. повышенная (обычно выше 60°C) оптимальная температура роста. Но, к сожалению, и этот критерий не гарантирует получения термостабильного фермента. Известны организмы, живущие при повышенных вплоть до 80°C температурах, полимеразы которых работают при таких температурах, но их стабильность значительно снижается при более высоких температурах, поэтому они не могут использоваться в ПЦР. С другой стороны, можно предположить, что фермент определенного организма может оставаться стабильным при температурах, превышающих оптимальную температуру роста данного организма.

С целью апробации алгоритма поиска новых ДНК-полимераз были проанализированы последовательности полимераз всех микроорганизмов из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур (КЭМТК) ИХБФМ СО РАН (http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc_collection). Анализ более 4000 депонированных микроорганизмов позволил отобрать 47, обитающих при температуре выше 50°C. Сравнение нуклеотидных последовательностей генов ДНК-полимераз этих 47 микроорганизмов позволило построить

филогенетическое дерево, отражающее сходство ферментов (рис. 4). Необходимо отметить, что три из этих 47 ДНК-полимераз, выделенные из представителей родов *Thermus* и *Geobacillus*, уже применяются на практике, поэтому далее были рассмотрены оставшиеся 44 фермента.

ДНК-полимеразы представителей рода *Thermus* являются основным источником биотехнологических ДНК-полимераз семейства A. На основании представленных в базе данных Uniprot последовательностей ДНК-полимераз 12 бактерий рода *Thermus* (с учетом аминокислотных замещений S543N, R660T, A743R, оказывающих положительный эффект на ферментативные свойства) получена консенсусная последовательность этих ДНК-полимераз. Эту консенсусную последовательность использовали в качестве эталонной для сравнения с 44 ДНК-полимеразами семейства A микроорганизмов, отобранных из коллекции КЭМТК и не относящихся к *Thermus* и *Geobacillus*. Парное сравнение полимеразных доменов 44 ферментов показало, что сходство всех ДНК-полимераз с консенсусной последовательностью составляет около 30–36%. Таким образом, на данном этапе был сформирован список ДНК-полимераз семейства A, которые отличаются от полимераз представителей рода *Thermus*, что может привести к различиям в таких важных свойствах данных ферментов, как, например, процессивность и точность. Однако это слишком общий критерий селекции новых ДНК-полимераз, поэтому требуются дополнительные ограничения.

С целью более детального сравнения были проанализированы структуры комплекса KlenTaq (фрагмент Кленова Taq-полимеразы) с ДНК [25], что позволило выделить 62 аминокислотных остатка, непосредственно контактирующих с субстратами и кофакторами — ДНК, dNTP и ионами металлов, т.е. либо имеющих водородные связи с ними, либо расположенных на расстоянии до 3 Å от них. Как оказалось, эти остатки обладают высокой степенью консервативности во всех вариантах ДНК-полимераз семейства A не только из рода *Thermus*, но среди отобранных 44 ферментов, что может отражать их функциональную значимость (рис. 5). Интересно отметить, что около половины этих остатков расположены в домене большой пальца и имеют прямой контакт с двухцепочечной частью ДНК (рис. 6). Еще около трети находятся в пальцах и связываются с одноцепочечной частью ДНК, включая пять dNTP-связывающих остатков. Наконец, оставшиеся семь остатков из домена ладони располагаются в различных местах активного центра.

В общем смысле “слепок” из ферментов *Thermus*, как набор функциональных аминокислотных остатков в определенных местах, может характеризовать все полимеразы семейства A, в том

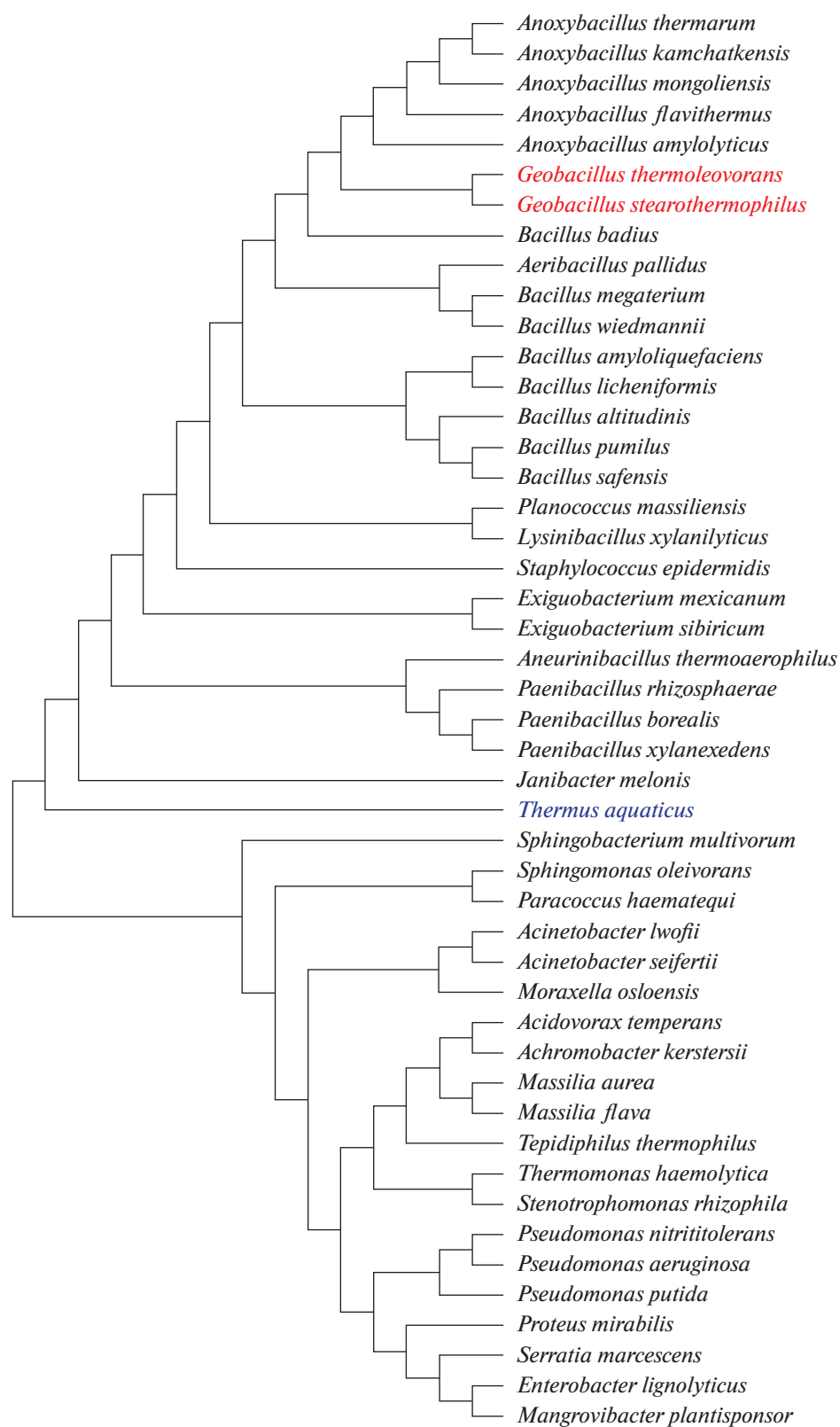


Рис. 4. Филогенетическое дерево ДНК-полимераз семейства A, отобранных из коллекции экстремофильных микроорганизмов, типовых культур и организмов КЭМТК. Цветом отмечены ДНК-полимеразы, которые применяются на практике: представители рода *Thermus* (выделен синим) и *Geobacillus* (выделены красным).

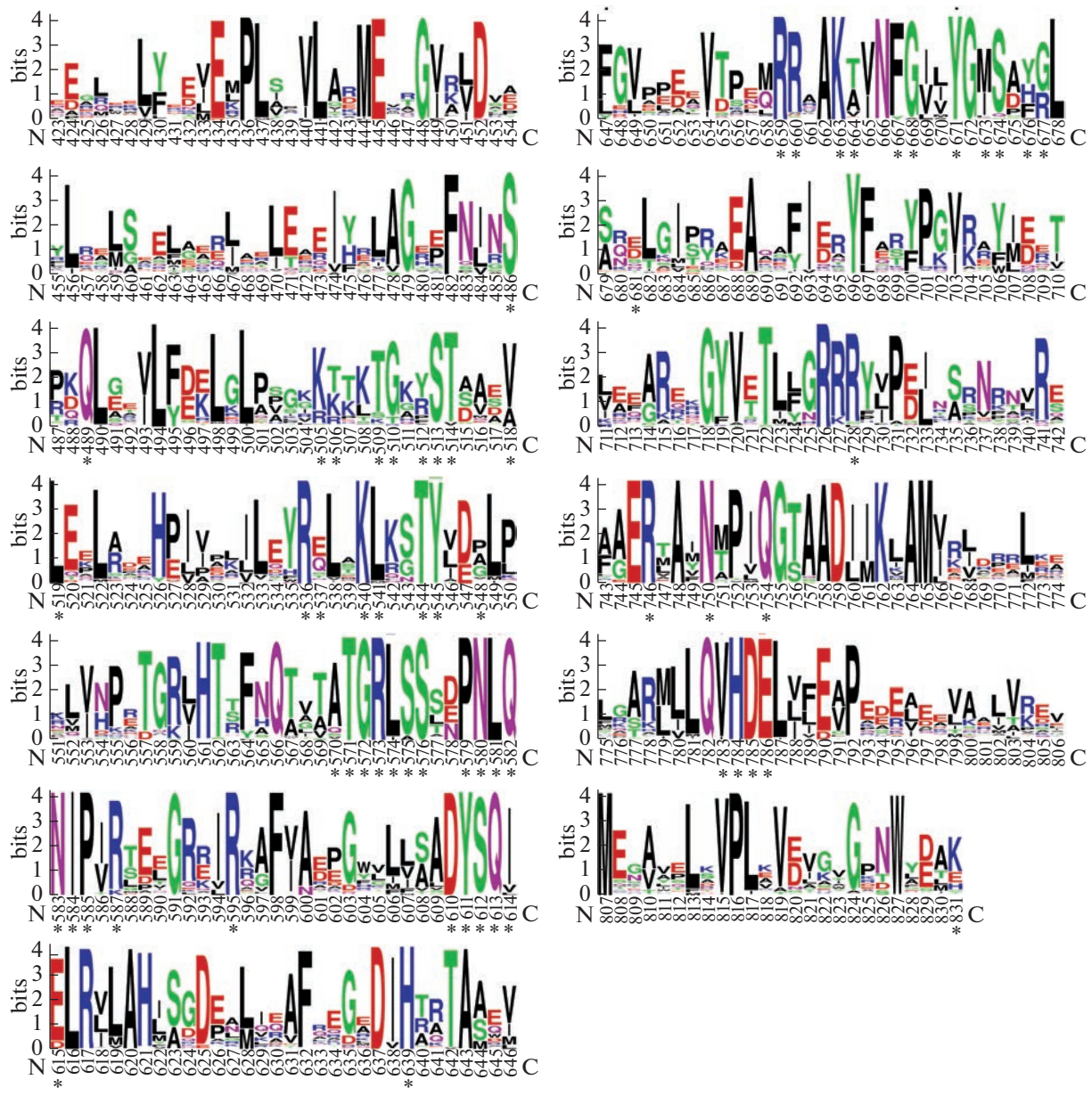


Рис. 5. Графическое представление относительных частот встречаемости различных остатков в последовательностях ДНК-полимераз из организмов, приведенных на рис. 4. Показан полимеразный домен, нумерация остатков соответствует ферменту Taq. Звездочками отмечены 62 аминокислотных остатка, взаимодействующих с субстратами и ионами металла.

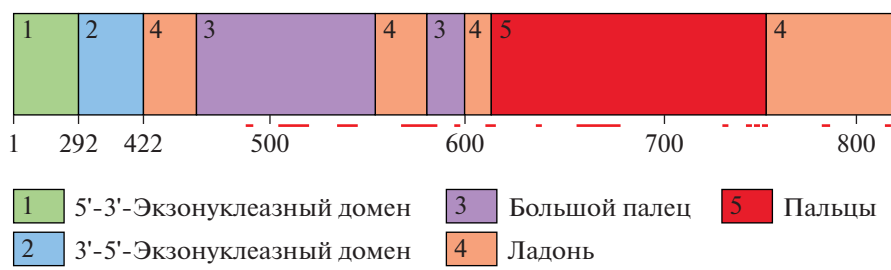


Рис. 6. Схема расположения доменов в аминокислотной последовательности ДНК-полимеразы на примере Taq. Красными точками и полосами возле шкалы обозначены области, в которых находятся 62 субстрат- и кофактор-связывающих остатка.

Таблица 1. Сходство функционального слепок ферментов бактерий рода *Thermus* и ДНК-полимераз других организмов

Номер	Организм*	Сходство, %	UniProt ID
1	<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	84.4	B1YKA1
2	<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	84.4	A0A099DI91
3	<i>Bacillus licheniformis</i>	84.3	A0A1Q9FQ82
4	<i>Bacillus wiedmannii</i>	84.3	A0A0G8C2W8
5	<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i>	83.5	A0A4S3L4B1
6	<i>Anoxybacillus mongoliensis</i>	83.5	A0A7W8JGI3
7	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	83.5	A0A178TIV8
8	<i>Anoxybacillus thermarum</i>	83.5	A0A0D0RXS3
9	<i>Anoxybacillus amylolyticus</i>	83.5	A0A167TTL3
10	<i>Acidovorax temperans</i>	82.9	A0A543L9Q8
11	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	82.0	A0A2X2J883
12	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	81.7	A0A4Y3IZ28
13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80.8	A0A069PX19
14	<i>Massilia aurea</i>	79.8	A0A422QJZ7
15	<i>Achromobacter kerstersii</i>	78.6	A0A6S6ZT87
16	<i>Bacillus altitudinis</i>	78.5	A0A1K1VQ13
17	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	78.4	A0A1G7WTW7
18	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	78.4	A0A5R1C3J3
19	<i>Paenibacillus borealis</i>	78.2	A0A089LEG1
20	<i>Tepidiphilus thermophilus</i>	78.0	A0A0K6IUJ5
21	<i>Acinetobacter seifertii</i>	77.8	N8R043
22	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	77.5	A0A0K9F7W4
23	<i>Proteus mirabilis</i>	77.4	A0A5F0S8B1
24	<i>Serratia marcescens</i>	77.2	A0A0P0Q8W4
25	<i>Enterobacter lignolyticus</i>	77.2	E3G5L7
26	<i>Mangrovibacter plantisponsor</i>	77.2	A0A317PXC7
27	<i>Moraxella osloensis</i>	77.1	A0A378QCD4
28	<i>Paracoccus haematequi</i>	77.0	A0A3S4GLG8
29	<i>Paenibacillus rhizosphaerae</i>	77.0	A0A1R1ERS0
30	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	77.0	A0A1L5LNH1
31	<i>Pseudomonas nitritolerans</i>	76.9	A0A7Y3RE40
32	<i>Janibacter melonis</i>	76.6	A0A176QCH1
33	<i>Planococcus massiliensis</i>	76.4	A0A098EN26
34	<i>Bacillus megaterium</i>	76.3	A0A0L1MA76
35	<i>Bacillus pumilus</i>	76.3	A0A0H1RZB5
36	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	76.3	A0A4V7TSC5
37	<i>Bacillus safensis</i>	76.3	A0A1L6ZGT4
38	<i>Aeribacillus pallidus</i>	76.1	A0A223EA52
39	<i>Bacillus badius</i>	76.0	A0A0C2Y898
40	<i>Pseudomonas putida</i>	75.7	A0A177SGM0
41	<i>Massilia flava</i>	75.0	A0A562Q539
42	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	74.1	A0A023XYJ8
43	<i>Thermomonas haemolytica</i>	73.0	A0A4R3N9Q2
44	<i>Sphingomonas oleivorans</i>	71.3	A0A2T5FXB6

*Жирным шрифтом отмечены отобранные из разных родов виды, обладающие максимальным сходством с функциональным слепком ферментов *Thermus*.

числе не обладающие термостабильностью. Например, в молекуле ДНК-полимеразы I *E. coli* аналоги описанных 62 остатков расположены в тех же местах и выполняют те же функции. Таким образом, набор этих консервативных остатков может выступать функциональным слепком, характеризующим ДНК-полимеразы семейства А в целом, а параметр термостабильности должен быть связан с дополнительными критериями отбора, например, с местом обитания микроорганизма.

Дальнейшее сравнение аминокислотного состава 44 ДНК-полимераз проводили по сходству остатков, входящих в данный функциональный слепок, при их попарном сравнении. Интересно отметить, что во всех 44 отобранных ферментах, принадлежащих к структурному семейству А, сходство этих 62 аминокислотных остатков с функциональным слепком было существенно выше и находилось в промежутке 71–85%, что свидетельствует о высокой функциональной важности входящих в него аминокислотных остатков (табл. 1). Тем не менее, не все эти остатки сохраняют консервативность в анализируемых ферментах. Это может свидетельствовать об изменении свойств отдельных ферментов и их отличии от свойств представителей полимераз *Thermus*.

Необходимо отметить, что среди микроорганизмов, обладающих максимальным сходством (табл. 1), встречаются представители одного рода, отличия между которыми относительно невелики. Поэтому на основании проведенного анализа (при условии отбора по одному представителю одного рода) можно выделить семь ДНК-полимераз, выделенных из *Exiguobacterium sibiricum*, *Bacillus licheniformis*, *Anoxybacillus kamchatkensis*, *Acidovorax temperans*, *Sphingobacterium multivorum*, *Acinetobacter lwoffii* и *Pseudomonas aeruginosa*, аминокислотная последовательность которых обладала сходством более 80% с функциональным слепком ферментов *Thermus*. Можно предположить, что обнаруженные отличия состава функционально важных аминокислотных остатков ДНК-полимераз из этих организмов приведут к улучшению свойств ферментов, необходимых для их использования в качестве биотехнологических инструментов.

Интересно отметить, что лишь одна из ДНК-полимераз этих семи организмов изучена в настоящее время, а именно ДНК-полимераза *B. licheniformis*. В работе 1977 года показано, что полимеразы этого умеренно термофильного организма может работать при температуре 55°C [40]. Кроме того, два представителя рода *Anoxybacillus*, входящие в список, могут существовать при температурах выше 60°C [41, 42], но их ДНК-полимеразы пока не охарактеризованы.

Таким образом, полученный функциональный слепок позволил сравнить представителей

ДНК-полимераз семейства А с ферментами, которые применяются в биотехнологии и нуждаются в улучшении их ферментативных характеристик. Так как сравнение выполнено не по полной аминокислотной последовательности, а лишь по важным функциональным аминокислотным остаткам, можно предположить, что степень соответствия консенсусу будет коррелировать с характеристиками ДНК-полимераз семейства А, которые используются в настоящее время, и при этом позволит выявить ферменты, превосходящие Taq и другие ДНК-полимеразы *Thermus* по точности синтеза.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования, соглашение № 075-15-2021-1085.

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. Nikoomanzar A., Chim N., Yik E.J., Chaput J.C. (2020) Engineering polymerases for applications in synthetic biology. *Q. Rev. Biophys.* **53**, 1–31.
2. Wu D.A.N.Y., Ugozzoli L., Pal B.K., Qian J.I.N., Wallace R.B. (1991) The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol.* **10**, 233–238.
3. Owczarzy R., Moreira B.G., You Y., Behlke M.A., Walder J.A. (2008) Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations. *Biochemistry*. **47**, 5336–5353.
4. Garcia-Diaz M., Bebenek K. (2007) Multiple functions of DNA polymerases. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* **26**, 105–122.
5. Alba M.M. (2001) Replicative DNA polymerases. *Genome Biol.* **2**, 1–7.
6. Rothwell P.J., Waksman G. (2005) Structure and mechanism of DNA polymerases. *Adv. Protein Chem.* **71**, 401–440.
7. Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**, 1550–1557.
8. Choi J.J., Jung S.E., Kim H.K., Kwon S.T. (1999) Purification and properties of *Thermus filiformis* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**, 19–25.
9. Lawyer F.C., Stoffel S., Saiki R.K., Chang S.Y., Landre P.A., Abramson R.D., Gelfand D.H. (1993) High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome Res.* **2**, 275–287.
10. Park J.H., Kim J.S., Kwon S.-T., Lee D.-S. (1993) Purification and characterization of *Thermus caldophilus* GK24 DNA polymerase. *Eur. J. Biochem.* **214**, 135–140.

11. Каледин А.С., Слюсаренко А.Г., Городецкий С.И. (1980) Выделение и свойства ДНК-полимеразы из экстремально-термофильной бактерии *Thermus aquaticus* YT1. *Биохимия*. **45**, 644–651.
12. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. **239**, 487–491.
13. Arezi B., Xing W., Sorge J.A., Hogrefe H.H. (2003) Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases. *Anal. Biochem.* **321**, 226–235.
14. Al-Soud W.A., Rådström P. (2001) Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 485–493.
15. Flaman J.-M., Frebourg T., Moreau V., Charbonnier F., Martin C., Ishioka C., Friend S.H., Iggo R. (1994) A rapid PCR fidelity assay. *Nucl. Acids Res.* **22**, 3259–3260.
16. Ling L.L., Keohavong P., Dias C., Thilly W.G. (1991) Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity: modified T7, Taq, and Vent DNA polymerases. *Genome Res.* **1**, 63–69.
17. Lee J.I., Kim Y.J., Bae H., Cho S.S., Lee J.-H., Kwon S.-T. (2010) Biochemical properties and PCR performance of a family B DNA polymerase from hyperthermophilic euryarchaeon *Thermococcus peptonophilus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**, 1585–1599.
18. Harrell R.A., Hart R.P. (1994) Rapid preparation of *Thermus flavus* DNA polymerase. *Genome Res.* **3**, 372–375.
19. Carballeira N., Nazabal M., Brito J., Garcia O. (1990) Purification of a thermostable DNA polymerase from *Thermus thermophilus* HB8, useful in the polymerase chain reaction. *Biotechniques*. **9**, 276–281.
20. Yang S.-W., Astatke M., Potter J., Chatterjee D.K. (2002) Mutant *Thermotoga neapolitana* DNA polymerase I: altered catalytic properties for non-templated nucleotide addition and incorporation of correct nucleotides. *Nucl. Acids Res.* **30**, 4314–4320.
21. Steitz T.A. (1993) DNA- and RNA-dependent DNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 31–38.
22. Steitz T.A. (1998) A mechanism for all polymerases. *Nature*. **391**, 231–2323.
23. Steitz T.A. (1999) DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *J. Biol. Chem.* **274**, 17395–17398.
24. Joyce C.M. (2013) DNA polymerase I, Bacterial. in *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 2nd ed. 87–90. Elsevier Inc.
25. Betz K., Malyshev D.A., Lavergne T., Welte W., Diedrichs K., Dwyer T.J., Ordoukhanian P., Romesberg F.E., Marx A. (2012) KlenTaq polymerase replicates unnatural base pairs by inducing a Watson-Crick geometry. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 612–614.
26. Raper A.T., Reed A.J., Suo Z. (2018) Kinetic mechanism of DNA polymerases: contributions of conformational dynamics and a third divalent metal ion. *Chem. Rev.* **118**, 6000–6025.
27. Berdis A.J. (2009) Mechanisms of DNA polymerases. *Chem. Rev.* **109**, 2862–2879.
28. Brautigam C.A., Steitz T.A. (1998) Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr. Biol.* **8**, 54–63.
29. Ignatov K.B., Bashirova A.A., Miroshnikov A.I., Kramarov V.M. (1999) Mutation S543N in the thumb subdomain of the Taq DNA polymerase large fragment suppresses pausing associated with the template structure. *FEBS Lett.* **448**, 145–148.
30. Drum M., Kranaster R., Ewald C., Blasczyk R., Marx A. (2014) Variants of a *Thermus aquaticus* DNA polymerase with increased selectivity for applications in allele- and methylation-specific amplification. *PLoS One*. **9**, e96640.
31. Raghunathan G., Marx A. (2019) Identification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase variants with increased mismatch discrimination and reverse transcriptase activity from a smart enzyme mutant library. *Sci. Rep.* **9**, 590.
32. Yamagami T., Ishino S., Kawarabayasi Y., Ishino Y. (2014) Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering. *Front. Microbiol.* **5**, 461.
33. Minnick D.T., Bebenek K., Osheroff W.P., Turner R.M., Astatke M., Liu L., Kunkel T.A., Joyce C.M. (1999) Side chains that influence fidelity at the polymerase active site of *Escherichia coli* DNA polymerase I (Klenow fragment). *J. Biol. Chem.* **274**, 3067–3075.
34. Yamagami T., Matsukawa H., Tsunekawa S., Kawarabayasi Y., Ishino S., Ishino Y. (2016) A longer finger-subdomain of family A DNA polymerases found by metagenomic analysis strengthens DNA binding and primer extension abilities. *Gene*. **576**, 690–695.
35. Roberts R.J. (1995) On base flipping. *Cell*. **82**, 9–12.
36. Suzuki M., Yoshida S., Adman E.T., Blank A., Loeb L.A. (2000) *Thermus aquaticus* DNA polymerase I mutants with altered fidelity. *J. Biol. Chem.* **275**, 32728–32735.
37. Bernad A., Blanco L., Lázaro J., Martín G., Salas M. (1989) A conserved 3'→5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell*. **59**, 219–228.
38. Park Y., Choi H., Lee D.S., Kim Y. (1997) Improvement of the 3'-5' exonuclease activity of Taq DNA polymerase by protein engineering in the active site. *Mol. Cells*. **7**, 419–424.
39. Ignatov K., Kramarov V., Billingham S. (2009) Chimeric DNA polymerase. US20090209005A1, US
40. Stenesh J., McGowan G.R. (1977) DNA polymerase from mesophilic and thermophilic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta — Nucl. Acids Protein Synth.* **475**, 32–41.
41. Kevbrin V.V., Zengler K., Lysenko A., Wiegel J. (2005) *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geyser valley, Kamchatka. *Extremophiles*. **9**, 391–398.
42. Namsaraev Z., Babasanova O., Dunaevsky Y., Akimov V., Barkhutova D., Gorlenko V.M., Namsaraev B. (2010) *Anoxybacillus mongoliensis* sp. nov., a novel thermophilic proteinase producing bacterium isolated from alkaline hot spring, central Mongolia. *Микробиология*. **79**, 516–523.

Comparative Analysis of DNA-Polymerases from Family A as a Tool to Search for Enzymes with New Properties

A. A. Bulygin^{1, 2}, A. A. Kuznetsova¹, **O. S. Fedorova**¹, and N. A. Kuznetsov^{1, 2, *}

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

DNA-polymerases catalyze DNA synthesis during DNA replication, repair, and recombination. A number of DNA-polymerases, such as the Taq enzyme from *Thermus aquaticus*, are used in various applications of molecular biology and biotechnology, in particular as DNA amplification tools. However, the efficiency of these enzymes depends on factors such as DNA origin, primer composition, template length, GC-content, and the ability to form stable secondary structures. Such limitations in the use of currently known DNA-polymerases leave the problem of searching for new enzymes with improved properties. This review summarizes the main structural and molecular-kinetic features of the functioning of DNA-polymerases belonging to the structural family A, including Taq polymerase. A phylogenetic analysis of these enzymes was carried out, which made it possible to establish a highly conserved consensus sequence containing 62 amino acid residues distributed over the structure of the enzyme. A comparative analysis of these amino acid residues among poorly studied DNA-polymerases revealed 7 enzymes that potentially have the properties necessary for their use for DNA amplification.

Keywords: protein-nucleic acid interactions, DNA-polymerase, structural family, catalytic mechanism, active site, kinetics

УДК 581.1

ГЕНОТИП-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССА ХОЛОДОВОГО ОСАХАРИВАНИЯ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

© 2023 г. А. А. Егорова^{а, б, *}, И. А. Сабоиев^б, Н. Е. Костина^а, Д. Д. Куваева^а, А. Б. Щербань^{а, б},
С. М. Ибрагимова^{а, б}, Е. А. Салина^б, А. В. Кочетов^а

^аФедеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

^бКурчатовский геномный центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: egorova@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 24.06.2022 г.

После доработки 26.08.2022 г.

Принята к публикации 26.08.2022 г.

Проанализирована динамика накопления сахаров, а также экспрессия генов вакуолярной инвертазы (*Pain-1*), сахарозсинтазы (*SUS4*), ингибитора инвертазы (*InvInh2*), регулирующих процесс холодового осахаривания, в клубнях картофеля (сорта Никулинский, Симфония, Невский) при хранении в условиях низких температур. Показано, что все три сорта накапливают сахара при низких температурах; при этом максимальное накопление редуцирующих сахаров наблюдается при температуре +4°C. Паттерн экспрессии генов, связанных с холодовым осахариванием, зависит от сорта и длительности хранения. На ранних сроках хранения уровень экспрессии гена вакуолярной инвертазы обратно пропорционален уровню экспрессии ее ингибитора. В клубнях голландского сорта Симфония выявлена высокая экспрессия гена вакуолярной инвертазы и низкая экспрессия гена ингибитора вакуолярной инвертазы; обратная зависимость наблюдается у российских сортов Никулинский и Невский. У всех трех сортов картофеля экспрессия гена сахарозсинтазы наиболее заметно повышена на поздних сроках хранения клубней. Обсуждается участие изученных генов в процессе холодового осахаривания в клубнях картофеля.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., картофель, холодовое осахаривание, вакуолярная инвертаза, сахарозсинтаза

DOI: 10.31857/S0026898423020064, **EDN:** EFXKDY

ВВЕДЕНИЕ

Картофель (*Solanum tuberosum*) — одна из важнейших продовольственных, кормовых, технических культур. Так как в зонах с умеренным климатом урожай картофеля убирают раз в году, осенью, то для круглогодичного использования клубни картофеля хранят при низких температурах, что предотвращает прорастание клубней, их усыхание и гниение. Срок хранения клубней в таких условиях не превышает 6 мес. [1]. Однако при хранении на холоде в клубнях картофеля накапливаются редуцирующие сахара, восстановительный потенциал которых обусловлен наличием свободных альдегидной или кетонной групп. Это накопление сопровождается появлением нежелательного сладкого вкуса (cold-induced sweetening, CIS, холодовое осахаривание). К тому же товарные характеристики клубней заметно ухудшаются, поскольку при термической обработке (например, при приготовлении картофельных чипсов) эти

сахара реагируют со свободными аминокислотами в реакции Майяра, что приводит к появлению темноокрашенных горьких продуктов [2]. Также образуется акриламид, который считается токсичным и потенциально канцерогенным, хотя его прямая связь с развитием онкологических заболеваний не показана [3].

Накопление сахаров как веществ, обладающих осмопротекторными свойствами, в ответ на воздействие низких температур, видимо, является защитной метаболической реакцией, необходимой для выживания диких предков культурного картофеля, которые происходят из Южной Америки. Однако для современных культурных видов это нежелательный признак, так как из-за высокого круглогодичного спроса на клубни около 70% осеннего урожая картофеля требуется помещать на средне- или долгосрочное хранение [4]. Поэтому предотвращение процесса холодового осахаривания клубней картофеля важно для пищевой промышленности.

В клубнях картофеля сахара представлены в основном сахарозой, глюкозой и фруктозой, которые образуются в результате биохимического разложения крахмала. Эти сахара метаболизируются в процессе дыхания клубней, а также могут участвовать в реакции Майяра во время термической обработки. Хотя сахароза не участвует напрямую в реакции Майяра, она гидролизруется в процессе жарки, что способствует развитию окраски чипсов [5].

В клубнях картофеля, хранящихся в холодных условиях, запускается распад крахмала в амилопластах обусловленный индукцией амилолитических ферментов, а продукты распада выводятся из амилопласта либо в виде гексозофосфатов (гексоза-Р) через переносчик глюкозофосфата, либо в виде свободных сахаров транспортерами глюкозы и/или мальтозы. В цитозоле под действием сахарозофосфатсинтазы и сахарозофосфатазы эти метаболиты превращаются в сахарозу. Затем сахароза гидролизруется на составляющие ее гексозы вакуолярной инвертазой [6].

Функциональное значение и точный механизм накопления редуцирующих сахаров при хранении клубней картофеля на холоде до конца не изучены. В настоящее время процесс холодового осахаривания считается одной из самых серьезных проблем в производстве и переработке картофеля. При этом получение картофеля, устойчивого к условиям холодового осахаривания, становится приоритетным в ряде селекционных программ [7, 8].

Вакуолярная инвертаза (*Pain-1*, potato acid invertase 1; *VacInv*, beta-fructofuranosidase, [E.C. 3.2.1.26]), локализованная в вакуолях, вносит основной вклад в холодовое осахаривание клубней картофеля. Показано, что экспрессия гена *Pain-1* повышается при воздействии холода, а снижение экспрессии гена вакуолярной инвертазы методом РНК-интерференции [9, 10] и его нокаут методом TALEN [11] приводят к уменьшению накопления редуцирующих сахаров на холоде, вследствие чего полученные из мутантных растений чипсы имеют более светлый цвет, нежели чипсы из немутантных растений.

Идентифицирован ген вакуолярной инвертазы (*Pain-1*) картофеля, изучена его структура и экспрессия, а также найдены однонуклеотидные замены (SNP, single nucleotide polymorphism), предположительно влияющие на активность фермента [12, 13]. Показано, что активность промотора гена вакуолярной инвертазы регулируется сахарами, гормонами, холодом [14], а гиперметилирование промотора приводит к снижению экспрессии гена и накопления редуцирующих сахаров [15]. Регуляция инвертазы происходит не только на уровне транскрипции, но и посттрансляционно, с участием белков-ингибиторов. Най-

дены два ингибитора вакуолярной инвертазы, *St-Inh* (*Inh1*) и *StInvInh2* (*Inh2*), локализованные, соответственно, в апопласте и вакуолях [16]. Показано, что активность вакуолярной инвертазы регулируется ингибиторами, но не влияет на уровень ее мРНК. Оба ингибитора играют роль в холодовом осахаривании, но показано, что *Inh2* более эффективно ингибирует вакуолярную инвертазу [17, 18]. Уровень экспрессии *Inh2* в клубнях картофеля с устойчивым к холодовому осахариванию генотипом также существенно выше, чем у сортов с чувствительным к осахариванию генотипом [16].

Сахарозосинтаза (*SuSy*, sucrose synthase, *SUS*, [E.C. 2.4.1.13]) катализирует превращение сахарозы и нуклеозиддифосфата (*NDP*) в нуклеозиддифосфатглюкозу (*NDP*-глюкоза) и фруктозу, а также обратный процесс синтеза сахарозы. Но в основном *SUS* расщепляет сахарозу и именно в этом качестве играет важную роль в метаболизме сахаров в клубнях картофеля. *SUS4* — это изоформа сахарозосинтазы, которая чаще всего экспрессируется в клубнях [19]. Показана возможная связь сахарозосинтазы с холодовым осахариванием, а также повышение экспрессии этого фермента в ответ на воздействие холода [20–23]. Сахарозосинтаза, наряду с вакуолярной инвертазой и ее ингибиторами, вносит большой вклад в холодовое осахаривание [24]. Относительный вклад генов, кодирующих эти ферменты, и их регуляция в процессе холодового осахаривания остаются неясными. Вполне вероятно, что наряду с общими особенностями генетической регуляции холодового осахаривания существуют и генотип-зависимые особенности, связанные с дифференцированным вкладом того или иного гена в этот процесс. Соответственно, для выработки оптимальной стратегии искусственного ингибирования процесса холодового осахаривания в селекционно-ценных сортах картофеля, необходимо детально исследовать динамику накопления сахаров в клубнях разных генотипов на холоде, параллельно оценивая уровень экспрессии, в первую очередь, структурных и метаболических генов, а также генов, вовлеченных в их регуляцию на разных уровнях.

Сорта российской селекции Никулинский, Невский, а также сорт голландской селекции Симфония популярны в России, имеют хорошие вкусовые качества, высокую урожайность, устойчивы ко многим заболеваниям и неблагоприятным факторам внешней среды (<http://reestr.gos-sort.com>). Но эти сорта генетически достаточно разнородны, что подтверждается их фенотипическими различиями — окраской цветков и клубней, массой клубня, содержанием крахмала, сроками созревания (<http://reestr.gos-sort.com>), опушением [25], спектральными характеристиками клубней [26]. Анализ маркеров этих сортов выяв-

ляет их генетическую разнородность по SSR-маркерам, маркерам устойчивости к заболеваниям [27, 28], SNP-маркерам, ассоциированным со свойствами крахмала [29, 30]. По набору хозяйственно-ценных признаков и уровню регенерационной способности *in vitro* эти сорта представляют интерес для работ по геномному редактированию [31]. Поэтому анализ процесса холодогов осахаривания именно у этих сортов особенно актуален. В нашей работе проанализирована динамика накопления сахарозы, глюкозы и фруктозы в клубнях трех сортов картофеля при низких температурах, а также экспрессия ключевых генов-кандидатов (*Pain-1*, *SUS4*, *Inh2*), отвечающих за процесс холодогов осахаривания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Растительный материал. В исследовании использовали сорта картофеля Никулинский, Симфония и Невский СибНИИРС ИЦиГ СО РАН. Растения выращивали на поле СибНИИРС ИЦиГ СО РАН летом 2020 года в одинаковых условиях. Урожай убрали в конце августа и отбирали свежие здоровые клубни массой 100–130 г. Клубни просушивали на открытом воздухе в течение 7 дней при температуре 23°C, затем упаковывали в небольшие бумажные пакеты и хранили в холодильной камере (Pozis, линия Paracels) при фиксированной температуре 4, 8 и 12°C до 120 дней.

Анализ содержания крахмала. Содержание крахмала определяли в контрольной точке (0 дней, сразу после высушивания) в трех клубнях каждого сорта. Использовали метод, основанный на определении количества глюкозы, образовавшейся после ферментативного расщепления крахмала.

Пробу гомогенизировали, брали навеску 200 мг, добавляли 1 мл смеси ДМСО и соляной кислоты (16 мл ДМСО, 4 мл концентрированной HCl), инкубировали при температуре 60°C в течение 60 мин, тщательно перемешивая. Пробу перенесли в стеклянные пробирки, добавляли 2.5 мл дистиллированной воды, смесь разбавляли в 5 раз и затем доводили pH до 4–5 с помощью гидроксида натрия (5 моль/л). Далее добавляли реактивы и инкубировали смесь согласно протоколу набора “Boehringer Ingelheim” (Германия).

Анализ содержания сахаров. В клубнях каждого сорта определяли содержание сахаров в контрольной точке (0 дней, сразу после высушивания), спустя 15, 30, 60, 90 и 120 дней хранения при указанных температурах. Брали по три клубня каждого сорта, промывали их и разрезали продольно пополам. Общее количество сахаров определяли с использованием антронового метода [32]. Содержание фруктозы и сахарозы определяли резорциновым методом [32], глюкозы — глюкозооксидазным методом, используя набор Глюкоза-

Ново (“Вектор Бест”, Россия). Оптическую плотность раствора измеряли на сканирующем спектрофотометре СПЕК ССП-705. Содержание сахаров рассчитывали по калибровочным графикам. Средние значения, определенные по трем биологическим повторностям, обрабатывали статистически для оценки стандартного отклонения и представления экспериментальных данных в виде гистограмм.

Анализ экспрессии генов. Суммарную РНК выделяли из срединной части клубней (по три клубня каждого сорта) в контрольной точке (после высушивания), через 15 и 90 дней хранения при 4°C с использованием RNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, Германия). Выделенную РНК обрабатывали ДНКазой (RNase-Free DNase Set, “Qiagen”). Концентрацию определяли с использованием NanoDrop 2000 (“Thermo Scientific”, США), качество РНК оценивали электрофоретически и с помощью Qubit 3.0 Fluorometer (“Thermo Scientific”). кДНК синтезировали с помощью iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (“BioRad”, США) и набора реактивов ОТ М-MuLV–RH (“Биолабмикс”, Россия). Количество РНК на образец — 100 нг. Для анализа экспрессии полученную кДНК разводили в 10 раз. Количественную ПЦР проводили в автоматическом анализаторе LightCycler® 96 (“Roche”, Швейцария) в объеме 15 мкл, включая 7.5 мкл БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (×2) (“Биолабмикс”), 0.4 мкл каждого праймера (10 мкМ), 3 мкл кДНК. Условия реакции с каждой парой праймеров: 95°C, 10 мин; затем 45 циклов — 95°C, 10 с; 61°C, 10 с; 72°C, 15 с. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в табл. 1.

Предварительно экспрессию референсных генов-кандидатов *APRT* (CK270447), *EF-1-α* (AB061263) и *SEC3A* (XM_006342541.2) [24] анализировали в различных точках, для итогового анализа в качестве референсного выбрали ген *APRT* (аденин-фосфорибозилтрансфераза), имеющий наиболее стабильный уровень экспрессии в клубнях. Стабильный уровень экспрессии этого гена в клубнях картофеля при холодогов стрессе показан и в работе [33]. Уровень транскриптов вакуолярной инвертазы (*Pain-1*, HQ110080.1), сахарозосинтазы (*Sus4*, NM_001288357.1) и ингибитора инвертазы (*Inh2*, XM_006349784.2) относительно референсного гена оценивали при помощи LightCycler® 96 Software.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим использованием критерия попарных сравнений Тьюки (https://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/). Значимыми считали $p \leq 0.05$.

Таблица 1. Праймеры, использованные для анализа экспрессии генов

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Источник
PAIN1_rt_F PAIN1_rt_R	GAGGCTCCGGGAGTTGGTAA CCAAATCTTGACGGAGGCAG	[24]
SUS4_rt_F SUS4_rt_R Inh2_rt_F Inh2_rt_R	GCATCCTTTCTTAAACCAACC GAGGTATTCTCTGCCTTCC ACCACCCTAGGCCTCATCAT ACGGCTACCGTTACATCAGC	Разработаны в данной работе
APRT_rt_F APRT_rt_R	GAACCGGAGCAGGTGAAGAA GAAGCAATCCCAGCGATACG	[33]
efl α _rt_F efl α _rt_R sec3_rt_F sec3_rt_R	ATTGGAAACGGATATGCTCCA TCCTTACCTGAACGCCTGTCA GCTTGCACACGCCATATCAAT TGGATTTTACCACCTTCCGCA	[24]

Таблица 2. Содержание крахмала в клубнях картофеля

Сорт	Среднее содержание, %	Данные Гос. реестра сортов России (http://reestr.gossort.com)
Невский	13.3 $\pm$ 0.40	12.0–14.0
Симфония	15.5 $\pm$ 0.15	13.0–19.0
Никулинский	17.5 $\pm$ 0.40	12.0–21.0

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Содержание крахмала

Содержание крахмала определяли ферментативным методом в трех клубнях каждого сорта (Невский, Никулинский, Симфония) (табл. 2). Можно отметить, что содержание крахмала в клубнях этих сортов соответствует данным оригинаторов и не выходит за пределы групп.

Содержание сахаров

Результаты нашего исследования показали, что в клубнях картофеля при хранении при низких температурах (4 и 8°C) происходит интенсивное накопление редуцирующих сахаров и сахарозы. Содержание сахаров, низкое в свежесобранных клубнях всех сортов, увеличивается по мере хранения (рис. 2а). При хранении при температуре 12°C, наоборот, наблюдалось снижение содержания сахаров в клубнях (рис. 2а).

Наиболее интенсивно сахара накапливались при 4°C, причем пик содержания всех трех видов сахаров у каждого из трех сортов приходился на срок 90 дней, далее содержание сахаров немного снижалось (рис. 2а).

Накопление сахаров было наиболее выраженным у сорта Никулинский, наиболее слабым — у сорта Невский. Самым значительным оказалось

накопление глюкозы при хранении. Содержание глюкозы в клубнях сорта Никулинский возросло в 5 раз, а у сорта Невский в 3 раза (рис. 2б). Конечное содержание фруктозы было примерно равно исходному содержанию глюкозы, поэтому увеличение содержания фруктозы у сорта Никулинский в 3 раза незначительно повышало уровень общих сахаров (рис. 2в).

Конечное содержание сахарозы было примерно равно исходному содержанию общих сахаров, при этом содержание сахарозы в клубнях сорта Никулинский возросло не более чем в 2.5 раза, что вдвое ниже конечного повышения содержания общих сахаров (рис. 2г). Таким образом, глюкоза вносит наибольший вклад в увеличение содержания общих сахаров в клубнях каждого из трех сортов картофеля, хранящихся в течение 90 дней при 4 и 8°C.

Экспрессия генов

Экспрессию генов мы анализировали при 4°C, так как именно при этой температуре наблюдалось максимальное накопление сахаров, и именно эта температура используется при промышленном хранении картофеля. Были выбраны временные точки — 15 и 90 дней, поскольку в этом временном диапазоне накопление сахаров достигает наибольшего значения, а значит, отражает

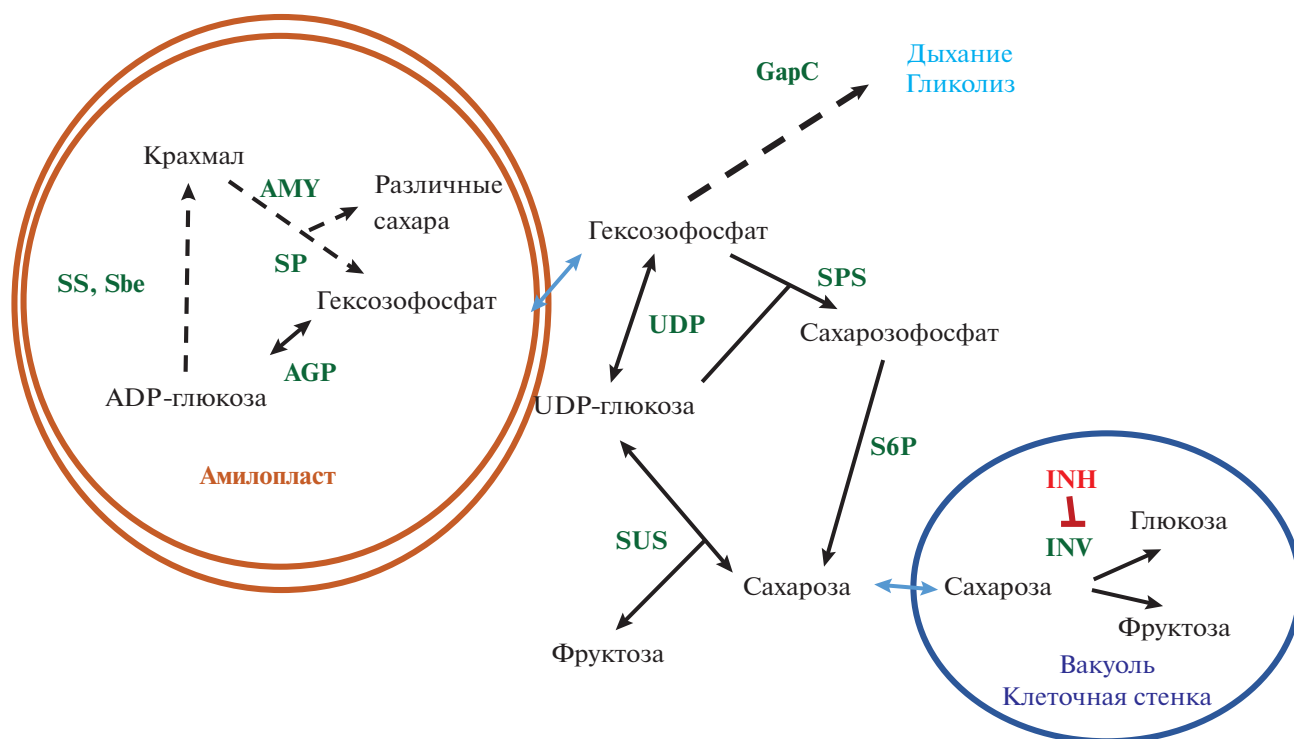


Рис. 1. Гены, вовлеченные в процесс холодового осаживания клубней картофеля. SS – крахмалсинтазы, INV – инвертазы (вакуолярная и апопластическая), INH – ингибиторы инвертаз, Sbe – крахмал-ветвящий фермент, AMY – амилазы, SP – фосфорилаза крахмала, UDP – UDP-глюкоза-пирофосфорилаза, AGP – ADP-глюкоза-пирофосфорилаза, GapC – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, S6P – сахарозофосфатаза, SUS – сахарозосинтаза, SPS – сахарозофосфатсинтаза.

процессы, происходящие в клубнях и на ранних этапах холодового стресса, и на поздних – в точке перехода в стадию снижения концентрации сахаров. Результаты оценки экспрессии генов приведены на рис. 3. Показано, что экспрессия всех трех исследуемых генов под воздействием низких температур увеличилась по сравнению с контролем (0 дней), однако степень увеличения зависела от сорта. Экспрессия гена вакуолярной инвертазы в клубнях сорта Симфония увеличилась наиболее значительно по сравнению с остальными сортами, достигая максимального значения на 15-й день и снижаясь через 90 дней до уровня контрольной точки. В клубнях сорта Никулинский экспрессия гена вакуолярной инвертазы также значительно повысилась на 15-й день и также вернулась к первоначальному состоянию через 90 дней. У сорта Невский экспрессия инвертазы увеличилась через 15 дней и оставалась примерно на том же уровне через 90 дней (рис. 3а).

Экспрессия гена ингибитора вакуолярной инвертазы увеличилась через 15 дней в клубнях сортов Невский и Никулинский и снизилась через 90 дней. В клубнях сорта Симфония экспрессия данного гена, если и увеличилась, то весьма незначительно на 15-й день и немного снизилась в конечной точке (рис. 3б).

Экспрессия гена сахарозосинтазы значительно увеличилась через 15 дней в клубнях сортов Никулинский и Невский и незначительно – у Симфонии. Через 90 дней экспрессия этого гена у сорта Симфония повысилась так же заметно, как у двух других сортов на 15-й день, и оставалась стабильно высокой у сортов Никулинский и Невский (рис. 3в).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хранение картофеля в условиях холода предотвращает их прорастание и гниение, но вызывает холодовое осаживание, что негативно сказывается на товарных качествах клубней. В нашей работе проанализирована динамика накопления сахаров в клубнях трех сортов картофеля при низких температурах, а также экспрессия ключевых генов-кандидатов, отвечающих за процесс холодового осаживания.

Установлено, что свежесобранные клубни всех изученных нами сортов характеризовались низким содержанием сахаров и накапливали сахара при хранении при низких температурах. Количество сахаров, накапливаемых при 4°C, было больше, чем при 8 и 12°C независимо от сорта, т.е. степень накопления сахаров отрицательно коррели-

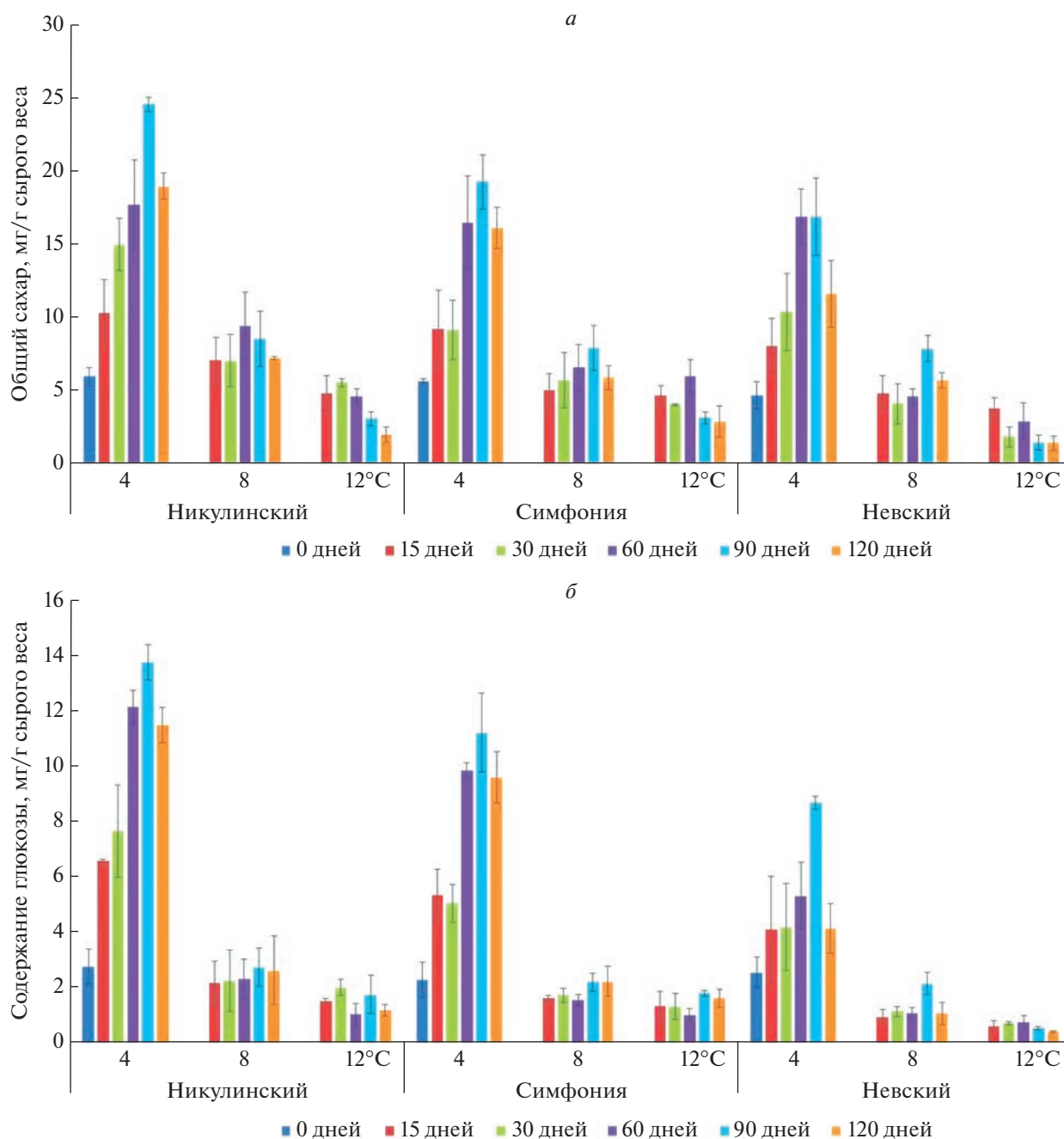


Рис. 2. Влияние температуры и длительности хранения на содержание общих сахаров (а), глюкозы (б), фруктозы (в) и сахарозы (г) в клубнях картофеля. Каждый столбец отражает среднее значение, вычисленное по трем биологическим повторам. Приведено стандартное отклонение.

ривала с температурой хранения. Это согласуется с данными предыдущих исследований [15, 34]. Основной вклад в накопление общих сахаров вносила глюкоза, концентрация которой в начальной и во всех последующих точках измерения значительно превышала концентрацию фруктозы и сахарозы (рис. 2б). Большие концентрации глюкозы свидетельствуют об активном разложении

крахмала и сахарозы на простые сахара, что наблюдалось и у других сортов, также подверженных холодовому осахариванию [15, 24]. Интересно, что в нашем исследовании концентрации глюкозы превышали концентрации фруктозы, хотя обычно после хранения на холоде концентрации этих двух сахаров имели близкие значения [24, 35]. Возможно, это связано с особенностями

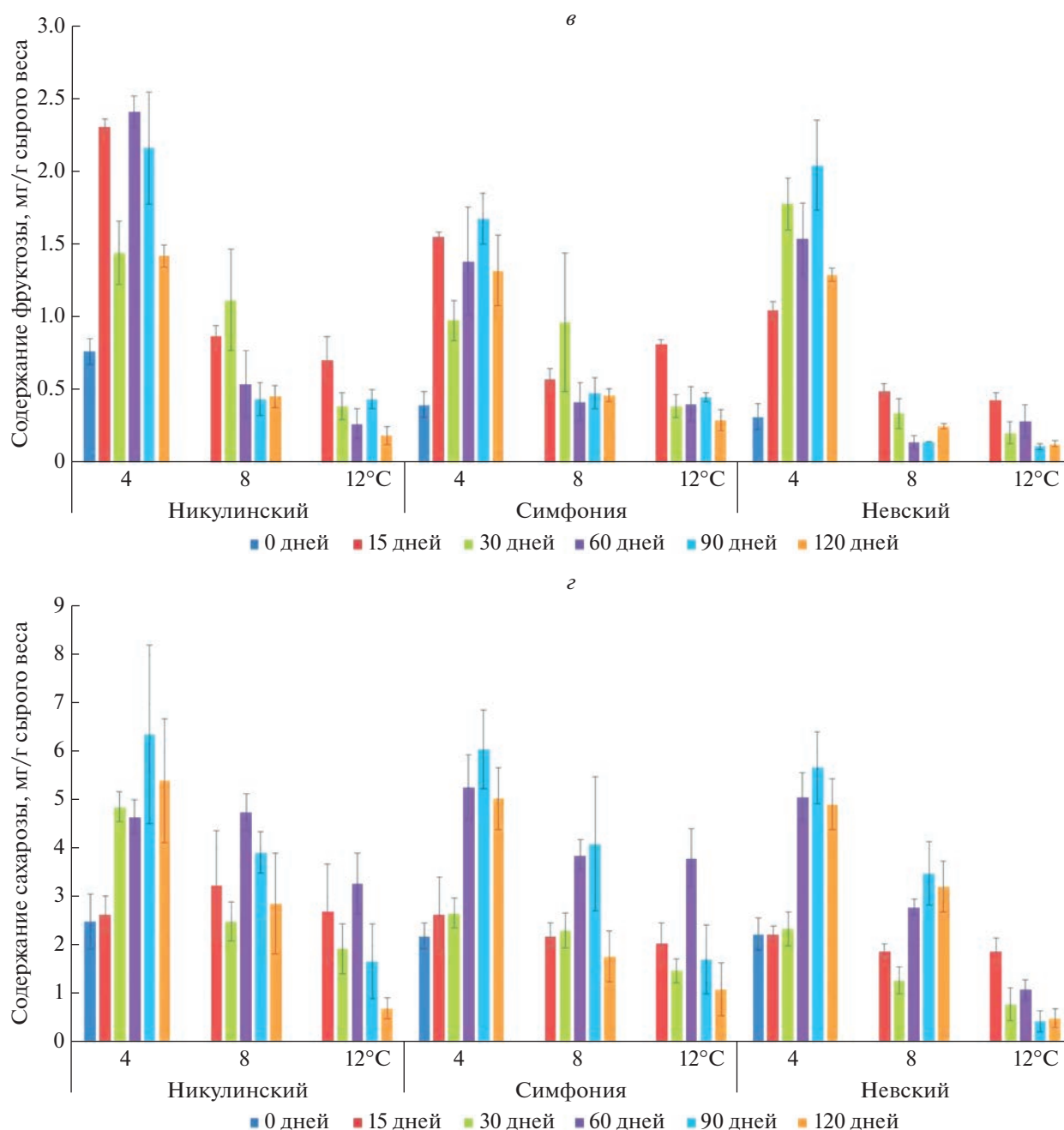


Рис. 2. Окончание.

генотипов использованных сортов или с активностью других ферментов, ответственных за метаболизм углеводов. Об этом свидетельствует тот факт, что сорта изначально различались по уровню сахаров в клубнях и динамике их накопления (рис. 2).

Содержание сахаров у сортов Никулinsky и Симфония было во всех точках выше, чем у сорта Невский. Концентрация сахаров может быть пропорциональной концентрации крахмала — основ-

ного источника редуцирующих сахаров, образующихся в результате его гидролиза. Содержание крахмала в клубнях сорта Невский по нашим данным составляет 13.3%, в то время как сорта Никулinsky и Симфония содержат 17.5 и 15.5% крахмала соответственно.

Накопление сахаров достигало пика на 90-й день хранения, далее их концентрация снижалась, хотя и не в одинаковой степени у разных сортов. Подобное снижение отмечено, например, Abbasi K.S.

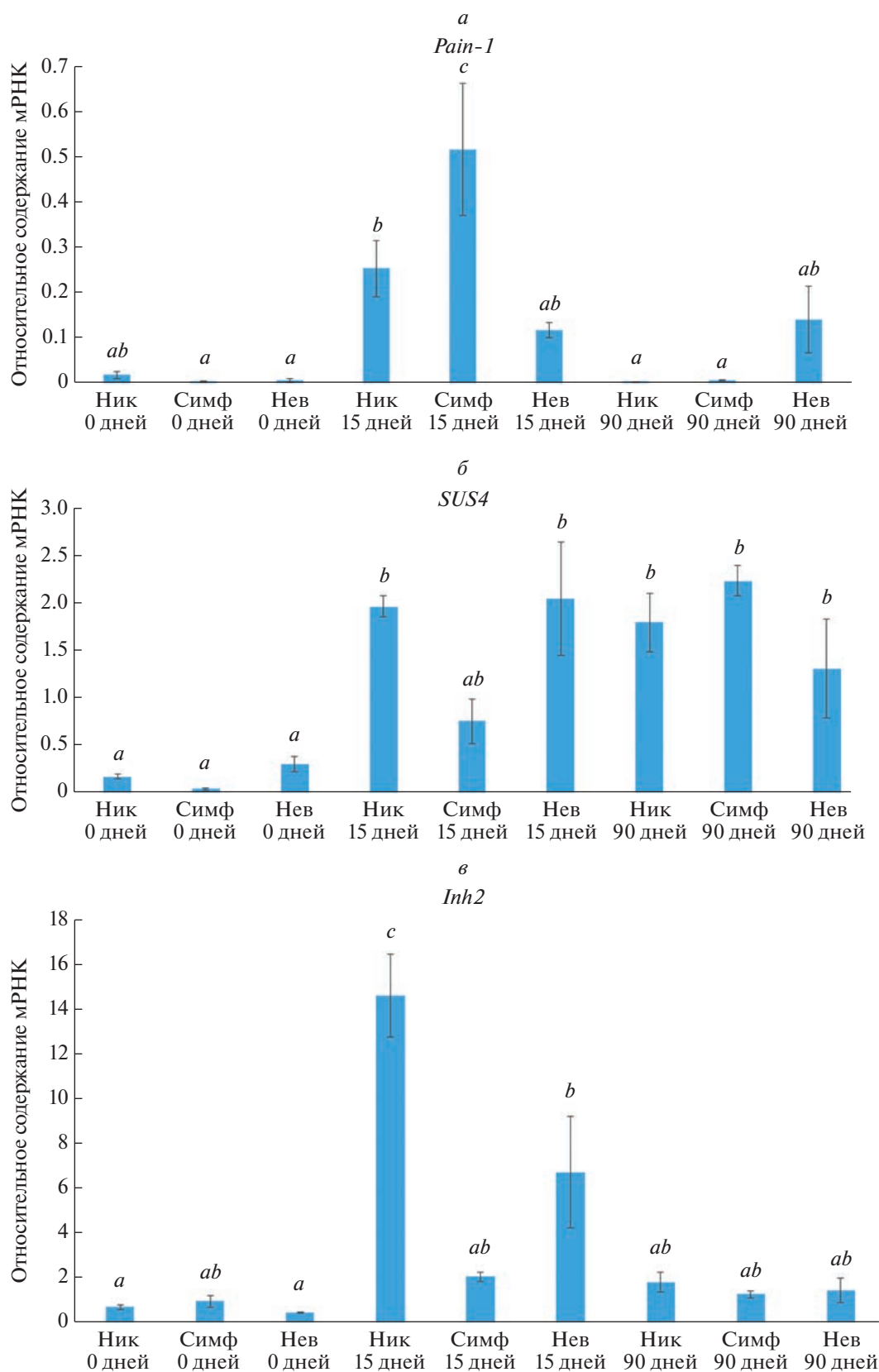


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов *Pain-1* (а), *Inh2* (б), *SUS4* (в) в контроле и при хранении в течение 15 и 90 дней при 4°C в клубнях сортов Невский, Симфония и Никулинский. Приведены средние значения, вычисленные по трем биологическим повторам, и ошибка среднего. Буквы над столбцами отражают статистически значимые различия (p -value < 0.05).

и соавт. [36], которые наблюдали снижение содержания общих сахаров после 70 дней хранения. Это снижение может быть связано с активацией окисления редуцирующих сахаров в процессе дыхания [37] или с ресинтезом крахмала в клубнях [22].

Нами выявлена активация экспрессии генов вакуолярной инвертазы (*Pain-1*), сахарозосинтазы (*SUS4*) и ингибитора инвертазы (*Inh2*) в ответ на воздействие низких температур (рис. 3), что согласуется с данными [20, 23, 24]. Однако заметные различия паттерна экспрессии этих генов в разных сортах могут свидетельствовать о генотипзависимой регуляции холодового осахаривания.

Полученные нами данные позволяют однозначно утверждать, что вакуолярная инвертаза является ключевым ферментом и основным лимитирующим фактором холодового осахаривания, как предполагалось ранее [22], так как повышение экспрессии гена *Pain-1*, наблюдаемое у всех сортов в начале срока хранения, было статистически значимым только у сорта Симфония. У двух же других сортов, включая Никулинский, который характеризуется самым высоким уровнем накопления сахаров, степень повышения экспрессии гена *Pain-1* была не столь значительной (рис. 3а). Кроме того, у сорта Никулинский эта степень отрицательно коррелировала с уровнем экспрессии гена ингибитора инвертазы *Inh2*, который статистически значимо увеличился, особенно при сопоставлении с низким уровнем экспрессии этого гена в клубнях сорта Симфония (рис. 3б). Следовательно, можно предположить, что активность гена *Pain-1* в клубнях сорта Никулинский снижена за счет ее ингибирования продуктом гена *Inh2*, и она не вносит существенного вклада в осахаривание. Пик экспрессии гена вакуолярной инвертазы спустя 7–14 дней хранения с последующим ее снижением наблюдали и ранее [20, 23]. Уровень экспрессии гена вакуолярной инвертазы в клубнях всех сортов снизился практически до исходных значений через 90 дней хранения, а экспрессия гена сахарозосинтазы значимо повысилась, начиная с 15-го дня хранения (рис. 3в). При этом уровень экспрессии гена сахарозосинтазы оставался повышенным и на 90-й день хранения, в отличие от инвертазы.

Повышенная экспрессия гена сахарозосинтазы сохраняется даже после хранения клубней в условиях холода в течение нескольких месяцев, что согласуется с данными [20, 24], указывающими на важную роль сахарозосинтазы в холодовом осахаривании. Согласно Baroja-Fernández E. и соавт. [19], существует обратная корреляция между уровнями экспрессии и активности инвертазы и сахарозосинтазы, кроме того, в трансгенных клубнях с повышенной экспрессией гена сахаро-

зосинтазы наблюдалось повышенное содержание крахмала. Известно, что сахароза, поступающая из апопласта в цитозоль клеток клубней, гидролизруется сахарозосинтазой до UDP-глюкозы и фруктозы. Следовательно, от уровня экспрессии этого фермента может зависеть степень накопления моносахаридов. Однако на степень накопления может влиять и обратный процесс — скорость синтеза олиго- и полисахаридов, особенно крахмала. В работе Lii X. и соавт. [22] показана активация генов синтеза крахмала в растениях картофеля с генотипом, устойчивым к холодовому осахариванию. Кроме того, Shumbe L. и соавт. [15] наблюдали повышение экспрессии сахарозосинтазы в клубнях сорта, устойчивого к осахариванию, по сравнению с чувствительным сортом. Таким образом, точная роль сахарозосинтазы, как и двух других изученных в нашей работе ферментов, в процессах метаболизма углеводов в клубнях картофеля до сих пор не определена.

В нашей работе мы анализировали гены, которые, как считается, вносят основной, но не единственный вклад в холодовое осахаривание. Известно, что с накоплением сахаров при воздействии холода связаны и другие гены углеводного метаболизма — как структурные, так и регуляторные. Щелочные/нейтральные инвертазы гидролизуют сахарозу в цитоплазме в ответ на воздействие низких температур [38], экспрессия амилаз и их ингибиторов коррелирует с накоплением редуцирующих сахаров в клубнях [39]. Некоторые аллели гена UDP-глюкоза-пирофосфорилазы ассоциированы с устойчивостью к холодовому осахариванию [40, 41]. Как упоминалось выше, вакуолярная инвертаза может регулироваться не только *INH2*, но и ингибитором *INH1*, а также протеинкиназой *SnRK1* [42]. Недавно показали, что транскрипционный фактор *StTINY3* влияет на устойчивость к холодовому осахариванию, повышая экспрессию ингибитора инвертазы *INH2* и взаимодействуя с другими генами метаболизма углеводов [43]. Скорее всего, эти гены обуславливают также генотип-специфичную регуляцию холодового осахаривания, поэтому требуется дальнейшее изучение роли генов в данном процессе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые показана генотип-специфичная динамика накопления редуцирующих сахаров в клубнях отечественных сортов картофеля Никулинский, Невский и голландского сорта Симфония при хранении при низких температурах, а также выявлены различия в экспрессии генов, связанных с процессом холодового осахаривания. Выдвинуто предположение о различном вкладе ферментов, кодируемых данными генами, в регуляцию холодового осахаривания. Получен-

ные результаты способствуют расширению представлений о молекулярно-генетических механизмах реакции растений на воздействие низких температур.

Авторы выражают благодарность С.В. Герасимовой и Д.А. Афонникову за помощь в проведении исследования и при написании статьи.

Анализ содержания сахаров в процессе хранения проведен в рамках подпрограммы КНТП “Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации” проект № FWNR-2019-0012. Разработка праймеров и анализ экспрессии генов выполнен в рамках бюджетного проекта № FWNR-2022-0017.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bianchi G., Scalzo R.L., Testoni A., Maestrelli A. (2014) Nondestructive analysis to monitor potato quality during cold storage. *J. Food Quality*. **37**, 9–17.
2. Zhang H., Hou J., Liu J., Zhang J., Song B., Xie C. (2017) The roles of starch metabolic pathways in the cold-induced sweetening process in potatoes. *Starch-Stärke*. **69**, 1600194.
3. McCullough M.L., Hodge R.A., Um C.Y., Gapstur S.M. (2019) Dietary acrylamide is not associated with renal cell cancer risk in the CPS-II nutrition cohort. *Cancer Epidemiol. Prevention Biomarkers*. **28**, 616–619.
4. Sowokinos J.R. (2001) Biochemical and molecular control of cold-induced sweetening in potatoes. *Am. J. Potato Res.* **78**, 221–236.
5. Amrein T.M., Schönbachler B., Rohner F., Lukac H., Schneider H., Keiser A., Escher F., Amadò R. (2004) Potential for acrylamide formation in potatoes: data from the 2003 harvest. *Eur. Food Res. Technol.* **219**, 572–578.
6. Chen S., Hajirezaei M.R., Zanol M.I., Hornyik C., Debastn S., Lacomme C., Fernie A.R., Sonnewald U., Boernke F. (2008) RNA interference-mediated repression of sucrose-phosphatase in transgenic potato tubers (*Solanum tuberosum*) strongly affects the hexose-to-sucrose ratio upon cold storage with only minor effects on total soluble carbohydrate accumulation. *Plant Cell Environ.* **31**, 165–176.
7. Xiong X., Tai G.C.C., Seabrook J.E.A., Wehling P. (2002) Effectiveness of selection for quality traits during the early stage in the potato breeding population. *Plant Breed.* **121**, 441–444.
8. Hamernik A.J., Hanneman R.E., Jansky S.H. (2009) Introgression of wild species germplasm with extreme resistance to cold sweetening into the cultivated potato. *Crop Sci.* **49**, 529–542.
9. Liu X., Zhang C., Ou Y., Lin Y., Song B., Xie C., Liu J., Li X.Q. (2011) Systematic analysis of potato acid invertase genes reveals that a cold-responsive member, StvacINV1, regulates cold-induced sweetening of tubers. *Mol. Genet. Genom.* **286**, 109–118.
10. Bhaskar P.B., Wu L., Busse J.S., Whitty B.R., Hamernik A.J., Jansky S.H., Jiang J. (2010) Suppression of the vacuolar invertase gene prevents cold-induced sweetening in potato. *Plant Physiol.* **154**, 939–948.
11. Clasen B.M., Stoddard T.J., Luo S., Demorest Z.L., Li J., Cedrone F., Tibebu R., Davison S., Ray E.E., Daulhac A., Coffman A. (2015) Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol. J.* **14**, 169–176.
12. Draffehn A.M., Meller S., Li L., Gebhardt C. (2010) Natural diversity of potato (*Solanum tuberosum*) invertases. *BMC Plant Biol.* **10**, 1–15.
13. Слугина М.А., Снегирь Е.А., Рыжова Н.Н., Кочиева Е.З. (2013) Структура и полиморфизм фрагмента локуса Pain-1, кодирующего вакуолярную инвертазу видов *Solanum*. *Молекуляр. биология*. **47**, 243–243.
14. Ou Y., Song B., Liu X., Xie C., Li M., Lin Y., Zhang H., Liu J. (2013) Promoter regions of potato vacuolar invertase gene in response to sugars and hormones. *Plant Physiol. Biochem.* **69**, 9–16.
15. Shumbe L., Visse M., Soares E., Smit I., Dupuis B., Vanderschuren H. (2020) Differential DNA methylation in the *Vinv* promoter region controls cold induced sweetening in potato. *bioRxiv*. 062562.
16. Brummell D.A., Chen R.K., Harris J.C., Zhang H., Hamiaux C., Kralicek A.V., McKenzie M.J. (2011) Induction of vacuolar invertase inhibitor mRNA in potato tubers contributes to cold-induced sweetening resistance and includes spliced hybrid mRNA variants. *J. Exp. Botany*. **62**, 3519–3534.
17. Liu X., Lin Y., Liu J., Song B., Ou Y., Zhang H., Li M., Xie C. (2013) StInvInh2 as an inhibitor of Stvac INV 1 regulates the cold-induced sweetening of potato tubers by specifically capping vacuolar invertase activity. *Plant Biotechnol. J.* **11**, 640–647.
18. Liu X., Cheng S., Liu J., Ou Y., Song B., Zhang C., Lin Y., Li X., Xie C. (2013) The potato protease inhibitor gene, *St-Inh*, plays roles in the cold-induced sweetening of potato tubers by modulating invertase activity. *Postharvest Biol. Tec.* **86**, 265–271.
19. Baroja-Fernández E., Muñoz F.J., Montero M., Etxeberria E., Sesma M.T., Ovecka M., Bahaji A., Ezquer I., Li J., Prat S., Pozueta-Romero J. (2009) Enhancing sucrose synthase activity in transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers results in increased levels of starch, ADPglucose and UDPglucose and total yield. *Plant Cell Physiol.* **50**, 1651–1662.
20. Bagnaresi P., Moschella A., Beretta O., Vitulli F., Ranalli P., Perata P. (2008) Heterologous microarray experiments allow the identification of the early events associated with potato tuber cold sweetening. *BMC Genomics*. **9**, 1–23.

21. Baldwin S.J., Dodds K.G., Auvray B., Genet R.A., Macknight R.C., Jacobs J.M.E. (2011) Association mapping of cold-induced sweetening in potato using historical phenotypic data. *Ann. Appl. Biol.* **158**, 248–256.
22. Liu X., Chen L., Shi W., Xu X., Li Z., Liu T., He Q., Xie C., Nie B., Song B. (2021) Comparative transcriptome reveals distinct starch-sugar interconversion patterns in potato genotypes contrasting for cold-induced sweetening capacity. *Food Chem.* **334**, 127550.
23. Wiberley-Bradford A.E., Bethke P.C. (2017) Rate of cooling alters chip color, sugar contents, and gene expression profiles in stored potato tubers. *Am. J. Potato Res.* **94**, 534–543.
24. Slugina M.A., Shchennikova A.V., Meleshin A.A., Kochieva E.Z. (2020) Homologs of vacuolar invertase inhibitor INH2 in tuber-bearing wild potato species and *Solanum tuberosum*: gene polymorphism and co-expression with saccharolytic enzyme genes in response to cold stress. *Sci. Horticult.* **269**, 109425.
25. Дорошков А.В., Симонов А.В., Сафонова А.Д., Афонников Д.А., Лихенко И.Е., Колчанов Н.А. (2016) Оценка количественных характеристик опущения листьев картофеля с использованием анализа цифровых микроизображений. *Достижения науки и техники АПК.* **30**, 12–14.
26. Альт В.В., Гурова Т.А., Елкин О.В., Клименко Д.Н., Максимов Л.В., Пестунов И.А., Дубровская О.А., Генаев М.А., Эрст Т.В., Генаев К.А., Комышев Е.Г., Хлесткин В.К., Афонников Д.А. (2020) Использование гиперспектральной камеры Specim IQ для анализа растений. *Вавил. Журн. Генет. Селекции.* **24**, 259–266.
27. Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Новикова Л.Ю., Шувалов О.Ю., Костина Л.И., Клименко Н.С., Шувалова А.Р., Гавриленко Т.А. (2016). Генетическое разнообразие сортов картофеля российской селекции и стран ближнего зарубежья по данным полиморфизма SSR-локусов и маркеров R-генов устойчивости. *Вавил. Журн. Генет. Селекции.* **20**, 596–606.
28. Totsky I.V., Rozanova I.V., Safonova A.D., Batov A.S., Gureeva Yu.A., Khlestkina E.K., Kochetov A.V. (2021) Genotyping of potato samples from the GenAgro ICG SB RAS collection using DNA markers of genes conferring resistance to phytopathogens. *J. Genet. Breed.* **25**, 677–686.
29. Khlestkin V.K., Erst T.V., Rozanova I.V., Efimov V.M., Khlestkina E.K. (2020) Genetic loci determining potato starch yield and granule morphology revealed by genome-wide association study (GWAS). *Peer. J.* **8**, e10286.
30. Khlestkin V.K., Rozanova I.V., Efimov V.M., Khlestkina E.K. (2019) Starch phosphorylation associated SNPs found by genome-wide association studies in the potato (*Solanum tuberosum* L.). *BMC Genet.* **20**, 45–53.
31. Ibragimova S., Romanova A., Saboiev I., Salina E., Kochetov A. *PlantGen2021: The 6th Internat. Sci. Conf.* (2021) Novosibirsk, Russia. Abstract book. P. 95. Abstract 79.
32. Туркина М.В., Соколова С.В. (1971) *Методы определения моносахаридов и олигосахаридов. Биохимические методы в физиологии растений.* Москва: Наука, 7–34.
33. Lopez-Pardo R., Ruiz de Galarreta J.I., Ritter E. (2013) Selection of housekeeping genes for qRT-PCR analysis in potato tubers under cold stress. *Mol. Breed.* **31**, 39–45.
34. Matsuura-Endo C., Ohara-Takada A., Chuda Y., Ono H., Yada H., Yoshida M., Kobayashi A., Tsuda S., Takigawa S., Noda T. (2006) Effects of storage temperature on the contents of sugars and free amino acids in tubers from different potato cultivars and acrylamide in chips. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**, 1173–1180.
35. Lin Q., Xie Y., Guan W., Duan Y., Wang Z., Sun C. (2019) Combined transcriptomic and proteomic analysis of cold stress induced sugar accumulation and heat shock proteins expression during postharvest potato tuber storage. *Food Chem.* **297**, 124991.
36. Abbasi K.S., Masud T., Qayyum A., Khan S.U., Abbas S., Jenks M.A. (2016) Storage stability of potato variety Lady Rosetta under comparative temperature regimes. *Sains Malaysiana.* **45**, 677–688.
37. Sonnewald U. (2001) Control of potato tuber sprouting. *Trends Plant Sci.* **6**, 333–335.
38. Datir S.S., Regan S. (2022) Role of alkaline/neutral invertases in postharvest storage of potato. *Postharvest. Biol. Technol.* **184**, 111779.
39. Слугина М.А., Кочиева Е.З. (2018) Использование генов углеводного обмена для улучшения качества клубней картофеля (*Solanum tuberosum* L.). *Сельскохозяй. биология.* **53**, 450–463.
40. Gupta S.K., Crants J. (2019) Identification and impact of stable prognostic biochemical markers for cold-induced sweetening resistance on selection efficiency in potato (*Solanum tuberosum* L.) breeding programs. *PLoS One.* **14**, e0225411.
41. McKenzie M.J., Sowokinos J.R., Shea I.M., Gupta S.K., Lindlauf R.R., Anderson J.A. (2005) Investigations on the role of acid invertase and UDP-glucose pyrophosphorylase in potato clones with varying resistance to cold-induced sweetening. *Am. J. Potato Res.* **82**, 231–239.
42. Lin Y., Liu T., Liu J., Liu X., Ou Y., Zhang H., Li M., Sonnewald U., Song B., Xie C. (2015) Subtle regulation of potato acid invertase activity by a protein complex of invertase, invertase inhibitor, and sucrose nonfermenting1-related protein kinase. *Plant Physiol.* **168**, 1807–1819.
43. Shi W., Ma Q., Yin W., Liu T., Song Y., Chen Y., Song L., Sun H., Hu S., Liu T., Jiang R. (2022) StTINY3 enhances cold-induced sweetening resistance by coordinating starch resynthesis and sucrose hydrolysis in potato. *J. Exp. Botany.* **73**, 4968–4980.

Genotype-Specific Features of Cold-Induced Sweetening Process Regulation in Potato Varieties Nikulinsky, Symphony, Nevski

A. A. Egorova^{1, 2, *}, I. A. Saboiev², N. E. Kostina¹, D. D. Kuvaeva¹, A. B. Shcherban^{1, 2}, S. M. Ibragimova^{1, 2}, E. A. Salina², and A. V. Kochetov¹

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Kurchatov Genomic Center of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: egorova@bionet.nsc.ru

Increasing the shelf life of potato tubers demands their storage under low temperature. However, storage at low temperatures causes activation of cold-protective mechanism, so-called cold-induced sweetening (CIS). During this process, the starch is converted into reducing sugars such as glucose and fructose. Upon processing at high-temperature, these sugars react with free amino acids, resulting in brown, bitter-tasting products, which reduces the consumer value of potatoes. In this study, we performed expression analysis of genes associated with cold-induced sweetening in potato tubers: vacuolar invertase (*Pain-1*), sucrose-synthase (*SUS4*), invertase inhibitor (*InvInh2*). Potato varieties Nikulinsky, Symphony, Nevski were used. All three varieties were found to accumulate sugars at low temperatures, the maximum accumulation of reducing sugars being observed at 4°C. It was found that the expression pattern of genes associated with cold-induced sweetening differs depending on the variety and storage duration. The increased expression of vacuolar invertase and its inhibitor is more pronounced at the beginning of storage period while the increased expression of sucrose synthase is more pronounced after three months of storage. At early storage periods, high expression of invertase and low expression of inhibitor is observed in Dutch variety Symphony, and vice versa in Russian varieties Nikulinsky and Nevsky. The participation of the studied genes in the process of cold-induced sweetening is discussed.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., potato, cold-induced sweetening, regulation, expression, vacuolar invertase, sucrose synthase

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ БЕЛКОВОЙ ИНЖЕНЕРИИ К СОЗДАНИЮ ФЕРМЕНТОВ С НОВЫМИ КАТАЛИТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

© 2023 г. Т. Е. Тюгашев^а, **О. С. Федорова^а**, Н. А. Кузнецов^а, *

^аИнститут химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 08.08.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 16.09.2022 г.

Аденин-ДНК-гликозилаза MutY — монофункциональный фермент, катализирующий гидролиз N-гликозидных связей с остатками аденина, расположенными в ДНК напротив остатков 8-оксогуанина. Проведен рациональный дизайн мутантных форм фермента с измененной каталитической активностью. Анализ структур мутантных форм MutY, рассчитанных методом молекулярной динамики, позволил сделать вывод, что некоторые мутантные формы MutY могут не только расщеплять N-гликозидную связь, но и обладают AP-лиазной активностью, как в случае бифункциональных ДНК-гликозилаз. Методом сайт-направленного мутагенеза получены мутантные формы MutY с заменами A120K или S124K и определена их каталитическая активность. Показано, что замена S120K приводит к появлению дополнительной AP-лиазной активности, в то время как замена A124K полностью инактивирует фермент.

Ключевые слова: биокатализ, рациональный дизайн ферментов, аденин-ДНК-гликозилаза, специфичность, каталитическая активность, конформационные изменения

DOI: 10.31857/S0026898423020234, **EDN:** EFXRBQ

ВВЕДЕНИЕ

Разработка ферментов с измененными свойствами — одно из важных приложений, направленных на использование ферментов в биотехнологических и медицинских целях. В настоящее время актуальны подходы, позволяющие найти фермент с измененными или улучшенными свойствами, такие как экспериментальный скрининг природных ферментов из различных источников; создание библиотек генов целевого фермента, имеющих случайно распределенные мутации, с последующим скринингом ферментативных свойств и рациональный дизайн ферментов с использованием молекулярного моделирования и прогнозирования свойств [1, 2]. Действительно, можно констатировать, что современные экспериментальные и вычислительные методы позволяют создавать улучшенные формы ферментов [3]. Например, достигнуты значительные успехи в улучшении точности, процессивности, термостабильности и других параметров таких широко используемых в диагностических целях ферментов, как ДНК-полимераза [2].

Однако создание ферментов с измененными свойствами по-прежнему сталкивается со значительными проблемами, поскольку функциональ-

ные свойства белков определяются не только их относительно жесткой общей структурой, но, что еще более важно, их динамическими свойствами [4, 5]. В процессе фермент-субстратного взаимодействия в некоторых областях белковой глобулы могут происходить согласованные перемещения одних частей белковой молекулы относительно других, при этом некоторые участки очень динамичны, тогда как другие относительно статичны [6–8]. Такие сложные взаимодействия образуют динамическую кросс-корреляционную сеть, которая может иметь важное значение для аллостерических переходов [9, 10], а при формировании белок-белковых комплексов может выступать в качестве эффекторов каталитической активности [11, 12].

Последние 20 лет белковая инженерия активно развивалась за счет появления новых технологий, среди которых можно отметить направленную эволюцию, например, с помощью технологии фагового дисплея [13, 14], и рациональный дизайн, включающий сайт-направленный мутагенез и создание химерных ферментов [2, 15]. Стремительное развитие генетических технологий привело к тому, что актуальными объектами рационального дизайна стали ферменты, модифицирующие нуклеиновые кислоты, необходи-

мые для осуществления основных процессов генетической инженерии.

Структурно-ориентированная инженерия остается одним из важнейших подходов к созданию ферментов с измененными свойствами. Действительно, высокая субстратная специфичность и/или определенный тип каталитической активности, характерные для большинства ферментов, могут препятствовать их использованию в практических приложениях. Поэтому важным представляется направленное изменение субстратной специфичности или каталитических свойств отдельных ферментов, процессирующих нуклеиновые кислоты.

Аденин-ДНК-гликозилаза MutY катализирует удаление аденина из неканонической пары с 7,8-дигидро-8-оксогуанином (охоG) [16–20]. Помимо удаления аденина из пары охоG:A MutY способна также удалять аденин из пары G:A [21], но со значительно меньшей скоростью [22]. Такая уникальная специфичность MutY должна обеспечиваться множественными контактами фермента с охоG:A- и G:A-парами нуклеотидов. В настоящей работе нами проведен рациональный дизайн аминокислотных остатков активного центра фермента и создана мутантная форма аденин-ДНК-гликозилазы MutY с измененной каталитической активностью. Методом молекулярной динамики получены модели мутантных форм фермента MutY, которые не только гидролизуют N-гликозидную связь с аденином, но и потенциально могут обладать новым типом каталитической активности, а именно, катализировать разрыв 2'-дезоксирибофосфатного остова ДНК в сайте узнавания ферментом. Методом сайт-направленного мутагенеза на основе данных моделирования получены мутантные формы MutY из *E. coli*, содержащие замены A120K или S124K, и определена их каталитическая активность. Показано, что замена S120K приводит к появлению дополнительной активности, в то время как A124K полностью инактивирует фермент.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Молекулярное моделирование. В молекулярно-динамических расчетах использовали структуру MutY из *Geobacillus stearothermophilus* в комплексе с нерасщепляемым одиннадцатизвенным ДНК-субстратом, содержащим 2'-фторо-2'-дезоксиаденозин (FLRC, PDB ID: 3G0Q) [23]. На основании этой структуры построены начальные модели фермента дикого типа и мутантных форм MutY из *G. stearothermophilus*, содержащих замены Y126K и A130K, соответствующие заменам S120K и A124K в MutY из *E. coli*. Были применены силовые поля AMBER ff99SB-ildn для описания белка [24–26] и bsc1 для ДНК [27, 28] с дополнительными параметрами для железо-серного кластера

[4Fe-4S]²⁺ и 8-оксогуанина [29, 30], модель воды TIP3P и соответствующие параметры ионов [31, 32]. Протонирование аминокислотных остатков оценивали с использованием опубликованных данных и с помощью веб-сервера H++ [33]. Расчеты выполняли с помощью пакета ПО GRO-MACS [34, 35]. Комплекс помещали в додекаэдрическую периодическую ячейку, заполняемую молекулами воды и ионами, с минимальным расстоянием 1.1 нм до границы ячейки. Радиус обрезания дальних взаимодействий составлял 1 нм, электростатические взаимодействия рассчитывали методом PME [36], ковалентные связи с атомами водорода обрабатывали методом LINCS [37], шаг интегрирования составлял 2 фс. Релаксацию системы выполняли последовательно в ансамблях NVT и NPT с гармоническими ограничениями на подвижность тяжелых атомов фермент-субстратного комплекса, длительностью 0.5 нс для каждого этапа. После релаксации системы генерировали независимые молекулярно-динамические траектории длительностью 100 нс троекратно для каждого варианта комплекса. Использовали модифицированный термостат Берендсена с установленной температурой 300 К и баростат Паринелло–Рамана [38].

Олигодезоксирибонуклеотиды. Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали фосфитамидным методом на синтезаторе ASM-700 (“Biosset Ltd”, Россия) с использованием мономеров производства “Glen Research” (США). Олигодезоксирибонуклеотиды очищали с помощью ВЭЖХ на ионообменной колонке (PRP-X500 “Hamilton Company” 3.9 × 300 мм с размером частиц 12–30 мкм) и последующей обращенно-фазовой хроматографии (Nucleoprep 100-20 C18 10 × 250 мм, “Macherey-Nagel”, Германия). Чистоту олигонуклеотидов проверяли с помощью электрофореза в денатурирующем 20%-ном полиакриламидном геле (ПААГ). Концентрацию олигонуклеотидов измеряли по оптической плотности растворов на длине волны 260 нм в электронных спектрах поглощения и рассчитывали по закону Бугера–Ламберта–Бера, исходя из коэффициентов молярной экстинкции, определенных в приближении метода ближайших соседей [39]. В качестве ДНК-субстрата использовали олигодезоксирибонуклеотидный дуплекс с последовательностью CTCTC(охоG)CCTTCC, содержащий аденин напротив 8-оксогуанина.

Ферменты. MutY выделен из клеток штамма BL21(DE3) *E. coli*, трансформированных плазмидой pET28c-MutY, как описано ранее [40]. Плазмида pET28c-MutY, содержащая ген *MutY*, любезно предоставлена М.К. Сапарбаевым (Groupe “Réparation de l’AND”, Université Paris-Sud XI, Institut Gustave Roussy, France).

Мутантные формы MutY с заменами S120K и A124K получены методом сайт-направленного мутагенеза. Правильность введения замен в ген *MutY* проверена секвенированием. Мутантные формы фермента очищали по следующей методике. Культуру клеток *E. coli* BL21(DE3) выращивали в среде LB (1 л), содержащей 25 мкг/мл канамицина, при температуре 37°C до оптической плотности 0.6–0.7 при длине волны 600 нм. После этого индуцировали транскрипцию добавлением изопропил- β -D-тиогалактопиранозидом до 0.2 мМ и инкубировали клетки в течение 16 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием (10 мин, 10000 g) и готовили суспензию клеток в 30 мл буферного раствора 20 мМ HEPES-NaOH pH 7.8, 40 мМ NaCl, содержащего набор ингибиторов протеаз (“Complete”, ФРГ). Клетки лизировали при помощи френч-пресса. Все последующие процедуры проводили при 4°C. Лизат клеток центрифугировали (40 мин, 40000 g), фермент выделяли хроматографией. Супернатант наносили на колонку I (Q-Sepharose Fast Flow, “Amersham Biosciences”, Швеция) и промывали буферным раствором, содержащим 20 мМ HEPES-NaOH pH 7.8, 200 мМ NaCl. Фракции, содержащие белок MutY, собирали и наносили на колонку II (HiTrap-Chelating™, “Amersham Biosciences”) в буферном растворе (20 мМ HEPES-NaOH pH 7.8, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол). Хроматографию проводили в линейном градиенте 20 → 500 мМ имидазола, оптическую плотность раствора регистрировали при длине волны 280 нм. Степень чистоты белка определяли с помощью гель-электрофореза. Фракции, содержащие мутантные формы MutY, диализовали в 20 мМ HEPES-NaOH-буфере pH 7.5, содержащем 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 250 мМ NaCl, 50%-ный глицерин, и хранили при –20°C. Концентрацию ферментов рассчитывали из значений оптической плотности белка при длине волны 280 нм и коэффициента молярной экстинкции 77328 M⁻¹cm⁻¹ [41].

Электрофорез в ПААГ. В экспериментах по разделению продуктов реакции с помощью электрофореза в ПААГ использовали олигонуклеотиды, меченные ³²P по 5'-концу. Все эксперименты выполняли при 25°C в буферном растворе 50 мМ Трис-HCl pH 7.5, 50 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 7%-ный глицерин. Зависимости степени превращения субстратов от времени получали с использованием следующей методики. К 10 мкл буферного раствора, содержащего ³²P-меченый ДНК-субстрат, добавляли 10 мкл 2.0–8.2 мкМ фермента в том же буферном растворе. Реакционную смесь быстро перемешивали и через определенные промежутки времени отбирали аликвоты объемом 2 мкл, которые переносили в пробирки, содержащие 2 мкл раствора 7 М мочевины, 0.1% бромфенолового синего и 0.1% ксиленианола. Затем пробы делили пополам, к

одной части добавляли 1 мкл 1 М NaOH и инкубировали при 56°C в течение 15 мин для гидролиза фосфодиэфирных связей в AP-сайтах. Раствор нейтрализовали 1 мкл 1 М HCl, наносили на ПААГ и проводили электрофорез при напряженности 50 В/см. Накопление продуктов реакции в ПААГ оценивали согласно [40].

Количество образующегося продукта определяли путем сканирования радиоавтографа на приборе Molecular Imager FX phosphorimager (“Bio-Rad”, США) и обработки данных в программном пакете Gel-Pro Analyzer 4.0 (“Media Cybernetics”, США). Степень накопления продуктов рассчитывали как отношение площадей пиков продуктов к сумме площадей пиков продуктов и пика исходного олигонуклеотида. Ошибка определения степени превращения не превышала, как правило, 20%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Степень изгиба сахарофосфатного остова в составе фермент-субстратных комплексов

Известно несколько кристаллических структур MutY: определены структуры фрагмента фермента из *E. coli* в свободном виде [42, 43], мутантных форм MutY из *G. stearothermophilus* в комплексе с различными олигонуклеотидными дуплексами [23, 44–47], а также фрагментов MUTYH человека и мыши [48, 49]. Рентгеноструктурный анализ MutY в свободном состоянии и в комплексе с ДНК показал, что в каталитически активном комплексе ДНК-дуплекс значительно изогнут. Однако угол изгиба и степень деформации ДНК, связанной в активном центре фермента, различаются в структуре комплекса каталитически-активного MutY и 2'-F-dA ДНК-субстрата (рис. 1, FLRC, 3G0Q) и в структуре комплекса каталитически неактивной мутантной формы MutY D144N и ДНК-субстрата (рис. 1, LRC, 1RRQ). Возможной причиной таких отличий может быть как наличие у MutY механизма специфичного связывания с субстратом через перенос электрона и окисление кластера [4Fe-4S]²⁺ до [4Fe-4S]³⁺ поврежденной ДНК, так и эффект 2'-фтор-модификации нуклеотида в комплексе FLRC. Интересно отметить, что в процессе молекулярной динамики угол изгиба ДНК занимал среднее значение между данными структурами в комплексах FLRC и LRC соответственно (рис. 1).

Структура сайта узнавания ohoG

Сайт узнавания ohoG в MutY образован консервативной петлей, содержащей аминокислотные остатки Phe307-Ser308-His309. Остатки Gln48, Thr49, Leu86, Tyr88, Ser308 образуют прямые контакты с ohoG. При этом замена ohoG на G

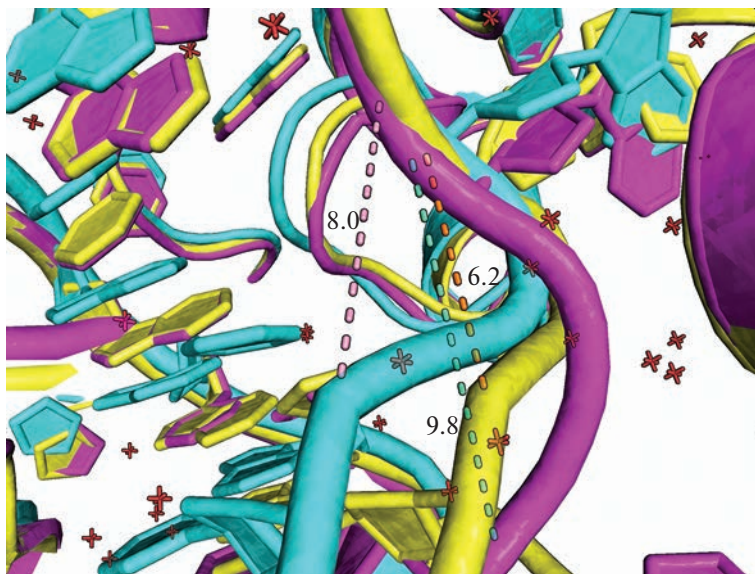


Рис. 1. Сравнение степени изгиба сахарофосфатного остова субстрата через расстояние между атомами Р, фланкирующими вывернутое основание нуклеотидов: желтый — кристаллографическая структура комплекса каталитически активного MutY и 2'-F-dA ДНК-субстрата (FLRC, 3G0Q); розовый — каталитически неактивный MutY D144N и ДНК-субстрат (LRC, 1RRQ); голубой — репрезентативный кадр из траектории молекулярной динамики (MD) комплекса MutY и ДНК.

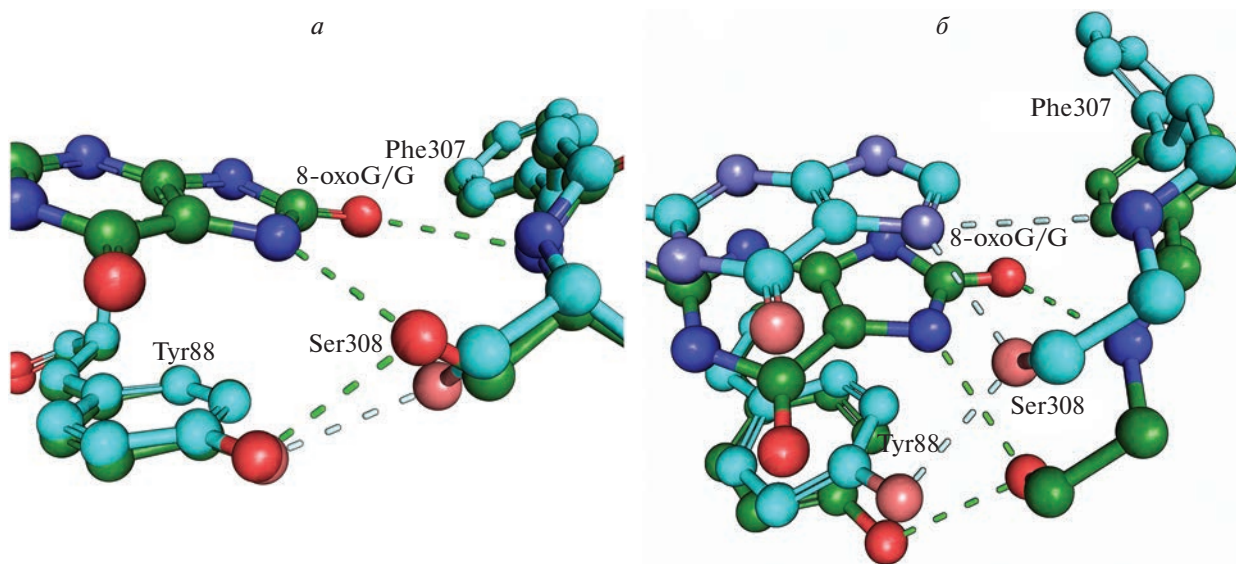


Рис. 2. Иллюстрация сайтов узнавания oxoG, содержащих oxoG/A-пару (зеленый) или G/A-пару (голубой), на основании кристаллографических структур 6U7T и 6Q0C (а) и репрезентативных кадров MD-симуляции (б).

изменяет конформацию остатка Ser308, образующего две водородные связи с атомами N7 и C8 oxoG, и ни одной связи с гуанином (рис. 2). Показано, что замена S308A приводит к пропорциональному снижению сродства фермента и к oxoG:A-, и к G:A-субстратам с сохранением селективности, а для утраты специфичности к oxoG-содержащей ДНК требуется двойная замена F307A/S308A [47]. Однако по результатам молекулярной динамики

(MD) в комплексе MutY с ДНК, содержащей G:A-пару, Ser308 также способен поддерживать водородную связь с атомом N7 гуанина за счет подвижности пептидного остова петли. При этом и у фермента дикого типа, и у мутантных форм изменяется конформация Phe307 с вращением боковой цепи на $\sim 90^\circ$ относительно положения, характерного для моделей с oxoG:A-парой или кристаллографических структур. Таким образом,

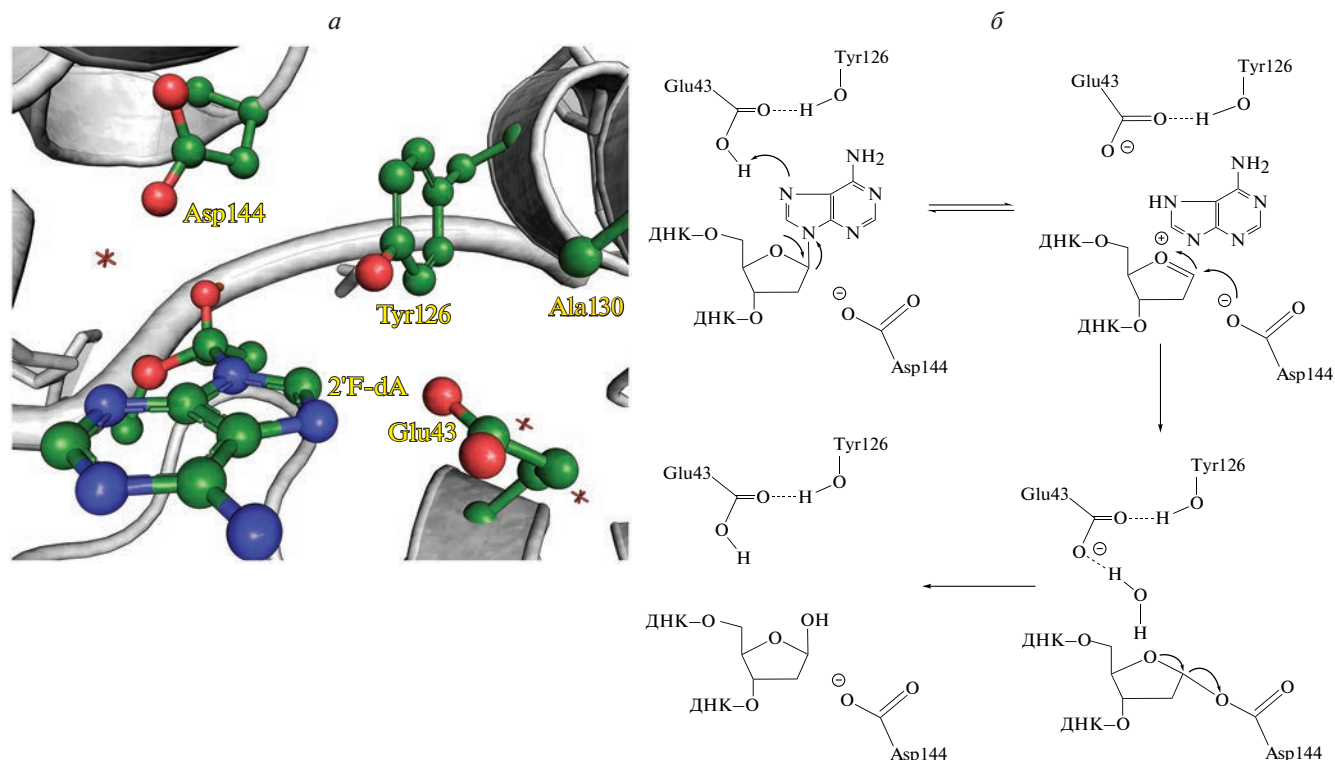


Рис. 3. Структура сайта узнавания 2'-дезоксаденозина (а) (FLRC, 3G0Q) и механизм гидролиза *N*-гликозидной связи (б) [53, Creative Commons Attribution License].

молекулярно-динамические расчеты свидетельствуют об участии Phe307 в распознавании целевого субстрата.

Структура сайта узнавания 2'-дезоксаденозина и механизм гидролиза *N*-гликозидной связи

В составе фермент-субстратных комплексов 2'-дезоксаденозин вывернут из двойной спирали и располагается в активном центре фермента, образованном Arg26, Leu28, Trp30, Arg31, Leu46, Glu43, Val51, Tyr126, Glu188, Ile191, Glu192, (номера аминокислотных остатков соответствуют MutY из *G. stearothermophilus*) (рис. 3а).

На основании рентгеноструктурных данных и квантовомеханических расчетов предложен каталитический механизм гидролиза *N*-гликозидной связи 2'-дезоксаденозина [23, 47, 50, 51]. Предполагается [50], что в активном центре фермента аминокислотный остаток Glu43 находится в нейтральной форме (рис. 3б). Таким образом, опубликованные данные свидетельствуют о том, что в каталитическом комплексе основание Ade протонируется по N7 остатком Glu43, в результате чего происходит разрыв *N*-гликозидной связи по механизму S_N1 [52, 53]. Существование этого механизма подтверждается данными о том, что аналог аденозина, в котором атом N7 заменен на группу

C7-H [54], а также замена Glu43 [23, 42] приводят к полной потере каталитической активности MutY.

Выбор аминокислотных остатков активного центра MutY, необходимых для АР-лиазной активности

С целью расширения каталитических свойств фермента при сохранении высокой субстратной специфичности использовали структурную гомологию активного центра монофункциональных MutY с бифункциональными ДНК-гликозилазами (рис. 4). Так, мутантную форму MutY S120K (Y126K в MutY *G. stearothermophilus*) предложили по аналогии с другими представителями структурного семейства спираль-шпилька-спираль (HhH), обладающими не только гликозилазной, но и АР-лиазной активностью — бифункциональными ДНК-гликозилазами hOGG1 и Nth из *E. coli* [56]. Действительно положение Ser120 в MutY из *E. coli* соответствует положению каталитических остатков Lys249 у hOGG1 и Lys120 в Nth.

Исходя из стерических соображений предложена замена A124K (A130K в MutY *G. stearothermophilus*), в которой боковая цепь остатка лизина также расположена в каталитическом центре фермента. Необходимо отметить, что положение Ala130 у MutY *G. stearothermophilus* соответствует

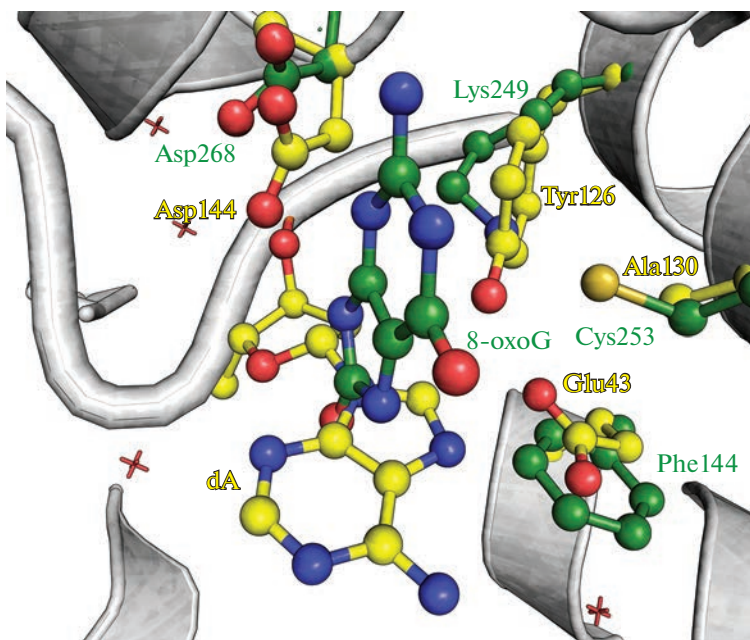


Рис. 4. Сравнение активных центров комплексов ферментов hOGG1 (зеленый, 3KTU) и MutY *G. stearothermophilus* (желтый, 3G0Q).

пространственному положению остатка Cys253 ДНК-гликозилазы hOGG1, который стабилизирует боковую цепь каталитического Lys249. При этом фермент с двойной заменой K249C/C253K, сохраняющей стабилизирующее взаимодействие между остатками лизина и цистеина в активном центре hOGG1, обладает частичной каталитической активностью [57].

Создание и анализ модельных структур MutY Y126K и MutY A130K

Для создания модельных структур комплексов мутантных форм MutY Y126K и MutY A130K с ДНК использовали кристаллическую структуру MutY *G. stearothermophilus* в комплексе с ДНК-субстратом, содержащим 2'-фторо-2'-дезоксиаденин (PDB ID: 3G0Q) [23].

В полученных нами MD моделях фермента дикого типа сохраняется структура активного центра с координацией N7 атома аденина боковыми цепями аминокислотных остатков Tyr126 и Glu43, что хорошо согласуется с протеканием реакции согласно механизму, предложенному для MutY [50] (рис. 5a). Кроме того, оценка pKa аминокислотных остатков белка алгоритмом H++ также свидетельствует о том, что в составе комплекса фермента дикого типа и мутантной формы Y126K с ДНК Glu43 находится в протонированной форме, но не в случае мутантной формы A130K.

Модельная структура комплекса мутантной формы MutY A130K с ДНК свидетельствует об из-

менении ориентации ключевых аминокислотных остатков в структуре активного центра за счет создаваемых боковой цепью Lys130 водородных связей с остатками Glu43 и Glu188 (рис. 5б). Формирование таких контактов приводит к отдалению вывернутого аденина от каталитических аминокислотных остатков и должно сопровождаться уменьшением *N*-гликозилазной активности.

Интересно отметить, что в MD-траекториях комплекса мутантной формы MutY Y126K оптимальная для осуществления *N*-гликозилазной активности ориентация аминокислотных остатков выявлена лишь на относительно небольшом участке, ~5% от общего времени симуляции (рис. 6a). При этом большую часть симуляционного времени вывернутое основание аденозина находится на большом расстоянии от пары Lys126–Glu43 не позволяющем сформировать прямые контакты, необходимые для осуществления *N*-гликозилазной активности по механизму, предложенному для MutY [50]. Однако среди возможных состояний взаиморасположения можно выделить состояние, подобное комплексу ДНК-гликозилазы hOGG1 с поврежденной ДНК, где аминокислотная боковая цепь лизина ориентирована в положение, подходящее для протонирования N1 атома вывернутого азотистого основания, что позволяет предположить возможность протекания реакции гидролиза *N*-гликозидной связи в случае MutY Y126K по пути, описанному для hOGG1 [58] (рис. 6б).

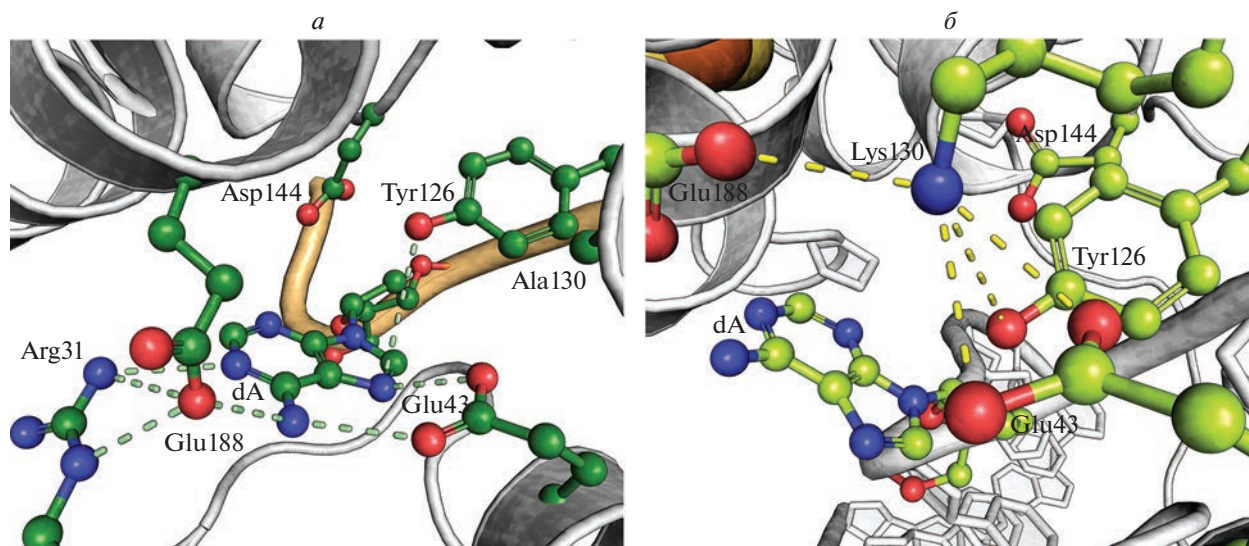


Рис. 5. Сравнение активных центров в комплексе MutY WT (а) и MutY A130K (б) с ДНК.

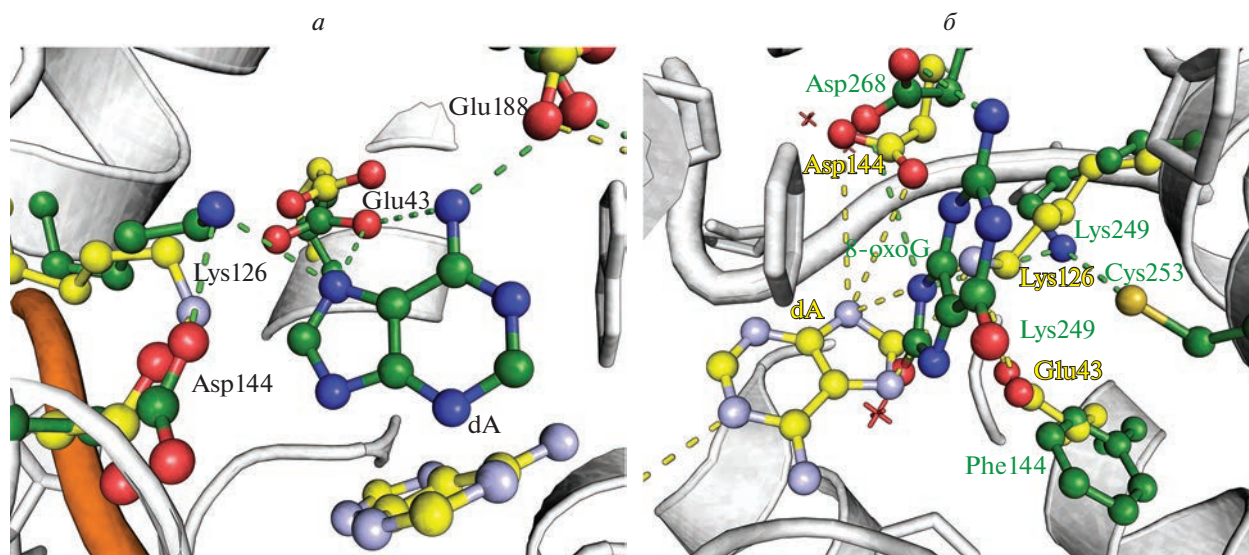


Рис. 6. Активный центр мутантной формы Y126K. а – Наложение конфигураций активного центра с оптимальным для катализа расположением аминокислотных остатков (зеленый, 5% времени MD траектории) и более устойчивым состоянием (желтый). б – Наложение структуры комплекса hOGG1 с вывернутым охoG в активном центре (зеленый, 3КТU) и подобной по пространственной организации структуры комплекса MutY Y126K из MD-траектории (желтый).

Каталитические свойства мутантных форм фермента MutY из E. coli, содержащих замены S120K и A124K

С целью подтверждения предположений, полученных с помощью молекулярно-динамических расчетов, экспериментально изучена активность MutY дикого типа и мутантных форм по отношению к ДНК-субстрату, содержащему пару охoG:A. При этом для регистрации продуктов N-гликозилазной реакции, содержащих AP-сайт, пробы реакционной смеси обрабатывали ще-

лочным раствором, что приводит к расщеплению ДНК. Прямое же разделение реакционной смеси электрофорезом в ПААГ без дополнительной щелочной обработки позволяет зарегистрировать собственную AP-лиазную активность мутантных форм.

Полученные данные свидетельствуют о том, что замена A124K полностью инактивирует фермент. При этом MutY S120K приобрел свойства бифункциональной ДНК-гликозилазы, удаляя аденин и расщепляя полученный AP-сайт. На

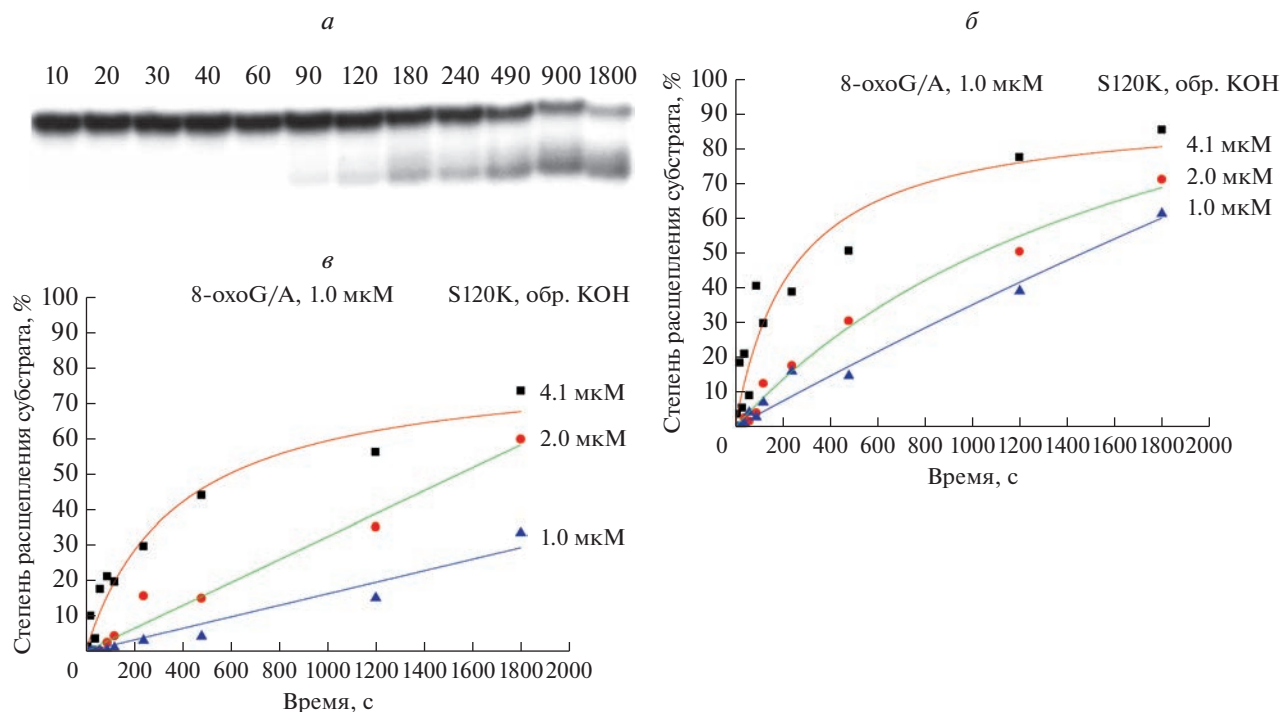


Рис. 7. Накопление продукта реакции в процессе взаимодействия MutY и ДНК-субстратов, данные электрофореза в ПААГ. *а* – Гель-электрофореграмма, характеризующая расщепление охoG:A-субстрата MutY S120K без обработки KOH, над дорожками указано время (с) отбора пробы. Кинетические кривые накопления продуктов расщепления охoG:A-субстрата, с обработкой (*б*) и без обработки (*в*) щелочным раствором.

рис. 7 представлена типовая электрофореграмма и кинетические кривые накопления продуктов *N*-гликозилазной и AP-лиазной реакций при взаимодействии MutY S120K с ДНК-субстратом. Сравнение с ферментом дикого типа [40, 59] показало снижение *N*-гликозилазной активности фермента по отношению к паре охoG:A. Такое уменьшение каталитической активности может объясняться тем, что замена S120K одновременно снижает рKa каталитического остатка Glu43, и аминокислотный остаток Lys120 более не может стабилизировать оксикарбениевый катион-интермедиат [53]. Также необходимо отметить, что в процессе молекулярной динамики исходная ориентация остатков активного центра, необходимая для протекания реакции по механизму, предложенному для MutY дикого типа, сохраняется лишь у ~5% траектории. При этом альтернативное и более устойчивое относительно положение боковой цепи остатка лизина и вывернутого азотистого основания может приводить к возможности разрыва *N*-гликозидной связи по пути, аналогичному механизму действия гликозилазы hOGG1, пусть и с меньшей эффективностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенный молекулярно-динамический анализ позволил установить при-

роду ключевых взаимодействий в активном центре, обеспечивающих специфическое узнавание повреждения и каталитическую реакцию гидролиза *N*-гликозидной связи ферментом MutY. Полученные данные позволили предложить замены аминокислотных остатков активного центра фермента, которые помимо гидролиза *N*-гликозидной связи с аденином, потенциально могут обеспечить появление нового типа каталитической активности, а именно, AP-лиазной и катализировать разрыв 2'-дезоксирибозофосфатного остова ДНК в сайте узнавания ферментом. Это означает, что путем направленного мутагенеза монофункциональная ДНК-гликозилаза MutY может быть превращена в бифункциональную ДНК-гликозилазу.

Методом сайт-направленного мутагенеза получены мутантные формы MutY из *E. coli*, содержащие замены S120K или A124K, и определена их каталитическая активность. Показано, что замена A124K полностью инактивирует фермент за счет нарушения сети контактов в составе активного центра, приводящей к отдалению каталитических остатков от вывернутого азотистого основания. При этом мутантная форма MutY S120K приводит к появлению дополнительной AP-лиазной активности и проявляет свойства бифункциональной ДНК-гликозилазы, удаляя аденин и расщепляя полученный AP-сайт.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования (соглашение № 075-15-2021-1085).

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. Vanella R., Kovacevic G., Doffini V., de Santaella J.F., Nash M.A. (2022) High-throughput screening, next generation sequencing and machine learning: advanced methods in enzyme engineering. *Chem. Commun.* **58**, 2455.
2. Nikoomezar A., Chim N., Yik E.J., Chaput J.C. (2020) Engineering polymerases for applications in synthetic biology. *Q. Rev. Biophys.* **53**, 1–31.
3. Siedhoff N.E., Schwaneberg U., Davari M.D. (2020) Machine learning-assisted enzyme engineering. in *Methods in Enzymology*. **643**, 281–315.
4. Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. (2020) Kinetic milestones of damage recognition by DNA glycosylases of the helix-hairpin-helix structural superfamily. *Adv. Exp. Biol. Med.* **1241**, 1–18.
5. Kuznetsova A.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. (2022) Structural and molecular kinetic features of activities of DNA polymerases. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 6373.
6. Yu H., Dalby P.A. (2020) A beginner's guide to molecular dynamics simulations and the identification of cross-correlation networks for enzyme engineering. In: *Methods in Enzymology*. **643**, 15–49.
7. Bulygin A.A., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. (2020) The role of active-site plasticity in damaged-nucleotide recognition by human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1. *Molecules*. **25**, 3940.
8. Bulygin A.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. (2022) Insights into mechanisms of damage recognition and catalysis by APE1-like enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 4361.
9. Bowerman S., Wereszczynski J. (2016) Detecting allosteric networks using molecular dynamics simulation. *Methods in Enzymology*. **578**, 429–447.
10. Tekpinar M., Neron B., Delarue M. (2021) Extracting dynamical correlations and identifying key residues for allosteric communication in proteins by correlation plus. *J. Chem. Inf. Model.* **61**, 4832–4838.
11. Kladova O.A., Bazlekova-Karaban M., Bacconnais S., Piétrement O., Ishchenko A.A., Matkarimov B.T., Iakovlev D.A., Vasenko A., Fedorova O.S., Le Cam E., Tudek B., Kuznetsov N.A., Saparbaev M. (2018) The role of the N-terminal domain of human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1, APE1, in DNA glycosylase stimulation. *DNA Repair (Amst)*. **64**, 10–25.
12. Kladova O.A., Alekseeva I.V., Saparbaev M., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. (2020) Modulation of the apurinic/apyrimidinic endonuclease activity of human APE1 and of its natural polymorphic variants by base excision repair proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 7174.
13. Smith G.P., Petrenko V.A. (1997) Phage display. *Chem. Rev.* **97**, 391–410.
14. Ghadessy F., Ong J., Holliger P. (2001) Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 4552–4557.
15. Choi J., Kim H.-S. (2020) Structure-guided rational design of the substrate specificity and catalytic activity of an enzyme. *Methods in Enzymology*. **643**, 181–202.
16. Au K.G., Cabrera M., Miller J.H., Modrich P. (1988) *Escherichia coli* MutY gene-product is required for specific A-G-C.G mismatch correction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**, 9163–9166.
17. Slupska M.M., Baikalov C., Luther W.M., Chiang J.-H., Wei Y.-F., Miller J.H. (1996) Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the *Escherichia coli* mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J. Bacteriol.* **178**, 3885–3892.
18. Back J.H., Park J.H., Chung J.H., Kim D.S.H.L., Han Y.S. (2006) A distinct TthMutY bifunctional glycosylase that hydrolyzes not only adenine but also thymine opposite 8-oxoguanine in the hyperthermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*. *DNA Repair*. **5**, 894–903.
19. Kunrath-Lima M., Repolês B.M., Alves C.L., Furtado C., Rajão M.A., Macedo A.M., Franco G.R., Pena S.D.J., Valenzuela L., Wisnovsky S., Kelley S.O., Galanti N., Cabrera G., Machado C.R. (2017) Characterization of *Trypanosoma cruzi* MutY DNA glycosylase ortholog and its role in oxidative stress response. *Infect. Genet. Evol.* **55**, 332–342.
20. Li X., Lu A.L. (2001) Molecular cloning and functional analysis of the MutY homolog of *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacteriol.* **183**, 6151–6158.
21. Au K.G., Clark S., Miller J.H., Modrich P. (1989) *Escherichia coli* mutY gene encodes an adenine glycosylase active on G-A mispairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**, 8877–8881.
22. Bulychev N.V., Varaprasad C.V., Dorman G., Miller J.H., Eisenberg M., Grollman A.P., Johnson F. (1996) Substrate specificity of *Escherichia coli* MutY protein. *Biochemistry*. **35**, 13147–13156.
23. Lee S., Verdine G.L. (2009) Atomic substitution reveals the structural basis for substrate adenine recognition and removal by adenine DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 18497–18502.
24. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. (1995) A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179–5197.
25. Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P., Klepeis J.L., Dror R.O., Shaw D.E. (2010) Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins*. **78**(8), 1950–1958. doi: 1002/prot.22711
26. Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. (2006) Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins*. **65**, 712–725.
27. Ivani I., Dans P.D., Noy A., Pérez A., Faustino I., Hospital A., Walther J., Andrio P., Goñi R., Balaceanu A., Portella G., Battistini F., Gelpi J.L., Gonzalez C., Vendruscolo M., Laughton C.A., Harris S.A., Case D.A.,

- Orozco M. (2016) PARMBSC1: a refined force-field for DNA simulations. *Nat. Methods*. **13**, 55–58.
28. Pérez A., Marchán I., Svozil D., Sponer J., Cheatham T.E., Lughton C.A., Orozco M. (2007) Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: improving the description of α/γ conformers. *Biophys. J.* **92**, 3817–3829.
 29. Cheng X., Kelso C., Hornak V., De Los Santos C., Grollman A.P., Simmerling C. (2005) Dynamic behavior of DNA base pairs containing 8-oxoguanine. *J. Am. Chem. Soc.* **127**(40), 13906–13918.
<https://doi.org/10.1021/ja052542s>
 30. Smith D.M.A., Xiong Y., Straatsma T.P., Rosso K.M., Squier T.C. (2012) Force-field development and molecular dynamics of [NiFe] hydrogenase. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 2103–2114.
 31. Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926.
 32. Joung I.S., Cheatham T.E. (2008) Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations. *J. Phys. Chem. B*. **112**, 9020–9041.
 33. Anandakrishnan R., Aguilar B., Onufriev A.V. (2012) H++ 3.0: automating PK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucl. Acids Res.* **40**, 537–541.
 34. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. (2015) Gromacs: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*.
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
 35. Berendsen H.J.C., Spoel D. van der, Drunen R. van (1995) GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput. Phys. Commun.* **91**, 43–56.
 36. Essmann U., Perera L., Berkowitz M.L., Darden T., Lee H., Pedersen L.G. (1995) A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **103**, 8577.
 37. Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M. (1997) LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comput. Chem.*.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199709\)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H)
 38. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* **126**, 014101.
 39. Fasman G.D. (1975) *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* / 3rd ed. Cleveland: CRC Press, p. 589.
 40. Тюгашев Т.Е., Кузнецова А.А., Кузнецов Н.А., Федорова О.С. (2017) Особенности взаимодействия аденин-ДНК-гликозилазы MutY из *E. coli* с ДНК-субстратами. *Биоорганическая химия*. **43**, 18–28.
 41. Gill S.C., von Hippel P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319–326.
 42. Guan Y., Manuel R.C., Arvai A.S., Parikh S.S., Mol C.D., Miller J.H., Lloyd R.S., Tainer J.A. (1998) MutY catalytic core, mutant and bound adenine structures define specificity for DNA repair enzyme superfamily. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 1058–1064.
 43. Zharkov D.O., Gilboa R., Yagil I., Kycia J.H., Gerchman S.E., Shoham G., Grollman A.P. (2000) Role for lysine 142 in the excision of adenine from A:G mispairs by MutY DNA glycosylase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. **39**, 14768–14778.
 44. Fromme J.C., Banerjee A., Huang S.J., Verdine G.L. (2004) Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase. *Nature*. **427**, 652–656.
 45. Wang L., Lee S.J., Verdine G.L. (2015) Structural basis for avoidance of promutagenic DNA repair by MutY adenine DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* **290**, 17096–17105.
 46. Wang L., Chakravarthy S., Verdine G.L. (2017) Structural basis for the lesion-scanning mechanism of the MutY DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* **292**(12), 5007–5017.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.757039>
 47. Russelburg P.L., O'Shea M., Valerie L., Demir M., Knutsen K.R., Sehgal S.L., Cao S., David S.S., Horvath M.P. (2020) Structural basis for finding OG lesions and avoiding undamaged G by the DNA glycosylase MutY. *ACS Chem. Biol.* **15**, 93–102.
 48. Luncsford P.J., Chang D.Y., Shi G., Bernstein J., Madabushi A., Patterson D.N., Lu A.L., Toth E. (2010) A structural hinge in eukaryotic MutY homologues mediates catalytic activity and Rad9-Rad1-Hus1 checkpoint complex interactions. *J. Mol. Biol.* **403**, 351–370.
 49. Nakamura T., Okabe K., Hirayama S., Chirifu M., Ike-mizu S., Morioka H., Nakabeppu Y., Yamagata Y. (2021) Structure of the mammalian adenine DNA glycosylase MUTYH: insights into the base excision repair pathway and cancer. *Nucl. Acids Res.* **49**, 7154–7163.
 50. Kellie J.L., Wilson K.A., Wetmore S.D. (2013) Standard role for a conserved aspartate or more direct involvement in deglycosylation? An ONIOM and MD investigation of adenine–DNA glycosylase. *Biochemistry*. **52**, 8753–8765.
 51. Brunk E., Arey J.S., Rothlisberger U. (2012) Role of environment for catalysis of the DNA repair enzyme MutY. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 8608–8616.
 52. McCann J.A., Berti P.J. (2008) Transition-state analysis of the DNA repair enzyme MutY. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5789–5797.
 53. Woods R.D., O'Shea V.L., Chu A., Cao S., Richards J.L., Horvath M.P., David S.S. (2016) Structure and stereochemistry of the base excision repair glycosylase MutY reveal a mechanism similar to retaining glycosidases. *Nucl. Acids Res.* **44**, 801–810.
 54. Porello S.L., Williams S.D., Kuhn H., Michaels M.L., David S.S. (1996) Specific recognition of substrate analogs by the DNA mismatch repair enzyme MutY. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10684–10692.
 55. Kaur R., Nikkel D.J., Wetmore S.D. (2020) Computational studies of DNA repair: insights into the function of monofunctional DNA glycosylases in the base excision repair pathway. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **10**, e1471.
 56. Ludwig D.L., MacInnes M.A., Takiguchi Y., Purtymun P.E., Henrie M., Flannery M., Meneses J., Pedersen R.A., Chen D.J. (1998) A murine AP-endonuclease gene-targeted deficiency with post-implantation em-

- bryonic progression and ionizing radiation sensitivity. *Mutat. Res.* **409**(1), 17–29.
[https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(98\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(98)00039-1)
57. Dalhus B., Forsbring M., Helle I.H., Vik E.S., Forstrom R.J., Backe P.H., Alseth I., Bjoras M. (2011) Separation-of-function mutants unravel the dual-reaction mode of human 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Structure*. **19**, 117–127.
58. Sebera J., Hattori Y., Sato D., Reha D., Nencka R., Kohno T., Kojima C., Tanaka Y., Sychrovsky V. (2017) The mechanism of the glycosylase reaction with hOGG1 base-excision repair enzyme: concerted effect of Lys249 and Asp268 during excision of 8-oxoguanine. *Nucl. Acids Res.* **45**(9), 5231–5242.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx157>
59. Williams S.D., David S.S. (2000) A single engineered point mutation in the adenine glycosylase MutY confers bifunctional glycosylase/AP lyase activity. *Biochemistry*. **39**, 10098–10109.

Modern Approaches of Protein Engineering for the Creation of Enzymes with New Catalytic Properties

T. E. Tyugashev¹, O. S. Fedorova¹, and N. A. Kuznetsov^{1, *}

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru*

Adenine-DNA-glycosylase MutY is a monofunctional enzyme and catalyzes the hydrolysis of *N*-glycosidic bonds with adenine residues located opposite 8-oxoguanine residues in DNA. A rational design of mutant forms of the enzyme with altered catalytic activity was carried out. An analysis of the structures of mutant forms of MutY calculated by the molecular dynamics method led to the conclusion that some mutant forms of MutY, in addition to hydrolysis of the *N*-glycosidic bond, may have AP-lyase activity, as in the case of bifunctional DNA glycosylases. Mutant forms of MutY containing substitutions A120K or S124K were obtained by site-directed mutagenesis, and their catalytic activity was determined. It was shown that the S120K substitution leads to the appearance of additional AP-lyase activity, while the A124K substitution completely inactivates the enzyme.

Keywords: biocatalysis, rational design of enzymes, adenine-DNA glycosylase, specificity, catalytic activity, conformational changes

СИСТЕМНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ
И СОЗДАНИЕ НОВЫХ МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

УДК 577.29

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНОГО УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ
(ИНГИБИТОРА ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1)
НА ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫЕ ОПУХОЛИ *in vivo* В КАЧЕСТВЕ
МОНОТЕРАПИИ И В СОЧЕТАНИИ С ОЛАПАРИБОМ¹

© 2023 г. Т. Е. Корниенко^a, А. Л. Захаренко^a, Е. С. Ильина^{a, d}, А. А. Чепанова^a, О. Д. Захарова^a,
Н. С. Дырхеева^a, Н. А. Попова^{b, d}, В. П. Николин^b, А. С. Филимонов^c, О. А. Лузина^c,
Н. Ф. Салахутдинов^{c, d}, О. И. Лаврик^{c, d, *}

^aИнститут химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

^bИнститут цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

^cНовосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

^dНовосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 29.07.2022 г.

После доработки 25.08.2022 г.

Принята к публикации 25.08.2022 г.

Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) удаляет различные аддукты с 3'-конца ДНК, которые образуются под действием ферментов (например, топоизомеразы I), вносящих в процессе катализа одноцепочечные разрывы в ДНК, а также ряда противоопухолевых препаратов с различным механизмом действия. Поли(ADP-рибоза)полимераза 1 (PARP1) катализирует посттрансляционную модификацию различных мишеней (PARIрование) и с помощью этих модификаций управляет множеством процессов в клетке, включая репарацию ДНК. Мишенью PARP1 является в том числе Tdp1, PARIрование которой привлекает Tdp1 к месту повреждения. PARIрованию и тем самым репарации ДНК препятствует олапариб – ингибитор PARP1, используемый в терапии опухолей с дефицитом гомологичной рекомбинации. В настоящей работе нами изучена возможность повышения противоопухолевого эффекта олапариба при использовании его в комбинации с ингибитором Tdp1 **OL7-43**. Обнаружено повышение цитотоксичности олапариба в присутствии **OL7-43** *in vitro*, при этом не выявлен сенсibiliзирующий эффект **OL7-43** в моделях карциномы Льюис и карциномы Кребс-2, но показан собственный противоопухолевый и антиметастатический эффект **OL7-43**.

Ключевые слова: тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1, ингибитор Tdp1, олапариб, карцинома Кребс-2, карцинома Льюис

DOI: 10.31857/S0026898423020143, **EDN:** EFXISX

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания считаются одной из основных причин смертности. По данным ВОЗ ежегодно в мире регистрируется не менее 12 млн новых случаев опухолевых заболеваний. Разработаны различные методы терапии опухолей, такие как радиационная, химическая, таргетная, корригирующая генная, циторедуктивная генная, иммунная терапия [1], однако существу-

ют и многочисленные проблемы, которые еще не имеют оптимального решения, например, метастазирование, тяжелые побочные эффекты и приобретение опухолевыми клетками резистентности к терапии. На сегодняшний день основными методами остаются радиационная терапия и химиотерапия, направленные на повреждение ДНК злокачественных клеток. Результат таких воздействий зависит, в том числе, от эффективности работы систем репарации ДНК, которые зачастую успешно удаляют повреждения, что препятствует действию применяемых препаратов и методов лечения, и считаются одним из ключе-

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898423020143 для авторизованных пользователей.

вых механизмов лекарственной резистентности опухоли. В связи с этим ферменты – участники и регуляторы систем репарации ДНК – становятся многообещающими мишенями в терапии онкологических заболеваний. К таким мишеням, в частности, относятся регулятор системы репарации ДНК поли(ADP-рибоза)полимераза 1 (PARP1), а также тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) [2, 3].

Tdp1 – один из ключевых ферментов репарации ДНК – играет важную роль в устранении повреждений ДНК, вызванных эндогенными (возникают в ходе нормального или патологического жизненного цикла клетки) и экзогенными (вызванными, например, противоопухолевыми препаратами, такими как топотекан, иринотекан и др.) факторами [4, 5]. Tdp1 участвует в восстановлении стабилизированных ковалентных комплексов Top1-ДНК (Top1cc, Top1 cleavage complex), гидролизуя фосфодиэфирную связь между остатком каталитического тирозина топоизомеразы 1 (Top1) и 3'-фосфатом ДНК в одноцепочечном разрыве, генерируемом Top1. Tdp1 также катализирует расщепление фосфодиэфирных связей в других аддуктах ДНК-белок и устраняет ряд различных повреждений на 3'-конце ДНК [6]. Следовательно, активность Tdp1 можно рассматривать как возможную причину резистентности опухолей к широко используемым в клинике препаратам.

PARP1 – фермент, участвующий в регуляции различных процессов, включая поддержание стабильности генома, регуляцию клеточного цикла, апоптоз. PARP1 действует как первичный сенсор разрывов в ДНК, который обеспечивает выбор пути репарации, катализируя синтез поли(ADP-рибозы) (PAR) и присоединение этого полимера к белку или к ДНК (ПАРилирование, или парилирование) [7, 8]. Олапариб – это препарат, разрешенный к применению при различных видах рака с мутацией *BRCA1/2*. Механизм действия олапариба основан на ингибировании синтеза PAR и, соответственно, на блокировании ответа на повреждение ДНК [9]: он подавляет опухолевый рост при применении в качестве монотерапии и в сочетании с традиционными химиотерапевтическими препаратами.

Известно, что парилирование усиливает рекрутирование Tdp1 в места повреждения ДНК, не влияя на каталитическую активность [10]. PARP1 стимулирует ферментативную активность Tdp1 на AP-сайтах [11]. По некоторым данным, парилирование комплекса Top1cc необходимо для протеолитической деградации белковой глобулы Top1 в составе этого комплекса непротеасомной протеазой SPRTN и обеспечения доступа Tdp1 к месту повреждения [12]. По другим данным, парилирование Top1cc мешает протеолизу этого комплекса протеазой 26S [13], следовательно, по-

давление активности PARP1 должно способствовать более быстрому и/или более эффективному расщеплению Top1cc. Таким образом, комбинированное применение ингибиторов PARP1 и Tdp1 может быть многообещающей терапевтической стратегией при различных видах рака.

Ранее мы обнаружили эффективный ингибитор Tdp1, синтезированный на основе вторичного метаболита лишайников – (+)-усниновой кислоты (УК) (рис. 1, слева), с химическими модификациями колец А и С, **OL7-43** (лабораторный шифр, рис. 1, справа) [14]. Сама (+)-усниновая кислота довольно токсична для перевиваемых клеточных линий (полутоксическая концентрация 17–45 мкМ) [15]. Модификации ее структуры, разработанные нашей командой, обеспечивают снижение токсичности и эффективное связывание с активным центром Tdp1 [14]. Введение цианогрупп, присоединенных через длинные алифатические линкеры, предположительно обеспечивает связывание с ферментом, а введение пиразольного цикла снижает токсичность соединения в отношении клеток линии MCF-7 (рак молочной железы) по сравнению с исходной (+)-усниновой кислотой (токсичность соединения **OL7-43** отсутствует во всем диапазоне изученных концентраций до 100 мкМ).

Результаты скрининга ингибирующей активности этого соединения в отношении очищенного рекомбинантного Tdp1 позволяют отметить, что оно обладает высокой ингибирующей активностью ($IC_{50} = 2.9 \pm 0.8$ мкМ) [14].

Ранее мы обнаружили сенсibiliзирующий эффект производных усниновой кислоты другой структуры в комбинации с топотеканом на карциномах Льюис и/или Кребс-2 [16–19]. В настоящей работе изучен противоопухолевый и другие эффекты производного (+)-усниновой кислоты **OL7-43**, олапариба и их комбинации на этих же экспериментальных моделях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Препараты и реагенты. Эксперименты проводили с использованием следующих реагентов: олапариба (“Santa Cruz Biotechnology”, США); диметилсульфоксида (ДМСО) (“Sigma”, США); Tween-80 (“Panreac”, Испания); 0.9%-ого физиологического раствора Буфус (Производственная фармацевтическая компания “Обновление”, Новосибирск, Россия); 3%-ной лимонной кислоты (“ХИММЕД”, Россия); 10%-ого формалина (“БиоВитрум”, Россия). Производное усниновой кислоты **OL7-43** (ингибитор Tdp1) синтезировано по методике, описанной в работе [14].

Исследование цитотоксичности соединений в отношении перевиваемых клеточных линий. Цитотоксичность олапариба, соединения **OL7-43** и их

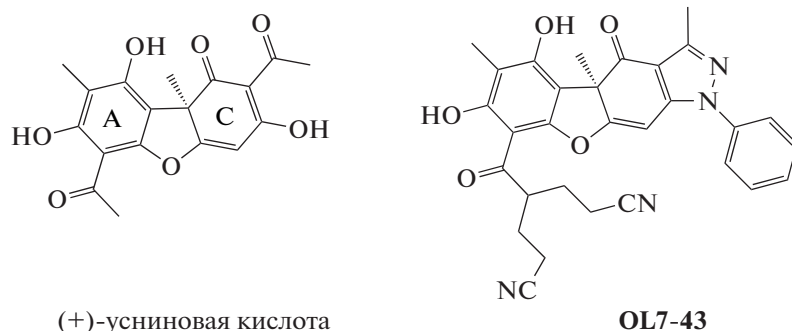


Рис. 1. Структура (+)-усниновой кислоты (слева) и ее производного OL7-43 (справа). Буквами А и С обозначены бензольные кольца, подвергнутые модификации.

комбинации изучали с использованием клеток линий MCF-7 (рак молочной железы), HeLa (рак шейки матки) и T98G (глиобластома) с помощью колориметрического теста EZ4U (“Biomedica”, Австрия). Клетки приобретены в Центре коллективного пользования “Коллекция культур клеток позвоночных” (Санкт-Петербург, Россия). Клетки выращивали в среде DMEM/F12 (“Gibco”, “Thermo Fisher Scientific”, США) в присутствии $\times 1$ GlutaMAX (“Gibco”, “Thermo Fisher Scientific”), 50 ед./мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (“MP Biomedicals”, США), 10% эмбриональной бычьей сыворотки (“Биолот”, Россия) в атмосфере 5% CO₂. После формирования 30–50% монослоя в среду добавляли исследуемые соединения или 1% ДМСО (растворитель) и проводили тест EZ4U через 72 ч согласно протоколу производителя с использованием флуориметра CLARIOstar (“BMG LABTECH”, GmbH, Германия). Данные обрабатывали с помощью встроенного программного обеспечения MARS Data Analysis 2.0 (“BMG LABTECH”). Графики зависимости выживаемости клеток от концентрации соединений строили в программе OriginPro 8.6.0 (“OriginLab”, США).

Лабораторные животные и модели опухолей. В исследованиях мы использовали самок мышей линии C57BL массой ~19–21 г. Животных содержали в пластиковых клетках на подстилках из опилок со свободным доступом к воде и корму. Содержание и обращение с мышами соответствовало международным правилам проведения экспериментов на животных (Директива Европейского сообщества (86/609 ЕЕС)).

В качестве экспериментальных моделей опухолей использовали карциному легких Льюис (LLC) и асцитную форму карциномы Кребс-2. Эти переносимые опухоли, полученные из хранилища клеток ИЦИГ СО РАН (Новосибирск, Россия), поддерживаются у мышей в виде трансплантированных опухолей. Мышиная модель LLC является наиболее широко используемой моделью рака легкого, которая поддерживает высокую опухо-

генность и метастазирование в легкие мышей C57BL. Перед трансплантацией опухолевую ткань измельчали и ресуспендировали в 0.9%-ном растворе NaCl. Опухолевые клетки прививали внутримышечно в правое бедро (объем 0.1 мл, 800000 опухолевых клеток на мышь); в месте введения формировался первичный опухолевый узел.

Линейно-неспецифическую опухоль Кребс-2 в асцитной форме трансплантировали мышам линии C57BL. Перед трансплантацией опухолевые клетки суспендировали в 0.9%-ном растворе NaCl и вводили внутривентриально (0.2 мл, 2 млн опухолевых клеток на мышь). При внутривентриальной прививке образуется асцитная форма опухоли, слабо иммуногенная и не дающая метастазов.

Противоопухолевое действие соединения OL7-43 в монорежиме и в сочетании с олапарибом на модели асцитной карциномы Кребс-2. После прививки опухоли животных разделяли произвольным образом на пять групп по шесть особей в каждой. Все препараты вводили на четвертый день после трансплантации опухоли (внутрибрюшинно однократно в объеме 0.2 мл, этот способ введения обеспечивает препаратам доступ непосредственно к опухолевым клеткам, что позволяет оценить их собственный противоопухолевый эффект). Каждая группа мышей, кроме контрольной, получала по две инъекции (в одной олапариб или растворитель, в другой ингибитор Tdp1 или растворитель):

- группа 1 — интактный контроль — мышам этой группы привили опухоль, но лекарства не вводили;
- группа 2 — мышам ввели 4% ДМСО + 10% Tween-80 (растворитель для олапариба) и 15% ДМСО + 10% Tween-80 (растворитель для OL7-43);
- группа 3 — мышам вводили олапариб в разовой дозе 25 мг/кг в виде суспензии в 4% ДМСО + 10% Tween-80 и 15% ДМСО + 10% Tween-80;

- группа 4 — мышам ввели олапариб в разовой дозе 25 мг/кг и **OL7-43** в разовой дозе 50 мг/кг в виде суспензии в 15% ДМСО + 10% Tween-80;

- группа 5 — мышам вводили **OL7-43** в разовой дозе 50 мг/кг и 4% ДМСО + 10% Tween-80.

Действие препаратов оценивали в конце эксперимента по массе асцитной опухоли, по концентрации опухолевых клеток в асцитической жидкости (клетки подсчитывали в камере Горяева), индексам массы печени и селезенки.

Приготовление образца для подсчета опухолевых клеток в камере Горяева: к 10 мкл асцита добавляли 400 мкл физиологического раствора 0.9% (разведение в 40 раз). Подсчет осуществляли при малом увеличении в пяти больших квадратах, разделенных на 16 малых (общее количество 80).

Противоопухолевое антиметастатическое действие соединения OL7-43 в монорежиме и в сочетании с олапарибом на модели карциномы легкого Льюис, а также влияние препаратов на формулу крови. Предварительно животных разделили случайным образом на пять групп по семь особей в каждой, группы были сформированы таким же образом, как в эксперименте с моделью опухоли Кребс-2. Препараты вводили однократно внутрибрюшинно в объеме 0.2 мл на 13-й день после трансплантации опухоли.

Оценка токсического действия препаратов основывалась на изменении массы тела мышей в ходе эксперимента (взвешивания проводили на 13, 15, 18, 20, 22 и 25 день после трансплантации) и в конце эксперимента по индексам массы печени и селезенки. Противоопухолевое действие оценивали по росту первичных опухолевых узлов (измерения проводили одновременно с взвешиванием) и по количеству метастазов в легких всех животных после фиксации в 10%-ном формалине (подсчет осуществляли под микроскопом МБИ-3 ("ЛОМО", СССР) при трехкратном увеличении. Также дополнительно подсчитывали количество лейкоцитов и эритроцитов крови в камере Горяева. Кроме того, выполняли микроскопический анализ мазка крови и подсчет лейкоцитарной формулы с помощью биологического исследовательского микроскопа БИОСКОП-1 ("ЛОМО-МА", Санкт-Петербург, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сенсибилизация цитотоксического действия олапариба соединением OL7-43 in vitro

Как уже упоминалось, соединение **OL7-43** нетоксично для клеток MCF-7 во всем исследованном диапазоне концентраций (до 100 мкМ, соединение **III** в работе [14]). Мы также изучили цитотоксичность этого соединения для клеток HeLa (карцинома шейки матки) и T98G (глиобластома) и обнаружили, что в концентрации до 50 мкМ

оно не влияет на выживаемость клеток (рис. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/2/supp_Kornienko_rus.pdf). Далее мы изучили влияние этого соединения на цитотоксичность олапариба в отношении перевиваемых клеток и обнаружили, что соединение **OL7-43** в нетоксичной концентрации 20 мкМ усиливает цитотоксический эффект олапариба на всех трех клеточных линиях (рис. 2). Следует отметить, что усиление цитотоксического эффекта топотекана было заметным на клетках линии HeLa и незначительным на клетках MCF-7 и T98G.

Противоопухолевое действие OL7-43 в монорежиме и в сочетании с олапарибом на модели асцитной карциномы Кребс-2

Введение только олапариба привело к незначительному снижению массы опухоли Кребс-2 (рис. 3) и концентрации опухолевых клеток в асците (рис. 4) по сравнению с контрольной группой (без введения препаратов) и с группой, которой вводили ДМСО. Сочетанное применение олапариба и ингибитора Tdp1 незначительно снизило массу опухоли (рис. 3) и концентрацию опухолевых клеток в асците (рис. 4) по сравнению с контрольной группой (без лечения), группой, которой вводили ДМСО, и группой, получившей олапариб в качестве монотерапии, но различия были статистически недостоверными. Масса асцитной опухоли в данной группе по сравнению с группой, которой вводили только **OL7-43**, снизилась аддитивно.

Для проверки общей токсичности исследуемых соединений и их комбинации по окончании эксперимента извлекали и взвешивали печень. На основе полученных данных рассчитывали индекс этих органов. Органные индексы рассчитывали как отношение массы органа к массе тела мыши (с опухолью). Изменение относительного веса печени (как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения) может свидетельствовать о токсическом влиянии соединений. Масса печени незначительно изменялась, однако в группах, получавших ингибитор Tdp1 — **OL7-43**, отмечено недостоверное увеличение печени (табл. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/2/supp_Kornienko_rus.pdf). Индекс печени также не менялся (табл. S1), что указывает на отсутствие острого токсического действия олапариба, соединения **OL7-43** и их комбинации на организм животных.

При лечении ингибитором Tdp1 наблюдалось недостоверное снижение массы асцита (рис. 3) и концентрации опухолевых клеток в асцитической жидкости (рис. 4) по сравнению со всеми группами.

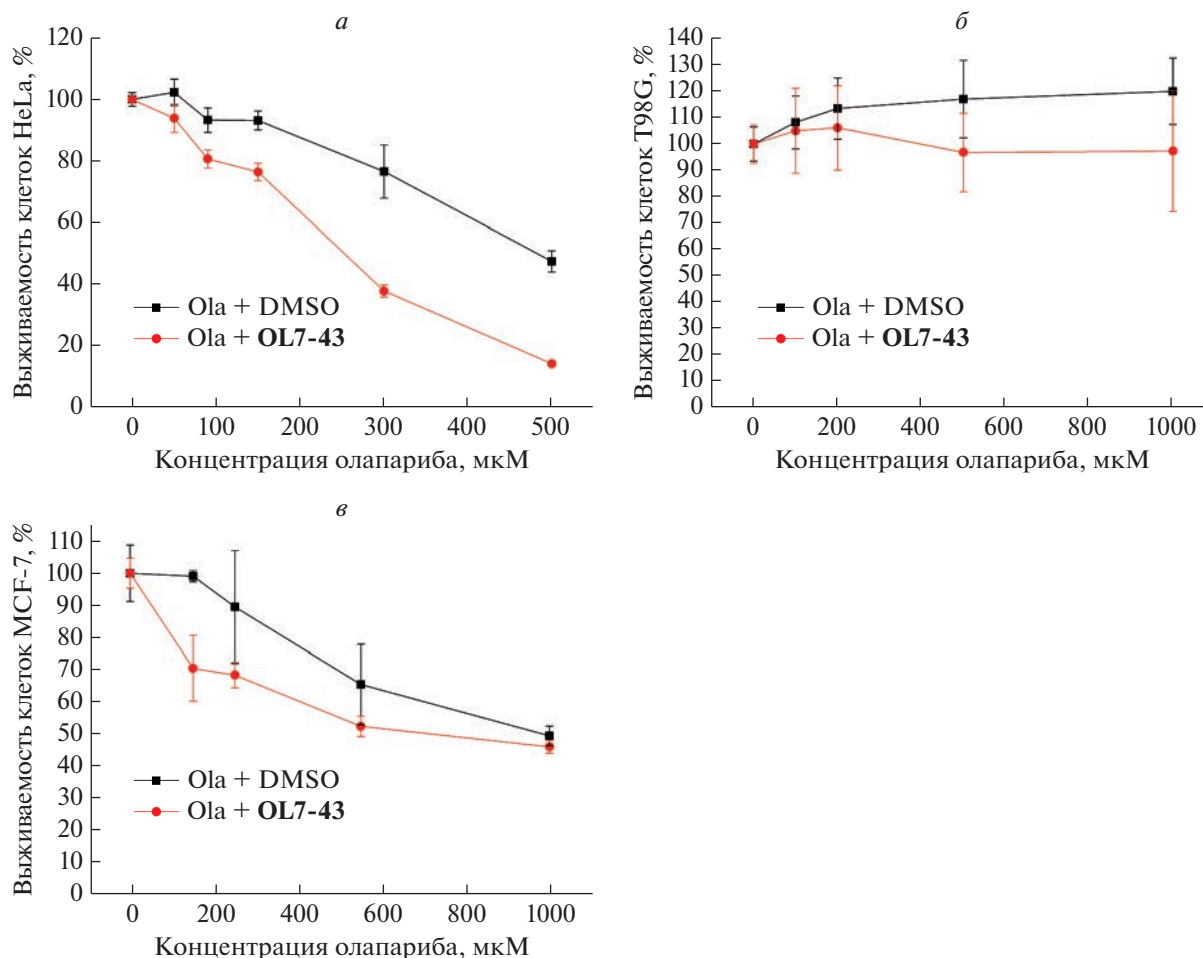


Рис. 2. Выживаемость клеток HeLa (а), T98G (б) и MCF-7 (в) в зависимости от концентрации олапариба (Ola) в присутствии (красные графики) и в отсутствие (черные графики) соединения OL7-43.

Таким образом, соединение **OL7-43** нетоксично для экспериментальных животных и обладает собственной противоопухолевой активностью в отношении асцитной карциномы Кребс-2, на что указывает снижение концентрации опухолевых клеток в асците. Синергический эффект этого соединения, показанный нами *in vitro* на клеточных линиях, в эксперименте *in vivo* не выявлен.

Противоопухолевое и антиметастатическое действие OL7-43 в монорежиме и в сочетании с олапарибом на модели карциномы легкого Льюис

Введение одного олапариба не привело к снижению массы первичного опухолевого узла (рис. 5) и не уменьшило число метастазов в легких мышей (рис. 6) по сравнению с контрольной группой (без введения препаратов) и с группой, которой вводили ДМСО. Применение соединения **OL7-43** в комбинации с олапарибом незначительно снижало массу опухоли, но не оказывало влияния на процесс метастазирования.

Соединение **OL7-43** в монорежиме более эффективно снижало как среднюю массу первичного опухолевого узла, так и число метастазов в легких мышей (количество метастазов под действием **OL7-43** снизилось статистически значимо по сравнению с группой мышей, которым ввели ДМСО) (рис. 5, 6). Также для всех групп рассчитывали коэффициент торможения роста опухоли (ТРО, %), данные представлены на рис. 5.

Слабый эффект терапии изучаемыми соединениями (олапариб, **OL7-43** и их комбинация), возможно, связан с выбором режима дозирования, лекарственной формы и/или моделью опухоли.

Токсичность олапариба, соединения OL7-43 и их комбинации

Токсичность препаратов и их комбинации мы оценивали по изменению массы тела мышей с 13-ого по 25-й день после трансплантации опухоли (т.е. со дня лечения). Выявлена тенденция к увеличению массы животных, что говорит об от-

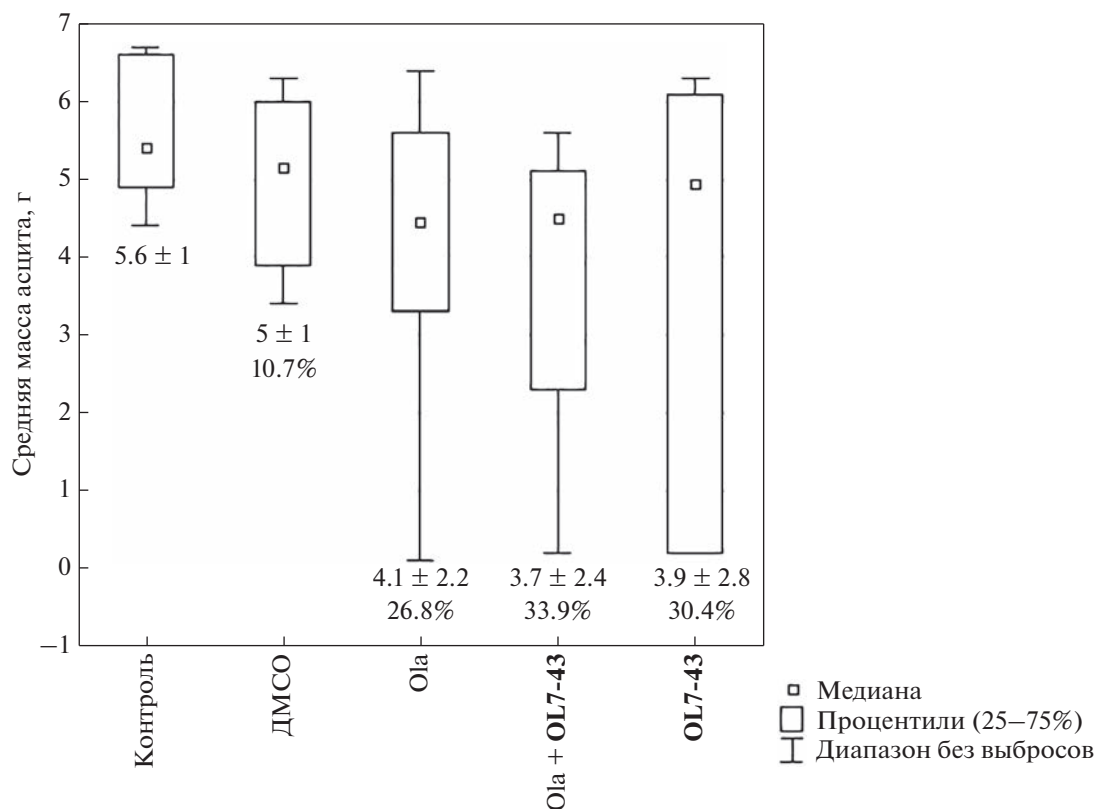


Рис. 3. Средняя масса асцитной опухоли Кребс-2 (разница в массе мыши с опухолью в брюшной полости и после удаления опухоли) после терапии олапарибом (Ola, 25 мг/кг), OL7-43 (50 мг/кг) и их комбинацией.

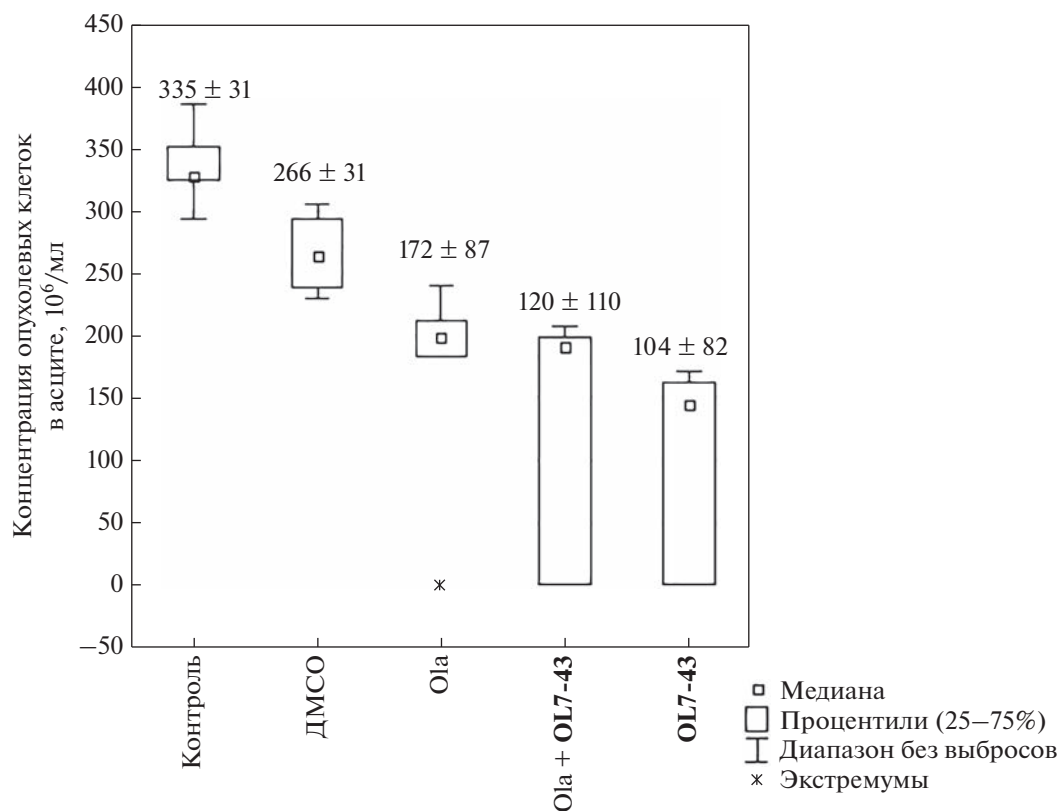


Рис. 4. Концентрация опухолевых клеток в асцитической жидкости после терапии олапарибом (Ola, 25 мг/кг), OL7-43 (50 мг/кг) и их комбинацией.

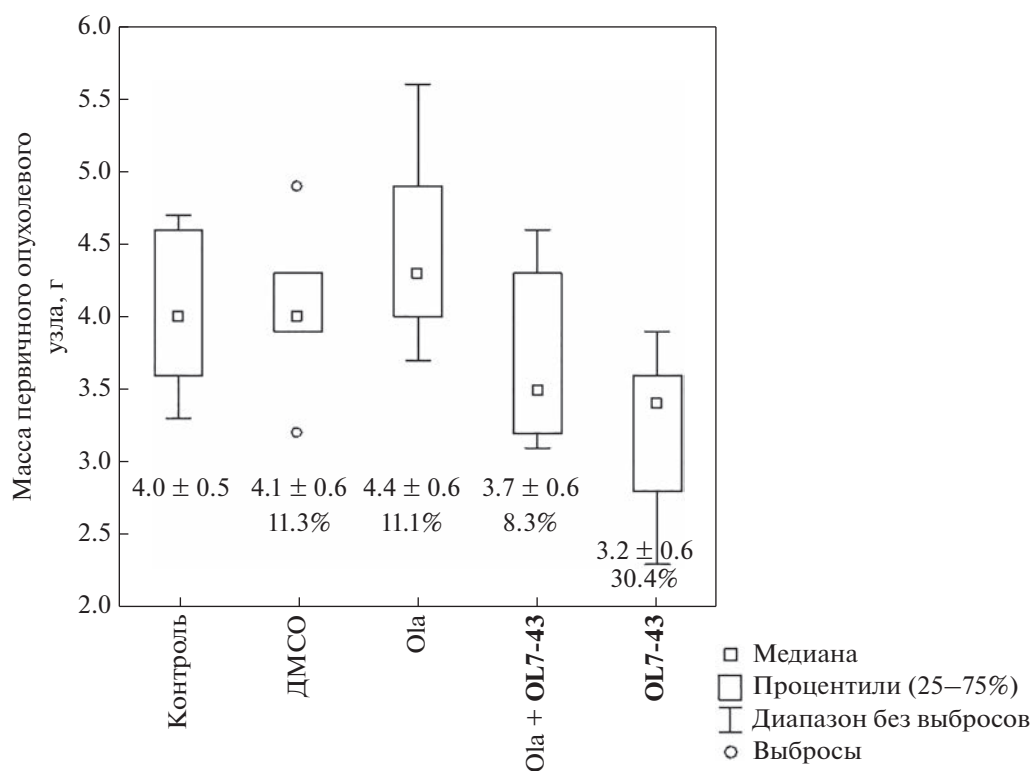


Рис. 5. Средняя масса первичного опухолевого узла. Цифры под ящичками обозначают среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (верхняя строчка) и значения коэффициента торможения роста опухоли (ТРО, %) (нижняя строчка).

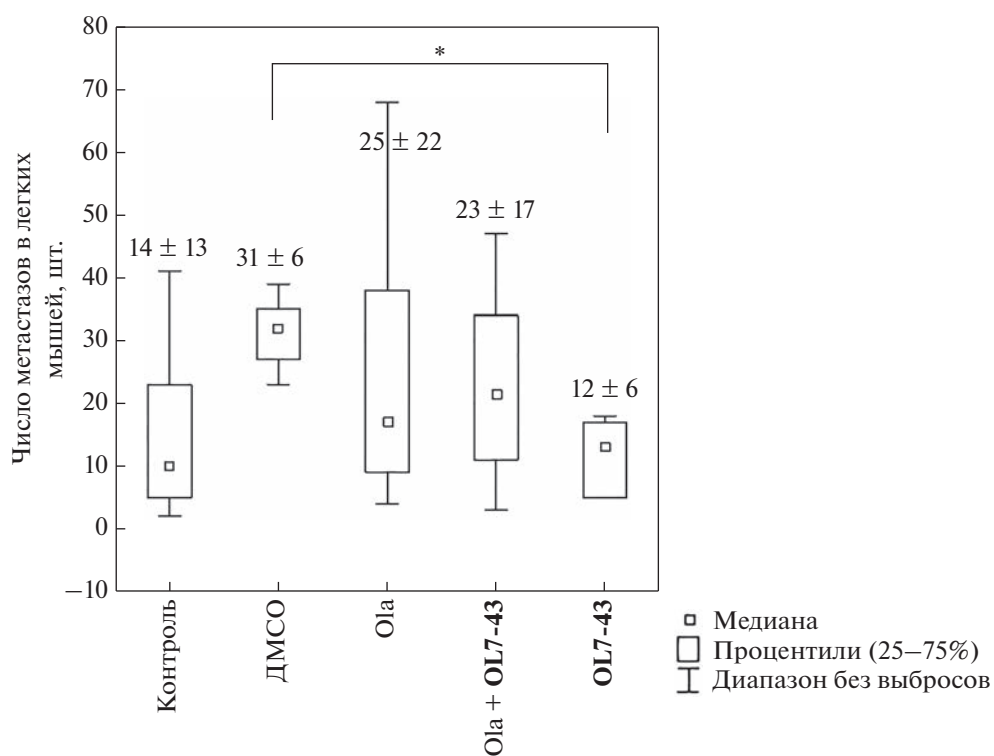


Рис. 6. Среднее число метастазов в легких мышей. Звездочкой отмечено статистически значимое различие между группами ($p < 0.05$). Цифры над ящичками обозначают среднее значение $\pm$ стандартное отклонение.

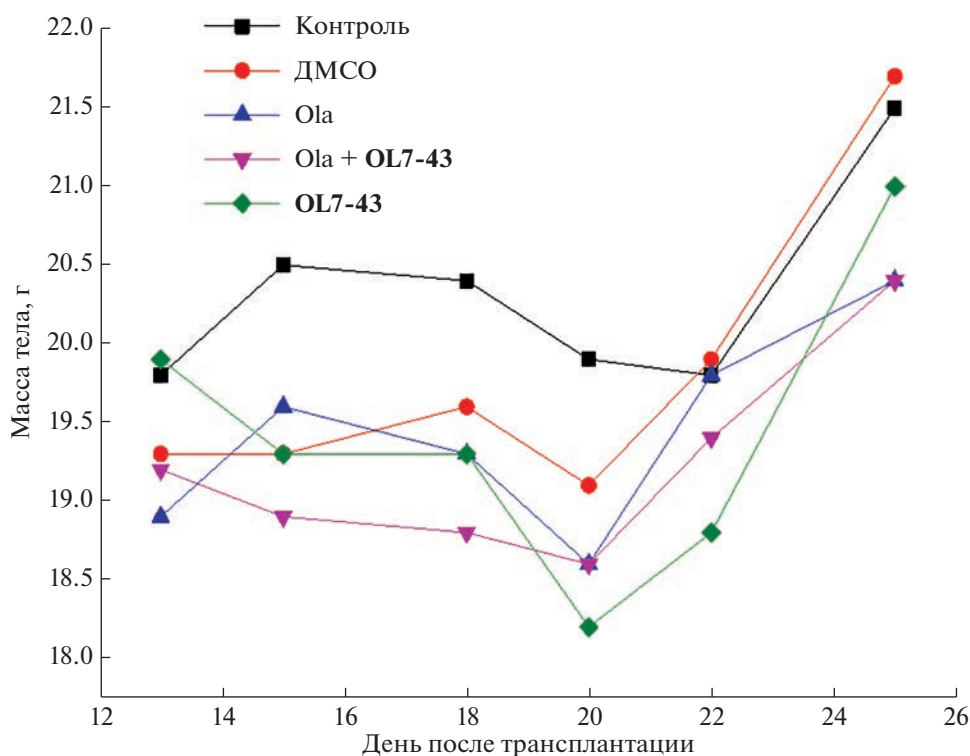


Рис. 7. Динамика изменений массы тела мышей под действием соединения **OL7-43** и его комбинации с олапарибом (Ola).

сутствии острой токсичности исследуемых соединений (рис. 7).

Кроме того, по окончании эксперимента мы извлекали и взвешивали печень и селезенку, рассчитывали индексы печени и селезенки. Значимых изменений массы печени и селезенки не наблюдали (табл. S2, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/2/supp_Kornienko_rus.pdf). Отмечено, что терапия олапарибом, **OL7-43** и их комбинацией в указанных дозах не вызывала острого токсического эффекта.

Таким образом, соединение **OL7-43** не оказывает острого токсического действия на внутренние органы мышей и обладает собственной противоопухолевой активностью в отношении карциномы легких Льюис, на что указывает снижение числа метастазов в легких и массы первичного опухолевого узла. Синергический эффект в отношении олапариба у данного соединения не выявлен.

Влияние изучаемых препаратов на периферическую кровь мышей с карциномой легких Льюис

У мышей с карциномой легких Льюис число эритроцитов в периферической крови значительно снижается [20], а количество лейкоцитов увеличивается [21]. Увеличение числа лейкоцитов в периферической крови связано с воспалительным

процессом, вызванным некрозом, который возникает в процессе формирования и роста опухолевого узла.

Применение олапариба в монорежиме увеличивает концентрацию эритроцитов в крови на 14% по сравнению с контрольной группой без лечения и на 10% по сравнению с группой, которой вводили ДМСО (табл. 1, рис. 8).

Сочетанное применение олапариба и **OL7-43** привело к увеличению концентрации эритроцитов по сравнению с группами, которым вводили ДМСО (на 18%) и олапариб (незначительно). Применение только соединения **OL7-43** привело к увеличению числа эритроцитов на 25% по сравнению с контролем без лечения и на 21% по сравнению с контролем с ДМСО, возвращая число эритроцитов к норме (здоровые мыши без лечения).

Введение олапариба снизило на 18% концентрацию лейкоцитов по сравнению с контролем без лечения и не изменило ее по сравнению с контролем с ДМСО. Комбинированная терапия снизила число лейкоцитов на 44% по сравнению с отсутствием лечения и на 22% по сравнению с применением растворителя и олапариба по отдельности. Соединение **OL7-43** более эффективно снижало концентрацию лейкоцитов, чем остальные препараты или их комбинации (рис. 9, табл. 1), также приводя число лейкоцитов к нормальным значениям.

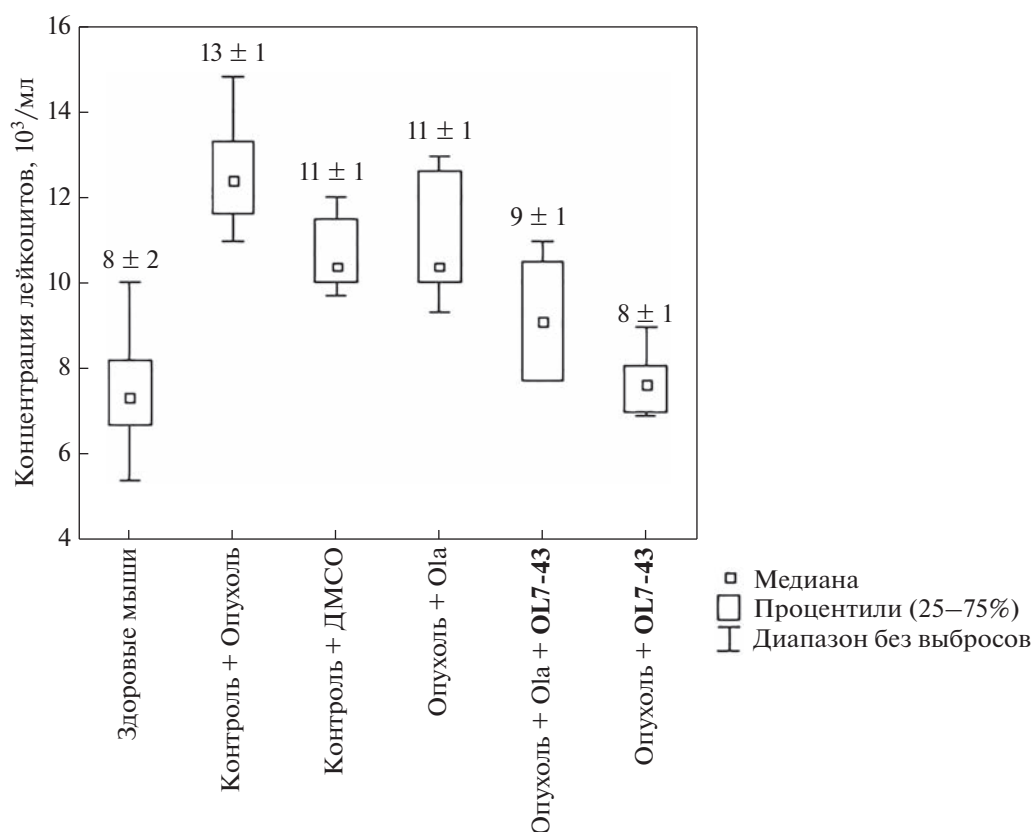


Рис. 8. Влияние соединения олапариба (Ola) в разовой дозе 25 мг/кг, **OL7-43** в разовой дозе 50 мг/кг и их комбинации на концентрацию эритроцитов.

Введение олапариба, **OL7-43** и их комбинации приводит к восстановлению показателей белой и красной крови, т.е. к нормализации гемопоэза (рис. 8, 9). За норму приняли показатели крови здоровых мышей без опухоли, не получавших никаких препаратов. Результаты подсчета лейкоцитарных формул периферической крови мышей представлены в табл. 1.

Применение олапариба в монорежиме увеличило число лимфоцитов по сравнению с кон-

трольной группой (без лечения) и особями, которым вводили ДМСО.

Сочетанное применение олапариба и **OL7-43** привело к статистически значимому увеличению числа лимфоцитов по сравнению с контрольной группой (опухоли без лечения) и особями, которым вводили ДМСО. Введение только **OL7-43** приводило к еще большему увеличению числа лимфоцитов по сравнению с комбинацией пре-

Таблица 1. Влияние **OL7-43** и его комбинации с олапарибом на лейкоцитарную формулу крови мышей

Показатель	Норма	Контроль – опухоль без лечения	Опухоль + ДМСО	Опухоль + олапариб	Опухоль + олапариб + OL7-43	Опухоль + OL7-43
Эритроциты, млн/мл	8.0–9.0	6.5 ± 0.6	6.7 ± 0.8	7.4 ± 0.5	7.9 ± 0.5	8.1 ± 0.3
Лейкоциты, т./мл	5.4–10.0	13 ± 1	11 ± 1	11 ± 1	9 ± 1	8 ± 1
Лимфоциты, %	55.0–63.0	44 ± 5	44 ± 5	50 ± 3	53 ± 3*	56 ± 4*
Моноциты, %	0.5–2.0	3 ± 1	1.1 ± 0.8	1.4 ± 1*	2 ± 1*	1.0 ± 0.6
Базофилы, %	0.0–0.5	0.2 ± 0.4	0	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0
Эозинофилы, %	0.0–1.0	2 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
Нейтрофилы п/я, %	1.0–5.0	5 ± 3	4 ± 2	3 ± 1	3 ± 1	3 ± 1
Нейтрофилы с/я, %	34.0–39.0	45 ± 7	50 ± 7	45 ± 4	41 ± 4	39 ± 5

*Статистически значимые отличия от группы ДМСО ($p < 0.05$).

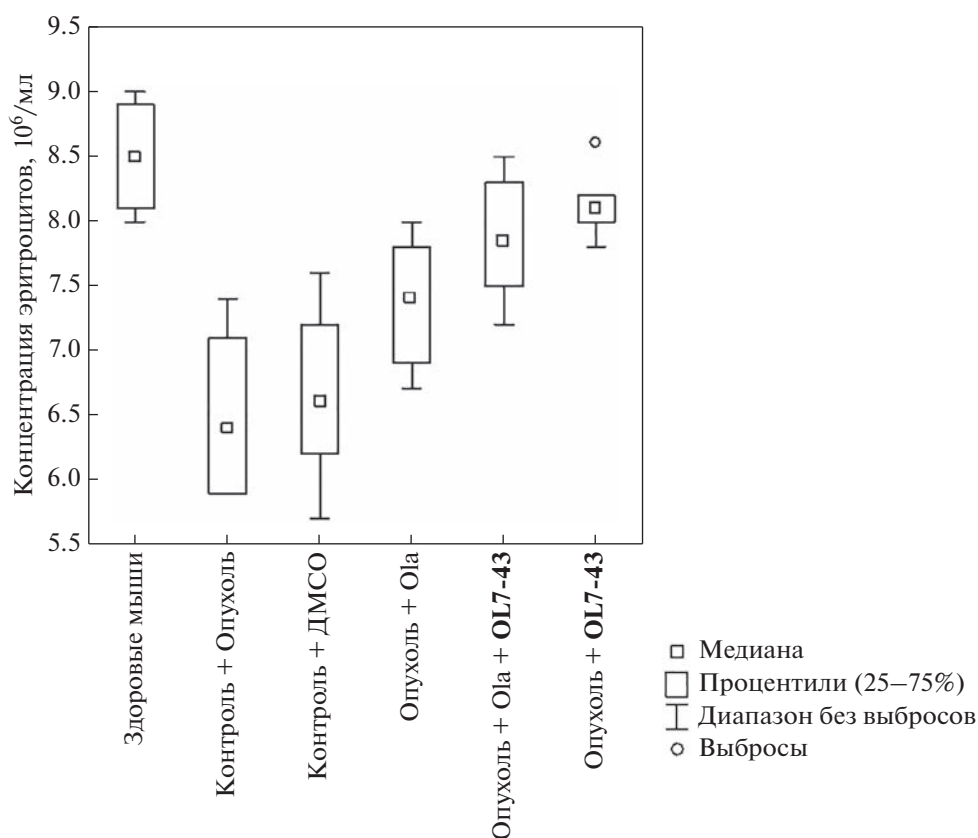


Рис. 9. Влияние соединения олапариба (Ola) в разовой дозе 25 мг/кг, **OL7-43** в разовой дозе 50 мг/кг и их комбинации на концентрацию лейкоцитов.

паратов и, как и в случае эритроцитов, возвращало этот показатель к норме (табл. 1).

Содержание моноцитов, эозинофилов и нейтрофилов при терапии только олапарибом было статистически значимо ниже, чем в контроле без лечения и незначительно повышено по сравнению с группами, которым вводили комбинацию олапариба с **OL7-43** и собственно **OL7-43** в монорежиме (табл. 1).

Терапия олапарибом, **OL7-43** и их комбинацией в указанных дозах не привела к развитию гематологических осложнений.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* на клеточных линиях MCF-7, HeLa и T98G производное усниновой кислоты **OL7-43** — ингибитор Tdp1 — в дозе 50 мкМ не оказывал токсического действия на клетки, однако даже в меньшей дозе (20 мкМ) **OL7-43** усиливал цитотоксический эффект олапариба при совместном с ним воздействии.

Исследование в системе *in vivo*, проведенное на мышах с асцитной опухолью Krebs-2 и карциномой легких Льюиса, показало, что на клетках этих опухолей проявилось непосредственное цитотоксическое действие **OL7-43**, но при этом не наблюдалось статистически значимой способно-

сти сенсibilизировать опухоль *in vivo* к действию олапариба.

Олапариб слабо влияет на показатели белой и красной крови. Введение **OL7-43** или его комбинации с олапарибом нормализует гемопоэз (по окончании эксперимента процентное соотношение различных видов лейкоцитов, определенное путем подсчета в окрашенном мазке крови, соответствовало норме либо было максимально близким к ней).

Учитывая противоопухолевую активность **OL7-43**, обнаруженную на двух перевиваемых линиях опухолей мышей, при отсутствии общетоксического действия на организм животных и нормализации гемопоэза, можно заключить, что соединение **OL7-43** может представлять интерес для дальнейшего исследования на других типах опухолей и при других схемах применения.

Авторы выражают благодарность Можной Александре Григорьевне за консультации по работе с лабораторными животными.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (№ 21-14-00105, Т.Е. Корниенко, Н.Д. Дырхеева, А.Л. Захаренко, А.С. Филимонов, А.А. Чепанова, Н.А. Попова, В.П. Николин) и проектом Государственного задания ИХБФМ СО

РАН (№ 121031300041-4, Е.С. Ильина, О.Д. Захарова, О.И. Лаврик).

Все процедуры с мышами соответствовали международным правилам проведения экспериментов на животных (Директива Европейского сообщества (86/609 ЕЕС)).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы включают данные по цитотоксичности олапарибы и по острой токсичности препаратов на моделях опухолей мышей и размещены на сайтах <http://link.springer.com>, <http://molecbio.ru>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безбородова О.А., Немцова Е.Р., Кармакова Т.А., Венедиктова Ю.Б., Панкратов А.А., Алексеенко И.В., Плешкан В.В., Зиновьева М.В., Монастырская Г.С., Свердлов Е.Д., Каприн А.А. (2019) Современные тенденции развития противоопухолевой генной и клеточной терапии. *Материалы Первого Международного Форума онкологии и радиологии*, 23–27 сентября 2019 г. Москва, 65–66.
2. Curtin N.J., Szabo C. (2020) Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 711–736.
3. Zakharenko A., Dyrkheeva N., Lavrik O. (2019) Dual DNA topoisomerase 1 and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibition for improved anticancer activity. *Med. Res. Rev.* **39**, 1427–1441.
4. Alagoz M., Gilbert D.C., El-Khamisy S., Chalmers A.J. (2012) DNA repair and resistance to topoisomerase I inhibitors: mechanisms, biomarkers and therapeutic targets. *Curr. Med. Chem.* **19**, 3874–3885.
5. Pommier Y., Huang S.N., Gao R., Das B.B., Murai J., Marchand C. (2014) Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (tdp1 and tdp2). *DNA Repair.* **19**, 114–129.
6. Comeaux E.Q., van Waardenburg R.C. (2014) Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I resolves both naturally and chemically induced DNA adducts and its potential as a therapeutic target. *Drug Metabolism Rev.* **46**, 494–507.
7. Virág L., Szabó C. (2002) The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol. Rev.* **54**, 375–429.
8. Gros Lambert J., Prokhorova E., Ahel I. (2021) ADP-ribosylation of DNA RNA. *DNA Repair.* **105**, 103144.
9. Lord C.J., Tutt A.N.J., Ashworth A. (2015) Synthetic lethality and cancer therapy: lessons learned from the development of PARP inhibitors. *Annu. Rev. Med.* **66**, 455–470.
10. Das B.B., Huang S.N., Murai J., Rehman I., Amé J.-C., Sengupta S., Das S.K., Majumdar P., Zhang H., Biard D., Majumder H.K., Schreiber V., Pommier Y. (2014) PARP1–TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage. *Nucl. Acids Res.* **42**, 4435–4449.
11. Lebedeva N.A., Anarbaev R.O., Sukhanova M., Vasil'eva I.A., Rechkunova N.I., Lavrik O.I. (2015) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 stimulates the AP-site cleavage activity of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. *Biosci. Rep.* **35**–44.
12. Lopez-Mosqueda J., Hurley K., Simonson Q., Kloet M.S., Liu Q., Filippov D.V., van der Heden van Noort G.J. (2022) Poly-ADP-ribosylation modifies DNA-protein crosslinks to signal for SPRTN-dependent degradation. *Int. Conference the PARP Family & ADP-ribosylation*, Cold Spring Harbor Lab., USA. Abstract book. P. 42.
13. Sun Y., Chen J., Huang S.N., Su Y.P., Wang W., Agama K., Saha S., Jenkins L.M., Pascal J.M., Pommier Y. (2021) PARylation prevents the proteasomal degradation of topoisomerase I DNA-protein crosslinks and induces their deubiquitylation. *Nat. Commun.* **12**, 1–16.
14. Захаренко А.Л., Лузина О.А., Соколов Д.Н., Захарова О.Д., Рахманова М.Е., Чепанова А.А., Дырхеева Н.С., Лаврик О.И., Салахутдинов Н.Ф. (2017) Производные усниновой кислоты как эффективные ингибиторы тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1. *Биоорганическая химия*. **43**, 97–104.
15. Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф. (2016) Биологическая активность усниновой кислоты и ее производных. Часть 2. Действие усниновой кислоты и ее производных на высшие организмы, молекулярные и физико-химические аспекты биологической активности (обзорная статья). *Биоорганическая химия*. **42**, 276–276.
16. Zakharenko A.L., Zakharenko A.L., Luzina O.A., Sokolov D.N., Kaledin V.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Patel J., Zakharova O.D., Chepanova A.A., Zafar A., Reynisson J., Leung E., Leung I.K.H., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. (2019) Novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors enhance the therapeutic impact of topotecan on *in vivo* tumor models. *Eur. J. Med. Chem.* **161**, 581–593.
17. Nikolin V.P., Popova N.A., Kaledin V.I., Luzina O.A., Zakharenko A.L., Salakhutdinov N.F., Lavrik O.I. (2021) The influence of an enamine usnic acid derivative (a tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitor) on the therapeutic effect of topotecan against transplanted tumors *in vivo*. *Clin. Exp. Metastasis*. **38**, 431–440.
18. Колдышева Е.В., Меньшикова А.П., Лушников Е.Л., Попова Н.А., Каледин В.И., Николин В.П., Захаренко А.Л., Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф., Лаврик О.И. (2018) Антиметастатическая активность комбинации топотекана и ингибитора тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 на модели карциномы легкого Льюис. *Бюлл. Эксп. биологии медицины*. **166**, 609–615.
19. Дырхеева Н.С., Захаренко А.Л., Новоселова Е.С., Чепанова А.А., Николин В.П., Лузина О.А., Салахутдинов Н.Ф., Рябчикова Е.И., Лаврик О.И. (2021) Противоопухолевая активность комбинации топотекана и ингибитора тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 на модели асцитной карциномы Кребс-2 мыши. *Молекулярная биология*. **55**, 312–317.
20. Моисеев С.В. (2012) Анемия при онкологических заболеваниях. *Онкол. Журн. им. П.А. Герцена*. **1**, 77–82.
21. Плотникова Н.А., Пятаев Н.А., Канаев П.М., Кокорев А.В., Кемайкин С.П., Харитонов С.В., Громова С.В. (2014) Особенности морфологии карциномы легкого Льюис на фоне коррекции опухолевого роста мелатонином и 3-гидроксипиридином. *Фунд. исслед.* **10**, 549–552.

Influence of Usnic Acid Derivative (Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Inhibitor) on Transplanted Tumors in vivo as a Monotherapy and in Combination with Olaparib

T. E. Kornienko¹, A. L. Zakharenko¹, E. S. Ilina^{1, 4}, A. A. Chepanova¹, O. D. Zakharova¹,
N. S. Dyrkheeva¹, N. A. Popova^{2, 4}, V. P. Nikolin², A. S. Filimonov³, O. A. Luzina³,
N. F. Salakhutdinov^{3, 4}, and O. I. Lavrik^{1, 4, *}

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Federal Research Centre Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

³*Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

⁴*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru*

Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1) is a DNA repair enzyme that removes various adducts from the 3'-end of DNA. Such damage is formed, for example, under the action of enzymes that introduce single-strand breaks in DNA during catalysis (for example, topoisomerase 1), as well as a number of anticancer drugs with different mechanisms of action. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) is an enzyme that catalyzes the post-translational modification of various targets (PARylation), and with its help controls many processes in the cell, including DNA repair. The target of PARP1 is also Tdp1, whose PARylation attracts Tdp1 to the site of DNA damage. Olaparib is a PARP1 inhibitor used in clinical practice to treat homologous recombination deficient tumors. The main mechanism of action of olaparib is to obstruction of PARylation and thus DNA repair. In this study, we used the Tdp1 inhibitor **OL7-43** in combination with olaparib to increase the antitumor effect of the latter. Despite the increase in cytotoxicity of olaparib in the presence of **OL7-43** *in vitro*, we did not find a sensitizing effect of this compound in the Lewis and Krebs-2 carcinoma models, but it showed its own antitumor and antimetastatic effects.

Keywords: tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1, Tdp1 inhibitor, olaparib, Krebs-2 carcinoma, Lewis carcinoma

СИСТЕМНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ И СОЗДАНИЕ НОВЫХ МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

УДК 616-097,571.27

ОБ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ В НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ УНИВЕРСИТЕТЕ “СИРИУС”

© 2023 г. И. В. Астраханцева^а, В. Г. Круть^а, С. А. Чувпило^а, Д. В. Шевырев^а,
А. Н. Шумеев^а, С. А. Рыбцов^а, С. А. Недоспасов^{а, б, *}

^аАНО ВО Научно-технологический университет “Сириус”, Федеральная территория Сириус,
Краснодарский край, 354340 Россия

^бИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, 119991 Россия

*e-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

Поступила в редакцию 10.08.2022 г.

После доработки 21.09.2022 г.

Принята к публикации 22.09.2022 г.

Эта небольшая статья суммирует результаты недавних иммунологических исследований, проведенных в новом Научно-технологическом университете “Сириус”. Основное направление работ связано с изучением особенностей иммунного ответа на вакцинацию и ревакцинацию против SARS-CoV-2, а также с поиском потенциальных агентов для предотвращения заражения этим вирусом.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, вакцины, поствакцинальный иммунитет, антитела, нейтрализация, пептиды, псевдовирусная система

DOI: 10.31857/S0026898423020039, **EDN:** EFWNVA

С момента образования Научно-технологического университета “Сириус” в состав Центра геноетики и наук о жизни вошло отдельное научное направление: “Иммунобиология и биомедицина”, задача которого состояла в развитии как фундаментальных исследований, так и технологий в области иммунологии. Пандемия COVID-19 оказала “мгновенное действие”, скорректировав научные планы направления и частично “переключив” исследования на инфекционную иммунологию. Отметим, что к этому моменту находящийся в стадии становления НТУ “Сириус” уже приобрел высокотехнологичное оборудование, которое было развернуто во временных помещениях. Эта статья обобщает результаты иммунологических исследований, в первую очередь связанных с пандемией COVID-19, которые были проведены в тесной кооперации с несколькими ключевыми партнерами. Кроме того, была оценена возможность создания пептидного аналога клеточного рецептора коронавируса — ангиотензинконвертирующего фермента-2 (ACE2), — как потенциального ингибитора проникновения вируса в клетку, тем самым предотвращающего ее заражение.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Участники исследования и образцы. У добровольцев-участников брали периферическую кровь

через 1 и 6 мес после прохождения полного курса вакцинации для оценки гуморального и клеточного иммунитета. Были сформированы следующие группы сравнения:

1. Переболевшие COVID-19, $n = 7$.
2. Вакцинированные Гам-Ковид-Вак (Sputnik V), $n = 7$.
3. Вакцинированные ЭпиВакКорона, $n = 7$.
4. Вакцинированные КовиВак (CoviVac), $n = 7$.
5. Вакцинированные мРНК-вакцинами: BNT162b2 (Pfizer/BioNTech) или mRNA-1273 (Moderna), — $n = 8$.
6. Вакцинированные Гам-Ковид-Вак через 6 мес или более после перенесенного заболевания COVID-19, $n = 7$.
7. Вакцинированные КовиВак через 6 мес или более после перенесенного заболевания COVID-19, $n = 5$.

Периферическую кровь собирали в две 9-миллилитровые пробирки IMPROVacutainer с натрий гепарином (“IMPROVE”, Китай). Кровь разделяли на клеточные фракции центрифугированием в градиенте плотности фикола. Мононуклеары периферической крови (PBMC) замораживали в жидком азоте в количестве 1×10^6 клеток в 1 мл среды RPMI-1640 (“ПанЭко”, Россия) с 10% диметилсульфоксида (DMSO; “Sigma”, США), 5% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; “Capricorn Scientific”, Германия). Для

выделения сыворотки периферическую кровь собирали в пробирки IMPROVacutainer с активатором свертывания объемом 5 мл (“IMPROVE”). Полученную сыворотку разделяли на аликвоты и хранили при -80°C .

Иммуноферментный анализ. Уровни антител к рецепторсвязывающему домену (RBD) белка шипа (S) SARS-CoV-2 оценивали с использованием иммуноферментной тест-системы SARS-CoV-2-IgG-ИФА (любезно предоставлена ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр гематологии” Минздрава России, Москва).

Мультиплексный анализ антител. Наличие антител против различных эпитопов в составе белков S (S1, S2, RBD) и нуклеопротеина (N) SARS-CoV-2 оценивали с помощью набора MILLIPLEX® SARS-CoV-2 Antigen Panel 1 IgG (“Merck”, Германия) на приборе MagPix (“Merck”).

Получение псевдовиральных частиц (PVPs) с S-белком SARS-CoV-2. Для получения PVP клетки HEK-293T (6×10^6 клеток) высаживали на 10-сантиметровую чашку Петри и культивировали в 7 мл полной среды DMEM/F12, содержащей 2% FBS (“Capricorn”, США), 2 мМ L-глутамин и пенициллин/стрептомицин в концентрации 50 ед/мл и 50 мкг/мл соответственно (“ПанЭко”), в течение ночи. Среду заменяли на DMEM/F12 без FBS (6.5 мл). Для трансфекции к 650 мкл культуральной среды OptiMEM (“Capricorn”) добавляли 30 мкл водного раствора полиэтиленимина (PEI, 1 мг/мл) и раствор плазмид pCMVdelta8.2R, pUHR-IR-GFP, pCG1-SARS-2S-deltaF-deltaC19 [1], содержащий суммарно 15 мкг ДНК (соотношение ДНК : PEI = 1 : 2), и проводили трансфекцию по стандартному протоколу [2]. Через 48 ч клеточную среду собирали и концентрировали центрифугированием ($23000 \times g$, 4°C , 2.5 ч). Содержащий PVPs осадок ресуспендировали в 1/20 исходного объема, разделяли на аликвоты и хранили при -80°C .

Нейтрализация трансдукции PVPs. Эту процедуру проводили, как описано ранее [1], с небольшими модификациями. Предварительно для опыта по нейтрализации клетки линии HEK-293T/ACE2, экспрессирующие на поверхности ACE2, высевали в лунки 96-луночного планшета TC-treated (“Eppendorf”, Германия) в расчете 2×10^5 клеток/лунка. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку человека, не содержащую антител против SARS-CoV-2, а для положительного контроля — сыворотку с высоким титром антител, полученную от реконвалесцента COVID-19. В опытных образцах PVPs инкубировали с пептидами, взятыми в диапазоне концентраций от 0.9 до 200 мкМ, в полной среде DMEM/F12 (“ПанЭко”) в течение 60 мин при комнатной температуре, после чего их вносили в

культуру клеток HEK-293T/ACE2 и культивировали в течение 48 ч при 37°C и 5% CO_2 . Анализ трансдукции проводили с помощью проточной цитометрии на анализаторе BD LSRFortessa™ (“BD Biosciences”, США).

FACS-анализ специфических Т-клеток. После разморозки PBMC культивировали в полной среде RPMI-1640 в 96-луночных планшетах TC-treated (“Eppendorf”) по 0.5×10^6 клеток на лунку. После размораживания жизнеспособность PBMC составляла 90–95% при оценке по включению в них пропидия йодида (PI). Стимуляцию проводили пептидами SARS-CoV-2 PepTivator Peptide Pools (“Miltenyi Biotec”, Германия). В качестве отрицательного контроля использовали нестимулированные клетки, для положительного контроля клетки активировали форбол-12-миристан-13-ацетатом (PMA) в концентрации 25 нг/мл (“Sigma”). Для подавления секреции цитокинов через 2 ч после стимуляции к клеткам добавляли брэфелдин А (“BioLegend”, США) и культивировали их в течение ночи при 37°C и 5% CO_2 . После отмывки клетки окрашивали антителами к поверхностным маркерам: anti-CD3-AF700 (56-0037-42, “Thermo Fisher Scientific”, США), anti-CD8-APC (17-0088-42, “Thermo Fisher Scientific”), anti-CD4-PE/Cy5.5 (35-0047-42, “Thermo Fisher Scientific”). Клетки фиксировали и пермеабилizировали по протоколу BD Cytofix/Cytoperm kit (“BD Biosciences”), после чего окрашивали антителами против интерферона- γ (IFN γ) — anti-IFN γ -BV421 (562988, “BD Biosciences”). Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе BD LSRFortessa (“BD Biosciences”). Полученные результаты обрабатывали с использованием программы FlowJo v.10.8.1.

Синтетические пептиды. С использованием данных о контактах между RBD S-белка SARS-CoV-2 и клеточным рецептором вируса — ACE2 [3] выбран и синтезирован пептид, соответствующий аминокислотной последовательности 19–50 а.о. N-концевого участка ACE2 (P1, табл. 1), а также контрольный пептид, в котором ключевые позиции были мутированы (Pm, табл. 1). Эти же варианты пептидов (P1 и Pm) были синтезированы с флуоресцентной меткой 5(6)-карбоксифлуоресцеином (FAM). Кроме того, был синтезирован пептид P1’st длиной 30 а.о., модифицированный ковалентными сшивками на основе (S)-2-(4-пентенил)аланина (табл. 1).

Иммунофлуоресцентный анализ. Способность синтетических пептидов связываться с S-белком SARS-CoV-2 оценивали в иммунофлуоресцентном тесте с использованием пептидов, меченных FAM. Пептиды инкубировали в 96-луночном планшете (“Greiner Bio-One”, Австрия), который предварительно сенсibilizировали рекомбинантным полноразмерным S-белком (1 мкг/мл бикарбонатного буфера, pH 9.5). Эффектив-

Таблица 1. Аминокислотная последовательность ACE2-пептидов

Пептид	Аминокислотная последовательность	Длина, а.о.	Ссылка
P1	STIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNY	32	[4, 5]
P1'st	TIEEQAKTXLDKXFNHEAEDLFYQXSLAXWN ^a	30	[6]
P1m	STIEEQAKTFLD A FNH A A A LF A QSSLASWNY ^b	32	[4, 5]

^aX = (S)-2-(4-пентенил)аланин (сшивающий агент).

^bA – исходные аминокислоты в последовательности P1 заменены на аланин.

ность связывания оценивали по интенсивности флуоресценции на микропланшетном ридере CLARIOstar® Plus (“BMG Labtech”, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение иммунного ответа на вакцины против COVID-19

Начиная с 2020 г., во всем мире развернулась настоящая гонка по скорейшей разработке профилактических вакцин от COVID-19 [7].

Отметим, что уже более 225 лет прошло со времен работ Э. Дженнера, а классический подход к профилактической вакцинации по-прежнему заключается в использовании ослабленного (аттенуированного) патогена, который, инфицируя клетки и ткани организма, размножается в них, не вызывая при этом серьезного заболевания. В связи с патогенезом COVID-19, высокой контагиозностью и смертностью разработка вакцинных препаратов на основе этиологического агента: уханьского варианта SARS-CoV-2 или его эволюционных вариантов — пока невозможна. Как альтернатива, вирус может быть инактивирован химическим или физическим воздействием. В этом случае он не способен реплицироваться, но при условии сохранения структуры вириона может оставаться высокоиммуногенным и вызывать хороший иммунный ответ. На этой платформе разработаны полновирсионные инактивированные вакцины BBIBP-CoV компании “Sinopharm” (Китай) и CoronaVac компании “Sinovac Biotech” (Китай), а также отечественная вакцина КовиВак (CoviVac) Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова Российской академии наук (ФГБНУ “ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова” РАН) [8–10].

Кроме того, широкое применение получили высокотехнологичные вакцины на основе рекомбинантных аденовирусов: Sputnik V (Гам-Ковид-Вак) Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи (ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России, Россия), AZD1222 от Oxford/“AstraZeneca” (Великобритания), Ad26.COVS2 компании “Johnson & Johnson” (США) [11–13] и Ad5-nCoV

(Convivicea) компании “CanSino Biologics Inc.” (Китай) [14] — и так называемые мРНК-вакцины BNT162b2 компаний “Pfizer”/“BioNTech” (США/Германия) и mRNA-1273 компании “Moderna” (США) [15]. Все они, как векторные, так и мРНК-вакцины, экспрессируют только S-белок в той или иной модификации.

К середине 2022 года 5.3 млрд человек в мире (более 65%) получило хотя бы одну дозу вакцины (а с учетом числа вакцинаций было сделано около 12.39 млрд прививок) [16]. Вакцинация населения России началась в начале 2021 года на фоне очень высокой нагрузки на медицинские службы в период второй волны пандемии COVID-19. Первая зарегистрированная отечественная вакцина — Sputnik V (Гам-Ковид-Вак) — была разработана учеными ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России [11, 16], второй стала пептидная вакцина ЭпиВакКорона Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора (ФБУН “ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора”) [17, 18] и третьей — полновирсионная инактивированная вакцина КовиВак (CoviVac) ФГБНУ “ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова” РАН [10]. Кампанию по вакцинации в России сопровождало общее недоверие к вакцинам, подогреваемое безответственными публикациями в средствах массовой информации. К настоящему времени в стране производится достаточное число доз вакцин (в основном Sputnik V и Sputnik-light), но появление новых вариантов вируса SARS-CoV-2, таких как Omicron, поставило новые вопросы относительно эффективности уже существующих вакцин [19]. Даже без учета этого обстоятельства на начало августа 2022 года только 57% населения Российской Федерации получили хотя бы одну дозу вакцины, что ниже среднемирового уровня [16]. Кроме того, для всех широко используемых вакцин было установлено снижение уровня защитных антител к вновь появляющимся вариантам SARS-CoV-2. В связи с этим во всем мире для уже вакцинированных рекомендована дополнительная ревакцинация, однако вопрос об оптимальной комбинации вакцин до конца не изучен [20].

В наших исследованиях мы прежде всего задались целью сравнить между собой несколько известных вакцин (3 отечественных, 2–3 зарубеж-

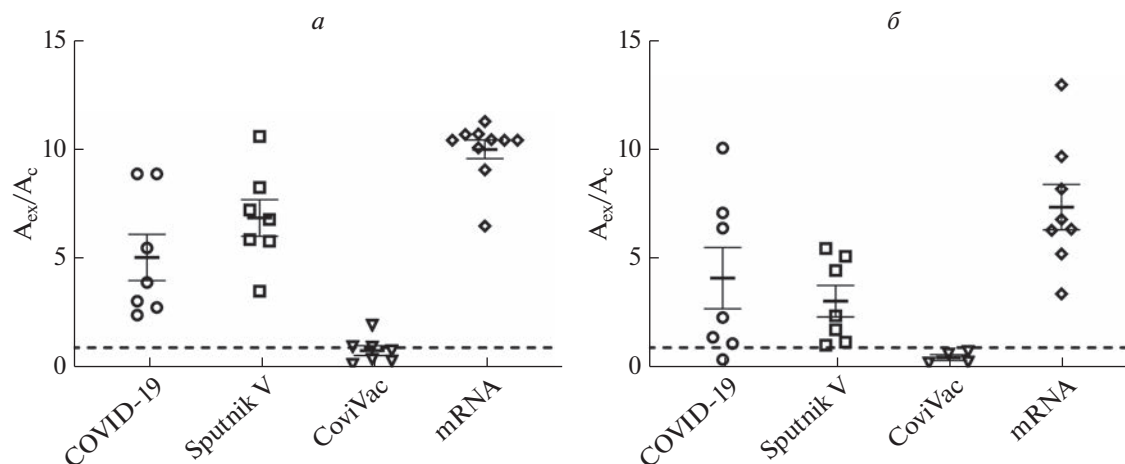


Рис. 1. Уровень антител к RBD S-белка через 1 (а) и 6 (б) месяцев после полного курса вакцинации или инфекции SARS-CoV-2. Иммуноферментный анализ проведен в тест-системе SARS-CoV-2-IgG-ИФА; оптическую плотность регистрировали при длине волны 450 нм (A_{450}). По оси Y — отношение оптической плотности образца (A_{ex}) к оптической плотности критического значения (A_c). Образцы, где отношение A_{ex}/A_c было больше 1, считались положительными. Здесь и далее: mRNA — группа участников, вакцинированных BNT162b2 (“Pfizer”/“BioNTech”) или mRNA-1273 (“Moderna”); COVID-19 — переболевшие COVID-19. У группы участников, вакцинированных ЭпиВакКорона, анти-телный ответ на S-белок вируса в данной тест-системе был ниже критического значения оптической плотности.

ных — в первую очередь инновационные мРНК-вакцины) по способности вызывать антителный ответ на несколько вирусных эпитопов с последующим определением уровня нейтрализующих антител. Для этого у выбранных групп добровольцев исследовали изменения титров антител в динамике. У некоторых участников определяли и Т-клеточный ответ на конкретные эпитопы вирусных белков. Кроме того, нам удалось сравнить гуморальный ответ после нескольких вариантов ревакцинации. Следует отметить, что в ходе исследования часть добровольцев (в том числе вакцинированных) не избежала заражения SARS-CoV-2 (о чем можно было объективно судить по паттерну антителного ответа), поэтому по ходу работы число испытуемых в экспериментальных группах снижалось.

Из рис. 1 следует, что как Sputnik V, так и особенно мРНК-вакцины вызывают сильный антителный ответ на RBD S-белка SARS-CoV-2, сравнимый с ответом у переболевших. Однако через 6 месяцев уровень ответа для всех исследованных вакцин значительно снижался, тогда как у переболевших он сохранялся на практически прежнем уровне. Антитела к RBD S-белка у вакцинированных полновирионной инактивированной вакциной CoviVac вырабатывались на очень низком уровне, хотя на основании эпидемиологических данных защитные свойства этой вакцины сомнения не вызывают [10].

Для дальнейших, более углубленных исследований применяли мультиплексную технологию Luminex, которая позволяет одновременно детектировать антитела к трем разным доменам S-бел-

ка: S1, S2 и RBD, а также к N-белку (рис. 2). Как и ожидалось, в этой системе только у переболевших и у вакцинированных полновирионной вакциной детектировали антитела к внутреннему N-белку вириона. Отметим, что появление антител к N-белку у вакцинированных Sputnik V или мРНК-вакцинами мы интерпретировали как “перенесенное заболевание COVID-19” и этих испытуемых исключали из дальнейших исследований.

Интересно, что у вакцинированных CoviVac уровни антител к субъединице S2 были сравнимы с таковыми у переболевших, в то время как у вакцинированных Sputnik V этот ответ был достоверно слабее. Роль иммунного ответа на белок S2 (напомним, что RBD не входит в состав этой субъединицы) до сих пор не выяснена. Недавно на мышинной модели показано, что иммунизация белком S2 вызывает у животных продукцию вируснейтрализующих антител [21, 22]. Эти результаты, безусловно, требуют осмысления и подтверждения.

Кроме того, с помощью псевдовиральной системы в динамике была исследована нейтрализующая активность антител к S-белку у испытуемых разных групп. К преимуществам этой системы относится возможность быстрой наработки РВП и смены их “покрытия” тем или иным целевым белком, например разными структурными компонентами S-белка SARS-CoV-2, причем от разных вариантов вируса.

Нами обнаружено, что у вакцинированных Sputnik V вируснейтрализующая активность антител против S-белка варианта Wuhan-Hu-1 SARS-

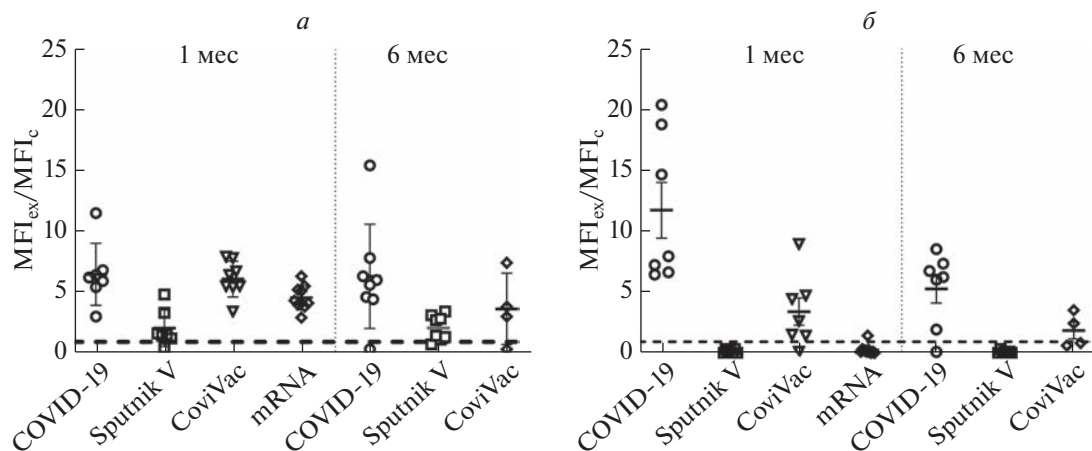


Рис. 2. Уровень антител против белков S2 (а) и N (б) SARS-CoV-2 через 1 и 6 месяцев после перенесенной инфекции или вакцинации. Анализ проведен в тест-системе MILLIPLEX® SARS-CoV-2 Antigen Panel 1 IgG. По оси Y – отношение медианы интенсивности флуоресценции (MFI) образца (MFI_{ex}) к медиане интенсивности флуоресценции критического значения (MFI_c). Образцы, где отношение MFI_{ex}/MFI_c было больше 1, считались положительными.

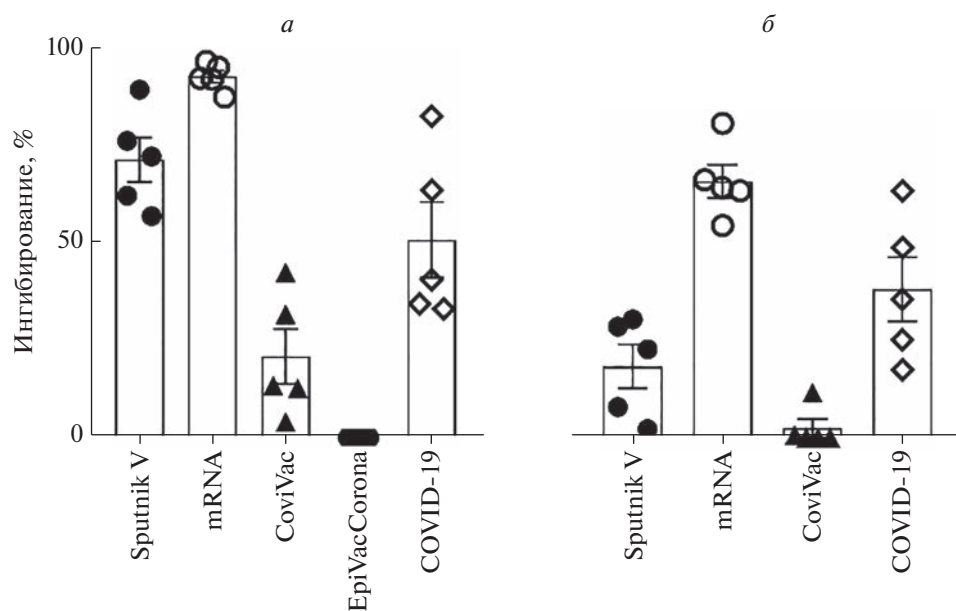


Рис. 3. Оценка вируснейтрализующей активности антител против S-белка SARS-CoV-2 (вариант Wuhan-Hu-1) у испытуемых через 1 (а) и 6 (б) месяцев после вакцинации или перенесенной инфекции COVID-19.

CoV-2 сильно снижается через полгода после вакцинации. В группе реципиентов вакцин на платформе мРНК детектировали самый высокий уровень нейтрализующих антител, который даже через полгода был выше, чем в группе переболевших. Вакцинация полновирионной инактивированной вакциной CoviVac не вызывала высокого антительного ответа против RBD, что соответствовало низкой эффективности нейтрализации в тесте с PVPs (рис. 3).

Дополнительно мы оценили нейтрализующую активность антител против S-белка SARS-CoV-2

варианта Delta (B.1.617.2.). В этом случае у вакцинированных Sputnik V уже через месяц после вакцинации титры вируснейтрализующих антител заметно снижались и оставались почти на том же уровне и через полгода. В группе реципиентов мРНК-вакцин через полгода также отмечалось резкое падение вируснейтрализующей активности (рис. 4). Стоит обратить внимание на специфичность и различия в нейтрализации варианта Delta SARS-CoV-2 у испытуемых, которые перенесли COVID-19 в разные периоды времени. Вируснейтрализующая активность сывороток тех,

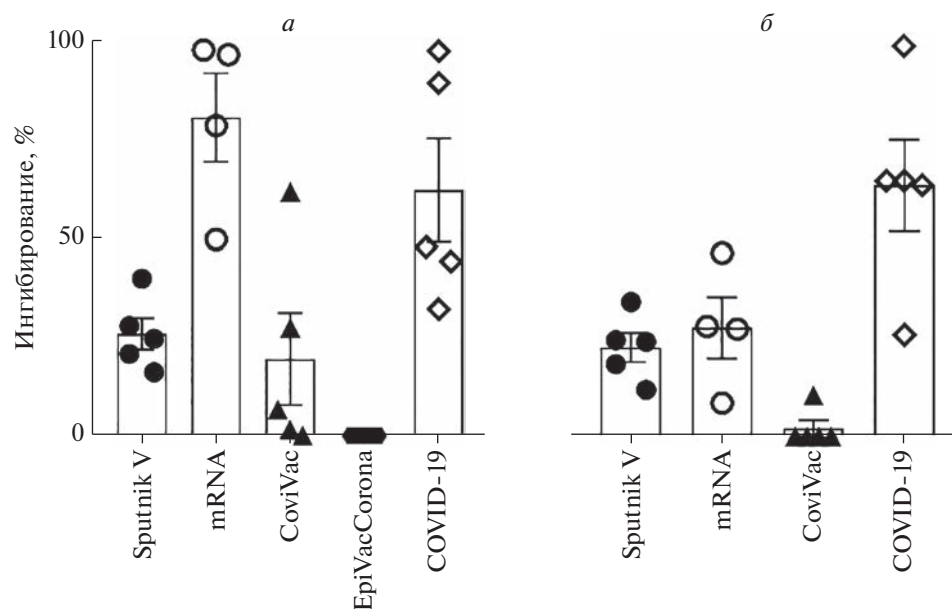


Рис. 4. Оценка вируснейтрализующей активности антител против S-белка SARS-CoV-2 (вариант B.1.617.2 – Delta) у испытуемых через 1 (а) и 6 (б) месяцев после вакцинации/перенесенной инфекции COVID-19.

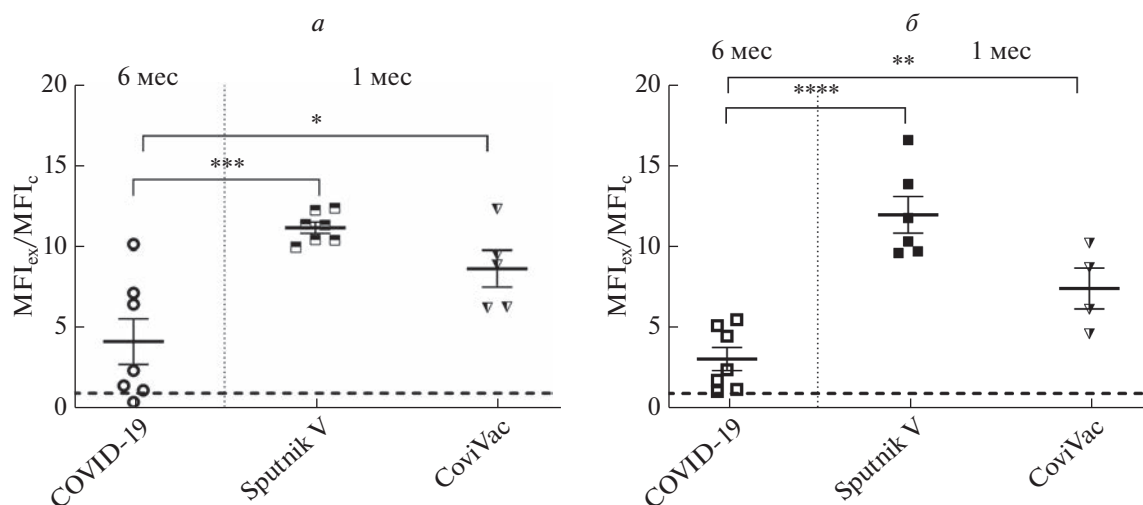


Рис. 5. Уровни антител к RBD S-белка SARS-CoV-2 после вакцинации ранее переболевших (а) и ревакцинации не болевших COVID-19 (б). Показаны уровни антител через 6 месяцев после заражения или первичной вакцинации и через 1 месяц после вакцинации переболевших или ревакцинации не болевших COVID-19.

кто перенес заболевание в весенне-летний период 2021 г., была выше по отношению к варианту Delta, чем у переболевших в 2020 году в период циркуляции варианта Wuhan-Hu-1.

Далее мы приступили к анализу эффективности различных схем ревакцинации. К середине 2021 года началась масштабная вакцинация в России, в том числе и тех, кто в прошлом перенес инфекцию SARS-CoV-2. На рис. 5а приведены данные по ревакцинации переболевших двумя отечественными вакцинами.

Эффективный иммунный ответ восстанавливался и при ревакцинации ранее вакцинированных групп (рис. 5б), при этом уровень антител через месяц после ревакцинации был существенно выше, чем до нее. Предполагается, что гетерологичная вакцинация, сочетающая вакцины разных типов, позволяет расширить репертуар эпитопов, против которых нацелены антитела, включая не-нейтрализующие. По последним данным, такие антитела, как и нейтрализующие, могут играть протективную роль [20, 21].

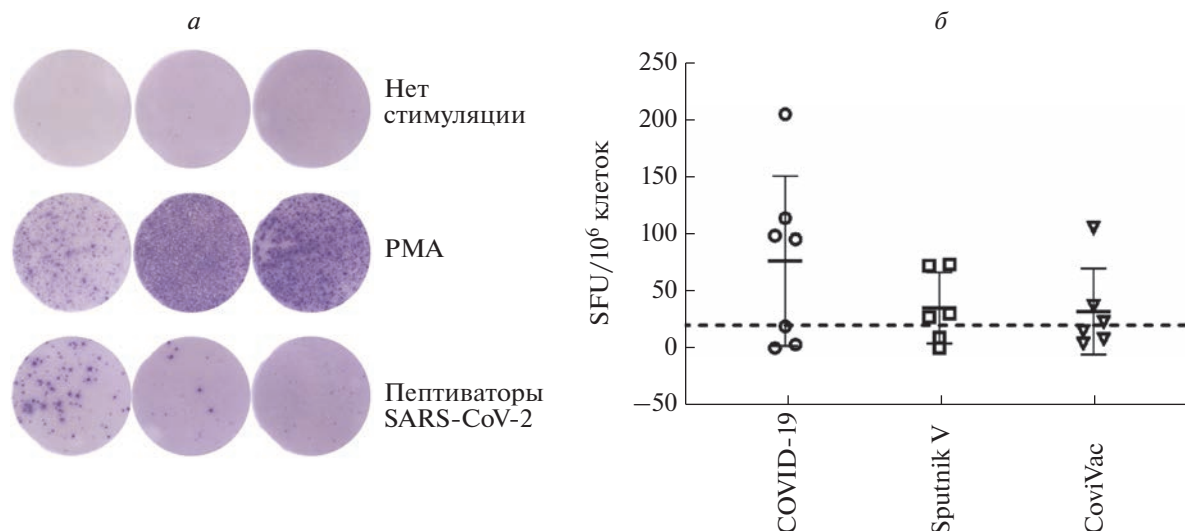


Рис. 6. Содержание IFN γ -продуцирующих Т-клеток в ответ на стимуляцию пулом пептизаторов SARS-CoV-2 (пептиды, представляющие собой участки Т-клеточных эпитопов S- и N-белков). *а* – Визуализация IFN γ -продуцирующих Т-клеток до и после стимуляции как пятнообразующих единиц (SFU); форбол-12-миристат-13-ацетат (PMA) использовали для неспецифической стимуляции Т-клеток. *б* – Число SFU на 1×10^6 клеток периферической крови, продуцирующих IFN γ , через 6 месяцев после перенесенного заболевания или вакцинации.

Наряду с антительным ответом у некоторых добровольцев из разных групп анализировали и Т-клеточный ответ с использованием проточной цитометрии и технологии ELISPOT. Нами обнаружено, что через полгода после заражения SARS-CoV-2, а также после вакцинации как векторной (Sputnik V), так и полновирионной (CoviVac) вакцинами у части добровольцев сохраняется специфический Т-клеточный иммунитет (рис. 6), хотя количество вирусспецифических Т-клеток у переболевших в среднем сохранялось на более высоком уровне.

Хотя цитометрический анализ менее чувствителен и более сложен, чем ELISPOT, его использование позволило определить, какие популяции Т-клеток активируются при инфекции и вакцинации. У всех исследованных групп детектировали в основном специфические CD8⁺-клетки; при этом у вакцинированных Sputnik V эти клетки были нацелены против Т-клеточных эпитопов S-белка SARS-CoV-2 (рис. 7*а, б*), в то время как у переболевших детектировали и CD8⁺-клетки, нацеленные против N-белка (рис. 7*б*). Важно отметить, что через месяц после ревакцинации существенно повышалась доля как CD4⁺, так и S-специфических CD8⁺ Т-клеток.

Поиск пептидов, блокирующих проникновение SARS-CoV-2 в клетку

Во многих лабораториях проводят работы по поиску ингибиторов SARS-CoV-2 на стадии проникновения в клетку. Для этой цели рассматри-

ваются молекулы на основе пептидов или небольших белков, представляющих собой домены молекулы ACE2, которые и контактируют с RBD S-белка вируса. Ранее было показано, что внеклеточная часть ACE2, экспрессированная в гетерологичной системе, может быть таким блокатором [23], однако минимальный размер такого фрагмента ACE2, достаточный для предотвращения взаимодействия с ним RBD, не был установлен. В основе нашего исследования лежала гипотеза о том, что одна или две хорошо структурированные α -спирали из N-концевого домена ACE2, включающие ключевые аминокислоты для контактов с RBD S-белка, могут быть активными блокаторами [4]. Для этого нами детально изучены свойства синтетического пептида P1, содержащего α 1-спираль, и рекомбинантного полипептида P2, содержащего α 1- и α 2-спирали. Эти пептиды хорошо связывались с S-белком *in vitro* (рис. 8*а*), но ни в PVP-системе, ни в экспериментах с живым вирусом SARS-CoV-2 они не блокировали проникновение вируса в клетку (рис. 8*в*).

В ряде других лабораторий, практически в одно и то же время, проверяли ту же гипотезу о возможности блокировки входа вируса SARS-CoV-2 в клетку с помощью пептида – аналога ключевого для взаимодействия с RBD участка ACE2, – используя различные синтетические пептиды [24–26]. Так R. Laue и соавт. [27] обнаружили, что очень короткие пептиды (всего 6–16 а. о.), содержащие часть α 1-спирали и относящиеся к самособирающимся пептидам (self-assembling peptides, SAP), ингибировали связывание S-белоксодержащих

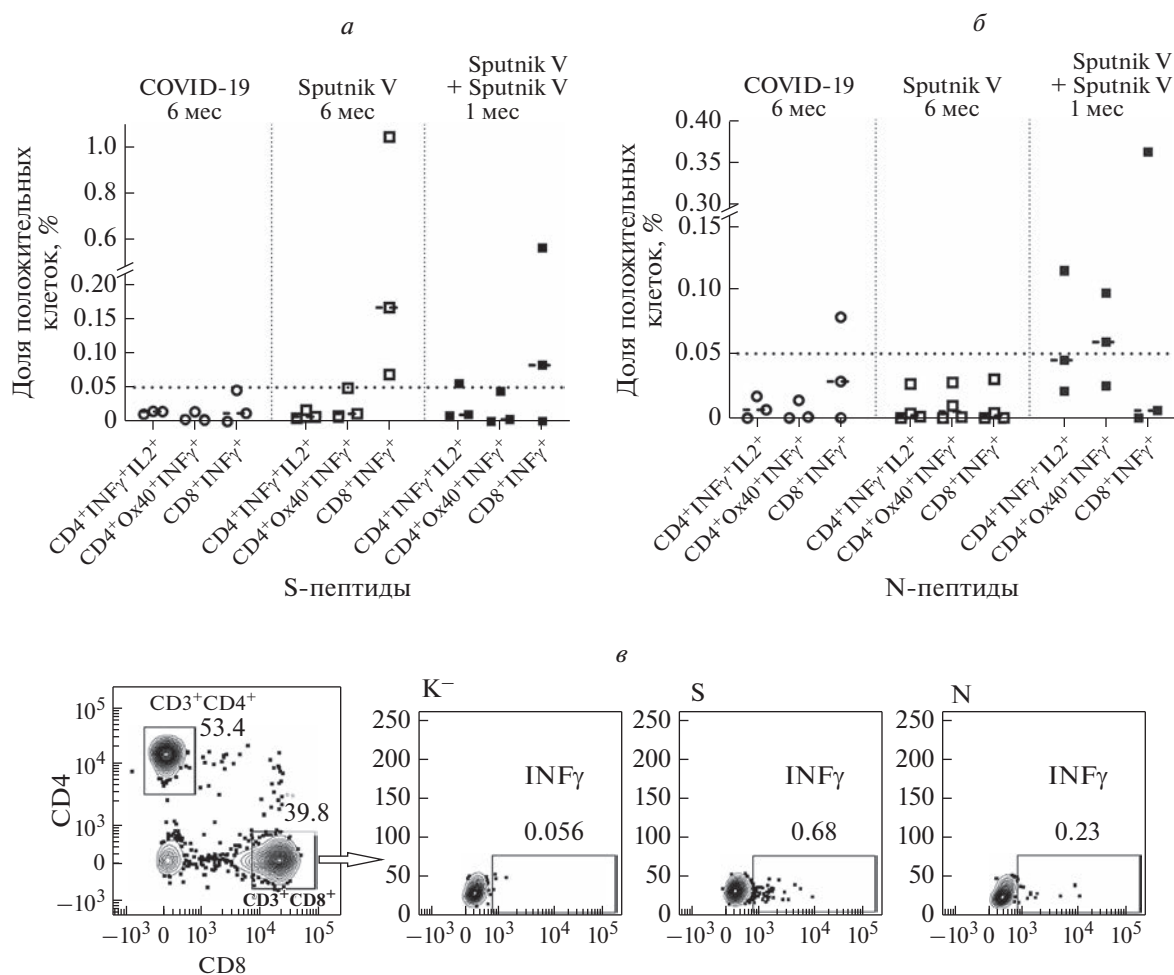


Рис. 7. Количество цитокинпродуцирующих Т-клеток у переболевших и вакцинированных в ответ на стимуляцию пулом пептидов, происходящих из белков S (*a*) или N (*б*) SARS-CoV-2 (PepTivators, Miltenyi Biotec). *в* — Популяция IFN γ -продуцирующих CD3⁺CD8⁺ клеток человека, вакцинированного Sputnik V, после стимуляции различными пулами S- или N-пептидов. K⁻ — клетки до стимуляции. Анализ выполнен на приборе BD LSRFortessa.

PVPs с ACE2, хотя по меньшей мере один из этих пептидов вообще не связывался с S-белком *in vitro*. Мы считаем, что SAP препятствуют проникновению вируса в клетку по какому-то иному механизму. Кроме того, идея использования “сшитых” пептидов как аналогов SAP для исследования взаимодействия SARS-CoV-2 с его рецептором ACE2 была реализована в работе F. Curreli и др. [6]. Нам удалось воспроизвести не только эти результаты по связыванию сшитого пептида с S-белком SARS-CoV-2, но и продемонстрировать его ингибирующую активность при внедрении в клетку как псевдовirusa (рис. 8б, в), так и SARS-CoV-2 (данные не приведены). Заметим, что классические синтетические пептиды уже получили широкое применение как в качестве лекарственных средств, так и компонентов вакцин. Что касается “сшитых” пептидов, то их синтез представляет собой трудную технологическую задачу, реализация которой на современном этапе нерентабельна [5].

Таким образом, за 2021–2022 гг. в НТУ “Сириус” удалось создать высокотехнологичную платформу для иммунологических исследований. Так, с участием сотрудников направления “Иммунология и биомедицина” и ресурсного центра “Клеточные технологии и иммунология” проведено три исследования, которые имеют отношение к иммунологическим аспектам пандемии COVID-19. Кроме того, выполнена работа, связанная с изучением метаболических особенностей различных типов миелоидных клеток. Продолжается работа по созданию собственной коллекции иммунологических реагентов, что позволит проводить исследования в условиях санкций. Наконец, в ожидании запуска вивария НТУ “Сириус” в сотрудничестве с Федеральным исследовательским центром “Институт цитологии и генетики” Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН) и Федеральным государственным бюджетным учреждением науки “Институт биоор-

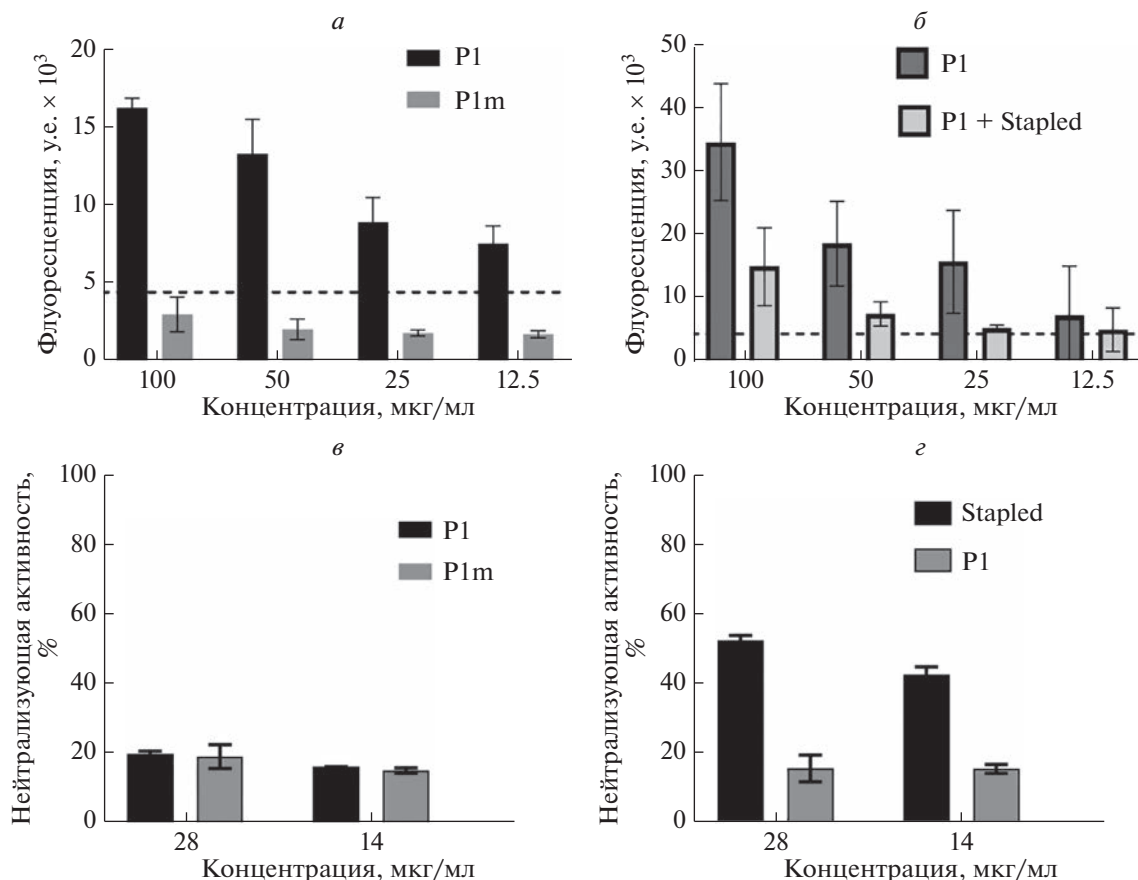


Рис. 8. Анализ взаимодействия S-белка SARS-CoV-2 с ACE2-пептидами. Показаны результаты иммунофлуоресцентного анализа связывания S-белка SARS-CoV-2 с ACE2-пептидами P1 и P1m, меченными флуорофором FAM (а), и конкурентного ингибирования связывания S-белка с P1-FAM, который предварительно инкубировали с аналогичным по первичной структуре пептидом, модифицированным химическими сшивками (Stapled) (б). Нейтрализация трансдукции псевдовиральных частиц под действием пептидов P1 и P1m (в) и под действием модифицированного пептида Stapled и его немодифицированного аналога P1 (г). (Данные по связыванию P2-пептида и данные по нейтрализации в системе с живым вирусом не приведены.)

ганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” Российской академии наук (ИБХ РАН) создаются новые мышиные модели для иммунологических исследований.

Авторы благодарят Н.А. Круглову, Г.А. Ефимова, А.А. Круглова, М.С. Друцкую, Л.И. Козловскую, А.В. Кривцова, М.А. Лагарькову, С.В. Кулемзину, Д.В. Мазурова, В.П. Терещенко, В.С. Лактешкина, А.А. Сухих, Д.М. Якшина и Р.А. Абагяна, а также коллектив медицинского центра Парка науки и Искусства (Сириус) за советы, помощь в сборе материала, отработке методов и прочее содействие.

Исследования были поддержаны НТУ “Сириус” (проект ИМБ-2103.), грантом РФФИ 20-04-60338 и Министерством науки и высшего образования (дополнительное соглашение № 075-03-2021-448/3, тема № 121122300151-5). Работы были выполнены на базе ресурсного центра “Клеточных технологий и иммунологии” НТУ “Сириус”; очистка пеп-

тида P2 была проведена на базе ресурсного центра “Биотехнологических продуктов” НТУ “Сириус”.

Исследование было разрешено Комитетом по Биоэтике АНО ВО “Университет Сириус” (протокол от 5.02.2021). Все участники исследования подписали информированное согласие на участие в исследовании до начала сбора биоматериала.

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kruglova N., Siniavin A., Gushchin V., Mazurov D. (2021) Different neutralization sensitivity of SARS-CoV-2 cell-to-cell and cell-free modes of infection to convalescent sera. *Viruses*. **13**, 1133.
2. Fliedl L., Kaisermayer C. (2011) Transient gene expression in HEK293 and Vero cells immobilised on microcarriers. *J. Biotechnol.* **153**, 15–21.
3. Joyce M.G., Wheatley A.K., Modjarrad K. (2020) Need for speed: from human SARS-CoV-2 samples to

- protective and efficacious antibodies in weeks. *Cell*. **182**, 7–9.
4. Круть В.Г., Астраханцева И.В., Чувпило С.А., Ефимов Г.А., Амбарян С.Г., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. (2022) Антитела к N-концевому домену ангиотензин-конвертирующего фермента (ACE2) блокируют его взаимодействие с S белком вируса SARS-CoV-2. *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. **502**, 5–9.
 5. Круть В.Г., Чувпило С.А., Астраханцева И.В., Козловская Л.И., Ефимов Г.А., Круглов А.А., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. (2022) Помогут ли пептиды остановить COVID-19? *Биохимия*. **87**, 707–726.
 6. Curreli F., Victor S.M.B., Ahmed S., Drelich A., Tong X., Tseng C.K., Hillyer C.D., Debnath A.K. (2020) Stapled peptides based on human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) potentially inhibit SARS-CoV-2 infection *in vitro*. *mBio*. **11**, e02451–20.
 7. Chen W.-H., Strych U., Hotez P.J., Bottazzi M.E. (2020) The SARS-CoV-2 vaccine pipeline: an overview. *Curr. Trop. Med. Rep.* **7**, 61–64.
 8. Xia S., Zhang Y., Wang Y., Wang H., Yang Y., Gao G.F., Tan W., Wu G., Xu M., Lou Z., Huang W., Xu W., Huang B., Wang H., Wang W., Zhang W., Li N., Xie Z., Ding L., You W., Zhao Y., Yang X., Liu Y., Wang Q., Huang L., Yang Y., Xu G., Luo B., Wang W., Liu P., Guo W., Yang X. (2021) Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. *Lancet Infect. Dis.* **21**, 39–51.
 9. Wu Z., Hu Y., Xu M., Chen Z., Yang W., Jiang Z., Li M., Jin H., Cui G., Chen P., Wang L., Zhao G., Ding Y., Zhao Y., Yin W. (2021) Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) in healthy adults aged 60 years and older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect. Dis.* **21**, 803–812.
 10. Kozlovskaya L.I., Piniava A.N., Ignatyev G.M., Gordeychuk I.V., Volok V.P., Rogova Y.V., Shishova A.A., Kopyak A.A., Ivin Y.Yu., Antonova L.P., Mefyod K.M., Prokosheva L.S., Sibirskina A.S., Tarasova Y.Yu., Bayurova E.O., Gancharova O.S., Illarionova V.V., Glukhov G.S., Sokolova O.S., Shaitan K.V., Moiseyevich A.M., Gulyaev S.A., Gulyaeva T.V., Moroz A.V., Gmly L.V., Ipatova E.G., Kirpichnikov M.P., Egorov A.M., Siniugina A.A., Ishmukhametov A.A. (2021) Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies. *Emerg. Microbes Infect.* **10**, 1790–1806.
 11. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyryshina A.V., Lubenet N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagametov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zyryanov S.K., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L.; Gam-COVID-Vac Vaccine Trial Group. (2021) Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*. **397**(10275), 671–681.
 12. Knoll M.D., Wonodi C. (2021) Oxford–AstraZeneca COVID-19 vaccine efficacy. *Lancet*. **397**, 72–74.
 13. Stephenson K.E., Le Gars M., Sadoff J., de Groot A.M., Heerwegh D., Truysers C., Atyeo C., Loos C., Chandrashekar A., McMahan K., Tostanoski L.H., Yu J., Gebre M.S., Jacob-Dolan C., Li Z., Patel S., Peter L., Liu J., Borducchi E.N., Nkolola J.P., Souza M., Tan C.S., Zash R., Julg B., Nathavitharana R.R., Shapiro R.L., Azim A.A., Alonso C.D., Jaegle K., Ansel J.L., Kanjilal D.G., Guiney C.J., Bradshaw C., Tyler A., Makoni T., Yanosick K.E., Seaman M.S., Lauffenburger D.A., Alter G., Struyf F., Douoguih M., Van Hoof J., Schuitemaker H., Barouch D.H. (2021) Immunogenicity of the Ad26.COV2.S vaccine for COVID-19. *JAMA*. **325**(15), 1535–15445.
 14. Zhu F.C., Li Y.H., Guan X.H., Hou L.H., Wang W.J., Li J.X., Wu S.P., Wang B.S., Wang Z., Wang L., Jia S.Y., Jiang H.D., Wang L., Jiang T., Hu Y., Gou J.B., Xu S.B., Xu J.J., Wang X.W., Wang W., Chen W. (2020) Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *Lancet*. **395**(10240), 1845–1854.
 15. Wang Z., Schmidt F., Weisblum Y., Muecksch F., Barnes C.O., Finkin S., Schaefer-Babajew D., Cipolla M., Gaebler C., Lieberman J.A., Oliveira T.Y., Yang Z., Abernathy M.E., Huey-Tubman K.E., Hurley A., Turroja M., West K.A., Gordon K., Millard K.G., Ramos V., Da Silva J., Xu J., Colbert R.A., Patel R., Dizon J., Unson-O'Brien C., Shimeliovich I., Gazumyan A., Caskey M., Bjorkman P.J., Casellas R., Hatzioannou T., Bieniasz P.D., Nussenzweig M.C. (2021) mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants. *Nature*. **592**, 616–622.
 16. Coronavirus (COVID-19) Vaccinations. <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>
 17. Ryzhikov A.B., Ryzhikov E.A., Bogryantseva M.P., Danilenko E.D., Imatdinov I.R., Nechaeva E.A., Pyankov O.V., Pyankova O.G., Susloparov I.M., Taranov O.S., Gudymo A.S., Danilchenko N.V., Sleptsova E.S., Bodnev S.A., Onkhonova G.S., Petrov V.N., Moiseeva A.A., Torzhkova P.Yu., Pyankov S.A., Tregubchak T.V., Antonets D.V., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A. (2021) Immunogenicity and protectivity of the peptide vaccine against SARS-CoV-2. *Annals RAMS*. **76**, 5–19.
 18. Ryzhikov A.B., Ryzhikov E.A., Bogryantseva M.P., Usova S.V., Danilenko E.D., Nechaeva E.A., Pyankov O.V., Pyankova O.G., Gudymo A.S., Bodnev S.A., Onkhonova G.S., Sleptsova E.S., Kuzubov V.I., Ryndyuk N.N., Ginko Z.I., Petrov V.N., Moiseeva A.A., Torzhkova P.Yu., Pyankov S.A., Tregubchak T.V., Antonec D.V., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A. (2021) A single blind, placebo-controlled randomized study of the safety, reactogenicity and immunogenicity of the “EpiVacCorona” vaccine for the prevention of COVID-19, in volunteers aged 18–60 years (phase I–II). *Russ. J. Inf. Immun.* **11**, 283–296.

19. Kudriavtsev A.V., Vakhrusheva A.V., Novoseletsky V.N., Bozdaganyan M.E., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S. (2022) Immune escape associated with RBD Omicron mutations and SARS-CoV-2 evolution dynamics. *Viruses*. **14**, 1603.
20. Rashedi R., Samieefar N., Masoumi N., Mohseni S., Rezaei N. (2022) COVID-19 vaccines mix-and-match: the concept, the efficacy and the doubts. *J. Med. Virol.* **94**, 1294–1299.
21. Ng K.W., Faulkner N., Finsterbusch K., Wu M., Harvey R., Hussain S., Greco M., Liu Y., Kjaer S., Swanton C., Gandhi S., Beale R., Gamblin S.J., Cherepanov P., McCauley J., Daniels R., Howell M., Arase H., Wack A., Bauer D.L.V., Kassiotis G. (2022) SARS-CoV-2 S2-targeted vaccination elicits broadly neutralizing antibodies. *Sci. Transl. Med.* **14**, eabn3715.
22. Claireaux M., Caniels T.G., de Gast M., Han J., Guerra D., Kerster G., van Schaik B.D.C., Jongejan A., Schriek A.I., Grobbsen M., Brouwer P.J.M., van der Straten K., Aldon Y., Capella-Pujol J., Snitselaar J.L., Olijhoek W., Aartse A., Brinkkemper M., Bontjer I., Burger J.A., Poniman M., Bijl T.P.L., Torres J.L., Copps J., Martin I.C., de Taeye S.W., de Bree G.J., Ward A.B., Sliepen K., van Kampen A.H.C., Moerland P.D., Sanders R.W., van Gils M.J. (2022) A public antibody class recognizes an S2 epitope exposed on open conformations of SARS-CoV-2 spike. *Nat. Commun.* **13**, 4539.
23. Zoufaly A., Poglitsch M., Aberle J.H., Hoepler W., Seitz T., Traugott M., Grieb A., Pawelka E., Laferl H., Wenisch C., Neuhold S., Haider D., Stiasny K., Bergthaler A., Puchhammer-Stoeckl E., Mirazimi A., Montserrat N., Zhang H., Slutsky A.S., Penninger J.M. (2020) Human recombinant soluble ACE2 in severe COVID-19. *Lancet Respir. Med.* **8**, 1154–1158.
24. Bibilashvili R.Sh., Sidorova M.V., Dudkina U.S., Palkeeva M.E., Molokoedov A.S., Kozlovskaya L.I., Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., Parfyonova Y.V. (2021) Peptide inhibitors of the interaction of the SARS-CoV-2 receptor-binding domain with the ACE2 cell receptor. *Biomed. Khim.* **67**, 244–250 (in Russ.)
25. Zhang G., Pomplun S., Loftis A.R., Tan X., Loas A., Pentelute B.L. (2020) Investigation of ACE2 N-terminal fragments binding to SARS-CoV-2 spike RBD. *bioRxiv*. 2020.03.19.999318. <https://doi.org/10.1101/2020.03.19.999318>
26. Karoyan P., Vieillard V., Gómez-Morales L., Odile E., Guihot A., Luyt C.E., Denis A., Grondin P., Lequin O. (2021) Human ACE2 peptide-mimics block SARS-CoV-2 pulmonary cells infection. *Commun. Biol.* **4**, 197.
27. Larue R.C., Xing E., Kenney A.D., Zhang Y., Tuazon J.A., Li J., Yount J.S., Li P.K., Sharma A. (2021) Rationally designed ACE2-derived peptides inhibit SARS-CoV-2. *Bioconjug. Chem.* **32**, 215–223.

About Immunological Studies in “Sirius” University

**I. V. Astrakhantseva¹, V. G. Krut'¹, S. A. Chuvpilo¹, D. V. Shevyrev¹, A. N. Shumeev¹,
S. A. Rybtsov¹, and S. A. Nedospasov^{1, 2, *}**

¹Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius, Krasnodarskiy region, 354340 Russia

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

This short report summarizes the results of recent immunological studies conducted at the new Sirius University of Science and Technology. The main area of work is dedicated to the study of the features of the post-vaccination immune response against SARS-CoV-2, as well as the search for potential agents to block that infection.

Keywords: SARS-CoV-2, vaccine, immunity, antibodies, neutralization, peptides, pseudovirus system

СИСТЕМНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ И СОЗДАНИЕ НОВЫХ МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

УДК 576.354.422.4:616.896

АНОМАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ mTOR В РАССТРОЙСТВАХ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА: ВОЗМОЖНОСТИ МЕХАНИЗМОБОСНОВАННОЙ ТЕРАПИИ

© 2023 г. Е. А. Трифонова^{а, *}, А. А. Котлярова^б, А. В. Кочетов^{а, с}

^аИнститут цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

^бИнститут клинической и экспериментальной лимфологии — филиал Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630117 Россия

^сНовосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: trifonova.k@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.07.2022 г.

После доработки 05.09.2022 г.

Принята к публикации 21.09.2022 г.

Расстройства аутистического спектра (РАС) — это патология развития, характеризующаяся ранним возникновением проблем в коммуникации, обучении и поведении. Синдромная форма РАС обусловлена моногенными мутациями. В том случае, когда не удается найти генетических или других известных механизмов для объяснения причин расстройства, используют термин “идиопатический аутизм”. Значительная часть случаев как синдромного, так и идиопатического аутизма связана с дисрегуляцией трансляции, зависящей от механизмов мишени рапамицина — mTOR. В этом обзоре мы представляем как биоинформатические, так и экспериментальные данные, которые связывают сигнальный путь mTOR с аутизмом, спровоцированным материнскими аутоантителами, и детскими аутоиммунными нейropsychиатрическими расстройствами, такими как хорей Сиденгама и детское аутоиммунное нейropsychиатрическое расстройство, ассоциированное со стрептококковой инфекцией (PANDAS). Также мы обсуждаем необходимость субтипирования РАС и возможности механизмообоснованной терапии ингибиторами сигнального пути mTOR.

Ключевые слова: расстройства аутистического спектра, mTOR, биоинформатика, механизмообоснованная терапия, материнская иммунная активация, PANDAS, хорей Сиденгама

DOI: 10.31857/S0026898423020222, EDN: EFQXLY

ВВЕДЕНИЕ

Расстройства аутистического спектра (РАС) относятся к гетерогенным расстройствам нейropsychического развития со сложными генетическими, экологическими и эпигенетическими компонентами и характеризуются ранним дебютом проблем с коммуникацией, в том числе и речевой, социализацией, стереотипным поведением и ограниченными интересами, часто сопровождаются сенсорной гиперчувствительностью. Согласно данным Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC, США), РАС поража-

ет примерно одного из 44 (2.27%) детей в США (<https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>).

Синдромная форма РАС включает вызываемые моногенными мутациями синдромы, которые значительно повышают риск развития аутизма, но каждый из них имеет дополнительные особенности, не связанные с РАС. В настоящее время принято считать, что генетическими причинами можно объяснить до 25% случаев РАС. В том случае, когда не удается найти генетических или других известных механизмов для объяснения причин расстройства, используют термин “идиопатический аутизм” [1]. С помощью модельных животных с мутациями, приводящими к разным типам синдромного аутизма, было продемонстрировано, что нарушения в структуре, функциях или формировании межнейронных связей — синапсов — часто встречаются при РАС. Оказалось, что некоторые гены предрасположенности к аутизму кодируют структурные белки синапса, такие как SHANK3 или нейролигины, другие кодируют белки-регуля-

Сокращения: GAS (group A Streptococcus) — гемолитический стрептококк группы А; PANDAS (pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections) — детское аутоиммунное нейropsychическое расстройство, ассоциированное со стрептококковой инфекцией; PANS (pediatric acute-onset neuropsychiatric syndrome) — детский нейropsychический синдром с острым началом; МИА — материнская иммунная активация; ОКР — обсессивно-компульсивное расстройство; РАС — расстройства аутистического спектра; ХС — хорей Сиденгама.

торы трансляции. С нарушениями регуляции локальной (происходящей непосредственно в синапсе) трансляции связан синдром ломкой X-хромосомы, туберозный склероз, а также ряд синдромов под названием RASопатии (включает нейрофиброматоз типа 1 и другие мутации в генах пути RAS/MAPK с очень похожими проявлениями), PTEN-синдром множественных гамартом и другие менее известные [2]. Один из генов, вызывающих такой малоизвестный синдром, — механистическая мишень рапамицина (mTOR). Это серин/треониновая протеинкиназа, центральный компонент двух мультибелковых комплексов: mTORC1 и mTORC2, — которые различаются по белковому составу и субстратам. Показано, что дерегуляция сигнального пути mTOR играет определяющую роль в патогенезе множества неврологических расстройств, таких как эпилепсия, аутизм, умственная отсталость, болезнь Альцгеймера, опухоли головного мозга [3], а проведенный нами биоинформатический анализ генов предрасположенности к аутизму, представленных в базе данных SFARI Gene (<https://gene.sfari.org>), выявил, что 606 из 1 053 генов (58%) прямо или косвенно связаны с активностью mTOR [4].

Учитывая сходство нейropsychических проявлений синдромной и идиопатической форм аутизма, Н. Zoghbi и М. Bear [5] высказали предположение, что дерегуляция mTORC1 — общий патологический механизм этого расстройства. Действительно, более высокая активность киназ mTOR, ERK и p70S6 и более низкая активность GSK3 и туберина (TSC2) зарегистрированы у детей с несиндромальным аутизмом, что предполагает повышение активности пути Akt/mTOR при идиопатическом РАС [6]. Также сообщалось о снижении продукции интерферона, эпидермального и тромбоцитарного факторов роста с одновременной активацией сигнальных путей PI3K/Akt/mTOR и RAS/MAPK и mTOR-зависимой трансляции при РАС [7]. Следовательно, значительная часть как синдромных, так и идиопатических случаев аутизма может быть отнесена к расстройствам, вызванным гиперактивацией mTOR-зависимой трансляции.

Одна из особенностей аутизма, как и большинства нейropsychических расстройств, заключается в их исключительно поведенческой диагностике, которая не предоставляет практической возможности определения патогенетических подтипов расстройства, а генетический скрининг разбивает спектр аутизма на очень мелкие категории (обычно менее 1%, максимум до 7% — в случае синдрома ломкой X-хромосомы). В этом обзоре мы проанализируем как генетические, так и напрямую не связанные с генетикой причины аутизмподобного поведения, выявленные в исследованиях последних лет, а также разберем варианты механизмов обостренной терапии РАС.

МАТЕРИНСКАЯ ИММУННАЯ АКТИВАЦИЯ (МИА)

Принимая во внимание известный тератогенный эффект инфицирования матери в процессе беременности вирусом краснухи, цитомегаловирусом и *Toxoplasma gondii*, Н.-Y. Jiang и соавт. [8] проанализировали исследования, подтверждавшие связь пренатальных инфекций с последующей диагностикой РАС у детей. Судя по результатам этого мета-анализа, случившиеся во время беременности инфекции в среднем на 12% повышали риск развития аутизма у ребенка, особенно в случае тяжелого течения заболевания, приведшего к госпитализации. Также на уровень риска развития РАС у ребенка влияли: а) тип инфекционного агента; б) триместр беременности, в котором инфекция имела место; в) сайт локализации инфекции. Хотя авторы обнаружили лишь небольшую в процентном отношении связь между МИА и РАС, популяционное влияние этой ассоциации должно быть существенным, потому что инфекции в процессе беременности достаточно частое явление [8]. Более того, показано, что для РАС, сопровождающихся сниженным интеллектом, корреляция с МИА выше, чем для РАС с сохраненным интеллектом, что позволяет предположить особенно сильное воздействие материнской инфекции в более тяжелых вариантах расстройства [9].

Гипотеза о том, что МИА нарушает регуляцию транскриптома мозга плода, приводя к тем же изменениям, которые наблюдаются у детей и взрослых с РАС, была проверена на нескольких линиях модельных животных. М. Lombardo и соавт. [10] показали, что идентичный набор генов deregulирован в транскриптомах мозга плода при МИА и в кортексе детей и взрослых с РАС. Оказалось, что МИА понижает экспрессию ассоциированных с РАС генов, причем в наибольшей степени в генах с редкими высокопенетрантными мутациями. При МИА также понижена экспрессия многих генов, которые постоянно экспрессируются на низком уровне в коре головного мозга пациентов с РАС и важны в развитии синапсов в позднепренатальном периоде [11].

Транскрипционные и трансляционные программы, связанные с высокопенетрантными генами *FMRI* и *CHD8*, ассоциированными с РАС, сильно изменяются под воздействием МИА. МИА значительно повышает экспрессию многих генов, участвующих в инициации трансляции, клеточном цикле, репарации повреждений ДНК и процессах протеолиза, которые влияют на несколько важных этапов развития центральной нервной системы (ЦНС). Один из ключевых генов инициации трансляции — *EIF4E* — относится к наиболее сильно МИА-дерегулированным из всех РАС-ассоциированных генов, причем ана-

лиз генных сетей выявил значительную МИА-индуцированную транскрипционную дерегуляцию сигнального пути mTOR/EIF4E [10].

Еще один хорошо исследованный ген предрасположенности к аутизму — *TSC2* (tuberous sclerosis 2) — ключевой регулятор сигнального пути mTOR, вызывает туберозный склероз. У 40–50% детей, пораженных туберозным склерозом, развивается РАС, и одно из возможных объяснений этой частичной пенетрантности заключается во взаимодействии между мутациями гена *TSC2* и факторами риска окружающей среды. Так, показано, что МИА снижает выживаемость плода и ухудшает социальное поведение взрослых мышей на одной из самых изученных мышинных моделей синдрома аутизма — *Tsc2*^{+/-}. В экспериментах по имитации сезонных вирусных инфекций D. Ehninger и соавт. [11] использовали модельных мышей *Tsc2*^{+/-}/Poly(I:C). А проведенный авторами статистический анализ туберозного склероза в человеческой популяции выявил связь между высокой сезонной активностью гриппа в поздние сроки беременности и появлением у ребенка аутизма [11].

Наличие у матери антител, направленных против нейронов мозга плода (аутоантител), было предложено в качестве одного из возможных механизмов того, как МИА провоцирует развитие фенотипа РАС. Недавно A. Ramirez-Celis и соавт. [12] сообщили о разработке серологического анализа для выявления специфичных для РАС материнских аутоантител к 8 ранее идентифицированным белкам: CRMP1, CRMP2, GDA, NSE, LDHA, LDHB, STIP1 и YBOX, — которые высоко экспрессируются в развивающемся мозге [12]. Эта иммуноферментная тест-система, включающая антигены каждого из вышеуказанных белков, позволяет определять паттерны аутоантител, имеющие значимую связь с РАС. Выделено три основных паттерна: CRMP1 + GDA (РАС (%) = 4.2 против контроль (%) = 0, OR = 31.04, $p \leq 0.0001$), CRMP1 + CRMP2 (РАС (%) = 3.6 против контроль (%) = 0, OR = 26.08, $p = 0.0005$) и NSE + STIP1 (РАС (%) = 3.1 против контроль (%) = 0, OR = 22.82, $p = 0.0001$). Также обнаружено, что реактивность материнских аутоантител к CRMP1 значительно увеличивает вероятность того, что у ребенка будет более глубокий аутизм. Авторы утверждают, что выявили МИА-специфичные паттерны РАС у 18% участников этого исследования [12].

Мы проанализировали взаимодействия между сигнальным путем mTOR и генами, кодирующими специфические для РАС белки-мишени материнских аутоантител. Обнаружено, что шесть (*CRMP1*, *CRMP2*, *LDHA*, *LDHB*, *STIP1* и *YBOX*) из восьми МИА-ассоциированных генов тесно переплетены с путем mTOR и три (*LDHA*, *LDHB* и *STIP1*) из восьми непосредственно модулируются

mTOR. Более того, по меньшей мере один mTOR-связанный ген представлен в каждом из трех основных паттернов аутоантител (CRMP1 + GDA, CRMP1 + CRMP2 и NSE + STIP1) [12], а именно *CRMP1*, *CRMP2* и *STIP1* [13].

Таким образом, влияние материнских аутоантител, по-видимому, следует рассматривать как определяющий фактор развития некоторой части аутистического спектра [14].

ПОСТИНФЕКЦИОННЫЕ АУТОИММУННЫЕ РАССТРОЙСТВА, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПОВЕДЕНИЕ (ХОРЕЯ СИДЕНГАМА, PANS/PANDAS)

Инфекции и индуцируемый ими иммунный ответ в последнее время получают все большее признание в качестве механизмов патогенеза психоневрологических расстройств. Хорея Сиденгама (ХС), известное постстрептококковое аутоиммунное заболевание, служит традиционной моделью для изучения патогенеза подобных расстройств. Считается, что при ХС дерегулированный иммунный ответ на стрептококковую инфекцию приводит к воспалению нейронных сетей, особенно ядер базальных ганглиев. Дисфункция в ядрах базальных ганглиев приводит к совокупности неконтролируемых движений и психиатрических симптомов, которые, как показали исследования, поддаются иммуномодулирующей терапии. PANDAS (детское аутоиммунное нейропсихическое расстройство, ассоциированное со стрептококковой инфекцией) считается вариантом ХС; предполагается, что они имеют общий патогенез, несмотря на уникальный профиль преимущественно психиатрических симптомов PANDAS [15]. Стрептококки не уникальны в своей способности вызывать аутоиммунные психоневрологические осложнения, среди альтернативных индукторов — вирусы гриппа и вирус варицелла-зостер (ветряная оспа), микоплазмы. Обобщенно весь спектр подобных синдромов называют PANS (детский нейропсихический синдром с острым началом) [15].

Исторически РАС во всем мире диагностируют исключительно путем наблюдения за поведением. Золотым стандартом диагностики аутизма считается шкала ADOS (Autism Diagnostic Observation Schedule — план диагностического обследования при аутизме), представляющий собой структурированный и удобный в использовании инструмент оценки социального взаимодействия, коммуникации и особенностей поведения. Таким образом, в настоящее время речь может идти только о диагностике аутизмподобного поведения. Часто после диагностики по ADOS проводят генетические тесты, но практически никогда не проверяют на наличие антинейрональных аутоантител. “PANS/PANDAS иногда ошибочно



Рис. 1. Сравнительная диаграмма симптоматики расстройств аутистического спектра (РАС) и детского аутоиммунно-психоневрологического расстройства, ассоциированного со стрептококковой инфекцией (PANDAS).

диагностируют как обсессивно-компульсивное расстройство (ОКР), синдром Туретта, РАС, синдром дефицита внимания и гиперактивности, анорексию и другие психические расстройства. Наличие навязчивых ритуалов и интересов, стереотипия и нарушение зрительного контакта могут быть ошибочно отнесены к РАС у маленьких детей», — отмечает доктор Касоли Рирдон [16]. И действительно, РАС и PANS/PANDAS на практике специалисты дискриминируют только по выраженности и скорости регресса (рис. 1), но в три года, а именно с этого возраста диагностируют PANDAS, регресс более заметен, так как ребенок обладает большим объемом знаний и навыков. Регресс в течение первого года жизни ребенка трудно заметить даже родителям, а от специалистов он совершенно ускользает.

Диагностические критерии PANS/PANDAS определяют как резкое начало ОКР или анорексии при наличии по крайней мере двух из следующих семи категорий: (1) беспокойство; (2) эмоциональная лабильность и/или депрессия; (3) раздражительность, агрессия и/или резко оппозиционное поведение; (4) поведенческий регресс; (5) ухудшение успеваемости в школе (связанное с симптомами, подобными синдрому дефицита внимания и гиперактивности, дефицитом памяти, когнитивными изменениями); (6) сенсорные или моторные нарушения (тики); (7) соматические признаки и симптомы, включая нарушения сна, энурез или повышенную частоту мочеиспускания [17].

Объективная, не связанная с поведением, диагностика ХС и PANS/PANDAS осложняется тем, что коммерчески доступные анализы на стрептококковую инфекцию: антитела к антигену (стрептолизину) (АСЛ-О) и/или антитела против ДНКазы В β -гемолитического стрептококка группы А (GAS) — вполне подходят для измерения активности GAS, но совершенно не связаны с аутоиммунной реактивностью GAS и ЦНС [18]. В процессе исследования нейropsychических аутоиммунных осложнений GAS-инфекций было выявлено несколько общих для ХС и PANDAS мишеней, которые использовали для разработки панели Каннингем [19, 20]. Эта диагностическая платформа включает пять анализов сыворотки крови человека. В четырех из них, используя иммуноферментную тест-систему, измеряют уровень антител IgG, направленных, изморя дофамина рецептора D1 (D1R), дофамина рецептора D2 (D2R), ганглиозид GM1 и тубулина. В пятом анализе оценивают способность IgG сыворотки стимулировать активность кальций/кальмодулинзависимой протеинкиназы II (CaMKII) в нейрональных клетках человека [18].

В исследовании, проведенном С. Shimasaki и соавт. [18] с использованием панели Каннингем, выявлена прямая связь между нейropsychическими симптомами и изменениями уровней антинейрональных антител и активацией CaMKII. На основании полученных результатов авторы высказали предположение, что мониторинг уровней аутоантител против этих четырех нейрональных

антигенных мишеней и активность СаМКII имеют клиническую значимость в диагностике и лечении аутоиммунных нейропсихических расстройств [18].

В то же время повышенная активность СаМКII напрямую связана с активацией пути mTOR. Известно, что избыток циркулирующих аминокислот играет определяющую роль в таких патологиях человека, как ожирение и диабет II типа, причем эта связь частично опосредована активацией mTORC1 под действием аминокислот [21]. Показано, что аминокислоты, особенно разветвленные, повышают внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} [21], которые затем активируют СаМКII. Протеинкиназа СаМКII фосфорилирует Akt [22] и тем самым активирует сигнальный путь Akt/mTOR [23]. Таким образом, клиническую значимость повышенного уровня СаМКII можно считать дополнительным подтверждением клинической значимости повышенной активности mTOR при аутоиммунных нейропсихических расстройствах.

Стрептококк группы A, GAS, относится к наиболее распространенным патогенам и индукторам ХС и PANDAS. GAS использует интернализацию в клетки в качестве основной стратегии иммунного уклонения. mTOR-зависимая аутофагия — важный компонент иммунной защиты от внутриклеточных бактерий, поэтому размножение GAS напрямую связано с активностью сигнального пути mTOR [24, 25]. Более того, во время взаимодействия с хозяином GAS регулирует множество путей аутофагии, включая mTOR, используя различные специфические регуляторы, такие как стрептолизин О и NAD-гликогидролазу (Nga), для выживания в клетках-хозяевах [26].

ИНГИБИТОРЫ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ mTOR И ИНДУКТОРЫ АУТОФАГИИ: ВОЗМОЖНОСТИ МЕХАНИЗМОБОСНОВАННОЙ ТЕРАПИИ РАС, ХС И PANS/PANDAS

На сегодняшний день нет патогенетической терапии РАС из-за отсутствия точного механизма развития заболевания. Нейровоспаление и иммунные нарушения часто становятся мишенями при разработке лекарственных средств для патогенетической терапии РАС [27].

Хотя РАС не относят к классическим иммуноопосредованным заболеваниям, интерес к исследованию роли иммунной системы и хронического воспаления в патогенезе РАС постоянно растет. Микроглия, будучи резидентными макрофагами ЦНС, первой реагирует на различные ее повреждения и отвечает за поддержание гомеостаза [28]. Действительно, микроглия выполняет в ЦНС множество функций: 1) участвует в обра-

зовании и развитии новых нейронов за счет высвобождения нейротрофического фактора BDNF [29]; 2) запускает процесс нейровоспаления путем высвобождения провоспалительных цитокинов TNF- α , интерлейкина-1 (IL-1), IL-6, IL-12, интерферона- γ [30]; 3) участвует в фагоцитозе дебриса и апоптотических клеток [31]. Нейровоспаление и избыточная активация микроглии обнаружены в аутопсийных препаратах мозга молодых и пожилых людей с аутизмом [32]. В настоящее время все больше внимания уделяют “невоспалительной” роли микроглии — синаптическому прунингу [31]. Синаптический прунинг — это нормальный процесс снижения числа синапсов, происходящий на протяжении всей жизни. Но при патологических состояниях этот процесс может нарушаться [33, 34]. Так, в исследованиях постмортальных образцов обнаружено, что у детей и взрослых с РАС синаптическая плотность пирамидных нейронов в височной доле повышена (см. обзор [35]).

Нейровоспаление, иммунная и митохондриальная дисфункция и дерегулированный сигнальный путь mTOR часто становятся мишенями для механизмовоснованной терапии РАС [27]. Однако на самом деле мутации генов и/или нарушение регуляции mTOR могут быть ответственны как за нарушения иммунитета, так и за митохондриальную дисфункцию. В некоторых исследованиях подтверждено [36, 37], что активация сигнального пути mTOR служит положительным регулятором дифференцировки CD4^+ эффекторных Т-клеток и отрицательным регулятором дифференцировки регуляторных Т-клеток (T_{reg}), а гиперактивация mTOR ассоциирована с патогенезом ряда аутоиммунных заболеваний. В то же время митохондриальную дисфункцию все чаще рассматривают как одну из причин нарушений развития нервной системы у детей, в том числе и при РАС [38]. В ходе исследований на модельных животных с туберозным склерозом, одним из вариантов синдромного аутизма, показано, что регуляция жизненного цикла митохондрий посредством аутофагии, или митофагии, критически нарушена как в аксоне, так и во всем организме. Обработка *Tsc2*-дефицитных нейронов и модельных животных ингибитором mTOR рапамицином восстанавливала митохондриальный фенотип, включая массу, транспорт и митофагию [39]. Снижение активности сигнального пути mTOR стало основным фармакологическим способом активации аутофагии [40]. Возможно, эта стратегия может также стать наиболее удачной механизмовоснованной терапией той части аутистического спектра, которая связана с гиперактивацией mTOR.

Основным инструментом в изучении активности сигнального пути mTOR изначально был его фармакологический ингибитор рапамицин, ина-

че называемый сиролимус (Rapamycin/Sirolimus). Еще в 2008 году было впервые показано, что взрослые мыши *Tsc2^{+/-}*, одна из самых распространенных моделей синдромного аутизма, после короткого курса рапамицина практически преодолевали как поведенческий дефицит, так и проблемы с обучением на фоне нормализации синаптической пластичности [41]. К сожалению, двойные слепые плацебо-контролируемые исследования оказались не такими обнадеживающими: рапалог (аналог рапамицина) эверолимус только слабо снижал судорожную активность и немного улучшал коморбидные симптомы РАС в первом исследовании [42] и не давал статистически значимого положительного эффекта во втором [43]. Вместе с тем встречаются отдельные публикации о значительном улучшении поведения и обучаемости детей как с идиопатическим [44], так и с синдромным, связанным с мутациями *TSC*, аутизмом [45] после терапии рапамицином или рапалогами.

Проанализируем с точки зрения связи с активностью mTOR актуальный протокол, используемый для лечения ХС и PANDAS [46] (рис. 2). Авторы протокола, S. Dean и H. Singer, не считают его механизмобоснованным, так как все симптоматическое лечение ХС основано на off-label использовании лекарств. Первым и обязательным пунктом в нем стоят антибиотики пенициллинового ряда, наиболее эффективные против GAS. Следующим по порядку пунктом протокола следуют применяемые off-label противоэпилептические препараты карбамазепин и вальпроат. Авторы отмечают, что препараты практически не вызывают побочных эффектов у пациентов с ХС, эффект достигается в первую же неделю применения и продолжительность курса составляет около 12 недель до полного исчезновения симптомов при средней тяжести заболевания. Однако вальпроат и карбамазепин известны как индукторы аутофагии [40] и, по крайней мере для вальпроата, показана реализация этой активности через ингибирование сигнального пути Akt/mTOR [47].

При более тяжелых вариантах ХС, например паралитическом, или в случае хронических и повторяющихся эпизодов, что скорее характерно для PANDAS, препаратами выбора чаще всего становятся глюкокортикоиды. Несмотря на множество описанных побочных эффектов для этого класса препаратов, в случае ХС и PANDAS большинства из них можно избежать за счет достаточно коротких курсов приема. Для этого типа препаратов также показано ингибирование сигнального пути mTOR [48, 49].

Авторы протокола с осторожностью предлагают использовать нейролептики (галоперидол, рисперидон и оланзапин) для симптоматической терапии ХС из-за противоречивых литературных

и клинических данных [46]. Возможно, это связано с тяжелыми моторными и каталептическими побочными эффектами галоперидола (в случае атипичных нейролептиков эти побочные эффекты проявляются в меньшей степени), которые, как показано, в некоторой степени объясняются активацией mTOR [50], что может приводить к непредсказуемым результатам терапии нейролептиками у пациентов с аномально активным mTOR.

Внутривенные иммуноглобулины и плазмаферез в анализируемом протоколе представлены последним пунктом, что объясняется как высокой стоимостью процедур, так и возможными побочными эффектами. В случае с иммуноглобулином индукция аутофагии и связанное с этим ингибирование mTOR, видимо, также вносят вклад в позитивный терапевтический эффект процедуры [51].

Еще одним интересным примером работающей для большого процента детей с аутизмом методики можно считать популярный в интернете протокол Немечека (<https://www.nemechekconsultativemedicine.com/nemechek-protocol>). Основные средства, используемые в этом протоколе, следующие: омега-3-полиненасыщенные жирные кислоты (из рыбьего жира), высокофенольное оливковое масло первого отжима, пребиотик инулин и антибиотик широкого спектра действия рифаксимин для детей старшего возраста. Соглашаясь со всеми оговорками об отсутствии плацебо-контролируемых исследований и рецензируемых публикаций данного протокола, но принимая также во внимание его безопасность и эффективность, замеченную “независимыми наблюдателями” — родителями, можно предположить, что действенность протокола Немечека связана с ингибированием mTOR. Так, при изучении влияния высокофенольного оливкового масла первого отжима на старение выявлена его способность нормализовать гиперактивированный mTOR [52]. В исследованиях влияния омега-3-жирных кислот на предотвращение и замедление онкогенеза показано, что и они служат ингибиторами mTOR и индукторами аутофагии и апоптоза [53, 54]. Как можно заметить, отличительная черта “работающих” протоколов (как протокола против ХС, так и протокола Немечека) — использование, помимо mTOR-ингибиторов, антимикробных и/или микробиомориентированных препаратов. Антимикробных препаратов определенно не требовалось модельным животным, выращенным в стерильных условиях. Возможно, более персонифицированное введение антимикробных лекарственных средств и/или про- и пребиотиков совместно с рапалогами сделало бы терапию этими препаратами более эффективной.

Ацетилцистеин (АЦЦ) в последнее время все чаще рекомендуют не только в качестве муколи-

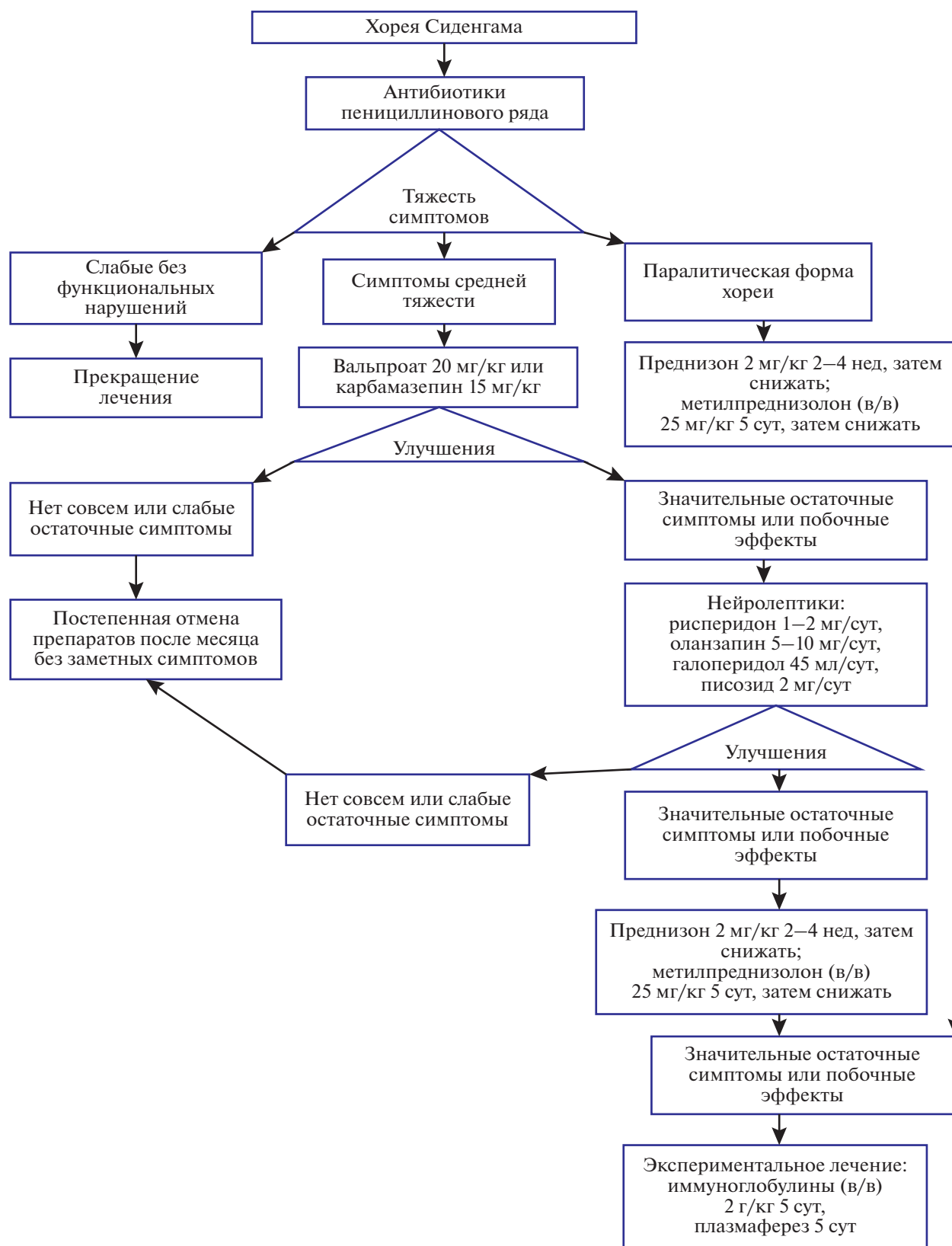


Рис. 2. Актуальный протокол лечения хореи Сиденгама и PANDAS, согласно S. Dean и H. Singer ([46], лицензия Creative Commons Attribution–Noncommercial–No Derivatives License). На схеме приведены суточные дозы лекарственных средств.

тического средства при кашле, но и как модулятор поведения. Продемонстрирована эффективность АЦЦ для снижения симптомов ОКР, часто сопровождающего РАС [55], а двойное слепое плацебо-контролируемое исследование подтвердило снижение раздражительности у детей с РАС при применении АЦЦ совместно с рisperидоном [56]. Также в двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании продемонстрирована эффективность курса АЦЦ при системной красной волчанке — заболевании, имеющем доказанную аутоиммунную этиологию; причем авторы обосновали механизм действия АЦЦ через ингибирование сигнального пути mTOR [57].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исторически психические заболевания в целом и расстройства аутистического спектра в частности диагностировали и классифицировали на основе поведенческих критериев. Биоинформатические и молекулярно-биологические исследования последних лет обосновали необходимость выделения подтипов РАС и других психических расстройств на основе патогенетических механизмов. Один из наиболее важных путей, вовлеченных в патогенез как психоневрологических, так и аутоиммунных заболеваний, — сигнальный путь mTOR. Дальнейшие попытки модулировать этот многостадийный разветвленный сигналинг на разных этапах с помощью природных и фармакологических ингибиторов нацелены на разработку перспективных лекарственных препаратов для механизмобоснованной терапии расстройств аутистического спектра.

Работа поддержана в рамках государственного задания FWNR-2022-0032.

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. Yoo H. (2015) Genetics of autism spectrum disorder: current status and possible clinical applications. *Exp. Neurol.* **24**, 257–272. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.257>
2. Winden K.D., Ebrahimi-Fakhari D., Sahin M. (2018) Abnormal mTOR activation in autism. *Annu. Rev. Neurosci.* **41**, 1–23. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-061747>
3. Bockaert J., Marin P. (2015) mTOR in brain physiology and pathologies. *Physiol. Rev.* **95**, 1157–1187. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2014>
4. Trifonova E.A., Klimenko A.I., Mustafin Z.S., Lashin S.A., Kochetov A.V. (2019) The mTOR signaling pathway activity and vitamin D availability control the expression of most autism predisposition genes. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, E6332. <https://doi.org/10.3390/ijms20246332>
5. Zoghbi H.Y., Bear M.F. (2012) Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a009886. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009886>
6. Onore C., Yang H., Van de Water J., Ashwood P. (2017) Dynamic Akt/mTOR signaling in children with autism spectrum disorder. *Front. Pediatr.* **5**, 43. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00043>
7. Tylee D.S., Hess J.L., Quinn T.P., Barve R., Huang H., Zhang-James Y., Chang Y., Stamova B.S., Sharp F.R., Hertz-Picciotto I., Faraone S.V., Kong S.W., Glatt S.J. (2017) Blood transcriptomic comparison of individuals with and without autism spectrum disorder: a combined-samples mega-analysis. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* **174**, 181–201. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32511>
8. Jiang H.-Y., Xu L.-L., Shao L., Xia R.M., Yu Z.H., Ling Z.X., Yang F., Deng M., Ruan B. (2016) Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Brain Behav. Immun.* **58**, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.005>
9. Lee B.K., Magnusson C., Gardner R.M., Blomström Å., Newschaffer C.J., Burstyn I., Karlsson H., Dalman C. (2015) Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders. *Brain Behav. Immun.* **44**, 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.09.001>
10. Lombardo M.V., Moon H.M., Su J., Palmer T.D., Courchesne E., Pramparo T. (2018) Maternal immune activation dysregulation of the fetal brain transcriptome and relevance to the pathophysiology of autism spectrum disorder. *Mol. Psychiatry.* **23**, 1001–1013. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.15>
11. Ehninger D., Sano Y., de Vries P.J., Dies K., Franz D., Geschwind D.H., Kaur M., Lee Y.S., Li W., Lowe J.K., Nakagawa J.A., Sahin M., Smith K., Whittemore V., Silva A.J. (2012) Gestational immune activation and Tsc2 haploinsufficiency cooperate to disrupt fetal survival and may perturb social behavior in adult mice. *Mol. Psychiatry.* **17**, 62–70. <https://doi.org/10.1038/mp.2010.115>
12. Ramirez-Celis A., Becker M., Nuño M., Schauer J., Aghaeepour N., Van de Water J. (2021) Risk assessment analysis for maternal autoantibody-related autism (MAR-ASD): a subtype of autism. *Mol. Psychiatry.* **26**, 1551–1560. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00998-8>
13. Trifonova E.A., Mustafin Z.S., Lashin S.A., Kochetov A.V. (2022) Abnormal mTOR activity in pediatric autoimmune neuropsychiatric and MIA-associated autism spectrum disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 967. <https://doi.org/10.3390/ijms23020967>
14. Meltzer A., Van de Water J. (2017) The role of the immune system in autism spectrum disorder. *Neuropsychopharmacology.* **42**, 284–298. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.158>
15. Williams K.A., Swedo S.E. (2015) Post-infectious autoimmune disorders: Sydenham's chorea, PANDAS

- and beyond. *Brain Res.* **1617**, 144–154.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.071>
16. True G. (2019) November Clinical Conversation: understanding PANS and PANDAS. In: *Aspire*.
<https://aspire.care/news/november-clinical-conversation-understanding-pans-and-pandas/>
 17. Swedo S.E., Leonard H.L., Mittleman B.B., Allen A.J., Rapoport J.L., Dow S.P., Kanter M.E., Chapman F., Zabriskie J. (1997) Identification of children with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections by a marker associated with rheumatic fever. *Am. J. Psychiatry.* **154**, 110–112.
<https://doi.org/10.1176/ajp.154.1.110>
 18. Shimasaki C., Frye R.E., Trifiletti R., Cooperstock M., Kaplan G., Melamed I., Greenberg R., Katz A., Fier E., Kem D., Traver D., Dempsey T., Latimer M.E., Cross A., Dunn J.P., Bentley R., Alvarez K., Reim S., Appleman J. (2020) Evaluation of the Cunningham Panel™ in pediatric autoimmune neuropsychiatric disorder associated with streptococcal infection (PANDAS) and pediatric acute-onset neuropsychiatric syndrome (PANS): changes in antineuronal antibody titers parallel changes in patient symptoms. *J. Neuroimmunol.* **339**, 577138.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.577138>
 19. Cunningham M.W. (2012) Streptococcus and rheumatic fever. *Curr. Opin. Rheumatol.* **24**, 408–416.
<https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32835461d3>
 20. Cunningham M.W. (2014) Rheumatic fever, autoimmunity, and molecular mimicry: the streptococcal connection. *Int. Rev. Immunol.* **33**, 314–329.
<https://doi.org/10.3109/08830185.2014.917411>
 21. Gulati P., Gaspers L.D., Dann S.G., Joaquin M., Nobukuni T., Natt F., Kozma S.C., Thomas A.P., Thomas G. (2008) Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca²⁺/CaM signaling to hVps34. *Cell Metab.* **7**, 456–465.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.03.002>
 22. Jing Z., Sui X., Yao J., Xie J., Jiang L., Zhou Y., Pan H., Han W. (2016) SKF-96365 activates cytoprotective autophagy to delay apoptosis in colorectal cancer cells through inhibition of the calcium/CaMKII γ /AKT-mediated pathway. *Cancer Lett.* **372**, 226–238.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.006>
 23. Fan X., Zhou J., Yan X., Bi X., Liang J., Lu S., Luo L., Zhou D., Yin Z. (2021) Citrate activates autophagic death of prostate cancer cells via downregulation CaMKII/AKT/mTOR pathway. *Life Sci.* **275**, 119355.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119355>
 24. Cheng Y.-L., Kuo C.-F., Lu S.-L., Omori H., Wu Y.N., Hsieh C.L., Noda T., Wu S.R., Anderson R., Lin C.F., Chen C.L., Wu J.J., Lin Y.S. (2019) Group A *Streptococcus* induces LAPosomes via SLO/ β 1 integrin/NOX2/ROS pathway in endothelial cells that are ineffective in bacterial killing and suppress xenophagy. *mBio.* **10**, e02148-19.
<https://doi.org/10.1128/mBio.02148-19>
 25. Wang J., Meng M., Li M., Guan X., Liu J., Gao X., Sun Q., Li J., Ma C., Wei L. (2020) Integrin α 5 β 1, as a receptor of fibronectin, binds the FbaA protein of group A *Streptococcus* to initiate autophagy during infection. *mBio.* **11**, e00771-20.
<https://doi.org/10.1128/mBio.00771-20>
 26. Toh H., Nozawa T., Minowa-Nozawa A., Hikichi M., Nakajima S., Aikawa C., Nakagawa I. (2020) Group A *Streptococcus* modulates RAB1- and PIK3C3 complex-dependent autophagy. *Autophagy.* **16**, 334–346.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1628539>
 27. Shuid A.N., Jayusman P.A., Shuid N., Ismail J., Nor N.K., Mohamed I.N. (2020) Update on atypicalities of central nervous system in autism spectrum disorder. *Brain Sci.* **10**, E309.
<https://doi.org/10.3390/brainsci10050309>
 28. Salter M.W., Stevens B. (2017) Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat. Med.* **23**, 1018–1027.
<https://doi.org/10.1038/nm.4397>
 29. Colonna M., Butovsky O. (2017) Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annu. Rev. Immunol.* **35**, 441–468.
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
 30. Block M.L., Zecca L., Hong J.-S. (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 57–69.
<https://doi.org/10.1038/nrn2038>
 31. Dong H., Zhang X., Qian Y. (2014) Mast cells and neuroinflammation. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* **20**, 200–206.
<https://doi.org/10.12659/MSMBR.893093>
 32. Pardo C.A., Vargas D.L., Zimmerman A.W. (2005) Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. *Int. Rev. Psychiatry.* **17**, 485–495.
<https://doi.org/10.1080/02646830500381930>
 33. Жмуров В.А., Кручинин Е.В., Жмуров Д.В., Лебедев И.А., Пышнов А.С., Ахметьянов М.А., Кузнецов В.В., Козлов М.В., Мокин Е.А., Алекберов Р.И., Тяпкин А.В., Сметанин Е.И., Сейпилов А.А., Тарасов М.Ю. (2020) Молекулярные механизмы развития синаптического прунинга. *Уральский медицинский журнал.* **1**(184), 58–63.
<https://doi.org/10.25694/URMJ.2020.01.11>
 34. Sakai J. (2020) How synaptic pruning shapes neural wiring during development and, possibly, in disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**, 16096–16099.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2010281117>
 35. Eltokhi A., Janmaat I.E., Genedi M., Haarman B.C.M., Sommer I.E.C. (2020) Dysregulation of synaptic pruning as a possible link between intestinal microbiota dysbiosis and neuropsychiatric disorders. *J. Neurosci. Res.* **98**, 1335–1369.
<https://doi.org/10.1002/jnr.24616>
 36. Liu Y., Zhang D., Liu X. (2015) mTOR signaling in T cell immunity and autoimmunity. *Int. Rev. Immunol.* **34**, 50–66.
<https://doi.org/10.3109/08830185.2014.933957>
 37. Delgoffe G.M., Pollizzi K.N., Waickman A.T., Heikamp E., Meyers D.J., Horton M.R., Xiao B., Worley P.F., Powell J.D. (2011) The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat. Immunol.* **12**, 295–303.
<https://doi.org/10.1038/ni.2005>
 38. Ortiz-González X.R. (2021) Mitochondrial dysfunction: a common denominator in neurodevelopmental disorders? *Dev. Neurosci.* **43**, 222–229.
<https://doi.org/10.1159/000517870>

39. Lenzi P., Ferese R., Biagioni F., Fulceri F., Busceti C.L., Falleni A., Gambardella S., Frati A., Fornai F. (2021) Rapamycin ameliorates defects in mitochondrial fission and mitophagy in glioblastoma cells. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 5379. <https://doi.org/10.3390/ijms22105379>
40. Thellung S., Corsaro A., Nizzari M., Barbieri F., Florio T. (2019) Autophagy activator drugs: a new opportunity in neuroprotection from misfolded protein toxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, E901. <https://doi.org/10.3390/ijms20040901>
41. Ehninger D., Han S., Shilyansky C., Zhou Y., Li W., Kwiatkowski D.J., Ramesh V., Silva A.J. (2008) Reversal of learning deficits in a *Tsc2*^{+/-} mouse model of tuberous sclerosis. *Nat. Med.* **14**, 843–848. <https://doi.org/10.1038/nm1788>
42. Mizuguchi M., Ikeda H., Kagitani-Shimono K., Yoshinaga H., Suzuki Y., Aoki M., Endo M., Yonemura M., Kubota M. (2019) Everolimus for epilepsy and autism spectrum disorder in tuberous sclerosis complex: EXIST-3 substudy in Japan. *Brain Dev.* **41**, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2018.07.003>
43. Overwater I.E., Rietman A.B., Mous S.E., Bindels-de Heus K., Rizopoulos D., Ten Hoopen L.W., van der Vaart T., Jansen F.E., Elgersma Y., Moll H.A., de Wit M.Y. (2019) A randomized controlled trial with everolimus for IQ and autism in tuberous sclerosis complex. *Neurology*. **93**, e200–e209. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000007749>
44. Hu L.-Y., Shi X.-Y., Yang X.-F., Liu M.J., Zou L.P. (2021) Rapamycin/Sirolimus improves the behavior of an 8-year-old boy with nonsyndromic autism spectrum disorder. *Am. J. Ther.* **28**, e608. <https://doi.org/10.1097/MJT.0000000000001131>
45. Hwang S.-K., Lee J.-H., Yang J.-E., Lim C.S., Lee J.A., Lee Y.S., Lee K., Kaang B.K. (2016) Everolimus improves neuropsychiatric symptoms in a patient with tuberous sclerosis carrying a novel TSC2 mutation. *Mol. Brain.* **9**, 56. <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0222-6>
46. Dean S.L., Singer H.S. (2017) Treatment of Sydenham's chorea: a review of the current evidence. *Tremor Other Hyperkinet. Mov. (N.Y.)*. **7**, 456. <https://doi.org/10.7916/D8W95GJ2>
47. Han W., Yu F., Cao J., Dong B., Guan W., Shi J. (2020) Valproic acid enhanced apoptosis by promoting autophagy via Akt/mTOR signaling in glioma. *Cell Transplant.* **29**, 963689720981878. <https://doi.org/10.1177/0963689720981878>
48. Weichhart T., Haidinger M., Katholnig K., Kopecky C., Poglitsch M., Lassnig C., Rosner M., Zlabinger G.J., Hengstschläger M., Müller M., Hörl W.H., Säemann M.D. (2011) Inhibition of mTOR blocks the anti-inflammatory effects of glucocorticoids in myeloid immune cells. *Blood*. **117**, 4273–4283. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-310888>
49. Fu L., Wu W., Sun X., Zhang P. (2020) Glucocorticoids enhanced osteoclast autophagy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Calcif. Tissue Int.* **107**, 60–71. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00687-2>
50. Ramírez-Jarquín U.N., Shahani N., Pryor W., Usiello A., Subramaniam S. (2020) The mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase mediates haloperidol-induced cataleptic behavior. *Transl. Psychiatry*. **10**, 336. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-01014-x>
51. Das M., Karnam A., Stephen-Victor E., Gilardin L., Bhatt B., Kumar Sharma V., Rambabu N., Patil V., Lecerf M., Käsermann F., Bruneval P., Narayanaswamy Balaji K., Benveniste O., Kaveri S.V., Bayry J. (2020) Intravenous immunoglobulin mediates anti-inflammatory effects in peripheral blood mononuclear cells by inducing autophagy. *Cell Death Dis.* **11**, 50. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2249-y>
52. Menendez J.A., Joven J., Aragonès G., Barrajón-Catalán E., Beltrán-Debón R., Borrás-Linares I., Camps J., Corominas-Faja B., Cufí S., Fernández-Arroyo S., Garcia-Heredia A., Hernández-Aguilera A., Herranz-López M., Jiménez-Sánchez C., López-Bonet E., Lozano-Sánchez J., Luciano-Mateo F., Martín-Castillo B., Martín-Paredero V., Pérez-Sánchez A., Oliveras-Ferreros C., Riera-Borrull M., Rodríguez-Gallego E., Quirantes-Piné R., Rull A., Tomás-Menor L., Vazquez-Martin A., Alonso-Vilaverde C., Micol V., Segura-Carretero A. (2013) Xenohormetic and anti-aging activity of secoiridoid polyphenols present in extra virgin olive oil. *Cell Cycle*. **12**, 555–578. <https://doi.org/10.4161/cc.23756>
53. Chen Z., Zhang Y., Jia C., Wang Y., Lai P., Zhou X., Wang Y., Song Q., Lin J., Ren Z., Gao Q., Zhao Z., Zheng H., Wan Z., Gao T., Zhao A., Dai Y., Bai X. (2014) mTORC1/2 targeted by n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention of mammary tumorigenesis and tumor progression. *Oncogene*. **33**, 4548–4557. <https://doi.org/10.1038/ncr.2013.402>
54. Liu J., Xu M., Zhao Y., Ao C., Wu Y., Chen Z., Wang B., Bai X., Li M., Hu W. (2016) n-3 polyunsaturated fatty acids abrogate mTORC1/2 signaling and inhibit adrenocortical carcinoma growth *in vitro* and *in vivo*. *Oncol. Rep.* **35**, 3514–3522. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4720>
55. di Michele F., Siracusano A., Talamo A., Nioi C. (2018) N-acetyl cysteine and vitamin D supplementation in treatment resistant obsessive-compulsive disorder patients: a general review. *Curr. Pharm. Des.* **24**, 1832–1838. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180417124919>
56. Nikoo M., Radnia H., Farokhnia M., Mohammadi M.R., Akhondzadeh S. (2015) N-acetylcysteine as an adjunctive therapy to risperidone for treatment of irritability in autism: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of efficacy and safety. *Clin. Neuropharmacol.* **38**, 11–17. <https://doi.org/10.1097/WNF.0000000000000063>
57. Lai Z.-W., Hanczko R., Bonilla E., Caza T.N., Clair B., Bartos A., Miklossy G., Jimah J., Doherty E., Tily H., Francis L., Garcia R., Dawood M., Yu J., Ramos I., Coman I., Faraone S.V., Phillips P.E., Perl A. (2012) N-acetylcysteine reduces disease activity by blocking mammalian target of rapamycin in T cells from systemic lupus erythematosus patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* **64**, 2937–2946. <https://doi.org/10.1002/art.34502>

Abnormal mTOR Signaling Pathway Activity in Autism Spectrum Disorders: Prospects of Mechanism-Based Therapy

E. A. Trifonova^{1, *}, A. A. Kotliarova², and A. V. Kochetov^{1, 3}

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630117 Russia*

³*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: trifonova.k@rambler.ru*

Autism spectrum disorder (ASD) is a developmental disorder characterized by the early onset of communication, learning, and behavioral problems. The syndromic form of ASD is caused by monogenic mutations, in the case when it is not possible to find genetic or other known mechanisms, the term “idiopathic autism” is used. A significant part of both syndromic and idiopathic autism is associated with translational deregulation dependent on the mechanistic target of rapamycin (mTOR). In this review, we present both bioinformatic and experimental data that link the mTOR signaling pathway to maternal autoantibody-induced autism and childhood autoimmune neuropsychiatric disorders such as Sydenham’s chorea and pediatric autoimmune neuropsychiatric disorder associated with streptococcal infections (PANDAS). The need for ASD subtyping and the possibility of mechanism-based therapy with inhibitors of the mTOR signaling pathway are also discussed.

Keywords: autism spectrum disorder, mTOR, bioinformatics, autoimmune disorders, maternal immune activation, PANDAS, Sydenham’s chorea

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ: ОТ РЕПАРАЦИИ ДНК ДО МЕТАБОЛОМИКИ

УДК 577.29

ПОЛИ(ADP-РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗЫ 1 И 2: КЛАССИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С HPF1 – НОВЫМ ФАКТОРОМ ПОЛИ(ADP-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЯ ГИСТОНОВ

© 2023 г. Т. А. Кургина^a, О. И. Лаврик^{a, b, *}

^aИнститут химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

^bНовосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 09.08.2022 г.

После доработки 07.09.2022 г.

Принята к публикации 07.09.2022 г.

Поли(ADP-рибоза) (PAR) — отрицательно заряженный полимер, линейный и разветвленный, состоящий из мономеров ADP-рибозы. Синтез этого полимера катализируют ферменты поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP) при активации на повреждениях ДНК, используя в качестве субстрата никотинамидадениндинуклеотид (NAD⁺). Наиболее изучены два члена семейства PARP: PARP1 и PARP2. Эти важнейшие ядерные белки участвуют во многих клеточных процессах, в том числе в регуляции репарации ДНК. PARP1 и PARP2 катализируют как синтез, так и перенос поли(ADP-рибозы) на аминокислотные остатки белков-мишеней, в том числе проводят эффективное ауто-PARилирование. Ввиду ключевой роли в регуляции процесса репарации ДНК PARP1 и PARP2 считают перспективными мишенями для химиотерапии. Недавно открыт новый фактор PARилирования гистонов — HPF1, — который модулирует активность PARP1/2, образуя временный совместный активный центр с PARP1/2. В присутствии HPF1 модификация гистонов происходит по остаткам серина. Общий механизм взаимодействия HPF1 с PARP1/2 в настоящее время интенсивно исследуют. В представленном обзоре мы рассматриваем открытие и классический механизм PARилирования у высших эукариот, а также роль в данном процессе HPF1 — нового фактора PARилирования гистонов.

Ключевые слова: поли(ADP-рибозил)ирование, PARилирование, PARP1, PARP2, поли(ADP-рибоза), HPF1, гистоны

DOI: 10.31857/S0026898423020167, **EDN:** EFQJGH

ВВЕДЕНИЕ

Поли(ADP-рибозил)ирование (PARилирование) представляет собой посттрансляционную модификацию белков, катализируемую ферментами поли(ADP-рибоза)полимеразами (PARP).

Сокращения: ARH3 (ADP-ribosylhydrolase 3) — ADP-рибозилгидролаза-3; ART (ADP-ribosyl transferase domain) — ADP-рибозилтрансферазный центр; BER (base excision repair) — эксцизионная репарация оснований; HDAC (histone deacetylases) — комплекс деацетилаз гистонов; HPF1 (histone PARylation factor 1) — фактор-1 PARилирования гистонов; MAR (mono(ADP-ribose)) — моно-ADP-рибоза; MARилирование (mono-ADP-ribosilation) — моно-ADP-рибозилирование; MSK1/2 (mitogen- and stress-activated protein kinase-1/2) — рибосомная протеинкиназа S6 α5/6; PARP1/2 (poly(ADP-ribose)polymerase 1/2) — поли(ADP-рибоза)полимеразы-1/2; PARG (poly(ADP-ribose)glycohydrolase) — поли(ADP-рибоза)гликогидролаза; Polβ (DNA polymerase β) — ДНК-полимераза β; PAR (poly(ADP-ribose)) — поли(ADP-рибоза); PARилирование — поли(ADP-рибозил)ирование; XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1) — белок-1 из группы комплементации.

Эта посттрансляционная модификация регулирует ключевые клеточные процессы, такие как репарация, репликация ДНК, организация структуры хроматина, экспрессия генов, процессинг РНК, биогенез рибосом и трансляция [1–10]. Известно, что PARилирование регулирует как функции белков, так и их внутриклеточную локализацию, а также участвует в формировании немембранных клеточных компартментов [4, 11–13]. Таким образом, ферменты PARP и катализируемая ими реакция синтеза поли(ADP-рибозы) (PAR) и ADP-рибозилирования белков осуществляют ключевую регуляцию процессов жизнедеятельности клеток высших эукариот. Именно поэтому PARP1 — первоочередная мишень, уничтожаемая клеткой в процессе апоптоза [14, 15].

Основные ферменты, катализирующие PARилирование в ядре и синтез протяженного полимера PAR, — два ДНК-зависимых фермента семейства PARP: PARP1 и PARP2 [5, 16]. Функции PARP1 и

PARP2 в регуляции репарации ДНК перекрываются [16]. Оба фермента вовлечены в процесс эксцизионной репарации оснований (base excision repair, BER) [17–19] и взаимодействуют с молекулами ДНК, имитирующими интермедиаты коротко- и длиннозаплаточного путей BER [20–24]. Были показаны и количественно оценены белок-белковые взаимодействия PARP1 и PARP2 с такими участниками процесса BER, как ДНК-полимераза β (Pol β), белок-1 из группы комплементации (XRCC1) и ДНК-лигазой III [18, 19, 25]. Показано влияние PARP1 и PARP2 на процесс BER с использованием синтетических ДНК-дуплексов, содержащих повреждения, а также нуклеосом [17–19, 26]. Кроме того, установлена роль PARP1 в регуляции процессов репарации двухцепочечных разрывов, а также процесса удаления из ДНК объемных повреждений [27–29].

В связи с ключевой ролью в регуляции репарации ДНК и других клеточных процессов PARP1 и PARP2 считают перспективными мишенями для поиска новых противораковых препаратов, а также лекарств для борьбы с нейродегенеративными заболеваниями [30–34]. Следует отметить, что только число обзоров, касающихся разработки ингибиторов PARP как потенциальных лекарственных средств, за 2021 год составило 365, а число статей по этой теме за тот же период превысило 1400. Ежегодно проводятся международные симпозиумы, посвященные исследованиям ферментов PARP и реакции ADP-рибозилирования в связи с бурным развитием в мире этого направления исследований и их исключительной важности для медицины. На данный момент многие ингибиторы PARP1 находятся в стадии клинических и доклинических испытаний, а олапариб, рупапариб, нирапариб и талазопариб уже используют в клинике для лечения онкологических заболеваний. Ингибиторы PARP1 наиболее интенсивно используют как химиотерапевтические препараты при лечении рака яичников и молочной железы, преимущественно в случае мутации в генах *BRCA1/2*. Несколько ингибиторов PARP в настоящее время находятся в стадии доклинических и клинических испытаний в качестве препаратов для лечения других типов злокачественных опухолей, а также для противовоспалительной терапии инфаркта миокарда, инсультов и других заболеваний [30, 35, 36].

Несмотря на то, что история изучения синтеза PAR и ферментов PARP началась еще в 60-е годы XX века, совсем недавно обнаружен новый белковый кофермент PARP1 и PARP2 – фактор PARилирования гистонов 1 (histone PARylation factor 1, HPF1) [37]. Этот белок регулирует активность и специфичность PARP1 и PARP2 и образует с ними временный совместный активный центр [38]. Роль такого взаимодействия заключается в переключении специфичности PARилирования с

остатков аспартата, глутамата и других аминокислот на остатки серина [39]. HPF1 играет важную роль в катализируемом PARP1 и PARP2 PARилировании гистонов [40–42]. В настоящий момент механизм взаимодействия PARP1/PARP2 с HPF1 и функции этого механизма в контексте хроматина только начинают изучать и это направление исследований ферментов PARP вызывает большой интерес.

ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОЛИ(ADP-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЯ

Первым указанием на процесс PARилирования стало открытие группы Поля Манделя (P. Mandel, P. Chambon, J.D. Weill), работавшей в Страсбурге (Франция), в 1963 г. [43]. Авторы показали, что включение [14 C]-аденина из АТР в кислотонерастворимую фракцию препарата ядер из куриной печени усиливалось в 1000 раз в присутствии никотинамидмононуклеотида (NMN). Сначала было высказано предположение, что кислотонерастворимый продукт реакции – полиадениловая кислота, то есть поли(А). Однако впоследствии было установлено, что в этих условиях образуется PAR [44]. В это же время были начаты исследования PAR в Национальном онкологическом центре в Токио [45]. Японские ученые подтвердили результаты группы французских исследователей по NMN-индуцированному накоплению нерастворимого в кислоте полимера в печени крысы и, кроме того, в клетках гепатомы. Интересно, что уже в это время появилась гипотеза, что образование этого продукта связано с ростом раковых клеток. В результате биохимических исследований установили структуру полимера и “участников” его биосинтеза. Показано, что в ядре под действием NAD-пирофосфорилазы из NMN и АТР образуется NAD $^{+}$, а фрагмент ADP-рибозы из NAD $^{+}$ затем используется для синтеза PAR с высвобождением никотинамида [45]. Таким образом, первым импульсом для исследований PAR стала работа группы Р. Мандела, опубликованная в 1963 году [43], которая получила развитие и в других лабораториях мира.

Долгое время PARP1 считали единственным ферментом, обладающим PARилирующей активностью в клетках млекопитающих [1]. Однако в течение нескольких лет интенсивных исследований идентифицировали пять различных генов, кодирующих другие поли- и моно(ADP-рибоза)полимеразы. В настоящее время семейство PARP включает 17 различных белков [46–49].

Установлено, что PAR представляет собой линейный и разветвленный полимер, состоящий из ADP-рибозных звеньев, связанных гликозидными связями [16]. Для синтеза PAR необходима молекула NAD $^{+}$ в качестве предшественника и не-

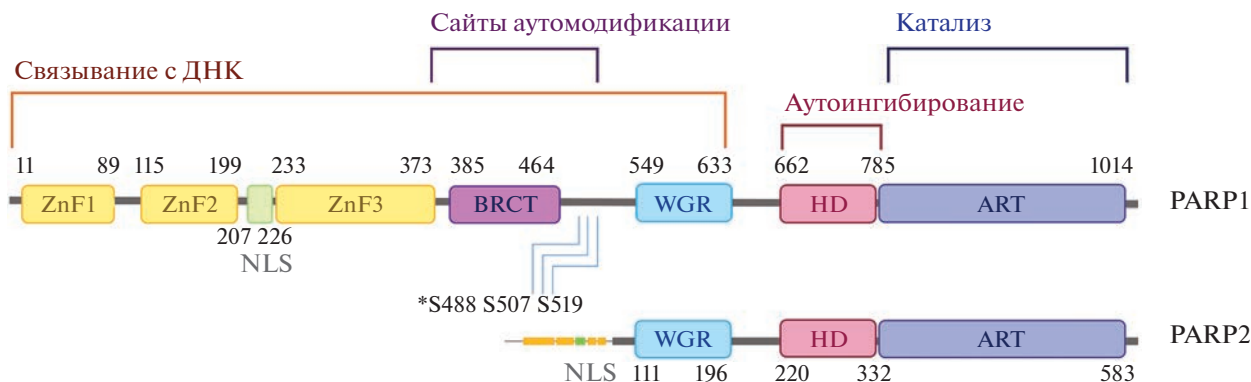


Рис. 1. Доменное строение PARP1 и PARP2. Функции доменов обозначены сверху и снизу от схемы; звездочкой отмечено три остатка серина, которые служат преимущественными мишенями PARилирования PARP1 *in vivo*.

посредственного субстрата PARP. Конститутивные уровни PAR обычно довольно низки в нестимулированных клетках [50]. Однако в ответ на генотоксический стресс (то есть при появлении разрывов в ДНК) активность PARP и уровни PAR могут возрасти в 10–500 раз. Структура PAR хорошо охарактеризована. В полимере PAR ADP-рибозные звенья связаны гликозидными рибозо-рибозными 1'-2'-связями. Длина цепи полимеров неоднородна и может достигать 200–400 мономеров *in vitro* и *in vivo* [51, 52]. Большинство свободных или связанных с белком полимеров (ADP-рибозы), синтезируемых при генотоксическом стрессе, быстро гидролизуются под действием поли(ADP-рибоза)гликогидролазы (PARG) с периодом полураспада от 40 с до 6 мин *in vivo*, что указывает на динамическую природу этого процесса в живых клетках [53]. Эффективный синтез и последующий быстрый гидролиз PAR определяют динамическую природу регуляции процессов, зависящих от PARP.

СТРУКТУРА ФЕРМЕНТОВ PARP1 И PARP2 И ОСОБЕННОСТИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ДНК

Суперсемейство PARP охватывает по меньшей мере 17 ферментов, вовлеченных во множество биологических процессов, таких как регуляция транскрипции, репарации ДНК, репликации, клеточного цикла и других [10, 47, 48]. Представителей суперсемейства PARP объединяет наличие консервативного каталитического домена (CAT), который содержит высококонсервативную последовательность, называемую “PARP signature” и образующую активный центр ферментов семейства PARP [49, 54]. Некоторые представители PARP-семейства катализируют моно-, а не поли(ADP-рибозил)ирование [48]. Наиболее изученный член семейства PARP – PARP1 – служит сенсором повреждений ДНК, обычно вызванных ионизирующим излучением и окисли-

тельным стрессом, и инициирует рекрутирование соответствующих белков в места повреждения ДНК [55, 56]. PARP2 также был обнаружен как фермент, катализирующий синтез PAR в ядре [57]. Проводятся интенсивные исследования по выяснению роли PARP2 и его кооперации с PARP1 [10, 47, 58, 59].

Структура PARP1 достаточно консервативна – у различных видов позвоночных идентичность аминокислотной последовательности составляет около 62%. Белок PARP1 человека имеет молекулярную массу 113 кДа. Фермент состоит из трех структурно-функциональных доменов: N-концевой ДНК-связывающий домен (NTR-домен), сайт аутомодификации и С-концевой каталитический домен (рис. 1) [60, 61]. ДНК-связывающий домен включает так называемые “цинковые пальцы”: гомологичные ZnF1 и ZnF2 и отличающийся от них ZnF3. Мутационный анализ ZnF1 и ZnF2 выявил ключевую роль ZnF1 в ДНК-зависимой активности PARP1 *in vitro*, в то время как ZnF2 оказался несущественным, хотя может играть важную роль в связывании PARP1 с определенными повреждениями ДНК [62]. ZnF3 обеспечивает контакт разных доменов при организации функциональной структуры белка [63]. Кроме этого, NTR-домен содержит сигнал ядерной локализации (NLS), который имеет сайт протеолитического расщепления PARP1 каспазами в процессе апоптоза. В состав центральной области входит BRCT-мотив, участвующий в формировании белок-белковых контактов, и сайт аутомодификации, который содержит потенциальные акцепторы PAR: 15 остатков глутамата и три остатка серина [64–66]. С-концевой домен состоит из каталитического домена (ART), регуляторного спирального домена (HD) и домена WGR [61]. Именно каталитический домен почти полностью идентичен у различных видов [49].

PARP2 имеет массу 66 кДа. Несмотря на значительную гомологию в структуре С-концевого каталитического домена, PARP1 и PARP2 значи-

тельно различаются по N-концевым участкам: в то время как PARP1 содержит три цинковых пальца (ZnF) и домен BRCT, NTR-домен PARP2 намного короче и его вторичная структура неупорядочена [61, 67, 68]. Такие структурные различия NTR влияют на взаимодействие ферментов с ДНК. PARP1 связывает поврежденную ДНК преимущественно цинковыми пальцами [61]. Домены WGR и BRCT также участвуют во взаимодействии с неповрежденной ДНК благодаря механизму “monkey bag”, который опосредует миграцию PARP1 по ДНК [65, 69]. PARP2 из-за отсутствия цинковых пальцев взаимодействует с ДНК-повреждениями доменами NTR и WGR [70]. Различия в доменной структуре и механизмах связывания с ДНК могут объяснить как различное сродство PARP1 и PARP2 к тем или иным повреждениям ДНК, так и отличающуюся каталитическую активность [20, 26, 71]. Кроме того, PARP1 и PARP2 имеют разное сродство к неповрежденной ДНК [71].

В экспериментах *in vitro* каталитическая активность фермента PARP2 слабее, чем PARP1, и синтезируемые им цепи PAR короче. *In vitro* PARP1 эффективно связывает ДНК и активируется широким спектром повреждений ДНК, в то время как PARP2, как предполагается, более специфично активируется ДНК, содержащей разрывы, фланкированные 5'-фосфатом (включая расщепленные апуриновые (AP) сайты) [70, 72–74]. В целом, сродство PARP1 к поврежденной, а также к неповрежденной ДНК выше, чем PARP2, но PARP2 с большей эффективностью, чем PARP1, связывает фланкированные 5'-фосфатами однонитевые разрывы ДНК [62, 75–77]. PARP1 взаимодействует с ранними интермедиатами BER, тогда как PARP2 наиболее эффективно “работает” на однонитевых разрывах – субстратах финальной стадии лигирования [56–58, 61, 76].

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ PARP1 И PARP2 В КЛЕТКЕ

В клетках человека в ответ на повреждение ДНК большая часть активности PARP обеспечивается PARP1 (около 90%), в то время как на долю PARP2 приходится 10–15% [12]. Из-за гораздо более медленной аутомодификации PARP2 часто рассматривают как каталитически менее активный аналог PARP1. Примечательно, что, несмотря на существенно меньшую каталитическую активность PARP2, а также различное сродство PARP1 и PARP2 к повреждениям ДНК [71], нокаут PARP1 (как и нокаут PARP2) не летален для клеток, в то время как двойной нокаут этих ферментов вызывает эмбриональную летальность. Из-за генетической нестабильности клетки *PARP1*^{-/-} и *PARP2*^{-/-} обладают более высокой

чувствительностью к агентам, повреждающим ДНК [78]. Более того, нокаут гена *PARP2* на мышиных моделях приводит к дефектам в развитии Т-клеток [79], эритропоэза [80] и сперматогенеза [81], которые не проявляются у мышей, лишенных PARP1, что указывает на уникальные функции PARP2. Предполагается, что PARP2 компенсирует недостаток PARP1 в ответ на генотоксический стресс, хотя до сих пор непонятно, как это происходит при относительно меньшей активности PARP2 и различиях в сродстве к повреждениям ДНК у этих двух ферментов. Для PARP1 показана стимуляция активности РНК-связывающими белками, такими как YB1 [82, 83], SAM68 [84], и взаимодействие с Fus [85]. Для PARP2 взаимодействие с белками, которые модулируют его активность, только начинают изучать.

Поврежденная ДНК служит кофактором-активатором для PARP1 и PARP2 [61, 68, 70, 86, 87]. Связывание ДНК-повреждения индуцирует цепь междоменных перестроек PARP1 и PARP2, что в конечном итоге приводит к изменению конформации аутоингибиторного спирального домена (HD) [61, 86, 88, 89]. Этот домен закрывает собой активный центр PARP1/2. Его реорганизация каталитически активирует ферменты и облегчает связывание NAD⁺ в активном центре. Активированные PARP1 и PARP2 синтезируют и ковалентно присоединяют PAR к аминокислотным остаткам самих PARP и различных белков-мишеней. В этом контексте рассматривают реакции ауто-PARилирования (аутомодификация, при которой молекула PAR ковалентно присоединена к PARP) и гетеро-PARилирования (гетеромодификация, когда PAR присоединяется к другим белкам-мишеням) (рис. 2). В настоящий момент остается открытым вопрос о механизме ауто-PARилирования. С одной стороны, есть доказательства аутомодификации PARP1 по *цис*-механизму – когда молекула фермента служит акцептором PAR, который она же и синтезирует [90, 91]. С другой стороны, сообщалось о способности PARP1 и PARP2 образовывать димеры, ускоряющие PARилирование в связи с вкладом *транс*-механизма модификации [92, 93]. Например, по данным светорассеяния, PARP1 и PARP2 в растворе находятся преимущественно в виде димеров [93]. Предположение о том, что аутомодификация PARP1 и PARP2 происходит межмолекулярным образом в составе димера, состоящего из двух субъединиц, согласуется со способностью PARP1 и PARP2 ковалентно модифицировать другие белки [52, 83]. В качестве дополнительного аргумента в пользу бимолекулярной природы реакции ауто-PARилирования можно привести стехиометрию комплексов PARP1 : ДНК и PARP2 : ДНК, которая составляет 2 : 1 для достижения оптимальной ферментативной активности [94, 95].

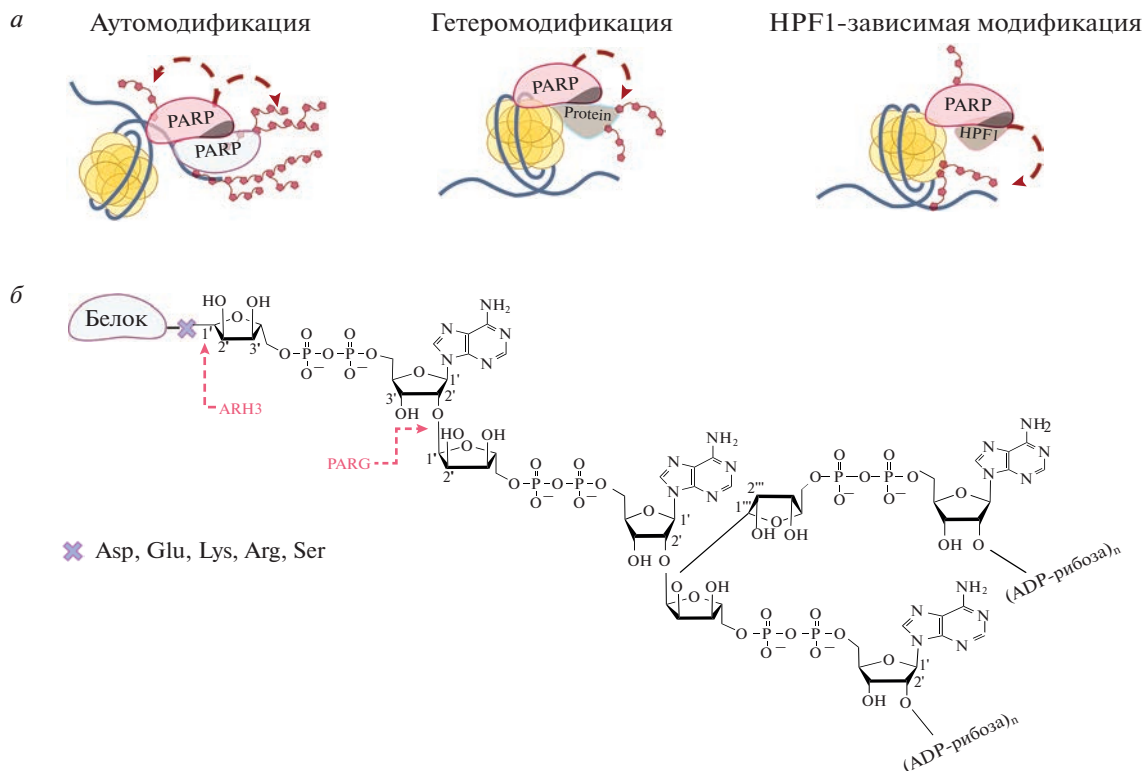


Рис. 2. Структура возможных комплексов PARP (**а**) и структура PAR (**б**). PAR-модификация PARP (аутомодификация), белков-мишеней (гетеромодификация) и HPF1-зависимая модификация остатков серина. ARH3 — ADP-рибозилгидролаза-3; PARC — поли(ADP-рибоза)гликогидролаза.

Интенсивно изучалась роль PARP1 и PARP2 в механизмах BER и репарации одноцепочечных разрывов [17, 18, 23, 24, 26]. Функции PARP1 и PARP2 в регуляции этих процессов установлены с использованием модельных дуплексов ДНК, а также нуклеосом [17, 26, 72]. Сейчас мы знаем, что PARP1 и PARP2 могут выполнять как общие, так и специфические функции в поддержании стабильности генома, кооперируясь друг с другом. Возможно, что разделение функций PARP1 и PARP2 в различных процессах происходит в том числе при участии их белков-партнеров, поэтому открытие белковых коферментов PARP1 и PARP2 и изучение их функций представляет особенный интерес.

HPF1 — НОВЫЙ КОФАКТОР ФЕРМЕНТОВ PARP1 И PARP2

Первоначально было установлено, что PARP1 и PARP2 модифицируют в белках преимущественно остатки глутамата и аспартата, а также лизина и аргинина [96–98]. Однако, недавно показано, что остатки серина также являются распространенными акцепторами PAR в клетках человека, в том числе в контексте репарации двуцепочечных разрывов [39–41]. Установлено, что PARP1

и PARP2 необходимы, но недостаточны для PARилирования остатков серина [42]. Фактор PARилирования гистонов-1 (HPF1) образует как с PARP1, так и с PARP2 временный непрочный комплекс, судя по высоким значениям констант диссоциации: K_d комплексов PARP1/2:HPF1:нуклеосома составляют 790 и 280 нМ соответственно [99, 100]. HPF1 формирует с этими ферментами совместный активный центр, который и модифицирует остатки серина [37]. Позже показали, что HPF1 человека специфически взаимодействует с PARP1 и PARP2, тем самым облегчая реакцию PARилирования гистонов (в отсутствие HPF1 PARP1/2 не модифицируют гистоны *in vitro*) [39].

Взаимодействие HPF1 с PARP1 усиливается присутствием ДНК и NAD^+ . Как описано выше, PARP1 и PARP2 имеют спиральный субдомен HD, который быстро разворачивается при распознавании повреждения ДНК, открывая сайт связывания NAD^+ [87]. Удаление HD усиливает взаимодействие HPF1:PARP1/2 *in vitro* [38]. Предполагается, что этот субдомен ингибирует связывание ферментов с HPF1, а для реализации их взаимодействия необходимо ДНК-индуцированное разворачивание HD.

Недавно методом рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии разрешена

структура HPF1 в комплексе с каталитическим доменом PARP2 [38, 101]. Обнаружено, что для взаимодействия HPF1 с PARP1/2 важен консервативный остаток Asp283 в С-концевой области HPF1, который контактирует с His826 в PARP1 (His381 в PARP2). Важно отметить, что эти остатки гистидина в PARP1/2 критичны для элонгации реакции PARIлирования и удлинения цепи PAR [102].

Структурный и мутационный анализ комплекса HPF1:PARP2 показал, что опосредованное HPF1 переключение аминокислотной специфичности PARP1/2 можно объяснить введением в общий активный центр каталитического остатка Glu284 HPF1 [38]. PARP1 и PARP2 содержат один каталитический остаток глутамата (Glu988 и Glu545 соответственно), каждый из которых, как было установлено, имеет решающее значение для инициации PARIлирования [103]. Однако одного остатка глутамата в активных центрах PARP1 и PARP2 оказалось недостаточно для ADP-рибозилирования остатков серина [39]. Взаимодействие HPF1 и PARP1/2 располагает Glu284 HPF1 рядом с каталитическим глутаматом PARP1/2 и молекулой NAD^+ , что позволяет сформировать активный центр, способный катализировать эффективный перенос ADP-рибозы на серин. Мутантный HPF1 с заменой Glu284 на Ala теряет способность переключать аминокислотную специфичность PARP1/2 на остатки серина [38]. Депротонированный Glu284 HPF1 может действовать как основание в этой реакции, оттягивая протон от акцепторного остатка серина и тем самым повышая его нуклеофильность. По сути, HPF1 способствует увеличению нуклеофильности серина для эффективного катализа, как это происходит в активных центрах сериновых протеаз, эстераз и липаз, с той разницей, что в случае протеаз повышение нуклеофильности серина обеспечивает каталитическая триада Ser-His-Asp [104]. Заметим, что формирование объединенного активного центра, в котором присутствуют субстратсвязывающие и каталитические остатки PARP1/2 и HPF1, напоминает аналогичные функции белков, активирующих GTFазу, — они тоже вводят необходимый для катализа аминокислотный остаток в активный центр фермента [38].

Интересно, что связывание с HPF1 приводит к образованию более коротких полимеров PAR [37]. Показано, что Asp283 HPF1 взаимодействует с His381 PARP2 (и аналогичным His826 PARP1) и занимает отрицательно заряженный связывающий карман, который во время реакции удлинения цепи PAR нужен для узнавания пирогосфатной группы акцепторной единицы ADP-рибозы (рис. 3) [38]. Аналогичные результаты получены в отношении His826 PARP1: мутант этого белка с реверсированием заряда в позиции 826 (His826Glu) терял способность формировать совместный ак-

тивный центр с HPF1. Этот мутант катализировал PARIлирование остатков аспартата и глутамата, но синтезировал только короткие полимеры PAR. Таким образом, связывание HPF1 с PARP1/2 блокирует ответственный за удлинение полимера остаток гистидина (His826 и His381 в активных центрах PARP1 и PARP2 соответственно) и исключает тем самым элонгацию PAR.

Недавно две группы исследователей, независимо друг от друга, пришли к выводу, что HPF1 стимулирует стадию инициации PARIлирования [105, 106]. Обнаружено увеличение начальной скорости аутомодификации PARP1 и PARP2 и увеличение уровня синтезированной PAR в присутствии субэквимоларных концентраций HPF1. В то же время высокие (микромоларные) концентрации HPF1 ингибировали синтез PAR [105]. Это объясняется подавлением элонгации в ситуации, когда центр элонгации занят HPF1 при его высокой концентрации, соответствующей насыщающей [99, 100]. По всей видимости, при концентрации HPF1 ниже насыщающей, которая составляет 2–5 мкМ, после инициации PARIлирования в объединенном активном центре PARP:HPF1 HPF1 диссоциирует из комплекса с PARP в силу низкого сродства. Это подтверждено в экспериментах, в которых продемонстрирована элонгация синтеза PAR свободным PARP [64, 105]. Таким образом, насыщающие концентрации HPF1 затрудняют стадию элонгации в активном центре PARP, что выражается в снижении количества синтезируемого полимера, а низкие концентрации HPF1 стимулируют синтез PAR. Это очень интересный пример регуляции синтеза PAR.

С эффектами, оказываемыми HPF1 на синтез PAR, согласуется его влияние на NAD^+ -гидролазную активность PARP1 и PARP2. Способность PARP1 гидролизовать NAD^+ без сопутствующего синтеза PAR обнаружена ранее и в отсутствие HPF1 [107]. HPF1 в высоких концентрациях по отношению к PARP1 (20-кратный избыток) стимулирует эту активность [102]. Авторы объясняют переключение PARP1 на гидролиз NAD^+ с образованием свободной ADP-рибозы действием двух факторов: при насыщающих концентрациях HPF1 элонгация PAR невозможна, а когда сайты для инициации синтеза “исчерпаны”, PARP использует воду в качестве акцептора ADP-рибозы, гидролизуя NAD^+ . Однако нами показано, что в условиях, обеспечивающих стимуляцию PARIлирования, происходит HPF1-зависимое уменьшение “холостого” гидролиза NAD^+ [105]. По всей видимости, субэквимоларные концентрации HPF1 не насыщают все активные центры PARP. Свободные от HPF1 молекулы PARP могут как предоставлять сайты для PARIлирования, так и катализировать элонгацию [105]. Следует отметить, что концентрация HPF1 в клетке значитель-

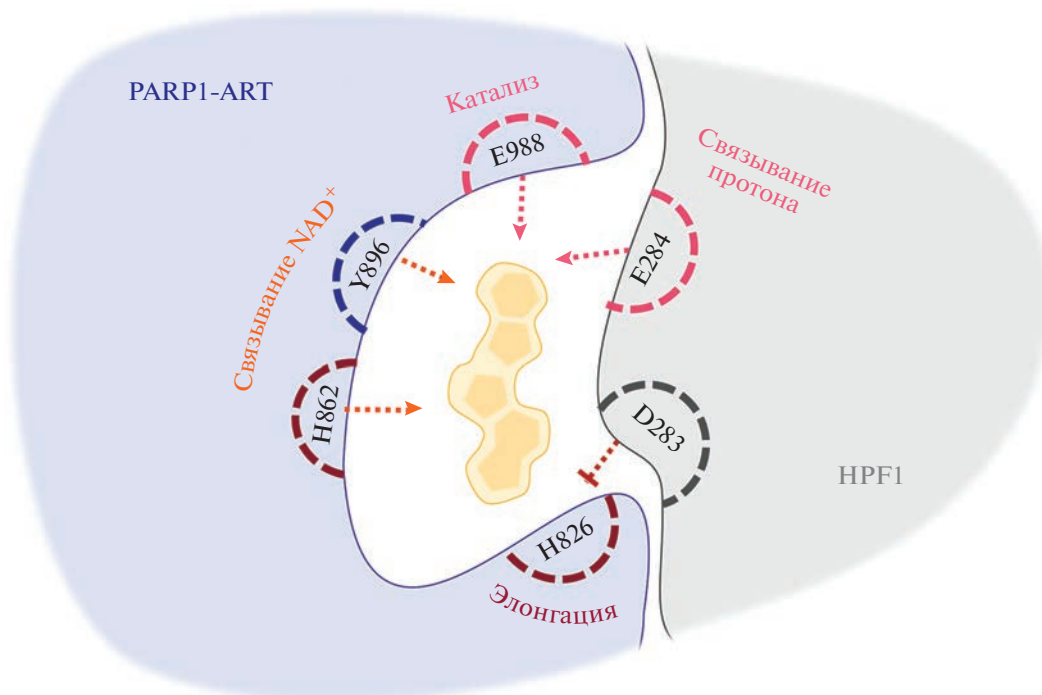


Рис. 3. Схематическое изображение совместного активного центра PARP1 и HPF1 с описанием функций аминокислотных остатков. Триада Н-У-Е (Н826, У896, Е988) задействована в позиционировании NAD^+ в АДР-рибозилтрансферазном центре (АРТ) и катализе. HPF1 предоставляет остаток глутамата (Е284), обеспечивающий депротонирование остатка серина, что повышает его нуклеофильность. Остаток Е988 PARP1 участвует в нуклеофильной атаке связи никотинамид-рибоза депротонированным остатком серина, завершая стадию инициации. В совместном активном центре остаток Н826 PARP1, необходимый для элонгации, экранирован остатком D283 HPF1.

но ниже концентрации PARP1 и сопоставима с концентрацией PARP2 [37]. Таким образом, относительная концентрация HPF1 гораздо ниже концентрации, необходимой для насыщения активных центров PARP1/2, в соответствии с найденными величинами констант диссоциации для комплексов PARP1/2:HPF1:нуклеосома (790 и 280 нМ соответственно) [99, 100]. Это обеспечивает оптимальные условия для стимуляции инициации без подавления элонгации и усиления гидролиза NAD^+ и в очередной раз позволяет предположить, что в присутствии HPF1 аутомодификация PARP1/2 происходит в димере, при этом одна из субъединиц связана с HPF1 и образует временный совместный активный центр, а вторая служит акцептором PAR.

Таким образом, HPF1 оказывает противоположные эффекты на инициацию и элонгацию синтеза PAR. Стимуляция инициации, по всей видимости, опосредована введением дополнительного каталитического глутамата в активный центр фермента. Подавление элонгации связано с взаимодействием HPF1 с остатком His826 активного центра PARP1, важного для элонгации. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* баланс между этими двумя эффектами преимущественно определяется соотношением концентраций HPF1:PARP [99, 100].

ПРИВЛЕЧЕНИЕ PARP1, PARP2 И HPF1 НА САЙТЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК

На основании данных, полученных на начальных этапах изучения HPF1, стали считать, что этот белок вместе с PARP1 вовлечен в репарацию ДНК. Так, I. Gibbs-Seymour и соавт. [37] показали, что HPF1 ограничивает гипераутомодификацию PARP1 *in vivo* и *in vitro* и рекрутируется к местам повреждения ДНК. Нокаут HPF1 значительно повышает чувствительность клеток к обработке агентами, алкилирующими ДНК, такими как метилметансульфонат (MMS), и повышает чувствительность клеток к ингибированию PARP. Оказалось, что двойной нокаут *HPF1*^{-/-}*PARP1*^{-/-} приводит к некоторому снижению чувствительности клеток к MMS и ингибиторам PARP по сравнению с одиночными нокаутами, то есть частично восстанавливает фенотип дикого типа [37].

Сообщалось, что после рекрутирования PARP1 в комплексе с HPF1 к участкам повреждения ДНК последний остается на поврежденных сайтах дольше, чем сам PARP1 [37, 38, 64]. В течение первых 30 с PARP1 рекрутируется в места повреждения. HPF1 привлекается на сайты повреждения вместе с PARP1, при этом динамика привлечения HPF1 не зависит от PАРилирования и опосредуется, по всей видимости, белок-белко-

выми взаимодействиями [37]. В течение 2 мин PARP1, по всей видимости, покидает сайты повреждения [64], в то время как HPF1 находится там до 5 мин [37]. Обработка ингибиторами PARP1 приводит к задержке и PARP1, и HPF1 на сайтах повреждений [37, 108]. Аналогично на длительность удержания PARP1 на сайтах повреждения ДНК действует нокаут гена *HPF1*: в этом случае время увеличивается [64]. Это, по-видимому, влияет на динамику рекрутирования белков к сайтам повреждений, что подтверждает роль HPF1 в передаче сигнала о повреждении ДНК. На основании этих фактов можно предположить, что каталитическая активность PARP1 необходима для его диссоциации с сайтов повреждения, а HPF1 ускоряет этот процесс, скорее всего, за счет стимуляции инициации PARилирования [105].

PARP2 рекрутируется на сайты повреждения ДНК позже PARP1 [108, 109]. Так, показано, что каталитическая активация PARP1 ускоряет привлечение PARP2, но некритично, так как в отсутствие PARP1 PARP2 все же привлекается на сайты повреждения ДНК, хотя и с некоторой задержкой [109]. Можно предположить, что PARP1 в комплексе с HPF1 катализирует PARилирование, а синтезированный PAR ускоряет привлечение PARP2 к поврежденной ДНК. Таким образом, PARP1, HPF1 и затем PARP2 совместно локализуются в местах повреждения ДНК в составе хроматина. В этом контексте исследования *in vitro*, в которых продемонстрирована более эффективная HPF1-зависимая модификация гистонов именно при участии PARP2 в сравнении с PARP1, можно трактовать как косвенное доказательство участия HPF1 в ответе на повреждение ДНК на уровне хроматина [105].

ДИНАМИКА ВОЗНИКНОВЕНИЯ И ДЕГРАДАЦИИ ПОЛИ(ADP-РИБОЗЫ), СВЯЗАННОЙ С ОСТАТКАМИ СЕРИНА

Как сказано выше, PARилирование — это обратимая посттрансляционная модификация. Наряду с ферментами, синтезирующими PAR, и взаимодействующими с этим полимером белками есть и ферменты, деградирующие PAR [6]. Среди последних в первую очередь следует упомянуть PARG. Этот PAR-деградирующий фермент, в силу механизма его действия, не удаляет первый остаток ADP-рибозы, связанный с аминокислотным остатком белка-мишени [110, 111]. Продукт реакции, катализируемой PARG, — белок, модифицированный моно-ADP-рибозой (MAR), который служит субстратом ферментов, удаляющих MAR. Функция PARG критична для клетки, так как нокаут гена *PARG* приводит к накоплению PAR, раннему апоптозу в клеточных линиях человека и эмбриональной летальности у мышей [112]. Таким образом, эффективный PARG-опосредо-

ванный оборот PAR необходим для функционирования клеточных систем после повреждения ДНК [17, 85].

MAR возникает как продукт PARилирования или действия PARG и удаляется несколькими ферментами, принадлежащими к семейству ADP-рибозилгидролаз (ARN1, ARN2 и ARN3) и макромоменсодержащих ADP-рибозилгидролаз (MacroD1, MacroD2 и TARG1) [113–115]. Среди них только ARN3 представляет собой ADP-рибозилгидролазу, удаляющую MAR с остатков серина [116, 117], остальные гидролизуют моно(ADP-рибозу), связанную с аспаратом, глутаматом или аргинином.

По всей видимости, синтезированный полимер PAR быстро деградирует под действием PARG. Стабильность оставшейся ковалентно присоединенной к PARP1/2 MAR определяется в первую очередь природой аминокислотного остатка, с которым она связана. В протеомных исследованиях сайтов PAR-модификации обнаружили, что модифицированные остатки серина не только преобладали, но и были самыми стабильными *in vivo*. Это подтверждается тем фактом, что рибозилирование по остаткам аспартата и глутамата обнаруживают только в клетках, нокаутных по *PARG* [97]. В то же время MARилирование серина достоверно регистрируют в клетках дикого типа [112]. Стабильность этой модификации регулируется преимущественно ARN3 [112]. Таким образом, каталитической активности комплекса HPF1:PARP1/2, синтезирующего PAR, противодействуют ферменты, его удаляющие: PARG и ARN3 [116–118].

ПОЛИ(ADP-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЕ ГИСТОНОВ И КАНОНИЧЕСКИЕ ГИСТОНОВЫЕ МЕТКИ

Функциональная значимость PARилирования гистонов — контроль состояния хроматина. Показано, что предпочтительными субстратами PARP1/2:HPF1 служат гистоны H2B и H3, а именно их аминокислотные остатки H2BS6, H3S28 и H3S10 [39]; причем последний — более эффективный акцептор ADP-рибозы по сравнению с H3S28 [40]. Заметим, что указанные сайты PARилирования гистонов служат и сайтами фосфорилирования [41, 119]. Остаток H2BS6 фосфорилируется в начале митоза и полностью дефосфорилируется после его завершения. Фосфорилирование H2BS6 особенно выражено в центромерных и прицентромерных областях, а его блокирование приводит к нарушению анафазы и неполному цитокинезу [120]. Фосфорилирование H3S10 инициируется в перичентромерном гетерохроматине в клетках поздней интерфазы G2. После инициации фосфорилирование H3, по-видимому, распространяется по всему хроматину. В целом, су-

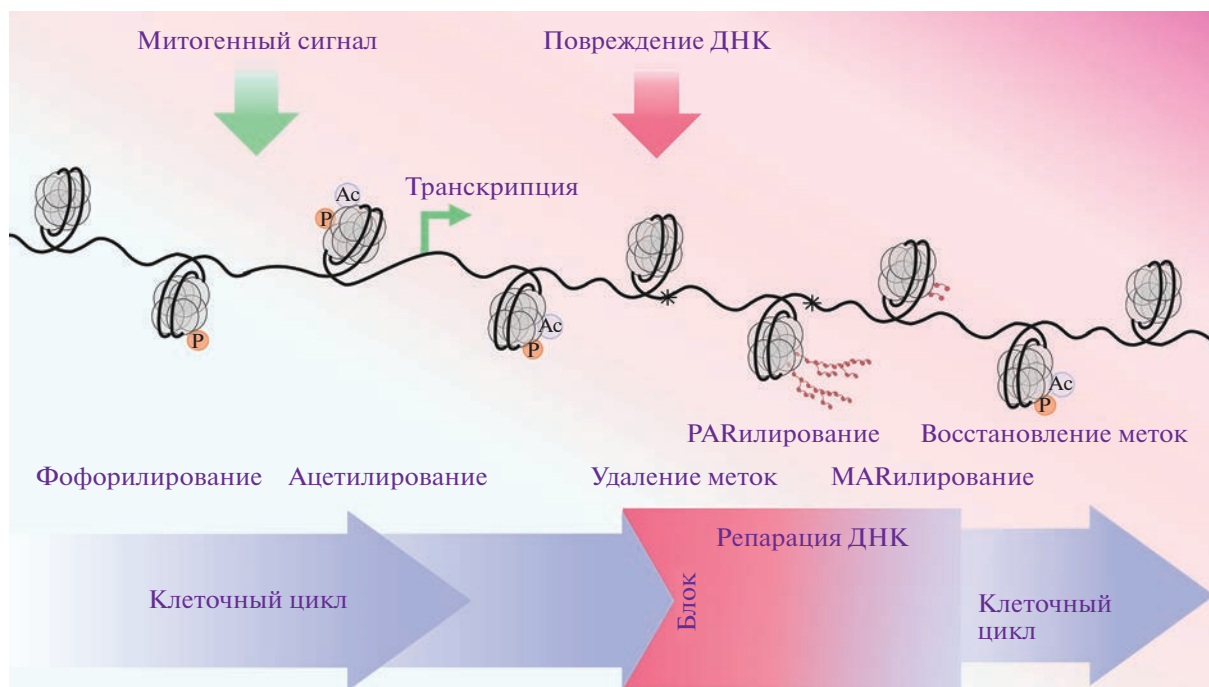


Рис. 4. Изменение паттерна посттрансляционной модификации гистонов при продвижении по клеточному циклу и повреждении ДНК.

существует точная пространственная и временная корреляция между фосфорилированием H3 и начальными стадиями конденсации хроматина [121]. PARилирование H2BS6 и H3S10 может оказывать регуляторное действие и вызывать остановку клеточного цикла в случае повреждения ДНК. Эту гипотезу подтверждают результаты исследования N. Hananaya и др. [122], в котором показано, что PARилирование H2BS6 ингибирует конденсацию хроматина и организацию структур более высокого порядка до завершения репарации.

Фосфорилирование H3S28 вместе с H3S10 вовлечено в регуляцию транскрипции [123]. По всей видимости, в контексте регуляции транскрипции важную роль играет сочетание фосфорилирования H3S10 с ацетилированием остатков H3K9 или H3K14 [124–126]. В частности, быстрое и временное фосфорилирование гистона H3 по остаткам Ser10 и Ser28 под действием киназ MSK1 и MSK2 (митоген- и стрессзависимые киназы) наблюдается при транскрипционной активации генов раннего ответа [125]. Показано, что MSK1/2-опосредованное фосфорилирование H3S28 на стрессзависимых промоторах способствует диссоциации корепрессорных комплексов HDAC и тем самым усилению локального ацетилирования гистонов и последующей активации транскрипции стресс-индуцированных генов [123]. На данный момент показано, что PARилирование гистона H3 по серинам препятствует его ацетилированию и, наоборот, ацетилирование H3K9 достаточно для блокирования PARилирования

H3S10 [127]. Иными словами, фосфорилирование и ацетилирование супрессируют HPF1-зависимое PARилирование гистонов. Это объясняет вклад гистоновых деацетилаз в регуляцию репарации ДНК [128, 129]. В ответ на повреждение ДНК наблюдали быстрое деацетилирование H3K9 и H3K14 [130, 131]. В то же время ацетилирование ограничивало распространение PARилирования гистонов, препятствуя чрезмерному расширению сигнала о повреждении, а восстановление ацетилирования происходило после завершения процесса репарации ДНК. Установлено, что в клетках, нокаутных по ARH3, уровень ацетилирования H3K9 в ответ на повреждение ДНК снижен более продолжительное время, чем в клетках дикого типа. По всей видимости, стабильное ADP-рибозилирование гистонов препятствует восстановлению уровня их ацетилирования [112]. Это может приводить к взаимному исключению ацетилирования H3K9 и H3K14 и PARилирования гистонов (рис. 4).

Таким образом, баланс между PARилированием и фосфорилированием остатков серина регулируется киназами, деацетилазами и ферментами, удаляющими PAR. В то время как фосфорилирование и ацетилирование считаются маркерами транскрипции и продвижения клетки по клеточному циклу, PARилирование, по всей видимости, регулирует остановку этих процессов для того, чтобы предоставить клетке время для восстановления структуры ДНК в случае ее повреждения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ADP-рибозилирование представляет собой посттрансляционную модификацию, которая реализуется как в мономерной (MAR), так и в полимерной (PAR) формах. Несмотря на то, что исследования PAR длятся уже 60 лет, новые детали механизма этой посттрансляционной модификации продолжают выяснять. Вслед за открытием ферментов, ответственных за синтез и деградацию PAR, обнаружили множество белков, взаимодействующих с этим полимером. С каждым годом расширяется спектр клеточных процессов, в которых показано участие PARилирования; при этом репарация ДНК, конечно, остается главным направлением.

Исследования PARP проводят как на модельных ДНК, так и в системе нуклеосом. В последнем случае можно обнаружить взаимодействие PARP с гистонами и его влияние на структуру нуклеосомы [26, 132–134]. Открытие PARилирования остатков серина и вместе с ним кофактора этого процесса — HPF1 — ознаменовало новый виток в исследованиях этой реакции; поэтому вряд ли дальнейшие исследования функционирования ферментов PARP в составе хроматина стоит проводить в отсутствие этого важного кофактора. На сегодняшний день уже известны некоторые закономерности взаимодействия HPF1 с PARP1/2, хотя есть и противоречащие друг другу данные, которые необходимо уточнить для понимания механизма действия HPF1. Примечательно, что делеция гена *HPF1* не отменяет PARилирования остатков серина [40]. Это дает основание предположить существование других, еще неизвестных кофакторов PARP1/2, меняющих специфичность PARилирования по аналогии с HPF1. Влияние HPF1 на активность PARP1/2, показанное *in vivo* и *in vitro*, важно понимать в контексте исследования ингибиторов PARP1/2, некоторые из которых уже используют как антираковые препараты в клинике. Недавно обнаружено вовлечение HPF1 в клеточный ответ при обработке такими ингибиторами [100]. Таким образом, последующий поиск ингибиторов PARP1/2 необходимо проводить с учетом влияния взаимодействий PARP1/2 с HPF1.

Авторы выражают благодарность Речкуновой Надежде Ивановне за обсуждения при написании обзора.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00112) и в рамках Проекта государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300041-4 (глава “Некоторые аспекты клеточной роли PARP1 и PARP2”).

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. Kraus W.L. (2015) PARPs and ADP-ribosylation: 50 years... and counting. *Mol. Cell.* **58**, 902–910.
2. Gibson B.A., Kraus W.L. (2012) New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 411–424.
3. Wei H., Yu X. (2016) Functions of PARylation in DNA damage repair pathways. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* **14**, 131–139.
4. Cohen M.S., Chang P. (2018) Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 236–243.
5. Kraus W.L. (2020) PARPs and ADP-ribosylation: 60 years on. *Genes Dev.* **34**, 251–253.
6. O’Sullivan J., Tedim Ferreira M., Gagné J.P., Sharma A.K., Hendzel M.J., Masson J.Y., Poirier G.G. (2019) Emerging roles of eraser enzymes in the dynamic control of protein ADP-ribosylation. *Nat. Commun.* **10**(1), 1182.
7. Perina, D., Mikoč A., Ahel J., Četković H., Žaja R., Ahel I. (2014) Distribution of protein poly(ADP-ribosylation) systems across all domains of life. *DNA Repair (Amst.)*. **23**, 4–16.
8. Žaja R., Mikoč A., Barkauskaite E., Ahel I. (2012) Molecular insights into poly(ADP-ribose) recognition and processing. *Biomolecules.* **3**, 1–17.
9. Hanzlikova H., Kalasova I., Demin A.A., Pennicott L.E., Cihlarova Z., Caldecott K.W. (2018) The importance of poly(ADP-ribose) polymerase as a sensor of unligated Okazaki fragments during DNA replication. *Mol. Cell.* **71**, 319–331.
10. Hanzlikova H., Gittens W., Krejčíková K., Zeng Z., Caldecott K.W. (2017) Overlapping roles for PARP1 and PARP2 in the recruitment of endogenous XRCC1 and PNKP into oxidized chromatin. *Nucleic Acids Res.* **45**, 2546–2557.
11. Buch-Larsen S.C., Rebak A.K.L.F.S., Hendriks I.A., Nielsen M.L. (2021) Temporal and site-specific ADP-ribosylation dynamics upon different genotoxic stresses. *Cells.* **10**(11), 2927.
12. Hoch N.C., Polo L.M. (2019) ADP-ribosylation: from molecular mechanisms to human disease. *Genet. Mol. Biol.* **43**, e20190075.
13. Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A. (2017) The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 610–621.
14. Soldani C., Scovassi A.I. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis.* **7**, 321–328.
15. D’Amours D., Sallmann F.R., Dixit V.M., Poirier G.G. (2001) Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J. Cell Sci.* **114**(Pt. 20), 3771–3778.
16. D’Amours D., Desnoyers S., D’Silva I., Poirier G.G. (1999) Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regu-

- lation of nuclear functions. *Biochem. J.* **342**(Pt. 2), 249–268.
17. Lavrik O.I. (2020) PARPs' impact on base excision DNA repair. *DNA Repair* (Amst.). **93**, 102911.
 18. Vasil'eva I., Moor N., Anarbaev R., Kutuzov M., Lavrik O. (2021) Functional roles of PARP2 in assembling protein–protein complexes involved in base excision DNA repair. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 4679.
 19. Ходырева С.Н., Лаврик О.И. (2016) Поли(ADP-рибоза)полимераза 1 – ключевой регулятор репарации ДНК. *Молекуляр. биология.* **50**, 655–673.
 20. Sukhanova M.V., Hamon L., Kutuzov M.M., Joshi V., Abrakhi S., Dobra I., Curmi P.A., Pastre D., Lavrik O.I. (2019) A single-molecule atomic force microscopy study of PARP1 and PARP2 recognition of base excision repair DNA intermediates. *J. Mol. Biol.* **431**, 2655–2673.
 21. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Kuznetsov N.A., Lavrik O.I. (2020) Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 is modified in vitro by poly(ADP-ribose) polymerase 1 under control of the structure of damaged DNA. *Biochimie.* **168**, 144–155.
 22. Суханова М.В., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. (2004) Поли(ADP-рибоза)полимераза-1 – регулятор белково-нуклеиновых взаимодействий в процессах, возникающих при генотоксическом воздействии. *Молекуляр. биология.* **38**, 834–847.
 23. Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Lebedeva N.A., Prasad R., Wilson S.H., Lavrik O.I. (2005) Human base excision repair enzymes apurinic/apyrimidinic endonuclease1 (APE1), DNA polymerase β and poly(ADP-ribose) polymerase 1: interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity. *Nucleic Acids Res.* **33**, 1222–1229.
 24. Sukhanova M., Khodyreva S., Lavrik O. (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase β in long patch base excision repair. *Mutat. Res.* **685**, 80–89.
 25. Моор Н.А., Лаврик О.И. (2018) Белок-белковые взаимодействия системы эксцизионной репарации оснований ДНК. *Биохимия.* **83**, 564–576.
 26. Kutuzov M.M., Belousova E.A., Kurgina T.A., Ukraintsev A.A., Vasil'eva I.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. (2021) The contribution of PARP1, PARP2 and poly(ADP-ribosyl)ation to base excision repair in the nucleosomal context. *Sci. Rep.* **11**, 4849.
 27. Caron M.C., Sharma A.K., O'Sullivan J., Myler L.R., Ferreira M.T., Rodrigue A., Coulombe Y., Ethier C., Gagné J.P., Langelier M.F., Pascal J.M., Finkelstein I.J., Hendzel M.J., Poirier G.G., Masson J.Y. (2019) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 antagonizes DNA resection at double-strand breaks. *Nat. Commun.* **10**, 2954.
 28. Krasikova Y., Rechkunova N., Lavrik O. (2021) Nucleotide excision repair: from molecular defects to neurological abnormalities. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 6220.
 29. Maltseva E.A., Rechkunova N.I., Sukhanova M.V., Lavrik O.I. (2015) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 modulates interaction of the nucleotide excision repair factor XPC-RAD23B with DNA via poly(ADP-ribosyl)ation. *J. Biol. Chem.* **290**, 21811–21820.
 30. Flippot R., Patrikidou A., Aldea M., Colomba E., Lavaud P., Albige's L., Naoun N., Blanchard P., Terlizzi M., Garcia C., Bernard-Tessier A., Fuerea A., Di Palma M., Escudier B., Lorient Y., Baciarello G., Fizazi K. (2022) PARP inhibition, a new therapeutic avenue in patients with prostate cancer. *Drugs.* **82**(7), 719–733.
 31. Spiegel J.O., van Houten B., Durrant J.D. (2021) PARP1: structural insights and pharmacological targets for inhibition. *DNA Repair* (Amst.). **103**, 103125.
 32. Dizdar O., Arslan C., Altundag K. (2015) Advances in PARP inhibitors for the treatment of breast cancer. *Exp. Opin. Pharmacother.* **16**, 2751–2758.
 33. Curtin N.J., Szabo C. (2020) Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 711–736.
 34. Schreiber V., Illuzzi G., Héberlé E., Dantzer F. (2015) From poly(ADP-ribose) discovery to PARP inhibitors in cancer therapy. *Bull. Cancer.* **102**, 863–873.
 35. Sim H.W., Galanis E., Khasraw M. (2022) PARP inhibitors in glioma: a review of therapeutic opportunities. *Cancers* (Basel). **14**, 1003.
 36. Sonnenblick A., de Azambuja E., Azim H.A., Piccart M. (2015) An update on PARP inhibitors—moving to the adjuvant setting. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12**, 27–41.
 37. Gibbs-Seymour I., Fontana P., Rack J.G.M., Ahel I. (2016) HPF1/C4orf27 is a PARP-1-interacting protein that regulates PARP-1 ADP-ribosylation activity. *Mol. Cell.* **62**, 432–442.
 38. Suskiewicz M.J., Zobel F., Ogden T.E.H., Fontana P., Ariza A., Yang J.C., Zhu K., Bracken L., Hawthorne W.J., Ahel D., Neuhaus D., Ahel I. (2020) HPF1 completes the PARP active site for DNA damage-induced ADP-ribosylation. *Nature.* **579**, 598.
 39. Bonfiglio J.J., Fontana P., Zhang Q., Colby T., Gibbs-Seymour I., Atanassov I., Bartlett E., Zaja R., Ahel I., Matic I. (2017) Serine ADP-ribosylation depends on HPF1. *Mol. Cell.* **65**, 932–940.
 40. Palazzo L., Leidecker O., Prokhorova E., Dauben H., Matic I., Ahel I. (2018) Serine is the major residue for ADP-ribosylation upon DNA damage. *Elife.* **7**, e34334.
 41. Leidecker O., Bonfiglio J.J., Colby T., Zhang Q., Atanassov I., Zaja R., Palazzo L., Stockum A., Ahel I., Matic I. (2016) Serine is a new target residue for endogenous ADP-ribosylation on histones. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 998–1000.
 42. Sun F.H., Zhao P., Zhang N., Kong L.L., Wong C.C.L., Yun C.H. (2021) HPF1 remodels the active site of PARP1 to enable the serine ADP-ribosylation of histones. *Nat. Commun.* **12**, 1028.
 43. Chambon P., Weill J.D., Mandel P. (1963) Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **11**, 39–43.
 44. Chambon P., Weill J.D., Doly J., Strosser M.T., Mandel P. (1966) On the formation of a novel adenylic compound by enzymatic extracts of liver nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **25**, 638–643.
 45. Fujimura S., Hasegawa S., Shimizu Y., Sugimura T. (1967) Polymerization of the adenosine 5'-diphosphate-ribose moiety of nicotinamide-adenine dinu-

- cleotide by nuclear enzyme. I. Enzymatic reactions. *Biochim. Biophys. Acta.* **145**, 247–259.
46. Sugimura T., Miwa M. (1994) Poly(ADP-ribose): historical perspective. *Mol. Cell. Biochem.* **138**, 5–12.
 47. Langelier M.F., Eisemann T., Riccio A.A., Pascal J.M. (2018) PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **53**, 187–198.
 48. Amé J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. (2004) The PARP superfamily. *BioEssays.* **26**, 882–893.
 49. Otto H., Reche P.A., Bazan F., Dittmar K., Haag F., Koch-Nolte F. (2005) *In silico* characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs). *BMC Genomics.* **6**, 139.
 50. Ferro A.M., Minaga T., Piper W.N., Kun E. (1978) Analysis of larger than tetrameric poly(adenosine diphosphoribose) by a radioimmunoassay in nuclei separated in organic solvents. *Biochim. Biophys. Acta.* **519**, 291–305.
 51. Hassa P.O., Haenni S.S., Elser M., Hottiger M.O. (2006) Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 789–829.
 52. Alemasova E.E., Lavrik O.I. (2019) Poly(ADP-ribosylation) by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins. *Nucleic Acids Res.* **47**, 3811–3827.
 53. Koh D.W., Dawson V.L., Dawson T.M. (2005) The road to survival goes through PARG. *Cell Cycle.* **4**, 397–399.
 54. Han S., Tainer J.A. (2001) The ARTT motif and a unified structural understanding of substrate recognition in ADP-ribosylating bacterial toxins and eukaryotic ADP-ribosyltransferases. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**, 523–529.
 55. Schreiber V., Dantzer F., Amé J.C., de Murcia G. (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 517–528.
 56. Pascal J.M., Ellenberger T. (2015) The rise and fall of poly(ADP-ribose): an enzymatic perspective. *DNA Repair (Amst.).* **32**, 10–16.
 57. Amé J.C., Rolli V., Schreiber V., Niedergang C., Apiou F., Decker P., Muller S., Höger T., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G. (1999) PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.* **274**, 17860–17868.
 58. Eisemann T., Pascal J.M. (2020) Poly(ADP-ribose) polymerase enzymes and the maintenance of genome integrity. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 19–33.
 59. Ghosh R., Roy S., Kamyab J., Dantzer F., Franco S. (2016) Common and unique genetic interactions of the poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 with DNA double-strand break repair pathways. *DNA Repair (Amst.).* **45**, 56–62.
 60. Ruf A., de Murcia J.M., de Murcia G.M., Schulz G.E. (1996) Structure of the catalytic fragment of poly(ADP-ribose) polymerase from chicken. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 7481–7485.
 61. Langelier M.F., Planck J.L., Roy S., Pascal J.M. (2012) Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1. *Science.* **336**, 728–732.
 62. Langelier M.F., Ruhl D.D., Planck J.L., Kraus W.L., Pascal J.M. (2010) The Zn3 domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction. *J. Biol. Chem.* **285**, 18877–18887.
 63. Langelier M.F., Planck J.L., Roy S., Pascal J.M. (2011) Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity. *J. Biol. Chem.* **286**, 10690–10701.
 64. Prokhorova E., Zobel F., Smith R., Zentout S., Gibbs-Seymour I., Schützenhofer K., Peters A., Groslambert J., Zorzini V., Agnew T., Brognard J., Nielsen M.L., Ahel D., Huet S., Suskiewicz M.J., Ahel I. (2021) Serine-linked PARP1 auto-modification controls PARP inhibitor response. *Nat. Commun.* **12**, 4055.
 65. Rudolph J., Muthurajan U.M., Palacio M., Mahadevan J., Roberts G., Erbse A.H., Dyer P.N., Luger K. (2021) The BRCT domain of PARP1 binds intact DNA and mediates intrastrand transfer. *Mol. Cell.* **81**, 4994–5006.
 66. Tao Z., Gao P., Liu H.W. (2009) Identification of the ADP-ribosylation sites in the PARP-1 automodification domain: analysis and implications. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 14258–14260.
 67. Obaji E., Haikarainen T., Lehtiö L. (2018) Structural basis for DNA break recognition by ARTD2/PARP2. *Nucleic Acids Res.* **46**, 12154–12165.
 68. Obaji E., Haikarainen T., Lehtiö L. (2016) Characterization of the DNA dependent activation of human ARTD2/PARP2. *Sci. Rep.* **6**, 34487.
 69. Rudolph J., Mahadevan J., Dyer P., Luger K. (2018) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 searches DNA via a “monkey bar” mechanism. *Elife.* **7**, e37818.
 70. Riccio A.A., Cingolani G., Pascal J.M. (2016) PARP-2 domain requirements for DNA damage-dependent activation and localization to sites of DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1691–1702.
 71. Sukhanova M.V., Abrakhi S., Joshi V., Pastre D., Kutuzov M.M., Anarbaev R.O., Curmi P.A., Hamon L., Lavrik O.I. (2015) Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribosylation) using high-resolution AFM imaging. *Nucleic Acids Res.* **44**, e60.
 72. Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Amé J.C., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Schreiber V., Lavrik O.I. (2013) Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins. *Biochimie.* **95**, 1208–1215.
 73. D'Silva I., Pelletier J.D., Lagueux J., D'Amours D., Chaudhry M.A., Weinfeld M., Lees-Miller S.P., Poirier G.G. (1999) Relative affinities of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-dependent protein kinase for DNA strand interruptions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1430**, 119–126.
 74. Langelier M.F., Riccio A.A., Pascal J.M. (2014) PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric

- regulatory mechanism shared with PARP-1. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7762–7775.
75. Cistulli C., Lavrik O.I., Prasad R., Hou E., Wilson S.H. (2004) AP endonuclease and poly(ADP-ribose) polymerase-1 interact with the same base excision repair intermediate. *DNA Repair* (Amst.). **3**, 581–591.
 76. Khodyreva S.N., Prasad R., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Kutuzov M.M., Liu Y., Hou E.W., Wilson S.H., Lavrik O.I. (2010) Apurinic/apyrimidinic (AP) site recognition by the 5'-dRP/AP lyase in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 22090–22095.
 77. Lavrik O.I., Prasad R., Sobol R.W., Horton J.K., Ackerman E.J., Wilson S.H. (2001) Photoaffinity labeling of mouse fibroblast enzymes by a base excision repair intermediate. Evidence for the role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in DNA repair. *J. Biol. Chem.* **276**, 25541–25548.
 78. Ménissier de Murcia J., Ricoul M., Tartier L., Niedergang C., Huber A., Dantzer F., Schreiber V., Amé J.C., Dierich A., LeMeur M., Sabatier L., Chambon P., de Murcia G. (2003) Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J.* **22**, 2255–2263.
 79. Nicolás L., Martínez C., Baró C., Rodríguez M., Baroja-Mazo A., Sole F., Flores J.M., Ampurdanés C., Dantzer F., Martín-Caballero J., Aparicio P., Yelamos J. (2010) Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-2 leads to rapid development of spontaneous T-cell lymphomas in p53-deficient mice. *Oncogene.* **29**, 2877–2883.
 80. Farrés J., Martín-Caballero J., Martínez C., Lozano J.J., Llacuna L., Ampurdanés C., Ruiz-Herguido C., Dantzer F., Schreiber V., Villunger A., Bigas A., Yelamos J. (2013) Parp-2 is required to maintain hematopoiesis following sublethal γ -irradiation in mice. *Blood.* **122**, 44–54.
 81. Farrés J., Llacuna L., Martín-Caballero J., Martínez C., Lozano J.J., Ampurdanés C., López-Contreras A.J., Florensa L., Navarro J., Ottina E., Dantzer F., Schreiber V., Villunger A., Fernández-Capetillo O., Yelamos J. (2015) PARP-2 sustains erythropoiesis in mice by limiting replicative stress in erythroid progenitors. *Cell Death Differ.* **22**, 1144–1157.
 82. Alemasova E.E., Naumenko K.N., Kurgina T.A., Anarbaev R.O., Lavrik O.I. (2018) The multifunctional protein YB-1 potentiates PARP1 activity and decreases the efficiency of PARP1 inhibitors. *Oncotarget.* **9**, 23349–23365.
 83. Naumenko K.N., Sukhanova M.V., Hamon L., Kurgina T.A., Alemasova E.E., Kutuzov M.M., Pastré D., Lavrik O.I. (2020) Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity by Y-box-binding protein 1. *Biomolecules.* **10**, 1325.
 84. Sun X., Fu K., Hodgson A., Wier E.M., Wen M.G., Kamenyeva O., Xia X., Koo L.Y., Wan F. (2016) Sam68 is required for DNA damage responses via regulating poly(ADP-ribosylation). *PLoS Biol.* **14**, e1002543.
 85. Sukhanova M.V., Singatulina A.S., Pastré D., Lavrik O.I. (2020) Fused in sarcoma (FUS) in DNA repair: tango with poly(ADP-ribose) polymerase 1 and compartmentalisation of damaged DNA. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 7020.
 86. Obaji E., Maksimainen M.M., Galera-Prat A., Lehtiö L. (2021) Activation of PARP2/ARTD2 by DNA damage induces conformational changes relieving enzyme autoinhibition. *Nat. Commun.* **12**, 3479.
 87. Dawicki-McKenna J.M., Langelier M.F., DeNizio J.E., Riccio A.A., Cao C.D., Karch K.R., McCauley M., Steffen J.D., Black B.E., Pascal J.M. (2015) PARP-1 activation requires local unfolding of an autoinhibitory domain. *Mol. Cell.* **60**, 755–768.
 88. Langelier M.F., Pascal J.M. (2013) PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 134–143.
 89. Ogden T.E.H., Yang J.C., Schimpl M., Easton L.E., Underwood E., Rawlins P.B., McCauley M.M., Langelier M.F., Pascal J.M., Embrey K.J., Neuhaus D. (2021) Dynamics of the HD regulatory subdomain of PARP-1; substrate access and allostery in PARP activation and inhibition. *Nucleic Acids Res.* **49**, 2266–2288.
 90. Bauer P.I., Buki K.G., Hakam A., Kun E. (1990) Macromolecular association of ADP-ribosyltransferase and its correlation with enzymic activity. *Biochem. J.* **270**, 17–26.
 91. Eustermann S., Videler H., Yang J.C., Cole P.T., Gruszka D., Veprintse D., Neuhaus D. (2011) The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger. *J. Mol. Biol.* **407**, 149–170.
 92. Buki K.G., Bauer P.I., Hakam A., Kun E. (1995) Identification of domains of poly(ADP-ribose) polymerase for protein binding and self-association. *J. Biol. Chem.* **270**, 3370–3377.
 93. Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Moor N.A., Lavrik O.I. (2019) Dynamic light scattering study of base excision DNA repair proteins and their complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1867**, 297–305.
 94. Panzeter P.L., Althaus F.R. (1994) DNA strand break-mediated partitioning of poly(ADP-ribose) polymerase function. *Biochemistry.* **33**, 9600–9605.
 95. Pion E., Ullmann G.M., Amé J.C., Gérard D., de Murcia G., Bombarda E. (2005) DNA-induced dimerization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 triggers its activation. *Biochemistry.* **44**, 14670–14681.
 96. Li P., Zhen Y., Yu Y. (2019) Site-specific analysis of the Asp- and Glu-ADP-ribosylated proteome by quantitative mass spectrometry. *Methods Enzymol.* **626**, 301–321.
 97. Zhang Y., Wang J., Ding M., Yu Y. (2013) Site-specific characterization of the Asp- and Glu-ADP-ribosylated proteome. *Nat. Methods.* **10**, 981–984.
 98. Martello R., Leutert M., Jungmichel S., Bilan V., Larsen S.C., Young C., Hottiger M.O., Nielsen M.L. (2016) Proteome-wide identification of the endogenous ADP-ribosylome of mammalian cells and tissue. *Nat. Commun.* **7**, 12917.
 99. Gaullier G., Roberts G., Muthurajan U.M., Bowerman S., Rudolph J., Mahadevan J., Jha A., Rae P.S., Luger K. (2020) Bridging of nucleosome-proximal

- DNA double-strand breaks by PARP2 enhances its interaction with HPF1. *PLoS One*. **15**, e0240932.
100. Rudolph J., Roberts G., Luger K. (2021) Histone PARylation factor 1 contributes to the inhibition of PARP1 by cancer drugs. *Nat. Commun.* **12**, 736.
 101. Bilokapic S., Suskiewicz M.J., Ahel I., Halic M. (2020) Bridging of DNA breaks activates PARP2-HPF1 to modify chromatin. *Nature*. **585**, 609–613.
 102. Rudolph J., Roberts G., Muthurajan U.M., Luger K. (2021) HPF1 and nucleosomes mediate a dramatic switch in activity of PARP1 from polymerase to hydrolase. *Elife*. **10**, e65773.
 103. Marsischky G.T., Wilson B.A., Collier R.J. (1995) Role of glutamic acid 988 of human poly-ADP-ribose polymerase in polymer formation: evidence for active site similarities to the ADP-ribosylating toxins. *J. Biol. Chem.* **270**, 3247–3254.
 104. Dodson G., Wlodawer A. (1998) Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 347–352.
 105. Kurgina T.A., Moor N.A., Kutuzov M.M., Naumenko K.N., Ukrainsev A.A., Lavrik O.I. (2021) Dual function of HPF1 in the modulation of PARP1 and PARP2 activities. *Commun. Biol.* **4**, 1259.
 106. Langelier M.F., Billur R., Sverzhinsky A., Black B.E., Pascal J.M. (2021) HPF1 dynamically controls the PARP1/2 balance between initiating and elongating ADP-ribose modifications. *Nat. Commun.* **12**, 6675.
 107. Desmarais Y., Ménard L., Lagueux J., Poirier G.G. (1991) Enzymological properties of poly(ADP-ribose)polymerase: characterization of automodification sites and NADase activity. *Biochim. Biophys. Acta*. **1078**, 179–186.
 108. Mortusewicz O., Amé J.C., Schreiber V., Leonhardt H. (2007) Feedback-regulated poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7665–7675.
 109. Lin X., Jiang W., Rudolph J., Lee B.J., Luger K., Zha S. (2022) PARP inhibitors trap PARP2 and alter the mode of recruitment of PARP2 at DNA damage sites. *Nucleic Acids Res.* **50**, 3958–3973.
 110. Crawford K., Bonfiglio J.J., Mikoč A., Matic I., Ahel I. (2018) Specificity of reversible ADP-ribosylation and regulation of cellular processes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **53**, 64–82.
 111. Uchida K., Suzuki H., Maruta H., Abe H., Aoki K., Miwa M., Tanuma S.-I. (1993) Preferential degradation of protein-bound (ADP-ribose), by nuclear poly(ADP-ribose) glycohydrolase from human placenta. *J. Biol. Chem.* **268**, 3194–3200.
 112. Hendriks I.A., Buch-Larsen S.C., Prokhorova E., Elsborg J.D., Rebak A.K.L.F.S., Zhu K., Ahel D., Lukas C., Ahel I., Nielsen M.L. (2021) The regulatory landscape of the human HPF1- and ARH3-dependent ADP-ribosylome. *Nat. Commun.* **12**, 5893.
 113. Sharifi R., Morra R., Appel C.D., Tallis M., Chioza B., Jankevicius G., Simpson M.A., Matic I., Ozkan E., Golia B., Schellenberg M.J., Weston R., Williams J.G., Rossi M.N., Galehdari H., Krahn J., Wan A., Trembath R.C., Crosby A.H., Ahel D., Hay R., Ladurner A.G., Timinszky G., Williams R.S., Ahel I. (2013) Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease. *EMBO J.* **32**, 1225–1237.
 114. Mashimo M., Kato J., Moss J. (2014) Structure and function of the ARH family of ADP-ribosyl-acceptor hydrolases. *DNA Repair*. **23**, 88–94.
 115. Oka S., Kato J., Moss J. (2006) Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J. Biol. Chem.* **281**, 705–713.
 116. Fontana P., Bonfiglio J.J., Palazzo L., Bartlett E., Matic I., Ahel I. (2017) Serine ADP-ribosylation reversal by the hydrolase ARH3. *Elife*. **6**, e28533.
 117. Abplanalp J., Leutert M., Frugier E., Nowak K., Feurer R., Kato J., Kistemaker H.V.A., Filippov D.V., Moss J., Caflisch A., Hottiger M.O. (2017) Proteomic analyses identify ARH3 as a serine mono-ADP-ribosylhydrolase. *Nat. Commun.* **8**, 2055.
 118. Slade D., Dunstan M.S., Barkauskaite E., Weston R., Lafite P., Dixon N., Ahel M., Leys D., Ahel I. (2011) The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Nature*. **477**, 616–622.
 119. Huang H., Lin S., Garcia B.A., Zhao Y. (2015) Quantitative proteomic analysis of histone modifications. *Chem. Rev.* **115**, 2376.
 120. Seibert M., Krüger M., Watson N.A., Sen O., Daum J.R., Slotman J.A., Braun T., Houtsmuller A.B., Gorbisky G.J., Jacob R., Kracht M., Higgins J.M.G., Schmitz M.L. (2019) CDK1-mediated phosphorylation at H2B serine 6 is required for mitotic chromosome segregation. *J. Cell Biol.* **218**, 1164.
 121. Hendzel M.J., Wei Y., Mancini M.A., van Hooser A., Ranalli T., Brinkley B.R., Bazett-Jones D.P., Allis C.D. (1997) Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*. **106**, 348–360.
 122. Hananya N., Daley S.K., Bagert J.D., Muir T.W. (2021) Synthesis of ADP-ribosylated histones reveals site-specific impacts on chromatin structure and function. *J. Am. Chem. Soc.* **143**, 10847–10852.
 123. Sawicka A., Hartl D., Goiser M., Pusch O., Stocsits R.R., Tamir I.M., Mechtler K., Seiser C. (2014) H3S28 phosphorylation is a hallmark of the transcriptional response to cellular stress. *Genome Res.* **24**, 1808.
 124. Cheung P., Tanner K.G., Cheung W.L., Sassone-Corsi P., Denu J.M., Allis C.D. (2000) Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol. Cell*. **5**, 905–915.
 125. Clayton A.L., Mahadevan L.C. (2003) MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation. *FEBS Lett.* **546**, 51–58.
 126. Simboeck E., Sawicka A., Zupkovitz G., Senese S., Winter S., Dequiedt F., Ogris E., di Croce L., Chiocca S., Seiser C. (2010) A phosphorylation switch regulates the transcriptional activation of cell cycle regulator p21 by histone deacetylase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **285**, 41062–41073.
 127. Liszczak G., Diehl K.L., Dann G.P., Muir T.W. (2018) Acetylation blocks DNA damage-induced

- chromatin ADP-ribosylation. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 837–840.
128. Miller K.M., Tjeertes J.V., Coates J., Legube G., Polo S.E., Britton S., Jackson S.P. (2010) Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1144–1151.
 129. Mao Z., Hine C., Tian X., van Meter M., Au M., Vaidya A., Seluanov A., Gorbunova V. (2011) SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science*. **332**, 1443–1446.
 130. Michishita E., McCord R.A., Berber E., Kioi M., Padilla-Nash H., Damian M., Cheung P., Kusumoto R., Kawahara T.L.A., Barrett J.C., Chang H.Y., Bohr V.A., Ried T., Gozani O., Chua K.F. (2008) SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*. **452**, 492.
 131. Tjeertes J.V., Miller K.M., Jackson S.P. (2009) Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. *EMBO J.* **28**, 1878–1889.
 132. Maluchenko N.V., Sultanov D.S., Kotova E.Y., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. (2019) Histone tails promote PARP1-dependent structural rearrangements in nucleosomes. *Dokl. Biochem. Biophys.* **489**, 377–379.
 133. Maluchenko N.V., Nilov D.K., Pushkarev S.V., Kotova E.Y., Gerasimova N.S., Kirpichnikov M.P., Langelier M.-F., Pascal J.M., Akhtar M.S., Feofanov A.V., Studitsky V.M. (2021) Mechanisms of nucleosome reorganization by PARP1. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12127.
 134. Kotova E.Y., Hsieh F.-K., Chang H.-W., Maluchenko N.V., Langelier M.-F., Pascal J.M., Luse D.S., Feofanov A.V., Studitsky V.M. (2022) Human PARP1 facilitates transcription through a nucleosome and histone displacement by Pol II *in vitro*. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 7107.

Poly(ADP-ribose)polymerases 1 and 2: Classical Functions and Interaction with HPF1 – New Histone Poly(ADP-ribosyl)ation Factor

T. A. Kurgina¹ and O. I. Lavrik^{1, 2, *}

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences (ICBFM SB RAS), Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Poly(ADP-ribose) (PAR) is a negatively charged polymer, linear and branched, consisting of ADP-ribose monomers. This polymer is synthesized by poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) enzymes which are activated on DNA damage and use nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) as a substrate. The most studied members of the PARP family, PARP1 and PARP2, are the most important nuclear proteins involved in many cellular processes, including the regulation of DNA repair. PARP1 and PARP2 catalyze both the synthesis and transfer of poly(ADP-ribose) to amino acid residues of target proteins, including autoPARylation. In view of the key role in the regulation of the DNA repair process, PARP1 and PARP2 are promising targets for chemotherapy. Recently, a novel histone PARylation factor (HPF1) has been discovered to modulate PARP1/2 activity by forming a transient joint active site with PARP1/2. In the presence of HPF1, histone modification occurs at serine residues. The general mechanism of interaction between HPF1 and PARP1/2 is only beginning to be elucidated. In this review, we consider the discovery and classical mechanism of this important process in higher eukaryotes, as well as the role of a new histone PARylation factor in this HPF1 process.

Keywords: poly(ADP-ribosyl)ation, PARylation, PARP1, PARP2, poly(ADP-ribose), HPF1, histones

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ: ОТ РЕПАРАЦИИ ДНК ДО МЕТАБОЛОМИКИ

УДК 577.151.4

МЕХАНИЗМЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9 В ГЕНОМНОМ РЕДАКТИРОВАНИИ

© 2023 г. Л. М. Кулишова^а, И. П. Вохтанцев^а, Д. В. Ким^{а, б}, Д. О. Жарков^{а, б, *}

^аИнститут химической биологии и фундаментальной медицины, Сибирское отделение Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

^бНовосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 15.08.2022 г.

После доработки 03.10.2022 г.

Принята к публикации 06.10.2022 г.

Не так давно открытая система CRISPR/Cas9, основанная на действии комплементарно адресуемых нуклеаз и изначально предназначенная для защиты бактерий от чужеродных генетических элементов, стала удобным инструментом в руках ученых для манипуляции геномами живых клеток. Технология геномного редактирования CRISPR/Cas9 вышла за пределы лаборатории и уже находит применение в биотехнологии и сельском хозяйстве. Однако использование этого метода для редактирования клеток человека в медицинских целях ограничено внеадресной активностью системы CRISPR/Cas9, которая может привести к появлению онкогенных мутаций. В связи с этим ведутся активные исследования с целью разработки вариантов системы CRISPR/Cas9 с повышенной точностью. В обзоре освещены механизмы точного и ошибочного действия рибонуклеопротеина Cas9, природные и искусственно созданные варианты РНК-адресуемых нуклеаз, способы модуляции специфичности за счет модификации направляющей РНК и другие подходы к увеличению точности системы CRISPR/Cas9 в геномном редактировании.

Ключевые слова: геномное редактирование, CRISPR/Cas9, белок Cas9, субстратная специфичность, белковая инженерия, мутации, неадресные эффекты редактирования

DOI: 10.31857/S0026898423020155, **EDN:** EFDQPQ

В связи с огромным интересом к редактированию генома с помощью технологии CRISPR/Cas9 (англ. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated protein 9; сгруппированные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками/CRISPR-ассоциированный белок-9) большое внимание в настоящее время уделяется различ-

ным аспектам специфичности этой системы, которая дает возможность точного редактирования генома – внесения специфичных замен путем гомологичной рекомбинации с низким фоном негомологичного соединения концов. Технологию CRISPR/Cas9 активно используют для создания клеточных линий, моделирующих заболевания, и рассматривают потенциал ее применения для терапевтического вмешательства в геном человека. Однако для этого необходимо снизить неадресное действие системы, в идеале – до такого значения, которое не превышало бы нормальный уровень мутаций ДНК в клетках человека ($\sim 10^{-10}$ мутаций на пару нуклеотидов на одно клеточное деление) [1–3].

Белок Cas9 (в дальнейшем, если нет дополнительных уточнений, рассматривается Cas9 из *Streptococcus pyogenes*, SpCas9) состоит из нескольких доменов и обладает РНК-зависимой ДНК-эндонуклеазной активностью, локализованной в двух из них: HNH-домене (домен, содержащий высококонсервативные остатки His–Asn–His), который расщепляет цепь ДНК, комплементарную направляющей РНК (адресуемая цепь), и

Сокращения: CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated protein 9) – сгруппированные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками/CRISPR-ассоциированный белок-9; sgРНК – CRISPR-РНК; e-sgРНК (англ. enhanced) – улучшенные sgРНК; gРНК – направляющая РНК; HDR (Homology-Directed Recombination) – гомологичная рекомбинация; HNH-домен – домен, содержащий высококонсервативные остатки His–Asn–His; iCas9 – индуцируемый белок Cas9; NHEJ (Non-Homologous End Joining) – воссоединение негомологичных концов; PAM (Protospacer-Adjacent Motif) – мотив, соседний с протоспейсером; REC2, REC3 (REcognition domain) – узнающие домены 2 и 3; RNP (RiboNucleoProtein) – рибонуклеопротеиновый комплекс; sgРНК – единая направляющая РНК; tracrРНК – транскрибирующая CRISPR-РНК; TAL (Transcription Activator-Like) – подобные активаторам транскрипции.

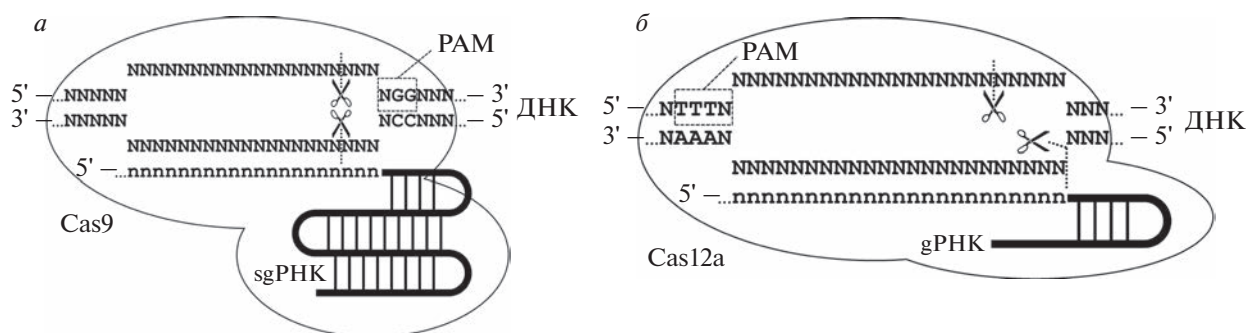


Рис. 1. Схема организации фермент-субстратных комплексов РНК-адресуемых нуклеаз Cas9 (а) и Cas12a (б).

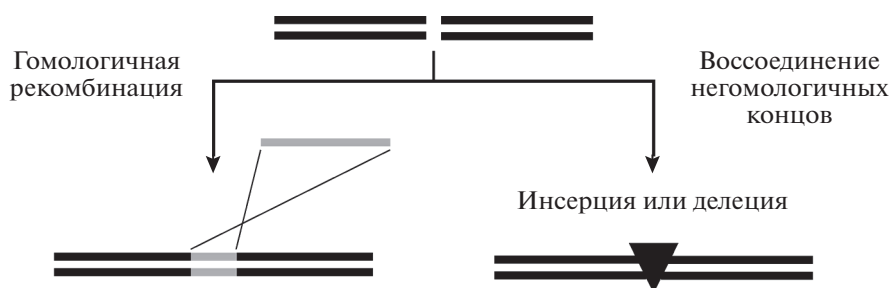


Рис. 2. Пути репарации двухцепочечного разрыва в клетках с образованием точной замены (гомологичная рекомбинация) или инсерции/делеции (воссоединение нехомологичных концов). Донор генетического материала для гомологичной рекомбинации обозначен серым цветом.

RuvC-подобном домене, гидролизующем цепь ДНК, совпадающую с последовательностью направляющей РНК (неадресуемая цепь) [4, 5]. Для расщепления ДНК необходимо наличие в ней протоспейсера — участка двухцепочечной ДНК (дцДНК), одна из цепей которой образует комплементарные связи с направляющей РНК, и примыкающего непосредственно к протоспейсеру мотива 5'-NGG-3' (PAM, англ. Protospacer-Adjacent Motif) (рис. 1а).

В природе действие Cas9 адресуется короткой направляющей CRISPR-РНК (crРНК), а для каталитической активности необходима трансактивирующая CRISPR-РНК (tracrРНК). Для применения в геномном редактировании зачастую эти две РНК интегрируют в единую направляющую РНК (далее использованы аббревиатуры: sgРНК для единой направляющей РНК и gРНК для направляющей РНК вне зависимости от ее природы). sgРНК содержит вариабельный участок узнавания целевой последовательности (20 нуклеотидов для SpCas9) и минимально необходимый фрагмент tracrРНК. Рибонуклеопротеиновый комплекс (RNP, англ. RiboNucleoProtein) Cas9 расщепляет обе цепи ДНК между третьим и четвертым нуклеотидами с 5'-стороны от PAM [4, 5]. Образовавшийся двухцепочечный разрыв далее подвергается репарации клеточными системами гомологичной рекомбинации (HDR, англ.

Homology-Directed Recombination) или воссоединения нехомологичных концов (NHEJ, англ. Non-Homologous End Joining) [6, 7]. В первом случае при наличии подходящего донора генетической информации редактирование приводит к точной замене исходной последовательности на донорную, а во втором обычно происходят небольшие делеции или инсерции на месте разрыва (рис. 2).

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОШИБОЧНОГО ДЕЙСТВИЯ БЕЛКА Cas9

Несмотря на кажущуюся простоту и специфичность комплементарной адресации нуклеазы Cas9 при помощи направляющих РНК, в первых попытках редактирования клеток человека система CRISPR/Cas9 оказалась недостаточно специфичной, так как вносила в геном множественные неадресные изменения [8–11]. В работах по определению основных детерминант комплементарной специфичности комплекса Cas9–РНК показано, что 6–8 пар оснований ДНК-мишени, ближайших к PAM, как правило, должны точно соответствовать последовательности gРНК, однако в условиях избытка фермента это требование становится менее жестким [12, 13]. Исчерпывающий анализ последствий наличия однонуклеотидных несоответствий (мисматчей) между

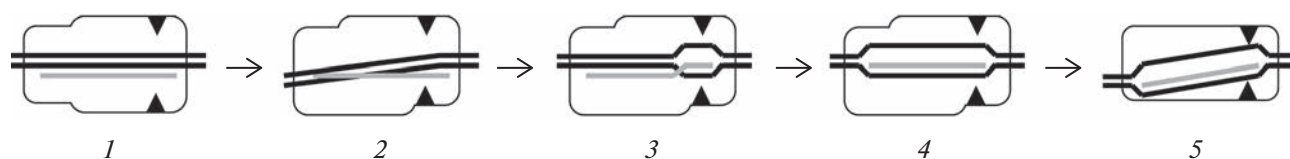


Рис. 3. Схема многоэтапного узнавания субстрата рибонуклеопротеином Cas9. ДНК обозначена черными линиями, РНК – серой. (1) – узнавание РАМ и образование первичного комплекса; (2) – конформационное изменение фермента и изгибание ДНК вблизи от РАМ, облегчающее раскрытие дуплекса; (3) – образование гетеродуплекса в затравочной области, при наличии в затравочной области мисматча этот шаг не реализуется; (4) – образование полного гетеродуплекса с ДНК-мишенью; (5) – изгибание гетеродуплекса с образованием дополнительных связей с белком, приводящих активные центры доменов HNH и RuvC (обозначены треугольниками) в контакт с расщепляемыми фосфодиэфирными связями, при наличии мисматча в дальней от РАМ области этот шаг не реализуется.

несколькими sgРНК и ДНК-мишенью в клеточных линиях HEK293 и K562 подтвердил, что нуклеаза Cas9 менее чувствительна к мисматчам в дальней от РАМ области по сравнению с расположенными вблизи РАМ [9, 10]. Чувствительность к единичным заменам максимальна в пределах 8–14 нуклеотидов, ближайших к РАМ. Эта область, определяющая специфичность узнавания, получила название “затравочной последовательности” (seed sequence). Впоследствии методами одномолекулярной микроскопии удалось установить, что при узнавании ДНК-мишени в затравочной последовательности быстро образуется гетеродуплекс, и, если он стабилен, комплементарные связи РНК–ДНК распространяются далее по всему узнаваемому участку [14]. Однако оказалось, что мисматчи разных типов влияют на специфичность системы в разной степени. При детальном анализе 11 дополнительных локусов генома обнаружили многочисленные исключения из принципа полной комплементарности затравочной последовательности: толерантность к мисматчам варьировала в зависимости от конкретной пары оснований, при этом мисматчи гС:дС сильнее всего снижали нуклеазную активность Cas9 [10].

Последствия множественных мисматчей между gРНК и ДНК-мишенью также исследовали как в отношении числа мисматчей в последовательности, так и их взаимного расположения [9]. Выяснилось, что ключевым фактором для потери активности Cas9 служит число мисматчей, но также важно их непосредственное соседство и близость к РАМ. Два, а тем более три мисматча, особенно в прилегающей к РАМ области, значительно снижают активность Cas9 независимо от их взаимного расположения, но при удалении от РАМ наибольшее влияние оказывают соседние друг с другом мисматчи. Однако в редких случаях фермент Cas9 способен продуктивно узнавать последовательности, содержащие до 7 мисматчей [15].

На основании недавно определенных структур Cas9 в комплексе с ДНК и РНК, отражающих разные стадии узнавания субстрата, стало возмож-

ным установить структурные особенности динамического процесса узнавания при точном и неточном соответствии gРНК и ДНК-мишени [16, 17] (рис. 3). Связываясь с дцДНК, комплекс Cas9–sgРНК изгибает ее примерно на 50°, что приводит к выворачиванию из дуплекса трех оснований, непосредственно прилегающих к РАМ. Образование гетеродуплекса в этом участке оказывается достаточным для дальнейшего раскрытия дцДНК. При наличии 3-нуклеотидного мисматча в центральной части ДНК-мишени гетеродуплекс образуется полностью, но такого изгиба не происходит, что не позволяет HNH-домену занять положение, необходимое для катализа. Однако ДНК, содержащая 3-нуклеотидный мисматч в удаленных от РАМ участках, способна изгибаться и тем самым индуцировать каталитически компетентную конформацию Cas9. Это обусловлено наличием в гетеродуплексе позиций, не образующих связей с белком в промежуточных конформациях, предшествующих образованию каталитически компетентного фермент-субстратного комплекса.

Кроме мисматчей потенциальным источником неадресного узнавания служит возможность комплементарных взаимодействий с образованием небольших петель. При исчерпывающем анализе влияния инсерций и делеций в sgРНК на нуклеазную активность Cas9 оказалось, что система толерантна к ДНК-выпетливаниям размером в 1 нуклеотид и к РНК-выпетливаниям до 4 нуклеотидов длиной, причем степень толерантности зависит от положения лишних нуклеотидов относительно РАМ [18].

Анализ влияния нуклеотидных замен в РАМ выявил, что при замене последовательности NGG на NAG или NGA сохраняется до 20% нуклеазной активности Cas9 [10, 19], а для РАМ NGT активность составляет около 10% [20]. Способность Cas9 расщеплять мишени вблизи неканонических РАМ впоследствии была подтверждена данными по полногеномному секвенированию после трансфекции клеток человека библиотеками sgРНК [21]. Как известно, метилирование ДНК не влияет на активность Cas9, поэтому спо-

способность фермента узнавать неканонические РАМ ведет к тому, что потенциально адресуемые участки в среднем встречаются 1 раз на 4 п.н. генома человека [10].

Наблюдаемый уровень неадресных изменений генома вполне приемлем для исследований потери функции генов на эукариотических клеточных линиях [22–25]. В этих случаях клетки обычно трансфицируют конструкциями на основе вирусных векторов, экспрессирующих Cas9 и sgРНК на низком уровне — вплоть до 1 конструкции на клетку. В одном из широкомасштабных анализов Cas9-опосредованных нокаутов генов в клетках млекопитающих [22] уровень расщепления в локусе-мишени составил 97%, а в 13 потенциальных неадресных участках, отличающихся от мишени не более чем на 3 п.н., — менее 2.5%. Единственный сайт с высоким уровнем неадресного расщепления был полностью комплементарен sgРНК по 8 п.н., прилегающим к РАМ. Подобные сайты встречаются с частотой ~2 на геном человека и почти всегда находятся в некодирующей ДНК [22].

ПОДБОР САЙТОВ-МИШЕНЕЙ *in silico* ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ТОЧНОСТИ РЕДАКТИРОВАНИЯ

Одним из первых шагов для повышения точности геномного редактирования стало создание компьютерных алгоритмов для выбора последовательности gРНК, поскольку вероятность неадресных изменений можно с некоторой точностью предсказать, исходя из экспериментально установленного влияния мисматчей на активность системы CRISPR/Cas9. В целом, gРНК должны направлять белок Cas9 к такой мишени, последовательность которой имеет минимальное сходство с другими участками генома, а похожие на нее участки либо не находятся рядом с РАМ, либо отличаются от адресной последовательности в ближней к РАМ части. Применение алгоритмов первого поколения сразу же позволило повысить специфичность редактирования на 50% [10]. Более современные алгоритмы учитывают энергию образования гетеродуплексов ДНК/РНК [26]. К настоящему времени создано несколько десятков программ для предсказания наиболее выгодных последовательностей-мишеней [27, 28].

Новое поколение подходов к селекции мишеней стало возможно после разработки эффективных и быстрых методов детекции неадресных мутаций во всем геноме. В первых исследованиях применялось глубокое полногеномное секвенирование, позволяющее в том числе отличать индивидуальные вариации генома от неадресных мутаций. Специально адаптированный для выявления сайтов неадресного редактирования метод Digenome-Seq основан на полногеномном секве-

нировании исходной и отредактированной ДНК после ее расщепления Cas9 с нужной gРНК [29]. Однако разработаны и многочисленные менее затратные методы, комбинирующие захват, фиксацию, амплификацию и секвенирование именно измененных участков генома: BLESS [30], NTGTS [31], GUIDE-Seq [15], SITE-Seq [32], CircleSeq [33], CHANGE-seq [34] и другие. Большие наборы данных, получаемые из таких экспериментов, позволили использовать методы машинного обучения для предсказания неадресных модификаций и оптимизации подбора сайтов-мишеней [34–36]. Накопленные экспериментальные данные для различных видов живых организмов: человека, мыши, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* и многих других — позволяют учитывать видоспецифичные паттерны неадресных изменений для дальнейшего повышения точности геномного редактирования [37–41].

Аналогичным образом в алгоритмах второго поколения были использованы данные по иммунопреципитации каталитически неактивного Cas9 (D10A H840A; dCas9) с последующим высокопараллельным секвенированием связанных фрагментов геномной ДНК [11, 42–44]. Хотя специфичность связывания dCas9 не вполне точно отражает специфичность расщепления активным ферментом, такие алгоритмы успешно используют в дизайне последовательностей gРНК для регуляции транскрипции, эпигенетической модификации, редактирования оснований и прайм-редактирования, где направляющий модуль представляет собой каталитически неактивную форму Cas9 [45–49]. В новых вариантах алгоритмов машинного обучения для редактирования оснований используют непосредственно данные по адресным и неадресным мутациям из полногеномного секвенирования [50].

ВАРИАНТЫ Cas9 С ПОВЫШЕННОЙ ТОЧНОСТЬЮ

В свете описанных проблем со специфичностью внесения двухцепочечных разрывов нуклеазой Cas9 практически сразу начались попытки модификации фермента для повышения точности системы. Первая использованная стратегия связана с применением Cas9-никаз и по сути аналогична популярной схеме применения химерных белков, сочетающих домены узнавания на основе цинковых пальцев или TAL-эффлекторов (англ. Transcription Activator-Like; подобные активаторам транскрипции) и димеризующийся эндонуклеазный домен рестриктазы FokI [51]. Замены D10A в домене RuvC или H840A в домене HNH превращают Cas9 в никаз, которые вносят в ДНК только одноцепочечные разрывы. При использовании Cas9-никаз с двумя правильно подобранными gРНК можно получать два близко

Таблица 1. Генно-инженерные варианты Cas9 из *Streptococcus pyogenes* с повышенной специфичностью

Название	Принцип создания	Замены по сравнению с SpCas9 дикого типа	Ссылка
eSpCas(1.0)	Рациональный дизайн: дестабилизация электростатических контактов ДНК с белком	K810A K1003A R1060A	[69]
eSpCas(1.1)	Рациональный дизайн: дестабилизация электростатических контактов ДНК с белком	K848A K1003A R1060A	[69]
SpCas9-HF1	Рациональный дизайн: дестабилизация водородных связей ДНК с белком	N497A R661A Q695A Q926A	[70]
HypaCas9	Рациональный дизайн: облегчение конформационной коррекции в ходе узнавания субстрата	N692A M694A Q695A H698A	[71]
SuperFi-Cas9	Рациональный дизайн: дестабилизация комплекса белка с гетеродуплексом, содержащим мисматчи	Y1010D Y1013D Y1016D V1018D R1019D Q1027D K1031D	[16]
evoCas9	Направленная эволюция: селекция на адресную инактивацию токсичного гена и отсутствие неадресной инактивации геномного локуса в дрожжах	M495V Y515N K526E R661Q	[72]
Sniper-Cas9	Направленная эволюция: селекция на адресную инактивацию токсичного гена и отсутствие неадресной инактивации геномного локуса в <i>Escherichia coli</i>	F539S M763I K890N	[73]
HiFi Cas9	Направленная эволюция: селекция на адресную инактивацию токсичного гена и отсутствие неадресной инактивации геномного локуса в <i>E. coli</i>	R691A	[74]
xCas9-3.6	Рациональный дизайн: расширение спектра узнаваемых PAM, увеличение специфичности как побочный эффект	E108G S217A A262T S409I E480K E543D M694I E1219V	[20]
xCas9-3.7	Рациональный дизайн: расширение спектра узнаваемых PAM, увеличение специфичности как побочный эффект	A262T R324L S409I E480K E543D M694I E1219V	[20]

расположенных одноцепочечных разрыва, которые вместе дадут двухцепочечный; при этом специфичность его образования будет значительно повышена из-за необходимости одновременного узнавания двух последовательностей. Увеличение специфичности в случае применения парных комплексов Cas9 D10A–gРНК составляет около 2 порядков для клеточной линии НЕК-293FT [52], а в ряде исследований находится ниже уровня детекции [13, 53, 54]. На практике этот подход был использован, в частности, для получения особей крупного рогатого скота с точечной заменой в гене *NRAMP1*, придающей врожденный иммунитет к туберкулезу [55]. Известны также попытки использовать химерную конструкцию dCas9–FokI [56–58]. В клетках НЕК293 специфичность такого белка была в 140 раз выше, чем Cas9, и в 1.3–8.8 превосходила пару Cas9–никаз.

Установление пространственной структуры эндонуклеазы Cas9 и ее комплексов с ДНК и РНК, в том числе разных конформеров, образуемых в ходе узнавания мишени [16, 17, 59–68], позволило применить для повышения специфичности фермента методы рационального дизайна (табл. 1). При сканирующем аланиновом мутагенезе ДНК-связывающего канала Cas9 было получено 11 вариантов с улучшенной специфичностью, которая, по всей видимости, объясняется уменьшением вклада ДНК-белковых контактов в стабилизацию комплекса Cas9–gРНК–ДНК и соответствующим увеличением вклада комплементарных взаимодействий ДНК–РНК [69]. Скрининг комбинаторной библиотеки этих замен позволил идентифицировать варианты с сохранившейся активностью и повышенной специфичностью: eSpCas(1.0) (K810A K1003A R1060A) и

eSpCas(1.1) (K848A K1003A R1060A). Они не вносили нецелевых изменений в 22 из 24 предсказанных наиболее вероятных неадресных сайтов и были чувствительны к единственному мисматчу в gPНК за пределами затравочной последовательности [69].

Аналогичный подход был использован для повышения специфичности Cas9 за счет дестабилизации водородных связей между белком и ДНК. В структуре комплекса есть 4 водородных связи между фосфатами ДНК-мишени и остатками Asn497, Arg661, Gln695 и Gln926. Скрининг библиотеки, содержащей варианты с заменой четырех этих остатков на Ala во всех возможных комбинациях, привел к обнаружению высокоспецифичных вариантов: R661A Q695A Q926A и N497A R661A Q695A Q926A (SpCas9-HF1) [70]. Частоты нецелевых мутаций, индуцированных SpCas9-HF1, в 34 из 36 предсказанных неадресных сайтов были статистически неотличимы от фонового уровня.

Первоначально предполагали, что замена остатков, находящихся на ДНК-белковом интерфейсе, приводит в целом к снижению аффинности связывания Cas9 с ДНК. Однако более детальные исследования с использованием динамического ферстеровского резонансного переноса энергии не подтвердили эту гипотезу [71]. Оказалось, что повышение специфичности связано с механизмом “конформационной коррекции” (conformational proofreading) в ходе последовательных изменений пространственной ориентации доменов REC3 (англ. RECognition domain 3; узнающий домен-3), REC2 и HNH при связывании фермента с субстратом (рис. 3). Домен REC3 действует как аллостерический эффектор, который узнает гетеродуплекс РНК/ДНК, чтобы обеспечить активацию нуклеазного домена HNH, а домен REC2 препятствует доступу каталитических остатков к гидролизуемым фосфодиэфирным связям при наличии мисматчей [16, 71]. На основе этих экспериментов был сконструирован вариант НураCas9 (N692A M694A Q695A H698A) с мутациями в домене REC3, более специфичный по сравнению даже с eSpCas(1.1) и SpCas9-HF1 при схожей эффективности [71]. Другой вариант, SuperFi-Cas9 (Y1010D Y1013D Y1016D V1018D R1019D Q1027D K1031D), в котором все аминокислотные остатки, стабилизирующие комплекс с мисматчем, заменены на Asp, показал 500-кратное повышение специфичности *in vitro* [16], но действие его в клетках пока не исследовано.

Помимо рационального дизайна, неоднократно делались попытки получения улучшенных вариантов белка Cas9 методами направленной эволюции (табл. 1). Для этого создано несколько систем селекции *in vivo* с одновременным отбором на адресную инактивацию токсичного гена и от-

сутствие неадресной инактивации геномного локуса. Одна из первых таких успешных систем на основе клеток дрожжей позволяет одновременно оценивать как адресную, так и неадресную активность Cas9 [72]. Скрининг библиотеки вариантов Cas9 со случайными мутациями в домене REC3 выявил варианты, повышающие точность редактирования при сохранении его эффективности. По своей точности наилучший из них фермент — evoCas9 (M495V Y515N K526E R661Q) — превышает как белок дикого типа, так и рационально сконструированные варианты Cas9 (в среднем 4-кратное улучшение по сравнению с eSpCas и SpCas9-HF1), сохраняя при этом адресную активность, близкую к белку дикого типа [72]. В другой системе, основанной на селекции в клетках *Escherichia coli*, был получен вариант Sniper-Cas9 (F539S M763I K890N), который показал высокую специфичность без уменьшения целевой активности в клетках человека [73]. По сравнению с eSpCas9(1.1), SpCas9-HF1, evoCas9 и НураCas9 фермент Sniper-Cas9 проявлял самую высокую специфичность в 10 из 12 сайтов клеток HEK-293T и HeLa. Похожий метод селекции в *E. coli* позволил получить вариант HiFi Cas9 (R691A), который по сравнению с другими улучшенными вариантами показывал наивысшую активность в первичных гемопоэтических клетках человека при использовании в виде предсформированных RNP [74]. Повышенная точность SpCas9-HF1, НураCas9 и HiFi Cas9 в клетках может быть обусловлена тем, что у этих эндонуклеаз резко снижена способность образовывать двухцепочечный разрыв, отчего они частично действуют как никизы [75].

В отличие от протоспейсера, узнавание PAM основано не на принципе комплементарности, а исключительно на взаимодействии обоих оснований G в последовательности NGG ДНК с аминокислотными остатками белка [59]. Попытки модифицировать узнавание PAM белком Cas9 в основном были направлены на расширение набора PAM-последовательностей, а не на повышение точности узнавания PAM. Любопытно, что некоторые полученные методом направленной эволюции варианты со множественными аминокислотными заменами (xCas9), узнающие PAM NG, NNG, GAA, GAT и CAA (xCas9-3.6 E108G S217A A262T S409I E480K E543D M694I E1219V и xCas9-3.7 A262T R324L S409I E480K E543D M694I E1219V), дополнительно проявляли и в 10–100 раз более высокую специфичность к мишени в клеточных линиях HEK-293T и U2OS [20].

ТОЧНОСТЬ НУКЛЕАЗ Cas ИЗ ДРУГИХ ВИДОВ БАКТЕРИЙ

Помимо SpCas9, достаточно детально исследованы некоторые РНК-адресуемые CRISPR-ас-

социированные эндонуклеазы из других микроорганизмов, принадлежащих к различным типам системы CRISPR. В числе этих ферментов удалось обнаружить нуклеазы с высокой специфичностью и с расширенным спектром РАМ. В пределах системы CRISPR типа II интерес для практического геномного редактирования представляют ферменты из *Staphylococcus aureus* (SaCas9), *Francisella novicida* (FnCas9) и *Neisseria meningitidis* (NmCas9). SaCas9 привлекает небольшим размером (примерно на 25% короче, чем SpCas9) и повышенным в сравнении с SpCas9 числом оборотов в каталитической реакции [76, 77]. Специфичность действия SaCas9 в клетках человека зависит от длины гРНК: она несколько ниже, чем у SpCas9, с оптимальной для активности гРНК (21–23 н.), но при укорочении гРНК до 20 н. значительно повышается из-за снижения толерантности к мисматчам [76, 78–80]. Методами рационального дизайна были получены варианты SaCas9 с повышенной точностью, аналогичные SpCas9-HF1 [81]. Активность FnCas9 составляет ~70% активности SpCas9, а специфичность в несколько раз выше [82, 83]. Однако по неясным до конца причинам фермент FnCas9 весьма чувствителен к структуре хроматина и неактивен по многим локусам в геноме человека [82]. Несколько меньшая активность и заметно более высокая точность по сравнению с SpCas9 характерна и для NmCas9 [84, 85].

Большой интерес вызывают также белки Cas12a (Cpf1) – представители CRISPR-систем типа V (рис. 1б). В отличие от Cas9, они содержат только RuvC-подобный домен и для проявления эндонуклеазной активности требуют только достаточно короткой crРНК (~42 н.), причем длина протоспейсера составляет 23–24 н. [86]. РАМ находится с 5'-стороны от протоспейсера и имеет последовательность (T)_{2–3}N, а гидролиз дцДНК происходит по фосфодиэфирным связям между нуклеотидами 23–24 адресуемой цепи (считая от РАМ) и 18–19 неадресуемой цепи, образуя липкие концы. Многие ферменты Cas12a неактивны при синтезе в клетках млекопитающих, хотя представители этого класса из *Acidaminococcus* sp. (AsCas12a) и *Lachnospiraceae* (LbCas12a) проявляют нуклеазную активность [86]. В клеточных линиях U2OS и HEK293 эффективность AsCas12a и LbCas12a была сравнима с таковой для Cas9, при этом 17 из 20 crРНК в сочетании с AsCas12a и 12 из 20 в случае LbCas12a не индуцировали неадресных мутаций [87, 88]. Специфичность к РАМ у AsCas12a выше, чем у LbCas12a. Систематический анализ мисматчей гРНК выявил, что система частично толерантна к единичным несоответствиям последовательности ДНК-мишени, но уже два мисматча практически полностью подавляют ее активность [87].

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ НАПРАВЛЯЮЩЕЙ РНК НА ТОЧНОСТЬ РЕДАКТИРОВАНИЯ

Дизайн РНК-компонента системы CRISPR/Cas9 также вносит заметный вклад в точность геномного редактирования. Так, специфичность редактирования значительно увеличивается при присоединении двух G на 5'-конец sgРНК (GG-X20): в клетках миелоидного лейкоза K562 sgРНК стандартного дизайна проявляла неадресную активность по всем 7 тестируемым сайтам, а sgРНК GG-X20 – только по одному [13]. Сходное действие оказывает добавление структурированных участков, например G-квадруплексов, на 3'-конец sgРНК [89]. Укорочение sgРНК на 1–3 нуклеотида повышает специфичность, увеличивая чувствительность к мисматчам, и при этом незначительно снижает активность Cas9 [12, 90]. Для эффективного функционирования комплекса Cas9–sgРНК в клетках человека длина адресуемой части РНК должна составлять минимум 17 н.: при этой длине ни активность системы, измеренная в процентах измененных клеток, ни соотношение HDR : NHEJ не отличаются от таковых для полноразмерной sgРНК (20 н.) [90]. В целом, укороченные sgРНК могут увеличивать специфичность системы более чем на три порядка в клетках человека [15, 90, 91] и дрожжей [92]. Интересно, что в системе *in vitro* из нескольких олигонуклеотидных библиотек sgРНК и ДНК-мишеней укороченные sgРНК (17–18 н.) и полноразмерная sgРНК (20 н.) обладают сходными профилями специфичности к мишеням [92]. Таким образом, структура хроматина, вероятно, также играет роль в точности редактирования. При использовании комбинации tracrРНК и синтетической crРНК вместо sgРНК наблюдаемый уровень неадресных изменений в клеточных линиях K562 и HeLa был низким [13].

Введение химических модификаций в РНК (рис. 4) также может влиять на активность и специфичности системы CRISPR/Cas9. Первые работы в этом направлении имели своей целью повысить устойчивость гРНК к внутриклеточным нуклеазам. Например, редактирование линии клеток K562 с использованием sgРНК, в которой три 5'-концевых и три 3'-концевых позиции несли нуклеотиды, содержащие 2'-O-метил-3'-тиофосфат или 2'-O-метил-3'-тиофосфоацетат, происходило значительно эффективнее, чем с немодифицированной sgРНК, хотя неадресная активность CRISPR-системы была немного выше [93]. Специфичность при этом возрастала в несколько раз, если Cas9 вводили в клетки не в виде экспрессионной плазмиды, а как рекомбинантный фермент в комплексе с sgРНК. Аналогичную стратегию использовали для системы crРНК/tracrРНК, в которой комбинированная модификация crРНК по ряду критических пози-

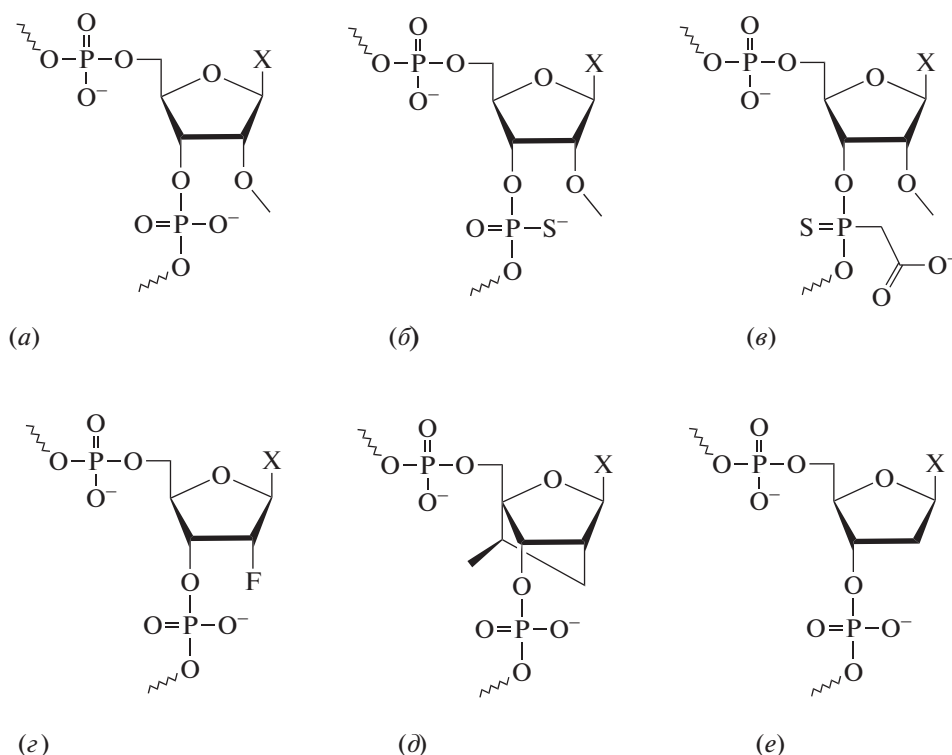


Рис. 4. Некоторые модификации, вносимые в структуру gРНК. а – 2'-*O*-метилрибонуклеотиды; б – 2'-*O*-метилрибонуклеотиды с 3'-тиофосфатной связью; в – 2'-*O*-метилрибонуклеотиды с 3'-тиофосфоновой связью; г – 2'-фторнуклеотиды; д – 2'-4'-мостиковые нуклеотиды; е – 2'-деоксирибонуклеотиды.

ций остатками 2'-фтор-, 2'-*O*-метил- и закрытых (2'–4'-мостиковых) нуклеотидов позволила в несколько раз увеличить и активность, и специфичность редактирования в клетках HEK-293T [94]. Внедрение мостиковых нуклеиновых кислот в структуру gРНК снижает неадресную активность за счет ускорения динамических переходов между открытой и закрытой конформациями гетеродуплексов с мисматчами [95].

Много внимания было уделено редактированию при помощи гибридных направляющих нуклеиновых кислот, в которых сочетались остатки рибо- и дезоксирибонуклеотидов, что также позволяло повысить специфичность узнавания мишеней за счет меньшей энергии взаимодействия в парах dNMP:dNMP по сравнению с rNMP:dNMP [96–98]. Одновременное использование нескольких типов модификаций в разных позициях, как правило, позволяет повысить эффективность редактирования за счет синергичных эффектов [98]. Разработка системы скрининга активных химически модифицированных sgРНК и tracrРНК в совокупности с рациональным дизайном сайтов модификации с сохранением контактирующих с белком 2'-ОН-групп в структуре комплекса Cas9–РНК–ДНК привела к созданию высокомодифицированных “улучшенных” (enhanced) sgРНК (e-sgРНК), в которых более половины всех рибо-

нуклеотидов заменены на 2'-фтор, 2'-*O*-метил- или тиофосфатные производные [99, 100]. Такие e-sgРНК были успешно применены для редактирования гена *Pcsk9* у мышей [99].

ВЛИЯНИЕ СИСТЕМ ДОСТАВКИ НА ТОЧНОСТЬ РЕДАКТИРОВАНИЯ

Для нокаута генов в эукариотическом геноме методом CRISPR/Cas9 в клетку необходимо доставить два компонента системы: Cas9 и sgРНК (либо Cas9, crРНК и tracrРНК). Для точной замены путем HDR дополнительно необходим донор для рекомбинации. Доставка компонентов возможна в виде кодирующей ДНК, РНК (мРНК Cas9 и sgРНК) либо рекомбинантного белка и РНК, синтезированной химическим или ферментативным способом.

В первых работах по редактированию генома клеток человека упор был сделан на кодирующие ДНК-конструкции, поскольку гомогенность синтетической РНК была недостаточной. Стандартные методы трансфекции до сих пор работают вполне удовлетворительно для решения многих исследовательских задач, однако для потенциальных терапевтических приложений и скрининга РНК-библиотек разработаны специализированные векторы на основе лентивирусов, аденовиру-

сов и аденоассоциированных вирусов [101, 102]. Вне зависимости от способа трансфекции доставки внутрь клетки плазмид, кодирующих Cas9 и РНК, зачастую ведет к полной или частичной интеграции плазмидной ДНК в геном хозяина по целевому или нецелевым сайтам [103, 104]. Кроме того, продукция элементов системы с плазмидной матрицы поддерживается в течение нескольких суток, что повышает вероятность внесения в геном неадресных изменений [103]. Вследствие этого внутриклеточная доставка векторов, кодирующих элементы системы CRISPR/Cas9, на сегодня считается неприемлемой для терапевтического использования, а организмы, созданные с ее помощью, законодательством большинства стран рассматриваются как генетически модифицированные.

Усовершенствование методов синтеза РНК позволило непосредственно доставлять в клетку мРНК Cas9 и нужную sgРНК [103, 105]. Точность редактирования при таком способе доставки как минимум не уступает точности при доставке кодирующих конструкций [106, 107]. Замечено, что при этом совместная доставка мРНК Cas9 и немодифицированной sgРНК дает невысокую частоту событий редактирования, но химические модификации sgРНК позволяют в несколько раз увеличить как эффективность, так и специфичность [93].

Доставка в клетку готового RNP, сформированного из рекомбинантного белка Cas9 и нужной sgРНК, стала очень популярна из-за хороших показателей эффективности и специфичности редактирования. Так, электропорация или липофекция комплекса RNP в клетки человека позволяет повысить специфичность редактирования примерно на порядок по сравнению с трансфекцией экспрессирующими плазмидами [103, 105, 108]. Высокая специфичность, по всей вероятности, связана с тем, что время существования RNP в клетке составляет часы, в то время как экспрессия плазмидных генов может продолжаться несколько суток. Из менее стандартных подходов можно упомянуть метод доставки RNP в виде конъюгата с интернализуемыми пептидами разнообразной структуры, способными проникать в клетку по разным зависимым и независимым от эндоцитоза механизмам [109]. При конъюгации таких пептидов с Cas9 через тиоэфирную связь обработка клеток RNP позволяла достичь эффективности редактирования 3–16% для разных клеточных линий, а специфичность по сравнению с плазмидным контролем повышалась в 2.2–4.1 раза [110]. Наконец, весьма многообещающей оказалась доставка с помощью золотых наночастиц, конъюгированных с ДНК и покрытых катионным полимером поли- $\{N-[N-(2\text{-аминоэтил})-2\text{-аминоэтил}]\text{аспартамидом}\}$, способствующим интернализации [111]. Эффективность HDR на панели

трансформированных и первичных клеток человека и мыши составила 3–6%, а *in vivo* на мышинной модели миодистрофии Дюшенна при внутримышечном введении удалось достичь эффективности редактирования ~5.4% для гена в мышечных клетках при неадресных событиях редактирования по 21 вероятному сайту в диапазоне 0.005–0.2% [111].

УСЛОВИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ЭКСПРЕССИИ КОМПОНЕНТОВ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9

Длительное присутствие компонентов системы CRISPR/Cas9 внутри клеток и их высокая концентрация способствуют неадресному редактированию. Одной из первых идей для достижения оптимального соотношения между эффективностью и специфичностью системы стало применение индуцируемых промоторов для экспрессии Cas9 (iCas9) [112–114]. Для строгой проверки специфичности одной из таких систем на панели человеческих клеток (293T, HeLa и SK-BR-3) было исследовано редактирование системой iCas9 с sgРНК (полностью комплементарных или с мисматчем), нацеленными на гены *KDM5C*, *EMX1* и *VEGFA*. По сравнению с нерегулируемой продукцией индуцированная экспрессия Cas9 приводила к задержке редактирования не полностью комплементарных мишеней на несколько десятков часов, в то время как кинетика редактирования точных мишеней была сходна для обоих способов экспрессии, а процент неадресных изменений для всех локусов снижался на порядок и более [114]. В лабораторных исследованиях оказался полезным подход со стабильной интеграцией гена белка Cas9 в хромосому под контролем индуцируемого промотора, что далее позволяет проводить модификации с доставкой лишь sgРНК и, при необходимости, донора для рекомбинации [112, 115]. При реализации такой схемы в плюрипотентных стволовых клетках человека уровень модификации по неадресным сайтам был ниже порога детекции [112].

Внутриклеточную активность Cas9 можно контролировать и на посттрансляционном уровне, например, ограничивая время существования активного фермента. Так, в системе split-Cas9 С- и N-концевой домены нуклеазы синтезируются отдельно в виде химерных полипептидов с белком FKBP и FRB-доменом белка mTOR, которые могут димеризоваться в присутствии рапамицина [116]. Однако самопроизвольная димеризация Cas9 не позволяет полностью свести на нет активность такого комплекса, хотя удалось снизить неадресную модификацию до уровня 4–20% от Cas9 [116]. Использование в аналогичной системе N- и С-концевых фрагментов Cas9, соединенных с фотодимеризуемыми Magnet-доменами, полу-

ченными из фоторецептора VVD *Neurospora*, позволило снизить фоновый уровень событий редактирования до недетектируемого [117]. В качестве еще одного метода посттрансляционного контроля в последовательность Cas9 включали 4-гидрокситамоксифензависимый интеин — домен, способный в определенных условиях катализировать собственное удаление из белка [118]. При редактировании локусов *EMX*, *VEGFA* и *CLTA* в культуре клеток НЕК293 в присутствии индуктора эффективность была сравнима с таковой для Cas9, а специфичность увеличена в 25 раз [118].

Ограничить активность Cas9 можно за счет экспрессии вместе с двумя sgРНК: нацеленной на заданный локус и направленной против самого Cas9. Таким способом удалось значительно сократить период активной экспрессии Cas9 и повысить специфичность редактирования в 4.0–7.5 раз [119, 120]. Наконец, при введении замен путем HDR можно включить в состав донора генетического материала фенотипически нейтральную замену, которая в случае удачной рекомбинации ликвидирует РАМ или изменяет затравочную последовательность, гибридизующуюся с gРНК. Такой подход позволил увеличить точность редактирования локусов *APP* и *PSEN1* в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках и в линии НЕК293 в 2–10 раз [121, 122].

Наконец, в связи с сопряжением механизмов репарации двухцепочечных разрывов с фазами клеточного цикла рассматривают возможность его синхронизации с редактированием. В качестве основной системы доставки в этом случае предпочтителен RNP, так как его действие начинается сразу после введения в клетки. При трансфекции RNP синхронизация клеток НЕК-293Т, первичных фибробластов человека и эмбриональных стволовых клеток человека нокадазолом на границе фаз G2/М повышала частоту событий HDR примерно в 3 раза, а уровень неадресных событий, определенных полногеномным секвенированием, не превышал фонового [123]. При редактировании гетерозиготных мутаций в зиготе человека введение RNP и ДНК-донора рекомбинации в S-фазе позволяло добиться преимущественного использования экзогенной ДНК, а не хромосомной копии как матрицы для рекомбинации [124].

Таким образом, в настоящее время активно исследуют несколько разных путей повышения точности геномного редактирования, основанного на комплементарной адресации, то есть в большинстве случаев — на системе CRISPR/Cas9. Позволит ли какой-то из этих путей или какая-либо их комбинация достичь точности, приемлемой для терапевтического применения геномного редактирования, — вопрос, который зависит не только от манипуляций с системами редактиро-

вания, но и от точности методов определения нецелевых событий. Современные методы высокопроизводительного секвенирования позволяют детектировать небольшие изменения в геноме лучше, чем крупные перестройки, и дискуссии о вероятности крупных перестроек как нецелевых событий редактирования не утихают до сих пор [125–127]. Ситуация, возможно, изменится с массовым внедрением нанопорного секвенирования, которое дает гораздо более длинные участки прочтения. В любом случае приемлемая безопасность технологии при применении *in vivo* может быть достигнута только при уровне неадресных изменений (причем для любой gРНК), сравнимом с фоновым уровнем соматического мутагенеза. Общепринятое значение точности репликации в нераковых клетках человека в культуре составляет $\sim 10^{-10}$ мутаций на пару нуклеотидов на одно клеточное деление [1], что достаточно хорошо совпадает с недавно полученными оценками в экспериментах по секвенированию единичных клеток клональных линий из разных тканей [128–130]. Такая точность остается пока недостижимой даже для “сверхточных” вариантов Cas9. Для терапевтических манипуляций *ex vivo* (например, при редактировании с последующей аутотрансплантацией) точность действия системы редактирования может быть несколько ниже, но это компенсируется необходимостью полногеномного секвенирования для поиска клонов, содержащих только адресные мутации, и чем ниже точность системы, тем больше нужно попыток секвенирования. В целом, повышение точности останется в ближайшие годы одним из главных направлений исследований в области геномного редактирования.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 21-64-00017. Д.В. Ким выражает благодарность Российскому фонду фундаментальных исследований (проект 20-34-90092-Аспиранты; анализ клеточных механизмов специфичности). Д.О. Жарков выражает благодарность Министерству высшего образования и науки Российской Федерации (государственное задание ИХБФМ СО РАН № 121031300056-8; структурный анализ специфичности ферментов).

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. Kunkel T.A. (2009) Evolving views of DNA replication (in)fidelity. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 74, 91–101.

2. Supek F., Lehner B. (2019) Scales and mechanisms of somatic mutation rate variation across the human genome. *DNA Repair*. **81**, 102647.
3. Balmain A. (2020) The critical roles of somatic mutations and environmental tumor-promoting agents in cancer risk. *Nat. Genet.* **52**, 1139–1143.
4. Wright A.V., Nuñez J.K., Doudna J.A. (2016) Biology and applications of CRISPR systems: Harnessing Nature's toolbox for genome engineering. *Cell*. **164**, 29–44.
5. Jiang F., Doudna J.A. (2017) CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 505–529.
6. Ceccaldi R., Rondinelli B., D'Andrea A.D. (2016) Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. *Trends Cell Biol.* **26**, 52–64.
7. Xue C., Greene E.C. (2021) DNA repair pathway choices in CRISPR–Cas9-mediated genome editing. *Trends Genet.* **37**, 639–656.
8. Cradick T.J., Fine E.J., Antico C.J., Bao G. (2013) CRISPR/Cas9 systems targeting β -globin and *CCR5* genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res.* **41**, 9584–9592.
9. Fu Y., Foden J.A., Khayter C., Maeder M.L., Reyon D., Joung J.K., Sander J.D. (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR–Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* **31**, 822–826.
10. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* **31**, 827–832.
11. Kescu C., Arslan S., Singh R., Thorpe J., Adli M. (2014) Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat. Biotechnol.* **32**, 677–683.
12. Pattanayak V., Lin S., Guilinger J.P., Ma E., Doudna J.A., Liu D.R. (2013) High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.* **31**, 839–843.
13. Cho S.W., Kim S., Kim Y., Kweon J., Kim H.S., Bae S., Kim J.-S. (2014) Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* **24**, 132–141.
14. Ivanov I.E., Wright A.V., Cofsky J.C., Palacio Aris K.D., Doudna J.A., Bryant Z. (2020) Cas9 interrogates DNA in discrete steps modulated by mismatches and supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117**, 5853–5860.
15. Tsai S.Q., Zheng Z., Nguyen N.T., Liebers M., Topkar V.V., Thapar V., Wyvekens N., Khayter C., Iafrate A.J., Le L.P., Aryee M.J., Joung J.K. (2015) GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR–Cas nucleases. *Nat. Biotechnol.* **33**, 187–197.
16. Bravo J.P.K., Liu M.-S., Hibshman G.N., Dangerfield T.L., Jung K., McCool R.S., Johnson K.A., Taylor D.W. (2022) Structural basis for mismatch surveillance by CRISPR–Cas9. *Nature*. **603**, 343–347.
17. Cofsky J.C., Soczek K.M., Knott G.J., Nogales E., Doudna J.A. (2022) CRISPR–Cas9 bends and twists DNA to read its sequence. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **29**, 395–402.
18. Lin Y., Cradick T.J., Brown M.T., Deshmukh H., Ranjan P., Sarode N., Wile B.M., Vertino P.M., Stewart F.J., Bao G. (2014) CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7473–7485.
19. Zhang Y., Ge X., Yang F., Zhang L., Zheng J., Tan X., Jin Z.-B., Qu J., Gu F. (2014) Comparison of non-canonical PAMs for CRISPR/Cas9-mediated DNA cleavage in human cells. *Sci. Rep.* **4**, 5405.
20. Hu J.H., Miller S.M., Geurts M.H., Tang W., Chen L., Sun N., Zeina C.M., Gao X., Rees H.A., Lin Z., Liu D.R. (2018) Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*. **556**, 57–63.
21. Kim N., Kim H.K., Lee S., Seo J.H., Choi J.W., Park J., Min S., Yoon S., Cho S.-R., Kim H.H. (2020) Prediction of the sequence-specific cleavage activity of Cas9 variants. *Nat. Biotechnol.* **38**, 1328–1336.
22. Wang T., Wei J.J., Sabatini D.M., Lander E.S. (2014) Genetic screens in human cells using the CRISPR–Cas9 system. *Science*. **343**, 80–84.
23. Wang T., Birsoy K., Hughes N.W., Krupczak K.M., Post Y., Wei J.J., Lander E.S., Sabatini D.M. (2015) Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science*. **350**, 1096–1101.
24. Wang T., Yu H., Hughes N.W., Liu B., Kendirli A., Klein K., Chen W.W., Lander E.S., Sabatini D.M. (2017) Gene essentiality profiling reveals gene networks and synthetic lethal interactions with oncogenic Ras. *Cell*. **168**, 890–903.e15.
25. Park R.J., Wang T., Koundakjian D., Hultquist J.F., Lamothe-Molina P., Monel B., Schumann K., Yu H., Krupczak K.M., Garcia-Beltran W., Piechocka-Trocha A., Krogan N.J., Marson A., Sabatini D.M., Lander E.S., Hacohen N., Walker B.D. (2017) A genome-wide CRISPR screen identifies a restricted set of HIV host dependency factors. *Nat. Genet.* **49**, 193–203.
26. Zhang D., Hurst T., Duan D., Chen S.-J. (2019) Unified energetics analysis unravels SpCas9 cleavage activity for optimal gRNA design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **116**, 8693–8698.
27. Newman A., Starrs L., Burgio G. (2020) Cas9 cuts and consequences; detecting, predicting, and mitigating CRISPR/Cas9 on- and off-target damage: techniques for detecting, predicting, and mitigating the on- and off-target effects of Cas9 editing. *Bioessays*. **42**, 2000047.
28. Li C., Chu W., Gill R.A., Sang S., Shi Y., Hu X., Yang Y., Zaman Q.U., Zhang B. (2022) Computational tools and resources for CRISPR/Cas genome editing. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. S1672-0229(22)00027-4. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2022.02.006>
29. Kim D., Bae S., Park J., Kim E., Kim S., Yu H.R., Hwang J., Kim J.-I., Kim J.-S. (2015) Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR–Cas9 off-target effects in human cells. *Nat. Methods*. **12**, 237–243.
30. Crosetto N., Mitra A., Silva M.J., Bienko M., Dojer N., Wang Q., Karaca E., Chiarle R., Skrzypczak M., Ginalski K., Pasero P., Rowicka M., Dikic I. (2013) Nucleotide-resolution DNA double-strand break mapping by next-generation sequencing. *Nat. Methods*. **10**, 361–365.

31. Frock R.L., Hu J., Meyers R.M., Ho Y.-J., Kii E., Alt F.W. (2015) Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nat. Biotechnol.* **33**, 179–186.
32. Cameron P., Fuller C.K., Donohoue P.D., Jones B.N., Thompson M.S., Carter M.M., Gradia S., Vidal B., Garner E., Slorach E.M., Lau E., Banh L.M., Lied A.M., Edwards L.S., Settle A.H., Capurso D., Llaca V., Deschamps S., Cigan M., Young J.K., May A.P. (2017) Mapping the genomic landscape of CRISPR–Cas9 cleavage. *Nat. Methods.* **14**, 600–606.
33. Tsai S.Q., Nguyen N.T., Malagon-Lopez J., Topkar V.V., Aryee M.J., Joung J.K. (2017) CIRCLE-seq: a highly sensitive *in vitro* screen for genome-wide CRISPR–Cas9 nuclease off-targets. *Nat. Methods.* **14**, 607–614.
34. Lazzarotto C.R., Malinin N.L., Li Y., Zhang R., Yang Y., Lee G., Cowley E., He Y., Lan X., Jividen K., Katta V., Kolmakova N.G., Petersen C.T., Qi Q., Strelcov E., Maragh S., Krenciute G., Ma J., Cheng Y., Tsai S.Q. (2020) CHANGE-seq reveals genetic and epigenetic effects on CRISPR–Cas9 genome-wide activity. *Nat. Biotechnol.* **38**, 1317–1327.
35. Listgarten J., Weinstein M., Kleinstiver B.P., Sousa A.A., Joung J.K., Crawford J., Gao K., Hoang L., Elibol M., Doench J.G., Fusi N. (2018) Prediction of off-target activities for the end-to-end design of CRISPR guide RNAs. *Nat. Biomed. Eng.* **2**, 38–47.
36. Kirillov B., Savitskaya E., Panov M., Ogurtsov A.Y., Shabalina S.A., Koonin E.V., Severinov K.V. (2022) Uncertainty-aware and interpretable evaluation of Cas9–gRNA and Cas12a–gRNA specificity for fully matched and partially mismatched targets with Deep Kernel Learning. *Nucleic Acids Res.* **50**, e11.
37. Bortesi L., Zhu C., Zischewski J., Perez L., Bassié L., Nadi R., Forni G., Lade S.B., Soto E., Jin X., Medina V., Villorbia G., Muñoz P., Farré G., Fischer R., Twyman R.M., Capell T., Christou P., Schillberg S. (2016) Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. *Plant Biotechnol. J.* **14**, 2203–2216.
38. Doench J.G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E.W., Donovan K.F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H.W., Listgarten J., Root D.E. (2016) Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR–Cas9. *Nat. Biotechnol.* **34**, 184–191.
39. Liang S.-Q., Liu P., Smith J.L., Mintzer E., Maitland S., Dong X., Yang Q., Lee J., Haynes C.M., Zhu L.J., Watts J.K., Sontheimer E.J., Wolfe S.A., Xue W. (2022) Genome-wide detection of CRISPR editing *in vivo* using GUIDE-tag. *Nat. Commun.* **13**, 437.
40. Uribe-Salazar J.M., Kaya G., Sekar A., Weyenberg K., Ingamells C., Dennis M.Y. (2022) Evaluation of CRISPR gene-editing tools in zebrafish. *BMC Genomics.* **23**, 12.
41. Zirin J., Bosch J., Viswanatha R., Mohr S.E., Perri-mon N. (2022) State-of-the-art CRISPR for *in vivo* and cell-based studies in *Drosophila*. *Trends Genet.* **38**, 437–453.
42. Wu X., Scott D.A., Kriz A.J., Chiu A.C., Hsu P.D., Dadon D.B., Cheng A.W., Trevino A.E., Konermann S., Chen S., Jaenisch R., Zhang F., Sharp P.A. (2014) Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **32**, 670–676.
43. O’Geen H., Henry I.M., Bhakta M.S., Meckler J.F., Segal D.J. (2015) A genome-wide analysis of Cas9 binding specificity using ChIP-seq and targeted sequence capture. *Nucleic Acids Res.* **43**, 3389–3404.
44. Boyle E.A., Andreasson J.O.L., Chircus L.M., Sternberg S.H., Wu M.J., Guegler C.K., Doudna J.A., Greenleaf W.J. (2017) High-throughput biochemical profiling reveals sequence determinants of dCas9 off-target binding and unbinding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, 5461–5466.
45. Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., Lim W.A. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell.* **152**, 1173–1183.
46. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., Zuris J.A., Liu D.R. (2016) Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* **533**, 420–424.
47. Vojta A., Dobrinić P., Tadić V., Bočkor L., Korać P., Julg B., Klasić M., Zoldoš V. (2016) Repurposing the CRISPR–Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* **44**, 5615–5628.
48. Gaudelli N.M., Komor A.C., Rees H.A., Packer M.S., Badran A.H., Bryson D.I., Liu D.R. (2017) Programmable base editing of A • T to G • C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature.* **551**, 464–471.
49. Anzalone A.V., Randolph P.B., Davis J.R., Sousa A.A., Koblan L.W., Levy J.M., Chen P.J., Wilson C., Newby G.A., Raguram A., Liu D.R. (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature.* **576**, 149–157.
50. Arbab M., Shen M.W., Mok B., Wilson C., Matuszek Ż., Cassa C.A., Liu D.R. (2020) Determinants of base editing outcomes from target library analysis and machine learning. *Cell.* **182**, 463–480.e30.
51. Kim Y.-G., Cha J., Chandrasegaran S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to FokI cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 1156–1160.
52. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.-Y., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* **154**, 1380–1389.
53. Chiang T.-W.W., le Sage C., Larrieu D., Demir M., Jackson S.P. (2016) CRISPR–Cas9^{D10A} nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. *Sci. Rep.* **6**, 24356.
54. Gopalappa R., Suresh B., Ramakrishna S., Kim H.H. (2018) Paired D10A Cas9 nickases are sometimes more efficient than individual nucleases for gene disruption. *Nucleic Acids Res.* **46**, e71.
55. Gao Y., Wu H., Wang Y., Liu X., Chen L., Li Q., Cui C., Liu X., Zhang J., Zhang Y. (2017) Single Cas9 nickase induced generation of *NRAMP1* knockin cattle with reduced off-target effects. *Genome Biol.* **18**, 13.
56. Guillinger J.P., Thompson D.B., Liu D.R. (2014) Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat. Biotechnol.* **32**, 577–582.
57. Tsai S.Q., Wyvekens N., Khayter C., Foden J.A., Thapar V., Reyon D., Goodwin M.J., Aryee M.J., Joung J.K. (2014) Dimeric CRISPR RNA-guided

- FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* **32**, 569–576.
58. Wyvekens N., Topkar V.V., Khayter C., Joung J.K., Tsai S.Q. (2015) Dimeric CRISPR RNA-guided FokI-dCas9 nucleases directed by truncated gRNAs for highly specific genome editing. *Hum. Gene Ther.* **26**, 425–431.
 59. Anders C., Niewoehner O., Duerst A., Jinek M. (2014) Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*. **513**, 569–573.
 60. Jinek M., Jiang F., Taylor D.W., Sternberg S.H., Kaya E., Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A.T., Charpentier E., Nogales E., Doudna J.A. (2014) Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*. **343**, 1247997.
 61. Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P.D., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. **156**, 935–949.
 62. Jiang F., Zhou K., Ma L., Gressel S., Doudna J.A. (2015) A Cas9–guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science*. **348**, 1477–1481.
 63. Jiang F., Taylor D.W., Chen J.S., Kornfeld J.E., Zhou K., Thompson A.J., Nogales E., Doudna J.A. (2016) Structures of a CRISPR–Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. *Science*. **351**, 867–871.
 64. Huai C., Li G., Yao R., Zhang Y., Cao M., Kong L., Jia C., Yuan H., Chen H., Lu D., Huang Q. (2017) Structural insights into DNA cleavage activation of CRISPR–Cas9 system. *Nat. Commun.* **8**, 1375.
 65. Chen W., Zhang H., Zhang Y., Wang Y., Gan J., Ji Q. (2019) Molecular basis for the PAM expansion and fidelity enhancement of an evolved Cas9 nuclease. *PLoS Biol.* **17**, e3000496.
 66. Guo M., Ren K., Zhu Y., Tang Z., Wang Y., Zhang B., Huang Z. (2019) Structural insights into a high fidelity variant of SpCas9. *Cell Res.* **29**, 183–192.
 67. Zhu X., Clarke R., Puppala A.K., Chittori S., Merk A., Merrill B.J., Simonović M., Subramaniam S. (2019) Cryo-EM structures reveal coordinated domain motions that govern DNA cleavage by Cas9. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 679–685.
 68. East K.W., Newton J.C., Morzan U.N., Narkhede Y.B., Acharya A., Skeens E., Jogl G., Batista V.S., Palermo G., Lisi G.P. (2020) Allosteric motions of the CRISPR–Cas9 HNH nuclease probed by NMR and molecular dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 1348–1358.
 69. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. **351**, 84–88.
 70. Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T., Zheng Z., Joung J.K. (2016) High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. **529**, 490–495.
 71. Chen J.S., Dagdas Y.S., Kleinstiver B.P., Welch M.M., Sousa A.A., Harrington L.B., Sternberg S.H., Joung J.K., Yildiz A., Doudna J.A. (2017) Enhanced proofreading governs CRISPR–Cas9 targeting accuracy. *Nature*. **550**, 407–410.
 72. Casini A., Olivieri M., Petris G., Montagna C., Reginato G., Maule G., Lorenzin F., Prandi D., Romanel A., Demichelis F., Inga A., Cereseto A. (2018) A highly specific SpCas9 variant is identified by *in vivo* screening in yeast. *Nat. Biotechnol.* **36**, 265–271.
 73. Lee J.K., Jeong E., Lee J., Jung M., Shin E., Kim Y.-H., Lee K., Jung I., Kim D., Kim S., Kim J.-S. (2018) Directed evolution of CRISPR–Cas9 to increase its specificity. *Nat. Commun.* **9**, 3048.
 74. Vakulskas C.A., Dever D.P., Rettig G.R., Turk R., Jacobi A.M., Collingwood M.A., Bode N.M., McNeill M.S., Yan S., Camarena J., Lee C.M., Park S.H., Wiebking V., Bak R.O., Gomez-Ospina N., Pavel-Dinu M., Sun W., Bao G., Porteus M.H., Behlke M.A. (2018) A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat. Med.* **24**, 1216–1224.
 75. Murugan K., Suresh S.K., Seetharam A.S., Severin A.J., Sashital D.G. (2021) Systematic *in vitro* specificity profiling reveals nicking defects in natural and engineered CRISPR–Cas9 variants. *Nucleic Acids Res.* **49**, 4037–4053.
 76. Ran F.A., Cong L., Yan W.X., Scott D.A., Gootenberg J.S., Kriz A.J., Zetsche B., Shalem O., Wu X., Makarova K.S., Koonin E.V., Sharp P.A., Zhang F. (2015) *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. **520**, 186–191.
 77. Yourik P., Fuchs R.T., Mabuchi M., Curcuru J.L., Robb G.B. (2019) *Staphylococcus aureus* Cas9 is a multiple-turnover enzyme. *RNA*. **25**, 35–44.
 78. Friedland A.E., Baral R., Singhal P., Loveluck K., Shen S., Sanchez M., Marco E., Gotta G.M., Maeder M.L., Kennedy E.M., Kornepati A.V.R., Sousa A., Collins M.A., Jayaram H., Cullen B.R., Bumcrot D. (2015) Characterization of *Staphylococcus aureus* Cas9: a smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications. *Genome Biol.* **16**, 257.
 79. Tycko J., Barrera L.A., Huston N.C., Friedland A.E., Wu X., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Myer V.E., Wilson C.J., Hsu P.D. (2018) Pairwise library screen systematically interrogates *Staphylococcus aureus* Cas9 specificity in human cells. *Nat. Commun.* **9**, 2962.
 80. Huston N.C., Tycko J., Tillotson E.L., Wilson C.J., Myer V.E., Jayaram H., Steinberg B.E. (2019) Identification of guide-intrinsic determinants of Cas9 specificity. *CRISPR J.* **2**, 172–185.
 81. Tan Y., Chu A.H.Y., Bao S., Hoang D.A., Kebede F.T., Xiong W., Ji M., Shi J., Zheng Z. (2019) Rationally engineered *Staphylococcus aureus* Cas9 nucleases with high genome-wide specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **116**, 20969–20976.
 82. Chen F., Ding X., Feng Y., Seebeck T., Jiang Y., Davis G.D. (2017) Targeted activation of diverse CRISPR–Cas systems for mammalian genome editing via proximal CRISPR targeting. *Nat. Commun.* **8**, 14958.
 83. Acharya S., Mishra A., Paul D., Ansari A.H., Azhar M., Kumar M., Rauthan R., Sharma N., Aich M., Sinha D., Sharma S., Jain S., Ray A., Jain S., Ramalingam S., Maiti S., Chakraborty D. (2019) *Francisella novicida* Cas9 interrogates genomic DNA with very high speci-

- ficity and can be used for mammalian genome editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **116**, 20959–20968.
84. Lee C.M., Cradick T.J., Bao G. (2016) The *Neisseria meningitidis* CRISPR-Cas9 system enables specific genome editing in mammalian cells. *Mol. Ther.* **24**, 645–654.
 85. Amrani N., Gao X.D., Liu P., Edraki A., Mir A., Ibrahim R., Gupta A., Sasaki K.E., Wu T., Donohoue P.D., Settle A.H., Lied A.M., McGovern K., Fuller C.K., Cameron P., Fazio T.G., Zhu L.J., Wolfe S.A., Sontheimer E.J. (2018) NmeCas9 is an intrinsically high-fidelity genome-editing platform. *Genome Biol.* **19**, 214.
 86. Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., van der Oost J., Regev A., Koonin E.V., Zhang F. (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*. **163**, 759–771.
 87. Kim D., Kim J., Hur J.K., Been K.W., Yoon S.-h., Kim J.-S. (2016) Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* **34**, 863–868.
 88. Kleinstiver B.P., Tsai S.Q., Prew M.S., Nguyen N.T., Welch M.M., Lopez J.M., McCaw Z.R., Aryee M.J., Joung J.K. (2016) Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* **34**, 869–874.
 89. Nahar S., Sehgal P., Azhar M., Rai M., Singh A., Sivasubbu S., Chakraborty D., Maiti S. (2018) A G-quadruplex motif at the 3' end of sgRNAs improves CRISPR–Cas9 based genome editing efficiency. *Chem. Commun.* **54**, 2377–2380.
 90. Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M., Joung J.K. (2014) Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.* **32**, 279–284.
 91. Morgens D.W., Wainberg M., Boyle E.A., Ursu O., Araya C.L., Tsui C.K., Haney M.S., Hess G.T., Han K., Jeng E.E., Li A., Snyder M.P., Greenleaf W.J., Kundaje A., Bassik M.C. (2017) Genome-scale measurement of off-target activity using Cas9 toxicity in high-throughput screens. *Nat. Commun.* **8**, 15178.
 92. Fu B.X.H., St. Onge R.P., Fire A.Z., Smith J.D. (2016) Distinct patterns of Cas9 mismatch tolerance *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* **44**, 5365–5377.
 93. Hendel A., Bak R.O., Clark J.T., Kennedy A.B., Ryan D.E., Roy S., Steinfeld I., Lunstad B.D., Kaiser R.J., Wilkens A.B., Bacchetta R., Tsalenko A., Dellinger D., Bruhn L., Porteus M.H. (2015) Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat. Biotechnol.* **33**, 985–989.
 94. Rahdar M., McMahon M.A., Prakash T.P., Swayze E.E., Bennett C.F., Cleveland D.W. (2015) Synthetic CRISPR RNA-Cas9–guided genome editing in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**, E7110–E7117.
 95. Cromwell C.R., Sung K., Park J., Krysler A.R., Jovel J., Kim S.K., Hubbard B.P. (2018) Incorporation of bridged nucleic acids into CRISPR RNAs improves Cas9 endonuclease specificity. *Nat. Commun.* **9**, 1448.
 96. Yin H., Song C.-Q., Suresh S., Kwan S.-Y., Wu Q., Walsh S., Ding J., Bogorad R.L., Zhu L.J., Wolfe S.A., Kotliansky V., Xue W., Langer R., Anderson D.G. (2018) Partial DNA-guided Cas9 enables genome editing with reduced off-target activity. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 311–316.
 97. Rueda F.O., Bista M., Newton M.D., Goeppert A.U., Cuomo M.E., Gordon E., Kröner F., Read J.A., Wrigley J.D., Rueda D., Taylor B.J.M. (2017) Mapping the sugar dependency for rational generation of a DNA-RNA hybrid-guided Cas9 endonuclease. *Nat. Commun.* **8**, 1610.
 98. O'Reilly D., Kartje Z.J., Ageely E.A., Malek-Adamian E., Habibian M., Schofield A., Barkau C.L., Rohilla K.J., DeRossett L.B., Weigle A.T., Damha M.J., Gagnon K.T. (2019) Extensive CRISPR RNA modification reveals chemical compatibility and structure–activity relationships for Cas9 biochemical activity. *Nucleic Acids Res.* **47**, 546–558.
 99. Yin H., Song C.-Q., Suresh S., Wu Q., Walsh S., Rhym L.H., Mintzer E., Bolukbasi M.F., Zhu L.J., Kauffman K., Mou H., Oberholzer A., Ding J., Kwan S.-Y., Bogorad R.L., Zatspein T., Kotliansky V., Wolfe S.A., Xue W., Langer R., Anderson D.G. (2017) Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral *in vivo* genome editing. *Nat. Biotechnol.* **35**, 1179–1187.
 100. Mir A., Alterman J.F., Hassler M.R., Debacker A.J., Hudgens E., Echeverria D., Brodsky M.H., Khvorova A., Watts J.K., Sontheimer E.J. (2018) Heavily and fully modified RNAs guide efficient SpyCas9-mediated genome editing. *Nat. Commun.* **9**, 2641.
 101. Nelson C.E., Gersbach C.A. (2016) Engineering delivery vehicles for genome editing. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **7**, 637–662.
 102. Xu C.L., Ruan M.Z.C., Mahajan V.B., Tsang S.H. (2019) Viral delivery systems for CRISPR. *Viruses*. **11**, 28.
 103. Kim S., Kim D., Cho S.W., Kim J., Kim J.-S. (2014) Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* **24**, 1012–1019.
 104. Hanlon K.S., Kleinstiver B.P., Garcia S.P., Zaborowski M.P., Volak A., Spirig S.E., Muller A., Sousa A.A., Tsai S.Q., Bengtsson N.E., Lööv C., Ingelsson M., Chamberlain J.S., Corey D.P., Aryee M.J., Joung J.K., Breakefield X.O., Maguire C.A., György B. (2019) High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. *Nat. Commun.* **10**, 4439.
 105. Liang X., Potter J., Kumar S., Zou Y., Quintanilla R., Sridharan M., Carte J., Chen W., Roark N., Ranganathan S., Ravinder N., Chesnut J.D. (2015) Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J. Biotechnol.* **208**, 44–53.
 106. 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**, 910–918.
 107. Yang H., Wang H., Shivalila C.S., Cheng A.W., Shi L., Jaenisch R. (2013) One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. **154**, 1370–1379.
 108. Zuris J.A., Thompson D.B., Shu Y., Guilinger J.P., Bessen J.L., Hu J.H., Maeder M.L., Joung J.K.,

- Chen Z.-Y., Liu D.R. (2015) Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* **33**, 73–80.
109. Peraro L., Kritzer J.A. (2018) Emerging methods and design principles for cell-penetrant peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 11868–11881.
 110. Ramakrishna S., Dad A.-B.K., Beloor J., Gopalappa R., Lee S.-K., Kim H. (2014) Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res.* **24**, 1020–1027.
 111. Lee K., Conboy M., Park H.M., Jiang F., Kim H.J., Dewitt M.A., Mackley V.A., Chang K., Rao A., Skinner C., Shobha T., Mehdi-pour M., Liu H., Huang W.-c., Lan F., Bray N.L., Li S., Corn J.E., Kataoka K., Doudna J.A., Conboy I., Murthy N. (2017) Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA *in vivo* induces homology-directed DNA repair. *Nat. Biomed. Eng.* **1**, 889–901.
 112. González F., Zhu Z., Shi Z.-D., Lelli K., Verma N., Li Q.V., Huangfu D. (2014) An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* **15**, 215–226.
 113. Dow L.E., Fisher J., O'Rourke K.P., Muley A., Kas-tenhuber E.R., Livshits G., Tschaharganeh D.F., Socci N.D., Lowe S.W. (2015) Inducible *in vivo* genome editing with CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* **33**, 390–394.
 114. Cao J., Wu L., Zhang S.-M., Lu M., Cheung W.K.C., Cai W., Gale M., Xu Q., Yan Q. (2016) An easy and efficient inducible CRISPR/Cas9 platform with improved specificity for multiple gene targeting. *Nucleic Acids Res.* **44**, e149.
 115. Castaño J., Bueno C., Jiménez-Delgado S., Roca-Ho H., Fraga M.F., Fernandez A.F., Nakanishi M., Torres-Ruiz R., Rodríguez-Perales S., Menéndez P. (2017) Generation and characterization of a human iPSC cell line expressing inducible Cas9 in the “safe harbor” AAVS1 locus. *Stem Cell Res.* **21**, 137–140.
 116. Zetsche B., Volz S.E., Zhang F. (2015) A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nat. Biotechnol.* **33**, 139–142.
 117. Nihongaki Y., Kawano F., Nakajima T., Sato M. (2015) Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. *Nat. Biotechnol.* **33**, 755–760.
 118. Davis K.M., Pattanayak V., Thompson D.B., Zuris J.A., Liu D.R. (2015) Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 316–318.
 119. Chen Y., Liu X., Zhang Y., Wang H., Ying H., Liu M., Li D., Lui K.O., Ding Q. (2016) A self-restricted CRISPR system to reduce off-target effects. *Mol. Ther.* **24**, 1508–1510.
 120. Petris G., Casini A., Montagna C., Lorenzin F., Prandi D., Romanel A., Zasso J., Conti L., Demicheli F., Cereseto A. (2017) Hit and go CAS9 delivered through a lentiviral based self-limiting circuit. *Nat. Commun.* **8**, 15334.
 121. Paquet D., Kwart D., Chen A., Sproul A., Jacob S., Teo S., Olsen K.M., Gregg A., Noggle S., Tessier-Lavigne M. (2016) Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature.* **533**, 125–129.
 122. Kwart D., Paquet D., Teo S., Tessier-Lavigne M. (2017) Precise and efficient scarless genome editing in stem cells using CORRECT. *Nat. Protoc.* **12**, 329–354.
 123. 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.
 124. Ma H., Marti-Gutierrez N., Park S.-W., Wu J., Lee Y., Suzuki K., Koski A., Ji D., Hayama T., Ahmed R., Darby H., Van Dyken C., Li Y., Kang E., Park A.-R., Kim D., Kim S.-T., Gong J., Gu Y., Xu X., Battaglia D., Krieg S.A., Lee D.M., Wu D.H., Wolf D.P., Heitner S.B., Izipisua Belmonte J.C., Amato P., Kim J.-S., Kaul S., Mitalipov S. (2017) Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos. *Nature.* **548**, 413–419.
 125. Kosicki M., Tomberg K., Bradley A. (2018) Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat. Biotechnol.* **36**, 765–771.
 126. Iyer V., Boroviak K., Thomas M., Doe B., Riva L., Ryder E., Adams D.J. (2018) No unexpected CRISPR-Cas9 off-target activity revealed by trio sequencing of gene-edited mice. *PLoS Genet.* **14**, e1007503.
 127. Höijer I., Emmanouilidou A., Östlund R., van Schendel R., Bozorgpana S., Tijsterman M., Feuk L., Gyllensten U., den Hoed M., Ameer A. (2022) CRISPR-Cas9 induces large structural variants at on-target and off-target sites *in vivo* that segregate across generations. *Nat. Commun.* **13**, 627.
 128. Li R., Di L., Li J., Fan W., Liu Y., Guo W., Liu W., Liu L., Li Q., Chen L., Chen Y., Miao C., Liu H., Wang Y., Ma Y., Xu D., Lin D., Huang Y., Wang J., Bai F., Wu C. (2021) A body map of somatic mutagenesis in morphologically normal human tissues. *Nature.* **597**, 398–403.
 129. Abascal F., Harvey L.M.R., Mitchell E., Lawson A.R.J., Lensing S.V., Ellis P., Russell A.J.C., Alcantara R.E., Baez-Ortega A., Wang Y., Kwa E.J., Lee-Six H., Cagan A., Coorens T.H.H., Spencer Chapman M., Olafsson S., Leonard S., Jones D., Machado H.E., Davies M., Øbro N.F., Mahubani K.T., Allinson K., Gerstung M., Saeb-Parsy K., Kent D.G., Laurenti E., Stratton M.R., Rahbari R., Campbell P.J., Osborne R.J., Martincorena I. (2021) Somatic mutation landscapes at single-molecule resolution. *Nature.* **593**, 405–410.
 130. Cagan A., Baez-Ortega A., Brzozowska N., Abascal F., Coorens T.H.H., Sanders M.A., Lawson A.R.J., Harvey L.M.R., Bhosle S., Jones D., Alcantara R.E., Butler T.M., Hooks Y., Roberts K., Anderson E., Lunn S., Flach E., Spiro S., Januszczyk I., Wigglesworth E., Jenkins H., Dallas T., Masters N., Perkins M.W., Deaville R., Druce M., Bogeska R., Milsom M.D., Neumann B., Gorman F., Constantino-Casas F., Peachey L., Bochynska D., Smith E.S.J., Gerstung M., Campbell P.J., Murchison E.P., Stratton M.R., Martincorena I. (2022) Somatic mutation rates scale with lifespan across mammals. *Nature.* **604**, 517–524.

Mechanism of the CRISPR/Cas9 System Specificity in Genome Editing

L. M. Kulishova¹, I. P. Vokhtantsev¹, D. V. Kim^{1, 2}, and D. O. Zharkov^{1, 2, *}

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru*

The recently discovered CRISPR/Cas9 system based on the action of complementary targeted nucleases and originally intended to protect bacteria from foreign genetic elements has become a convenient tool for manipulating the genomes of living cells. The CRISPR/Cas9 genomic editing technology has moved beyond the laboratory and is already finding application in biotechnology and agriculture. However, the use of this method for editing human cells for medical purposes is limited by CRISPR/Cas9 system off-target activity, which can lead to oncogenic mutations. Therefore, many studies aim to develop variants of the CRISPR/Cas9 system with improved accuracy. The review highlights the mechanisms of precise and erroneous action of the RNA-guided nuclease Cas9, natural and artificially created variants of RNA-targeted nucleases, possibilities to modulate their specificity through guide RNA modifications, and other approaches to increase the accuracy of the CRISPR/Cas9 system in genome editing.

Keywords: genome editing, CRISPR/Cas9, Cas9 protein, enzyme specificity, protein engineering, mutations, non-target effects

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ: ОТ РЕПАРАЦИИ ДНК ДО МЕТАБОЛОМИКИ

УДК 577.29

ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ПОЛИ(АДР-РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗЫ 1 НА СТАТУС СИСТЕМЫ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. Е. С. Ильина^{а, б, 1}, А. С. Кочеткова^{а, б, 1}, Е. А. Белоусова^{а, б}, М. М. Кутузов^{а, б},
О. И. Лаврик^{а, б}, С. Н. Ходырева^{а, *}

^аИнститут химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

^бНовосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: svetakh@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 02.08.2022 г.

После доработки 22.08.2022 г.

Принята к публикации 22.08.2022 г.

Система эксцизионной репарации оснований (BER) направлена на исправление самой многочисленной группы повреждений ДНК, а именно поврежденных оснований. Основные этапы BER включают распознавание и удаление аберрантного основания, разрезание сахарофосфатного остов ДНК, процессинг бреши (включая встраивание dNMP) и лигирование ДНК. Точное функционирование BER зависит от регуляции каждой стадии процесса регуляторными/вспомогательными белками, наиболее значимый из которых — поли(АДР-рибоза)полимераза 1 (PARP1). PARP1 играет важную роль в репарации ДНК, сохранении целостности генома, а также в регуляции стабильности и распада мРНК, поэтому PARP1 может влиять на BER как на уровне белков, участвующих в процессе, так и на уровне экспрессии кодирующих их мРНК. Систематические данные о влиянии количества PARP1 на активность ключевых белков BER и уровни кодирующих их мРНК в клетках человека пока отсутствуют. В нашей работе с использованием цельноклеточных экстрактов и препаратов РНК, полученных из родительской клеточной линии HEK293T и происходящей из нее линии HEK293T/P1-KD со сниженной экспрессией PARP1 (shPARP1-экспрессирующие клетки, нокдаун PARP1), оценены уровни мРНК, кодирующих белки BER: PARP1, PARP2, урацил-ДНК-гликозилазу (UNG2), АР-эндонуклеазу 1 (APE1), ДНК-полимеразу β (POL β), ДНК-лигазу III (LIG3) и XRCC1. Параллельно оценена каталитическая активность этих ферментов. Не обнаружено значимого влияния количества PARP1 на уровни мРНК UNG2, APE1, POL β , LIG3 и XRCC1. В то же время, показано снижение количества мРНК PARP2 в клетках HEK293T/P1-KD в 2 раза. Активности указанных ферментов в цельноклеточных экстрактах клеток HEK293T и HEK293T/P1-KD также не отличались статистически значимо. В условиях синтеза поли(АДР-рибозы) эффективность протекания реакций, катализируемых UNG2, APE1, POL β и LIG3, также не изменялась статистически значимо. Кроме того, сниженное количество PARP1 в экстракте клеток HEK293T/P1-KD не приводило к принципиальным изменениям в характере РАРилирования ДНК по сравнению с экстрактом клеток родительской линии HEK293T.

Ключевые слова: ферменты эксцизионной репарации оснований, поли(АДР-рибоза)полимераза 1, мРНК, синтез поли(АДР-рибозы), поли(АДР-рибозил)ирование ДНК

DOI: 10.31857/S0026898423020106, **EDN:** EFCKOU

ВВЕДЕНИЕ

Система эксцизионной репарации оснований (BER) направлена на исправление самой многочисленной группы повреждений ДНК — повре-

жденных азотистых оснований, но по этому пути могут репарироваться и одноцепочечные разрывы или спонтанно возникшие апуриновые/апиримидиновые (АР) сайты [1–5]. BER проходит следующие основные этапы: распознавание и

¹ Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

Сокращения: АР-сайты — апуриновые/апиримидиновые сайты, APE1 — апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1, BER — эксцизионная репарация оснований, dRP — дезоксирибозофосфатный остаток, LIG3 — ДНК-лигаза III, PARP1, PARP2, PARP3 — поли(АДР-рибоза)полимеразы 1, 2 или 3, PAR — поли(АДР-рибоза), РАРилирование — поли(АДР-рибозил)ирование, POL β — ДНК-полимераза β , UNG — урацил-ДНК-гликозилаза, UDG — урацил-ДНК-гликозилаза *E. coli*, XRCC1 — белок, входящий в группу комплементации 1, обуславливающую чувствительность клеток к рентгеновскому излучению.

удаление аберрантного основания, разрезание сахарофосфатного остова, процессинг бреши (включая встраивание dNMP) и лигирование ДНК. BER может протекать по одному из двух путей: “короткозаплаточному” (SP-BER), при котором заменяется только 1 нуклеотид, или “длиннозаплаточному” (LP-BER), отвечающему за замену 2–13 нуклеотидов [4, 5].

Короткозаплаточный (как и длиннозаплаточный) путь начинается с распознавания поврежденного азотистого основания подходящей ДНК-гликозилазой. Эти ферменты гидролизуют N-гликозидную связь между дезоксирибозой и неправильным основанием. ДНК-гликозилазы, распознающие урацил и алкилированные основания, являются монофункциональными ферментами, т.е. они ограничиваются удалением основания, не затрагивая сахарофосфатный остов. Затем апуриновая/апириимидиновая эндонуклеаза 1 (APE1) расщепляет сахарофосфатный остов с 5'-стороны от AP-сайта с образованием 3'-ОН и 5'-dRP. Окисленные основания удаляются преимущественно бифункциональными ДНК-гликозилазами, которые обладают дополнительной лиазной активностью. Они могут не только выщеплять основания, но также расщеплять сахарофосфатный остов по механизму β - или β,δ -элиминирования. В первом случае получается разрыв, фланкированный 5'-фосфатом и 3'-ненасыщенным альдегидом, во втором – одонуклеотидная брешь с 5'-фосфатом и 3'-фосфатом. Эти заблокированные 3'-концы нуждаются в процессинге до синтеза ДНК. В случае β -элиминирования роль APE1 сводится к удалению 3'-ненасыщенного альдегида, а 3'-фосфат, образующийся в результате β,δ -элиминирования, преимущественно удаляется полинуклеотидкиназой. В случае SP-BER ДНК-полимераза β (POL β) встраивает один dNMP и удаляет 5'-dRP-остаток. Затем разрыв лигируется ДНК-лигазой III (LIG3) в комплексе со своим кофакторным белком XRCC1 (белок, входящий в группу комплементации 1, обуславливающую чувствительность клеток к рентгеновскому излучению) [1–3]. LP-BER включается, когда POL β не может удалить 5'-dRP-группу. POL β встраивает первый нуклеотид, затем диссоциирует с ДНК, далее POL δ или POL ϵ осуществляют синтез с вытеснением участка цепи с получением структуры типа “flap” (ДНК-дуплекс, в котором одна из цепей имеет свисающий одноцепочечный участок). Затем флэп-эндонуклеаза 1 (FEN1) удаляет этот одноцепочечный участок и ДНК-лигаза I (LIG1) лигирует разрыв [1–5].

Точное функционирование BER зависит от регуляции каждой стадии процесса регуляторными/вспомогательными белками, наиболее важным из которых является поли(ADP-рибоза)полимераза 1 (PARP1) [6–8]. PARP1 принадлежит к

семейству белков, три члена которого, PARP1, PARP2 и PARP3, связываясь с повреждением ДНК катализируют реакцию ADP-рибозилирования, используя NAD⁺ в качестве субстрата [6–10]. PARP способны добавлять одиночные остатки ADP-рибозы к мишеням или синтезировать на них полимер ADP-рибозы. PARP используют в качестве мишеней сами себя (автоPARилирование) или ряд белков или ДНК (PARилирование) [6–10]. Показано, что PARP1 и PARP2 играют важную роль в процессах репарации ДНК и сохранении целостности генома [6–10].

Взаимодействие PARP1 с ключевыми белками и промежуточными продуктами ДНК на разных стадиях BER интенсивно анализировали, используя различные методы [9–13]. В частности, выявлено специфическое взаимодействие PARP1 и PARP2 с ранним интермедиатом BER до образования разрыва, т.е. с AP-сайтом [13, 14]. Изучено влияние PARилирования на активность POL β и других ферментов BER в SP- и LP-путях [12, 15, 16].

В последние годы обнаружено, что PARP1 является фактором регуляции стабильности и распада мРНК [17], поэтому PARP1 может влиять на BER как на уровне белков, участвующих в процессе, так и на уровне экспрессии кодирующих их мРНК.

Следует отметить, что способность PARP1 функционировать одновременно и как каталитический, и как акцепторный белок, привела к накоплению противоречивых данных о его функциях. Роль PARP1 в регуляции BER изучали на различных экспериментальных моделях, включая очищенные белки, клеточные экстракты, клетки и организмы. Однако систематические исследования влияния различных количеств PARP1 на активность ключевых белков BER и уровни кодирующих их мРНК в клетках человека пока не проведены.

В нашем исследовании с использованием цельноклеточных экстрактов и препаратов РНК, полученных из родительской клеточной линии HEK293T и происходящей из нее линии HEK293T/P1-KD со сниженной экспрессией PARP1 (shPARP1-экспрессирующие клетки, нокдаун PARP1), оценены уровни мРНК, кодирующих белки BER: PARP1, PARP2, урацил-ДНК-гликозилазу (UNG2), AP-эндонуклеазу 1 (APE1), ДНК-полимеразу β (POL β), ДНК-лигазу III (LIG3) и XRCC1. В этих экспериментах параллельно определяли каталитическую активность этих ферментов. Не обнаружено значимого влияния количества PARP1 на уровни мРНК урацил-ДНК-гликозилазы, AP-эндонуклеазы 1, ДНК-полимеразы β , ДНК-лигазы III и XRCC1. В то же время оказалось, что количество мРНК PARP2 в клетках HEK293T/P1-KD снижено в 2 раза. Активности указанных ферментов в цельноклеточных экстрактах клеток HEK293T и HEK293T/P1-KD не

Таблица 1. Последовательности использованных ДНК

ДНК	Нуклеотидная последовательность	Схематическое изображение
ДНК-1	5'-pGGGAGGCCCTGGCGTTUCCCGGCTTAGTCGCC-3'	³² p — U — 3'
ДНК-2	5'-pGGCGACTAAGCCGGG-3'	³² p — OH
ДНК-3	5'-pCGGTATCCAGGTCTG-3'	³² p —
ДНК-4	5'-pGGGAGGCCCTGGCGTTUCCCGGCTTAGTCGCC-3' 3'-CCCTCCGGGACCGCAAGGGGCCGAATCAGCGG-5'	³² p — U — 3' 5'
ДНК-5	5'-pGGCGACTAAGCCGGG pUCCCGGCTTAGTCGCC-3' 3'-CCGCTGATTCGGCCCCGTTGCGGTCCCGGGCGG-5'	³² p — OH pU — 3' 5'
ДНК-6	5'-pGGCGACTAAGCCGGG pCAACGCCAGGGCCTCCC-3' 3'-CCGCTGATTCGGCCCCGTTGCGGTCCCGGAGGG-5'	³² p — OH pC — 3' 5'
ДНК-7	5'-pCGGTATCCAGGTCTG pGACAACGATGAAGCC-3' 3'-GCCATAGGTCCAGACTCTGTTGCTACTTCCG-5'	³² p — p — 3' 5'

различались статистически значимо. Не выявлено значимых изменений в эффективности протекания реакций, катализируемых UNG2, AP-эндонуклеазой 1, POL β и LIG3 в условиях синтеза поли(ADP-рибозы), а также принципиальных отличий в протекании недавно обнаруженного процесса поли(ADP-рибозил)ирования ДНК [18–23] в экстракте клеток HEK293T/P1-KD со сниженным количеством PARP1 и в экстракте клеток родительской линии HEK293T.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Олигонуклеотиды, в том числе ПЦР-праймеры, синтезированы в Лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН. [γ -³²P]АТР и [α -³²P]dАТР (>3000 Ки/ммоль) (Лаборатория биотехнологии, ИХБФМ СО РАН); урацил-ДНК-гликозилаза *E. coli* (UDG), Т4-полинуклеотидкиназа (“Биосан”, Россия), вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Лаборатория биотехнологии, ИХБФМ СО РАН). БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (×2) (“Биолаб-микс”, Россия).

Плазмиды, несущие кДНК AP-эндонуклеазы 1 человека и ДНК-полимеразы β мыши, любезно предоставлены S.H. Wilson (NIH, NIH, США). Рекомбинантные белки POL β и APE1 очищены согласно [24, 25]. Векторы, кодирующие PARP1 и PARP2, любезно предоставлены V. Schreiber (ESBS, Ikirch, Франция). Препараты PARP1 и PARP2 выделены как описано в [26]. Плазмида, несущая кДНК PARP3, любезно предоставлена G. Zarkovich (Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Франция). PARP3 очищен согласно [21].

Клеточные линии HEK293T и HEK293T/P1-KD (со сниженным содержанием PARP1) любезно

предоставлены коллегами из лаборатории нуклеопротеинов, руководимой О.А. Донцовой (МГУ, Москва). Цельноклеточные экстракты из этих клеток получены согласно [27]. РНК выделяли набором Invitrogen (“Thermo Fisher Scientific”, США) в соответствии с протоколом производителя [28]. Чистоту препарата проверяли по соотношению значений поглощения на длинах волн 260 и 230 нм (A_{260/230}) (в чистом препарате соотношение варьирует в диапазоне 1.8–2.2). Перед использованием в реакции обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР (ОТ-кПЦР) препарат РНК обрабатывали ДНКазой. Концентрацию белков определяли по методу Брэдфорда [29] с использованием бычьего сывороточного альбумина (BSA) в качестве стандарта.

Введение [³²P] на 5'-конец олигонуклеотида и получение ДНК-субстратов. ДНК-1, ДНК-2 или ДНК-3 метили [³²P] по 5'-концу (табл. 1) с использованием Т4-полинуклеотидкиназы и [γ -³²P]АТР, затем меченые олигонуклеотиды выделяли согласно [30].

С полученными ³²P-мечеными олигонуклеотидами создавали ДНК-дуплексы, структура и обозначение которых приведены в табл. 1. Олигонуклеотиды смешивали в эквимольном соотношении и проводили гибридизацию, нагревая в течение 5 мин при 95°C с последующим медленным охлаждением до комнатной температуры.

Количественная обработка результатов радиоавтографии. Для визуализации радиоактивных продуктов гель экспонировали с радиочувствительным экраном. Радиоактивные продукты в геле визуализировали с помощью прибора The Typhoon FLA 9000 Scanner (“GE Healthcare”, США). Интенсивность пятен оценивали с использова-

Таблица 2. Прямые (F) и обратные (R) праймеры

Ген	Нуклеотидная последовательность
<i>GAPDH</i>	F: 5'-AGATCATCAGCAATGCCTCCT-3' R: 5'-TGGTCATGAGTCCTTCCACG-3'
<i>B2M</i>	F: 5'-CGCTCCGTGGCCTTAGCTGT-3' R: 5'-AAAGACAAGTCTGAATGCTC-3'
<i>TUBβ</i>	F: 5'- TGGTGGATCTAGAACCTGGGA-3' R: 5'- CTGCCCCAGACTGACCAAAT-3'
<i>PARP1</i>	F: 5'-TGCCTATTACTGCACTGGGG-3' R: 5'-TCTCGGAATTCCTTTGGGGTT-3'
<i>PARP2</i>	F: 5'-TCCTAAGGCCGAAGGATTGC-3' R: 5'-CCCATTGAGGGTGACGAAGT-3'
<i>UNG2</i>	F: 5'-AAGCAAGGTGTTCTCCTTCTCA-3' R: 5'-GCCAGGACACAACTGCATC-3'
<i>APE1</i>	F: 5'- GATCTCGCGAGTAGGGCAAC-3' R: 5'- TTCGGCATTCCCGTTACGAA-3'
<i>POLβ</i>	F: 5'-GAACACTCTGGGGTTCTCGG-3' R: 5'-TGCGAGTTCTGTGAGCATGT-3'
<i>LIG3</i>	F: 5'-GAACACTCTGGGGTTCTCGG-3' R: 5'-TGCGAGTTCTGTGAGCATGT-3'
<i>XRCC1</i>	F: 5'-TACAGCAAGGACTCCCCCTT-3' R: 5'-CACTGTCACCTTCTGGGACG-3'

нием программного обеспечения Quantity One (“Bio-Rad”, США).

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР). Относительный уровень экспрессии генов в клетках HEK293T и HEK293T/P1-KD определяли с помощью ОТ-кПЦР с использованием БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (×2). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 10 нг суммарной РНК, 0.5 мкМ праймеры, смесь обратной транскриптазы (75 ед. акт./мкл) и ДНК-полимеразы (4 ед. акт./мкл) в буфере для ОТ-кПЦР (из расчета 2 мкл смеси ферментов на 25 мкл ОТ-ПЦР SYBR Blue (×2)). Реакцию проводили в амплификаторе LigthCycler96 (“Roche”, Швейцария) по заданной программе: обратная транскрипция при 45°C в течение 1800 с, предынкубация при 95°C – 300 с, 40 циклов: денатурация при 95°C – 10 с, гибридизация праймеров при 60°C – 10 с и элонгация при 72°C – 10 с. Сигнал детектировали при 84°C в течение 5 с. В эксперименте проводили по 3 повтора для каждой точки, в качестве калибраторов использовали гены домашнего хозяйства *GAPDH*, *B2M*, *TUBβ*. Последовательности использованных праймеров представлены в табл. 2. Все праймеры подобраны с использованием программы Primer-BLAST (NCBI, США),

для каждой пары определена эффективность амплификации.

Эффективность амплификации каждой пары праймеров, нормированное значение уровня экспрессии относительно калибратора ($\Delta\Delta C_t$) и стандартную ошибку рассчитывали с использованием программного обеспечения LigthCycler96 (“Roche”). Данные представлены в виде средних значений, для каждого рассчитано стандартное отклонение. Относительный уровень экспрессии генов в двух клеточных линиях HEK293T и HEK293T/P1-KD сравнивали, рассчитывая *p*-значение и используя критерий Манна–Уитни, статистически значимым считали $p \leq 0.05$ ((*) $p \leq 0.05$). Расчеты производили с использованием программы PRISM (GraphPad Software, США).

Сравнение количества PARP1 в клеточных экстрактах с помощью вестерн-блот-анализа. Вестерн-блот-анализ проводили согласно методике, описанной в [31]. Кратко, 2.5 мкг суммарного белка клеточного экстракта или 0.05 мкг индивидуального белка PARP1 разделяли с помощью электрофореза по методу Лэммли [32]. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проводили с использованием набора Trans-Blot Turbo в условиях, указанных производителем. Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в растворе первич-

ных антител (антитела кролика к PARP1 в разведении 1: 1000), в растворе конъюгата пероксидазы хрена с вторичными антителами к антителам кролика, затем с коммерческим субстратом для проявления вестерн-блота Super Signal West Pico PLUS ("Thermo Scientific"). Хемилюминесценцию регистрировали на приборе Amersham Imager 600 ("GE Healthcare", США).

Получение ДНК-структур, содержащих AP-сайт или расщепленный AP-сайт с остатком 5'-dRP. Указанные ДНК получали из урацил-содержащих ДНК под действием фермента UDG непосредственно перед проведением эксперимента, инкубируя ДНК в течение 30 мин при 37°C в соотношении 1 мкМ U-ДНК: 0.1 ед. акт./мкл UDG. Реакцию проводили в TE-буфере (10 мМ Трис-HCl, pH 7.8, 1 мМ EDTA).

Определение уровня поли(ADP-рибозил)ирования в клеточных экстрактах. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 0.6 A₂₆₀/мл активированной ДНК, 20 мкМ радиоактивно меченный [³²P]NAD⁺ ([³²P]NAD⁺ : NAD⁺ = 1 : 9), 0.5 мг/мл экстракта или 30 нМ PARP1, 5 мМ MgCl₂ и буферные компоненты (50 мМ Трис-HCl pH 8.0, 40 мМ NaCl, 0.1 мг/мл BSA, 1 мМ DTT). Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 мин. Отбирали 4 мкл пробы и наносили на бумажные мишени, пропитанные трихлоруксусной кислотой (ТХУ), оставшаяся реакция. Мишени промывали 3 раза 5%-ным раствором ТХУ и 2 раза этиловым спиртом, затем высушивали и проводили радиоавтографический анализ.

Определение урацил-ДНК-гликозилазной активности в клеточных экстрактах. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 0.1 мкМ меченую ³²P U-ДНК (ДНК-1 или ДНК-4, табл. 1), 0.05 мг/мл экстракта или 0.1 ед. акт./мкл UDG, 10 мМ EDTA, 400 мкМ NAD⁺ (где указано), буферные компоненты (50 мМ Трис-HCl pH 8.0, 40 мМ NaCl, 5% глицерин, 0.1% Nonidet P-40, 1 мМ DTT). Реакцию проводили при температуре 37°C. Аликвоты объемом 2 мкл отбирали через 2, 5, 10 мин в равный объем 100 мМ NaOH и инкубировали в течение 10 мин при 60°C. Продукты реакции анализировали с помощью гель-электрофореза в 20% полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии 7 М мочевины и 10% формамида [33].

Анализ процессинга AP-сайтов белками клеточных экстрактов. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 0.1 мкМ ³²P-меченый AP-ДНК-дуплекс (ДНК-4, предварительно обработанная UDG, табл. 1), 0.01 мг/мл экстракта или 1 нМ APE1, 5 мМ MgCl₂, 400 мкМ NAD⁺ (где указано) и буферные компоненты: 50 мМ Трис-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 5% глицерин, 0.1% Nonidet P-40, 0.1 мг/мл BSA. Реакцию проводили при температуре 37°C. Аликвоты объемом 2 мкл отбирали через 2, 4, 8 мин в равный объем смеси метоксиами-

на (100 мМ) и EDTA (50 мМ) и инкубировали в течение 30 мин при 0°C. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 20%-ном ПААГ в присутствии 7 М мочевины и 10% формамида с последующей радиоавтографией [33]. Определение эффективности расщепления AP-сайтов по лиазному механизму проводили аналогичным образом, за исключением того, что в реакционные смеси вместо ионов магния добавляли 20 мМ EDTA, а времена инкубации составляли 10, 15 и 30 мин.

Определение ДНК-полимеразной активности в клеточных экстрактах. Реакционные смеси содержали 0.1 мкМ ³²P-меченый ДНК-дуплекс (ДНК-5, предварительно обработанная UDG, табл. 1), 0.05 мг/мл экстракта или 50 нМ POLβ, 5 мМ MgCl₂, смесь dATP, dCTP, dGTP и dTTP по 0.1 мкМ каждого, 400 мкМ NAD⁺ (где указано) и буферные компоненты: 50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 5% глицерин, 0.1% Nonidet P-40, 0.1 мг/мл BSA. Пробы инкубировали при 37°C и через 5, 10 и 15 мин отбирали аликвоты по 2 мкл в 1 мкл 25 мМ EDTA для остановки реакции. Анализ продуктов реакции проводили с помощью электрофореза в 20%-ном ПААГ в присутствии 7 М мочевины и 10% формамида с последующей радиоавтографией [33].

Определение ДНК-лигазной активности в клеточных экстрактах. Реакционные смеси содержали 0.1 мкМ ³²P-меченый ДНК-дуплекс (ДНК-6, табл. 1), 0.05 мг/мл экстракта или 0.1 ед. акт./мкл ДНК-лигазы T4, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ АТР, 400 мкМ NAD⁺ (где указано) и буферные компоненты (50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 50 мМ NaCl), 1 мМ DTT, 5% глицерин, 0.1% Nonidet P-40, 0.1 мг/мл BSA. Пробы инкубировали при 37°C и через 5, 15, 30 мин отбирали аликвоты по 2 мкл в 1 мкл 25 мМ EDTA для остановки реакции. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 20%-ном ПААГ в присутствии 7 М мочевины и 10% формамида с последующей радиоавтографией [33].

РАРилирование ДНК. Стандартные реакционные смеси (10 мкл) содержали 50 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 50 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 0.1 мг/мл BSA, 2 мМ спермин, 0.15 мМ NAD⁺, 10 мМ EDTA, 20 нМ [5'-³²P]-меченый ДНК-субстрат (ДНК-7, табл. 1) и 200 нМ PARP3; реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Затем добавляли белки клеточного экстракта (до 1.25 мг/мл) и/или PARP1 (200 нМ), PARP2 (200 нМ) и дополнительно инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Реакцию останавливали, добавляя равный объем формамида. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины и 10% формамида с последующей радиоавтографией [33].

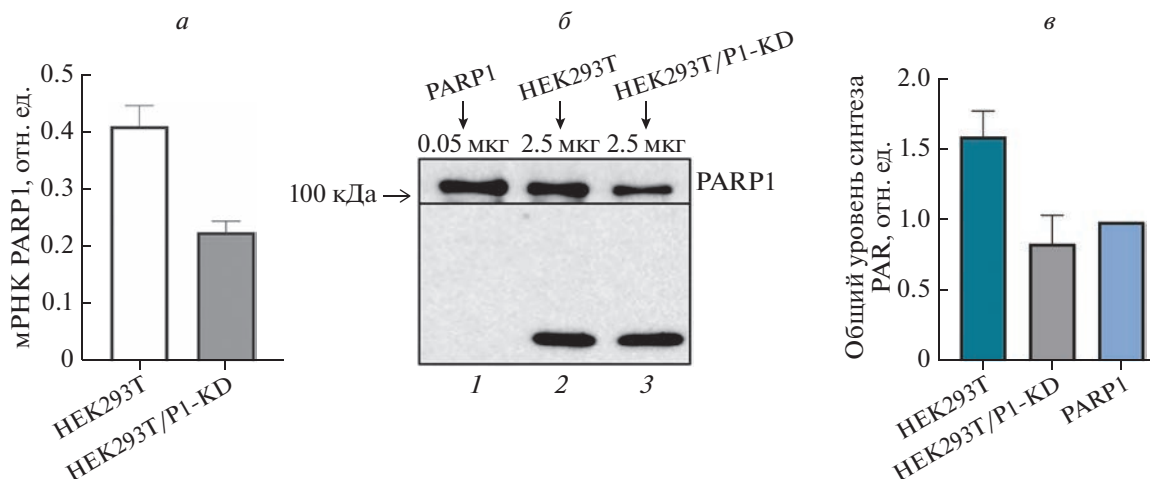


Рис. 1. Результаты ОТ-кПЦР (а), вестерн-блот-анализа уровня PARP1 в клеточных линиях HEK293T и HEK293T/P1-KD (б) и синтеза поли(ADP-рибозы) в цельноклеточных экстрактах (в). Относительные уровни мРНК определены в трех независимых экспериментах и представлены в виде средних значений со стандартным отклонением. Количество поли(ADP-рибозы), синтезированной за 1 мин при 37°C, представлено в виде гистограммы. В каждом эксперименте количество PAR, синтезируемой эндогенными PARP экстрактов, нормировали на количество полимера, синтезированное с помощью 30 нМ рекомбинантного PARP1. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, вычисленные из трех независимых экспериментов.

Синтез $[^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$. Синтез радиоактивного NAD^+ осуществляли из $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, как описано в [19]. Реакционные смеси, содержащие 1 мМ АТФ, 10 МБк $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 20 мМ MgCl_2 , 2 мМ β -никотинамидмононуклеотид и 5 мг/мл никотинамиднуклеотидаденилтрансферазы в 25 мМ Трис- HCl (pH 7.5), инкубировали при 37°C в течение 60 мин и останавливали нагреванием до 90°C в течение 3 мин. После удаления денатурированного белка центрифугированием раствор использовали в качестве источника NAD^+ без очистки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

PARP1 — высококопийный белок, выполняющий плеiotропные функции в клетках. Роль PARP1 в различных способах репарации ДНК ранее изучали на различных экспериментальных моделях, которые имеют свои преимущества и недостатки. Одним из удобных и продуктивных способов анализа активности ферментов репарации ДНК (в том числе и системы BER) на определенном этапе является реконструкция этой системы *in vitro* с использованием цельноклеточных экстрактов и интермедиатов ДНК с характерными для данной стадии репарации повреждениями ДНК. Использование клеток с уменьшенным количеством PARP1 открывает новые возможности для изучения влияния этого белка на эффективность системы BER как на уровне самих белков и/или их активности, так и на уровне кодирующих их мРНК. В нашей работе использована клеточная линия HEK293T/P1-KD, в которой уро-

вень PARP1 снижен введением в клетки конструкции (лентивирусный вектор LeGO Cer), подавляющей экспрессию по механизму РНК-интерференции.

Сначала были охарактеризованы уровни PARP1 в клетках HEK293T и HEK293T/P1-KD. С помощью ОТ-кПЦР показано, что в клеточной линии HEK293T/P1-KD уровень мРНК PARP1 практически в 2 раза ниже, чем в родительской линии HEK293T (рис. 1а).

Данные вестерн-блот-анализа (рис. 1б) согласуются с результатами ОТ-кПЦР и свидетельствуют о значительном, но неполном снижении количества PARP1. Следует отметить, что умеренное снижение количества PARP1 в клетках HEK293T/P1-KD отмечено исследователями, предоставившими нам клеточную линию [34].

С целью дальнейшей характеристики клеточных линий оценили эффективность синтеза поли(ADP-рибозы) (PAR), катализируемого эндогенными PARP цельноклеточных экстрактов. Для этого использовали меченный $[^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$ и активированную ДНК в качестве кофактора (рис. 1в). Исходя из кинетики синтеза PAR эндогенными PARP экстрактов, в качестве интервала времени на линейной части кинетической кривой была выбрана 1 мин. Количество PAR, синтезированное в экстрактах, для адекватного сравнения нормировали на количество полимера, синтезированного с помощью 30 нМ рекомбинантного PARP1. Уровни синтеза PAR хорошо коррелируют с уровнями мРНК, кодирующей PARP1, и количеством PARP1, оцененным с помощью ве-

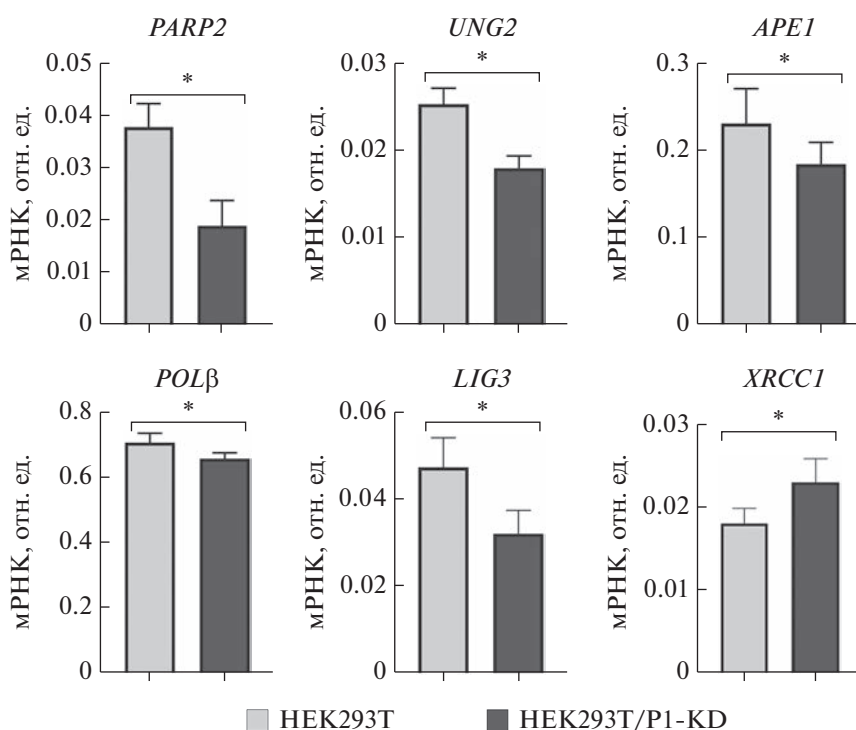


Рис. 2. Сравнение уровней мРНК, кодирующих PARP2, UNG2, APE1, POLβ, LIG3 и XRCC1 в клетках HEK293T и HEK293T/P1-KD. Уровни мРНК получены из трех независимых экспериментов. Величину *P* рассчитывали с использованием критерия Манна–Уитни, статистически значимым считали $p \leq 0.05$; * $p \leq 0.05$).

стерн-блотинга. Сравнение уровней PAR, синтезированной в экстрактах за счет активности именно PARP1, правомерно, поскольку, согласно опубликованным данным, этот фермент обеспечивает синтез более 90% поли(ADP-рибозы) в клетке [6–10]. Таким образом, снижение уровней PAR в исследуемых клеточных экстрактах соответствует степени подавления экспрессии PARP1.

Сравнение относительного уровня мРНК PARP2, UNG, APE1, POLβ, LIG3 и XRCC1 в клетках HEK293T и HEK293T/P1-KD

С использованием суммарной РНК, полученной из клеток HEK293T и HEK293T/P1-KD, оценено влияние изменения количества PARP1 в клетках на уровни мРНК, кодирующих белки SP-BER. На рис. 2 представлены данные ОТ-кПЦР с относительными уровнями мРНК генов, кодирующих некоторые ключевые белки, участвующие в SP-BER: PARP2, UNG, APE1, POLβ, LIG3 и XRCC1. В клетках с нокдауном PARP1 уровень мРНК PARP2 снижен приблизительно в 2 раза в сравнении с клетками родительской линии. Кроме того, снижение экспрессии генов *UNG2*, *APE1*, *POLβ* и *LIG3* в этих клетках менее выражено, а в случае *XRCC1* регистрируется умеренное повышение.

Оценка эффективности стадий BER в экстрактах из клеток HEK293T и HEK293T/P1-KD

Влияние PARP1 на активность белков SP-BER на всех этапах процесса: удаление урацила из цепи, процессинг AP-сайта, синтез ДНК и лигирование разрыва, оценили с помощью функциональных тестов с использованием ^{32}P -меченых ДНК-структур, моделирующих интермедиаты соответствующих стадий BER, и цельноклеточных экстрактов. Кроме того, чтобы оценить возможное влияние синтеза PAR на этапы процесса BER, тесты выполняли в присутствии NAD^+ .

Удаление урацила из ДНК. В общем случае BER начинается с удаления поврежденного азотистого основания ДНК-гликозилазами. Таким поврежденным азотистым основанием, репарируемым системой BER, может быть урацил. Урацил иногда включается вместо тимина во время синтеза ДНК или может получаться путем спонтанного и ферментативного дезаминирования цитозина. Считается, что в одной клетке спонтанное дезаминирование цитозинов происходит 70–200 раз в день [35].

Клетки высших эукариот содержат три типа урацил-ДНК-гликозилаз [36] — SMUG (одноцепочечная селективная урацил-ДНК-гликозилаза), UNG1 (митохондриальная UNG) и UNG2 (ядерная UNG). Урацил-N-гликозилазы UNG2 и

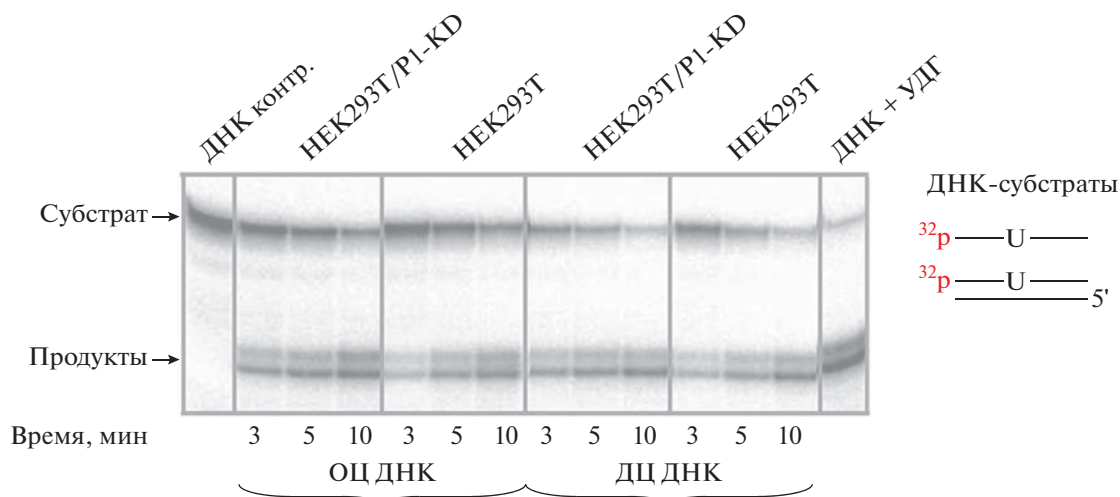


Рис. 3. Эффективность удаления урацила из ДНК. Реакционные смеси (10 мкл) содержали 0.1 мкМ ^{32}P -меченую урацилсодержащую ДНК, цельноклеточный экстракт в конечной концентрации 0.05 мг/мл или UDG и буферные компоненты.

SMUG1 инициируют BER в большинстве контекстов ДНК [36].

Удаление урацила отслеживали, применяя обработку ДНК щелочью, которая расщепляет сахарофосфатный остов в месте AP-сайта, образовавшегося в результате удаления урацила. Сравнили эффективность удаления урацила как из двухцепочечной, так и из одноцепочечной ДНК (ДНК-1 и ДНК-4, табл. 1).

Не обнаружено значимых отличий в эффективности выщепления урацила из одноцепочечных и двухцепочечных субстратов в экстрактах обоих типов (рис. 3). Присутствие NAD^+ также не оказывало значимого влияния на удаление урацила.

Следует отметить, что при определении влияния синтеза PAR на активность эндогенных ферментов исследуемых экстрактов в качестве кофактора PARP1, необходимого для активации этого фермента, выступал ДНК-субстрат, имитирующий интермедиат определенной стадии BER. Предварительно с использованием рекомбинантной PARP1 сравнили кофакторные характеристики активированной ДНК, традиционно используемой в тестах определения активности PARP1, и ДНК-субстратов BER в концентрации 0.1 мкМ. Такая концентрация ДНК-субстратов BER использована нами для определения в экстрактах активности ферментов этого пути репарации. Скорость синтеза PAR в присутствии ДНК-субстратов BER приблизительно в 2 раза ниже, чем в стандартной смеси с активированной ДНК ($0.6 A_{260}/\text{мл}$). В результате выщепления урацила из цепи образуется AP-сайт, который далее подвергается процессингу.

Процессинг AP-сайтов. Разрезание сахарофосфатного остова по положению AP-сайта может

происходить за счет гидролиза либо расщепления по механизму β - или β,δ -элиминирования. Основной вклад в процессинг AP-сайтов в клетках млекопитающих вносит именно гидролиз, приводящий к формированию разрыва с 3'-гидроксильной и 5'-дезоксирибозофосфатной группами [37]. APE1 ответственна за гидролиз 95% AP-сайтов в клетках млекопитающих [38].

Данные о взаимном влиянии PARP1 и APE1 в процессе BER противоречивы. Следует отметить, что наблюдали как стимулирующие, так и ингибирующие эффекты при кооперации этих ферментов [12, 13, 39–41]. На рис. 4 представлены данные по эффективности расщепления AP-сайтов. Степень гидролиза AP-сайтов в экстракте клеток HEK293T/P1-KD несколько ниже, чем в экстракте клеток родительской линии. Таким образом, в использованных условиях PARP1 оказывает слабое стимулирующее влияние. Присутствие NAD^+ как субстрата PARилирования практически не влияет на процесс.

Для оценки вклада независимого от Mg^{2+} расщепления AP-сайтов реакцию проводили в присутствии EDTA, чтобы подавить связывание ионов металла с APE1. Такое расщепление AP-сайта может происходить по лиазному механизму за счет действия бифункциональных ДНК-гликозилаз и других ферментов, обладающих AP-лиазной активностью [1, 2, 6, 13, 14]. В частности, такую активность, согласно полученным нами данным, проявляют PARP1 и PARP2 [6, 13, 14]. Также возможно ферментативное расщепление AP-сайтов по гидролитическому механизму, не требующему ионов магния для катализа. К числу таких ферментов относится тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 [42]. В целом, вклад магний-не-

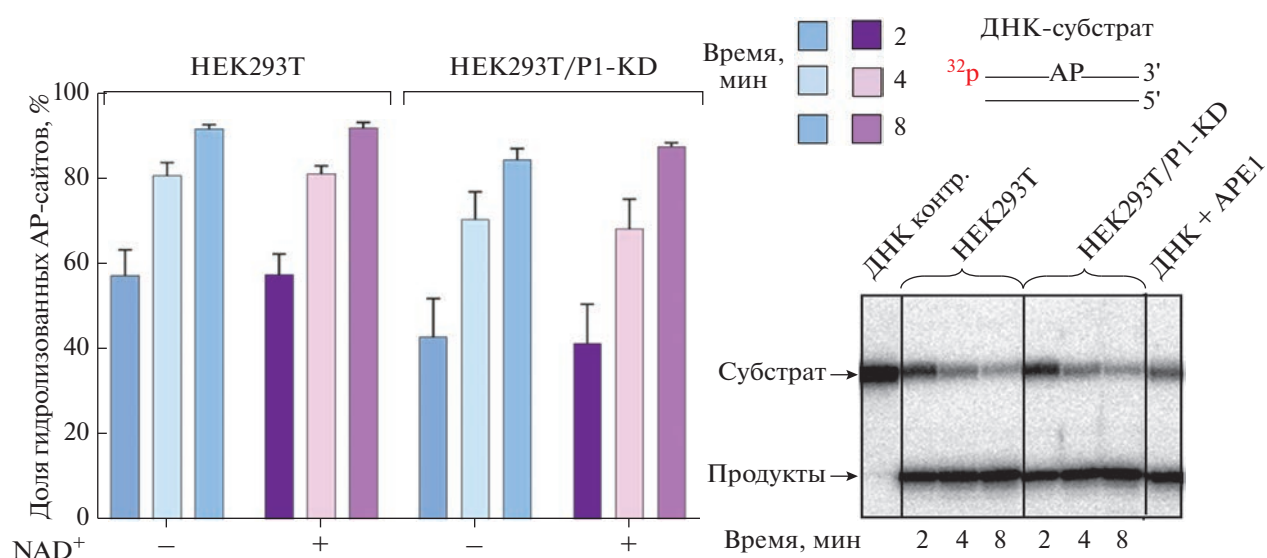


Рис. 4. Эффективность гидролиза AP-сайтов. Реакционные смеси (10 мкл) содержали 0.1 мкМ ^{32}P -меченую AP-ДНК, цельноклеточный экстракт в конечной концентрации 0.01 мг/мл или 1 нМ APE1, 5 мМ MgCl_2 , 400 мкМ NAD^+ (если указано) и буферные компоненты. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

зависимого процессинга AP-сайтов невелик и в использованных условиях составляет 4–6%. Эти варианты расщепления AP-сайтов могут обеспечивать независимые от APE1 пути процессинга AP-сайтов, однако они значительно менее эффективны и, по-видимому, могут иметь значение для обеспечения выживания клеток при утрате APE1.

Синтез ДНК. Следующий шаг BER — синтез цепи ДНК в месте разрыва, образовавшегося после процессинга AP-сайта. Основной вклад в застраивание бреши в субстрате SP-BER вносит ДНК-полимераза β [43].

В работах нашей лаборатории с использованием рекомбинантных белков и некоторых клеточных экстрактов было показано, что PARP1 может снижать ДНК-полимеразную активность $\text{POL}\beta$, особенно в синтезе ДНК с вытеснением цепи [40, 41, 44]. Автомоификация же PARP1 снижает ингибирующее действие этого белка. Данные по синтезу ДНК представлены на рис. 5. В экстракте клеток HEK293T/P1-KD со сниженным содержанием PARP1 эффективность удлинения праймеров несколько выше, чем в экстракте исходной клеточной линии. Это относится как к встраиванию одного нуклеотида, в случае SP-BER, так и к включению в праймеры нескольких нуклеотидных звеньев, что происходит в LP-BER. Удлинение праймеров на большее количество нуклеотидных звеньев не учитывается в использованной здесь количественной оценке. В условиях синтеза PAR (присутствие NAD^+) эффективность синтеза ДНК несколько выше для обоих экстрактов. Полученные результаты полностью объясняются

конкуренцией за связывание с субстратом между $\text{POL}\beta$ и PARP1, а, возможно, и PARP2. PARP1 и PARP2 обладают высоким сродством к ДНК, содержащим брешь [44–46]. Автомоифицированная форма PARP1 проявляет более низкое сродство к ДНК по сравнению с исходной формой из-за электростатического отталкивания ДНК и PAR, что выражается в уменьшении комплексообразования фермента с ДНК и приводит к менее эффективному удлинению праймера.

Лигирование ДНК. Последний этап SP-BER — восстановление целостности сахарофосфатного остова — осуществляется АТФ-зависимой ДНК-лигазой III альфа (LIG3). LIG3 образует стабильный комплекс с архитектурным белком XRCC1 и этот комплекс участвует в BER [46]. XRCC1 не обладает каталитической активностью, но формируя двойные и тройные комплексы с несколькими ферментами (белками) BER, обеспечивает их согласованное взаимодействие, которое в значительной степени обусловлено способностью XRCC1 связываться с самими белками BER, а также PARилироваться и связываться с PAR [46, 47].

ДНК-лигазную активность в экстрактах исследуемых клеточных линий оценивали с использованием ДНК-субстрата с разрывом в одной из цепей (ДНК-6, табл. 1). На рис. 6 представлены данные эффективности лигирования разрыва в экстрактах за 5, 15, 30 мин. Из-за низкой эффективности этого процесса времени инкубации были увеличены по сравнению с другими реакциями BER, что приводит к появлению в образцах частично гидролизованных олигонуклеотидов. Не

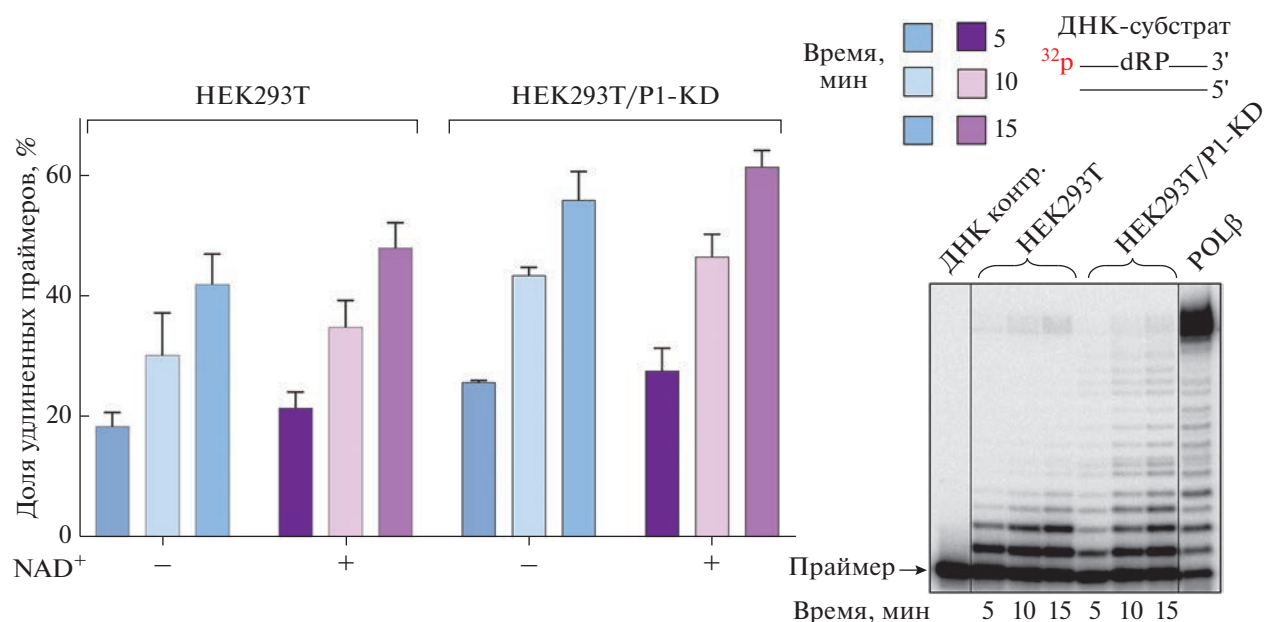


Рис. 5. Эффективность синтеза ДНК. Реакционные смеси (10 мкл) содержали 0.05 мг/мл белков экстракта или 50 нМ POLβ, 5 мМ MgCl₂, смесь dATP, dCTP, dGTP и dTTP по 0.1 мМ каждого, 0.1 мкМ ³²P-меченую ДНК, 400 мкМ NAD⁺ (где указано) и буферные компоненты. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение, вычисленные в трех независимых экспериментах.

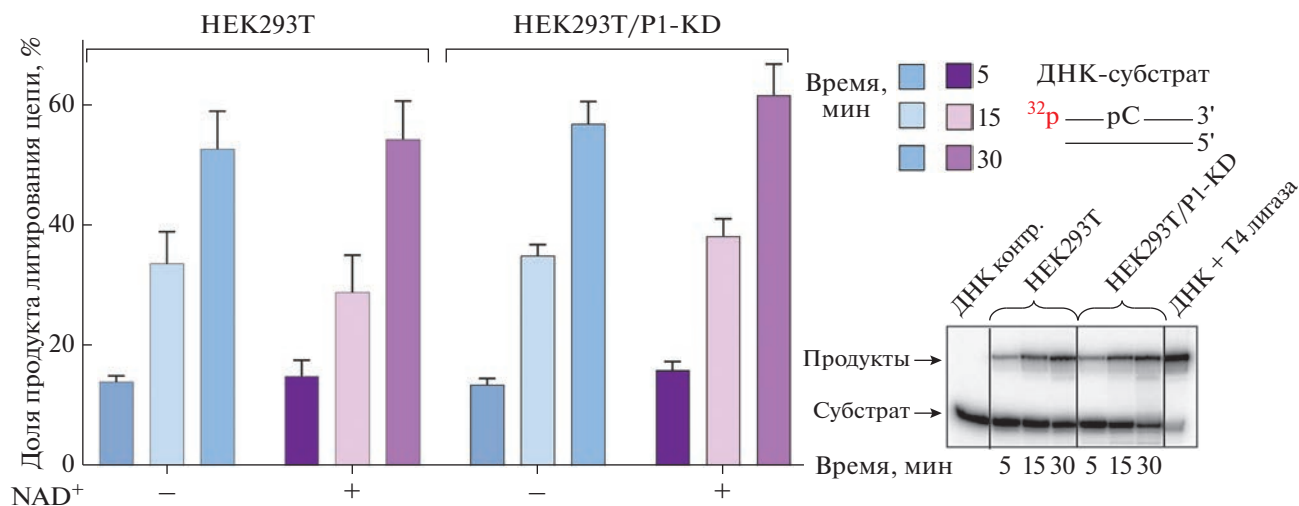


Рис. 6. Эффективность лигирования ДНК. Реакционные смеси (10 мкл) содержали 0.1 мкМ ³²P-меченый ДНК-дуплекс, 0.05 мг/мл белков экстракта или 0.1 ед. акт./мкл ДНК-лигазы T4, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ АТФ, 400 мкМ NAD⁺ (где указано) и буферные компоненты. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение, вычисленные из трех независимых экспериментов.

удалось обнаружить ни достоверной разницы в эффективности лигирования между исходным и модифицированным по содержанию белка PARP1 экстрактами, ни влияния синтеза PAR на этот процесс.

Поли(ADP-рибозил)ирование ДНК. Еще один недавно обнаруженный процесс, в котором участвуют PARP, — поли(ADP-рибозил)ирование

ДНК [18–23]. Нами и другими исследователями продемонстрировано поли(ADP-рибозил)ирование концов ДНК за счет активности PARP1 и PARP2 и моно(ADP-рибозил)ирование — PARP3 [18–23]. Более того, 5'-концевые моно(ADP-рибозил)ированные ДНК являются значительно более эффективными субстратами для удлинения цепи PAR с помощью PARP1 и PARP2 по сравне-

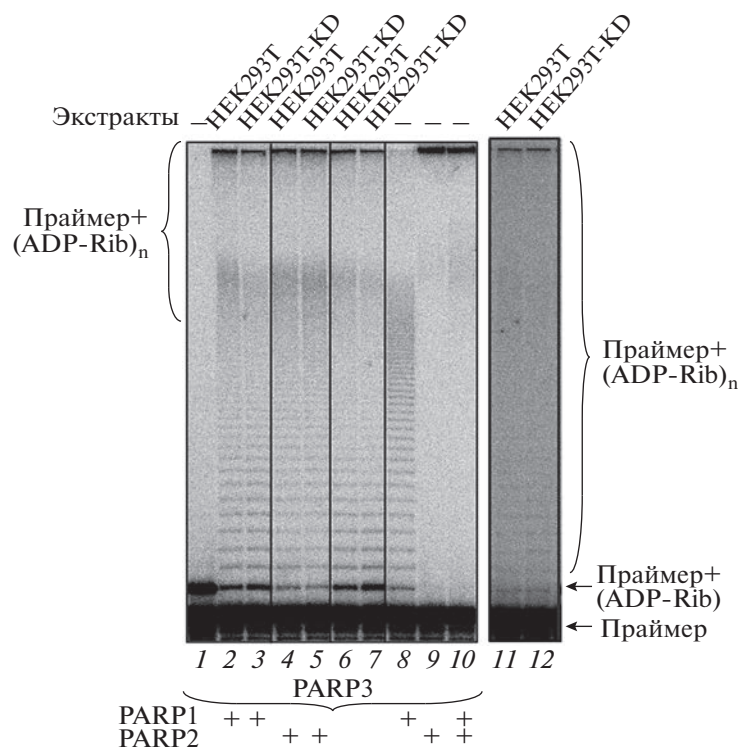


Рис. 7. Поли(ADP-рибозил)ирование ДНК. Стандартные реакционные смеси (10 мкл) содержали 50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 0.1 мг/мл BSA, 2 мМ спермин, 0.15 мМ NAD⁺, 10 мМ EDTA, 20 нМ [5'-³²P]-меченый ДНК-субстрат (ДНК-7, табл. 1) и белки клеточного экстракта (1.25 мг/мл); реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 15 мин (11 и 12). В ряде случаев в реакционные смеси добавляли 200 нМ PARP3 и инкубировали при 37°C в течение 15 мин, затем добавляли белки клеточного экстракта (до 1.25 мг/мл) и/или PARP1 (200 нМ), PARP2 (200 нМ) и дополнительно инкубировали при 37°C в течение 15 мин.

нию с немодифицированными ДНК. Кроме того, обнаружено поли(ADP-рибозил)ирование ДНК эндогенными PARP нескольких экстрактов клеток млекопитающих, которые отличаются количеством PARP1. Показана зависимость паттернов PARилирования ДНК от количества этого белка [18, 19, 21–23]. Такая модификация ДНК может рассматриваться как механизм защиты двухцепочечных концов от “подрезания” клеточными нуклеазами. С учетом специфических требований PARP к структуре ДНК в реакции ее (ADP-рибозил)ирования защитный эффект может реализовываться, когда двухцепочечные концы и разрывы/бреши расположены в пределах 1–2 витков спирали ДНК, чтобы обеспечить временной промежутки, необходимый для репарации одноцепочечного разрыва [20, 21, 23]. Учитывая различия в содержании PARP1 и, вероятно, PARP2 в исследуемых экстрактах, можно ожидать и существование различий в паттернах модификации ДНК. Данные поли(ADP-рибозил)ирования ДНК в экстрактах с использованием ДНК-7, которая содержит однонуклеотидную брешь, приведены на рис. 7. Эта ДНК представляет собой модельный субстрат BER, мы использовали ее и ранее [21, 23]. Поли(ADP-рибозил)ирование ДНК эндогенными

PARP происходит в обоих экстрактах (рис. 7, 11 и 12), однако с низким выходом, что затрудняет проведение анализа. Ранее такую же картину регистрировали для схожих по структуре ДНК-дуплексов и экстрактов клеток млекопитающих и показали, что выход продуктов поли(ADP-рибозил)ирования ДНК значительно увеличивается в случае ДНК, предварительно модифицированных одним остатком ADP-рибозы [19]. Такую модификацию удобнее всего вводить с использованием PARP3 (рис. 7, 1) [18]. Последующая инкубация с белками экстрактов, а также белками экстрактов, дополненными рекомбинантным PARP3 и/или рекомбинантными PARP1 и PARP2 (рис. 7, 4–8) приводит к формированию поли(ADP-рибозил)ированной ДНК, которая содержит продукты пошагового удлинения праймера остатками ADP-рибозы и высокомолекулярные продукты, не разрешающиеся в процессе электрофореза (обозначены скобками слева).

Экстракт HEK293T/P1-KD характеризуется менее эффективным PARилированием праймера — выход продуктов 71 против 84% в экстракте HEK293T (рис. 7, 6 и 7). Каждая из рекомбинантных PARP1 и PARP2 имеет свой паттерн PARилирования олигонуклеотида; продукты пошагового

удлинения праймера остатками ADP-рибозы при незначительном количестве высокомолекулярных продуктов характерны для PARP1, в то время как PARP2 образует высокомолекулярные продукты, не разрешающиеся в процессе электрофореза, при практически полном отсутствии праймера с относительно небольшим количеством присоединенных остатков ADP-рибозы (рис. 7, 8 и 9). При совместном присутствии PARP1 и PARP2 наблюдается распределение продуктов ПАрилирования праймера, характерное для PARP2, что свидетельствует об эффективном функционировании PARP2 в этом процессе. Если же добавлять PARP1 и PARP2 в экстракты, то распределение указанных продуктов изменяется незначительно по сравнению с исходными экстрактами (рис. 7, сравнить 2+3 и 4+5 с 6+7). Однако следует отметить уменьшение количества неизрасходованного моно(ADP-рибозил)ированного праймера при добавлении PARP2 в экстракты (с 16 до 5% и с 29 до 6% для HEK293T и HEK293T/P1-KD соответственно). Добавление дополнительных количеств PARP1 и PARP2 в экстракты приводит к сдвигу паттерна формируемых продуктов к виду, характерному для каждой из PARP. Этот эффект более ярко проявляется в случае PARP2. Однако нужно отметить, что влияние добавленного PARP2 в экстрактах несоизмеримо ниже, чем в системе, реконструированной из очищенных белков, где паттерн продуктов при совместном присутствии эквимоларных количеств PARP1 и PARP2 практически не отличается от паттерна PARP2. Это, по-видимому, обусловлено конкуренцией других ДНК-связывающих белков клетки. В целом, снижение количества PARP1 в экстрактах не внесло принципиальных изменений в характер ПАрилирования ДНК. Полученные результаты однозначно выявляют кооперацию трех PARP, активирующихся при взаимодействии с ДНК, в ПАрилирование этой мишени.

Таким образом, не выявлено значимого влияния количества PARP1 в экстрактах на активность основных ферментов SP-BER и ПАрилирование ДНК. Не обнаружено также существенного влияния PARP1 на уровни мРНК ферментов BER. По-видимому, в отсутствие сильного стрессового воздействия на клетки PARP1 может участвовать в точной подстройке активностей ферментов BER за счет относительно небольших эффектов. Полученные данные о слабом влиянии PARP1 на активность системы BER согласуются с текущими представлениями об избыточной “пропускной способности” системы BER и о том, что лишние количества невостребованных белков подвергаются процессингу, например, за счет убиквитинзависимой системы протеолиза [48–50].

Основная часть работы выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-

14-00204); эксперименты по ПАрилированию ДНК – Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-00674 А).

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. Hegde M.L., Hazra T.K., Mitra S. (2008) Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* **18**, 27–47.
2. Almeida K.H., Sobol R.W. (2007) A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair.* **6**, 695–711.
3. Schärer O.D. (2003) Chemistry and biology of DNA repair. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 2946–2974.
4. Frosina G., Fortini P., Rossi O., Carrozzino F., Raspaglio G., Cox L.S., Lane D.P., Abbondandolo A., Dogliotti E. (1996) Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 9573–9578.
5. Klungland A., Lindahl T. (1997) Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J.* **16**, 3341–3348.
6. Ходырева С.Н., Лаврик О.И. (2016) Поли(ADP-рибоза)полимераза 1 – ключевой регулятор репарации ДНК. *Молекуляр. биология.* **50**, 655–673.
7. Langelier M.F., Eisemann T., Riccio A.A., Pascal J.M. (2018) PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **53**, 187–198.
8. Alemasova E.E., Lavrik O.I. (2019) Poly(ADP-ribosylation) by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins. *Nucl. Acids Res.* **47**, 3811–3827.
9. Hanzlikova H., Gittens W., Krejciikova K., Zeng Z., Caldecott K.W. (2017) Overlapping roles for PARP1 and PARP2 in the recruitment of endogenous XRCC1 and PNKP into oxidized chromatin. *Nucl. Acids Res.* **45**, 2546–2557.
10. De Vos M., Schreiber V., Dantzer F. (2012) The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem. Pharmacol.* **84**, 137–146.
11. Mortusewicz O., Amé J.-C., Schreiber V., Leonhardt H. (2007) Feedback-regulated poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucl. Acids Res.* **35**, 7665–7675.
12. Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Lebedeva N.A., Prasad R., Wilson S.H., Lavrik O.I. (2005) Human base excision repair enzymes apurinic/apyrimidinic endonuclease1 (APE1), DNA polymerase beta and poly(ADP-ribose) polymerase 1: interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity. *Nucl. Acids Res.* **33**, 1222–1229.
13. Khodyreva S.N., Prasad R., Ilna E.S., Sukhanova M.V., Kutuzov M.M., Liu Y., Hou E.W., Wilson S.H., Lavrik O.I. (2010) Apurinic/apyrimidinic (AP) site recognition by

- the 5'-dRP/AP lyase in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 22090–22095.
14. Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Amé J.C., Lavrik O.I. (2015) Interaction of PARP-2 with AP site containing DNA. *Biochimie*. **112**, 10–19.
 15. Sukhanova M.V., Hamon L., Kutuzov M.M., Joshi V., Abrakhi S., Dobra I., Curmi P.A., Pastre D., Lavrik O.I. (2019) A single-molecule atomic force microscopy study of PARP1 and PARP2 recognition of base excision repair DNA intermediates. *J. Mol. Biol.* **431**, 2655–2673.
 16. Kurgina T.A., Anarbaev R.O., Sukhanova M.V., Lavrik O.I. (2018). A rapid fluorescent method for the real-time measurement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity. *Anal. Biochem.* **545**, 91–97.
 17. Matveeva E.A., Mathbout L.F., Fondufe-Mittendorf Y.N. (2019) PARP1 is a versatile factor in the regulation of mRNA stability and decay. *Sci. Repts.* **91**, 1–12.
 18. Belousova E.A., Ishchenko A.A., Lavrik O.I. (2018) DNA is a new target of PARP3. *Sci. Rep.* **8**, 4176.
 19. Kosova A.A., Kutuzov M.M., Evdokimov A.N., Ilina E.S., Belousova E.A., Romanenko S.A., Trifonov V.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. (2019) Poly(ADP-ribosylation) and DNA repair synthesis in the extracts of naked mole rat, mouse, and human cells. *Aging (Albany NY)*. **11**, 2852–2873.
 20. Белоусова Е.А., Кутузов М.М., Иванкина П.А., Ищенко А.А., Лаврик О.И. (2018) Новый путь репарации разрывов ДНК с участием PARP3 и белков эксцизионной репарации оснований. *ДАН*. **482**, 96–100.
 21. Talhaoui I., Lebedeva N.A., Zarkovic G., Saint-Pierre C., Kutuzov M.M., Sukhanova M.V., Matkarimov B.T., Gasparutto D., Saporbaev M.K., Lavrik O.I., Ishchenko A.A. (2016) Poly(ADP-ribose) polymerases covalently modify strand break termini in DNA fragments *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* **44**, 9279–9295.
 22. Munnur D., Ahel I. (2017) Reversible mono-ADP-ribosylation of DNA breaks. *FEBS J.* **284**, 4002–4016.
 23. Zarkovic G., Belousova E.A., Talhaoui I., Saint-Pierre C., Kutuzov M.M., Matkarimov B.T., Biard D., Gasparutto D., Lavrik O.I., Ishchenko A.A. (2018) Characterization of DNA ADP-ribosyltransferase activities of PARP2 and PARP3: new insights into DNA ADP-ribosylation. *Nucl. Acids Res.* **46**, 2417–2431.
 24. Lebedeva N.A., Khodyreva S.N., Favre A., Lavrik O.I. (2003) AP endonuclease 1 has no biologically significant 3'–5'-exonuclease activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 182–187.
 25. Драчкова И.А., Петрусева И.О., Сафронов И.В., Захаренко А.Л., Шишкин Г.В., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. (2001) Реагенты для модификации белково-нуклеиновых комплексов. II. Сайт-специфическая фотомодификация комплексов ДНК-полимеразы β праймерами, элонгированными экзо-N-замещенными арилазидными производными dСТР. *Биоорганическая химия*. **27**, 197–204.
 26. Amé J.C., Kalisch T., Dantzer F., Schreiber V. (2011) Purification of recombinant poly(ADP-ribose) polymerases. *Meth. Mol. Biol.* **780**, 135–152.
 27. Biade S., Sobol R.W., Wilson S.H., Matsumoto Y. (1998) Impairment of proliferating cell nuclear antigen-dependent apurinic/aprimidinic site repair on linear DNA. *J. Biol. Chem.* **273**, 898–902.
 28. Rio D.C., Ares M. Jr., Hannon G.J., Nilsen T.W. (2010) Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, 5439.
 29. Bradford M.A. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
 30. Ilina E.S., Lavrik O.I., Khodyreva S.N. (2008) Ku antigen interacts with abasic sites. *Biochim. Biophys. Acta*. **1784**, 1777–1785.
 31. Ilina E.S., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. (2018) Unusual interaction of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) with abasic sites via the Schiff-base-dependent mechanism. *Biochimie*. **150**, 88–99.
 32. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685.
 33. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press., 2nd Ed.
 34. Savelyev N.V., Shepelev N.M., Lavrik O.I., Rubtsova M.P., Dontsova O.A. (2021) PARP1 regulates the biogenesis and activity of telomerase complex through modification of H/ACA-Proteins. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 621134.
 35. Doseth B., Visnes T., Wallenius A., Ericsson I., Sarno A., Pettersen H.S., Flatberg A., Catterall T., Slupphaug G., Krokan H.E., Kavli B. (2011) Uracil-DNA glycosylase in base excision repair and adaptive immunity: Species differences between man and mouse. *J. Biol. Chem.* **286**, 16669–16680.
 36. Doseth B., Ekre C., Slupphaug G., Krokan H.E., Kavli B. (2012) Strikingly different properties of uracil-DNA glycosylases UNG2 and SMUG1 may explain divergent roles in processing of genomic uracil. *DNA Repair (Amst)*. **11**, 587–593.
 37. Mol C.D., Hosfield D.J., Tainer J.A. (2000) Abasic site recognition by two apurinic/aprimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means. *Mutat. Res.* **460**, 211–229.
 38. Wilson D.M., Barsky D. (2001) The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat. Res.* **485**, 283–307.
 39. Prasad R., Dyrkheeva N., Williams J., Wilson S.H. (2015) Mammalian base excision repair: functional partnership between PARP-1 and APE1 in AP-site repair. *PLoS One*. **10**, e0124269.
 40. Суханова М.В., Ходырева С.Н., Лаврик О.И. (2004) Поли(АДР-рибоза)-полимераза-1 ингибирует синтез ДНК с вытеснением цепи, катализируемый ДНК-полимеразой β . *Биохимия*. **69**, 558–568.
 41. Sukhanova M., Khodyreva S., Lavrik O. (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase beta in long patch base excision repair. *Mutat. Res. — Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **685**(1–2), 80–89.
 42. Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., El-Khamisy S.F., Lavrik O.I. (2012) Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1

- initiates repair of apurinic/apyrimidinic sites. *Biochimie*. **94**, 1749–1753.
43. Srivastava D.K., Berg B.J., Prasad R., Molina J.T., Beard W.A., Tomkinson A.E., Wilson S.H. (1998) Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *J. Biol. Chem.* **273**, 21203–21209.
 44. Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Amé J.C., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Schreiber V., Lavrik O.I. (2013) Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins. *Biochimie*. **95**, 1208–1215.
 45. Kutuzov M.M., Belousova E.A., Kurgina T.A., Ukraintsev A.A., Vasil'eva I.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. (2021) The contribution of PARP1, PARP2 and poly(ADP-ribose) to base excision repair in the nucleosomal context. *Sci. Rep.* **11**, 4849.
 46. Caldecott K.W. (2019) XRCC1 protein; form and function. *DNA Repair (Amst)*. **81**, 102664.
 47. Моор Н.А., Лаврик О.И. (2018) Белок-белковые взаимодействия системы эксцизионной репарации оснований ДНК. *Биохимия*. **83**, 564–576.
 48. Parsons J.L., Dianov G.L. (2013) Co-ordination of base excision repair and genome stability. *DNA Repair (Amst)*. **12**, 326–333.
 49. Edmonds M.J., Parsons J.L. (2014) Regulation of base excision repair proteins by ubiquitylation. *Exp. Cell. Res.* **329**, 132–138.
 50. Fang Q., Inanc B., Schamus S., Wang X.H., Wei L., Brown A.R., Svilar D., Sugrue K.F., Goellner E.M., Zeng X., Yates N.A., Lan L., Vens C., Sobol R.W. (2014) HSP90 regulates DNA repair via the interaction between XRCC1 and DNA polymerase β . *Nat. Commun.*, **5**, 5513.

Influence of Poly(ADP-ribose)polymerase 1 Level on the Status of Base Excision Repair in Human Cells

E. S. Ilina^{1, 2}, A. S. Kochetkova^{1, 2}, E. A. Belousova^{1, 2}, M. M. Kutuzov^{1, 2},
O. I. Lavrik^{1, 2}, and S. N. Khodyreva^{1, *}

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: svetakh@niboch.nsc.ru

The base excision repair (BER) system is aimed at repair of the largest group of DNA lesions, namely of damaged bases. The main steps in BER are: recognition and removal of the aberrant base, cutting the DNA sugar-phosphate backbone, gap processing (including dNMP insertion), and DNA ligation. The precise functioning of BER depends on the regulation of each step of the process by regulatory/accessory proteins, the most important of which is poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP1). PARP1 plays an important role in various processes of DNA repair, maintenance of genome integrity, and regulation of mRNA stability and decay. In this regard, PARP1 can affect BER both at the level of proteins involved in the process and at the level of expression of the mRNAs encoding them. There are no systematic data on the effect of various amounts of PARP1 on the activity of key BER proteins and the levels of mRNAs encoding them in human cells. In our work, using whole-cell extracts and RNA preparations obtained from the parental HEK293T cell line and its derivative HEK293T/P1-KD cell line with reduced PARP1 expression (shPARP1-expressing cells, PARP1 knockdown), we assessed the levels of mRNA encoding BER proteins: PARP1, PARP2, uracil DNA glycosylase (UNG2), AP endonuclease 1 (APE1), DNA polymerase β (POL β), DNA ligase III (LIG3), and XRCC1. In parallel, the catalytic activity of these enzymes was evaluated. No significant effect of the PARP1 amount of on the mRNA levels of UNG2, APE1, POL β , LIG3, and XRCC1 was found. At the same time, in HEK293T/P1-KD cells, the amount of PARP2 mRNA was reduced by 2 times. The activities of these enzymes in whole-cell extracts of HEK293T and HEK293T/P1-KD cells also did not differ significantly. Under the conditions of poly(ADP-ribose) synthesis, the efficiency of the reactions catalyzed by UNG2, APE1, POL β , and LIG3 also did not change significantly. In addition, it was shown that a reduced amount of PARP1 in the extract of HEK293T/P1-KD cells does not cause fundamental changes in the nature of DNA PARylation compared to the extract of the parental HEK293T cell line.

Keywords: Base excision repair enzymes, poly(ADP-ribose)polymerase 1, mRNA, poly(ADP-ribose) synthesis, DNA poly(ADP-ribose)ylation

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ:
ОТ РЕПАРАЦИИ ДНК ДО МЕТАБОЛОМИКИ

УДК 577.25

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ мРНК ГЕНОВ *Tph1*, *Tph2*, АКТИВНОСТИ
ТРИПТОФАНГИДРОКСИЛАЗЫ И МЕТАБОЛИЗМА СЕРОТОНИНА
В МОЗГЕ МЫШЕЙ ЧЕРЕЗ 5 СУТОК
ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

© 2023 г. Д. В. Щербаков^а, А. Б. Арефьева^а, П. Д. Комлева^а, А. Е. Изъюров^а, Н. В. Хоцкин^а,
Д. В. Базовкина^а, А. В. Куликов^{а, *, **}

^аИнститут цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: v_kulikov@bionet.nsc.ru

**e-mail: avkulikov52@gmail.com

Поступила в редакцию 24.07.2022 г.

После доработки 25.08.2022 г.

Принята к публикации 25.08.2022 г.

Триптофангидроксилазы 1 и 2 (ТПГ1 и ТПГ2) играют ключевую роль в синтезе гормона и медиатора серотонина (5-НТ) в периферических тканях и 5-НТ нейронах соответственно. С целью изучения роли ТПГ1 в головном мозге мыши определили уровень мРНК гена *Tph1* в разных структурах мозга мышей в норме и при воспалении и сравнили его с уровнем мРНК гена *Tph2*, с активностью ТПГ и метаболизмом 5-НТ. Опыты проводили на трех группах молодых (4 недели) самцов мышей линии C57BL/6 (интактных, контрольных, которым вводили в/б физиологический раствор, и опытных, у которых воспаление моделировали однократным в/б введением липополисахарида (2 мг/кг, ЛПС)). Через 5 суток после введения физиологического раствора или ЛПС определяли маркеры воспаления, массу селезенки и тимуса. В коре головного мозга, гиппокампе, стриатуме, гипоталамусе и среднем мозге с помощью ВЭЖХ оценивали уровень 5-НТ и его метаболита — 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-НИАА), активность ТПГ. Уровень мРНК генов *Tph1* и *Tph2* определяли методом количественной ОТ-ПЦР. Через 5 суток после введения ЛПС наблюдали значительное увеличение массы селезенки и уменьшение массы тимуса. Выявлено значительное увеличение уровня 5-НТ и 5-НИАА в среднем мозге и снижение уровня 5-НИАА и активности ТПГ в гипоталамусе мышей, которым вводили физиологический раствор и ЛПС, по сравнению с интактными мышами. Уровень мРНК гена *Tph2* была максимальной в среднем мозге, где расположены тела 5-НТ нейронов, тогда как в коре, гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе уровень мРНК этого гена был в несколько раз ниже. В среднем мозге мышей всех групп уровень мРНК гена *Tph1* был в несколько сотен раз ниже, чем уровень мРНК гена *Tph2*. Таким образом, в мозге мышей ТПГ1 экспрессируется на слишком низком уровне, чтобы существенно влиять на синтез 5-НТ в норме и при воспалении.

Ключевые слова: мыши, триптофангидроксилазы 1 и 2, серотонин, липополисахарид, головной мозг

DOI: 10.31857/S0026898423020209, **EDN:** EEWKAW

ВВЕДЕНИЕ

Серотонин (5-НТ) действует как ключевой медиатор в мозге и гормон на периферии. В мозге позвоночных 5-НТ синтезируется в 5-НТ нейронах, тела которых расположены в стволовой части мозга [1], тогда как на периферии он синтезируется в энтерохромаффинных клетках кишечника, тучных клетках кожи и эпифизе. Нарушения 5-НТ системы мозга связывают с риском различных психопатологий, тогда как транспортер и рецепторы 5-НТ служат мишенями для клинически эффективных антидепрессантов, анксиолитиков и антипсихотиков [2–4].

В организме млекопитающих 5-НТ синтезируется из незаменимой аминокислоты — *L*-триптофана. Ключевыми ферментами синтеза 5-НТ являются триптофангидроксилазы 1 и 2 (ТПГ1 и ТПГ2), которые гидроксилируют *L*-триптофан до 5-гидрокситриптофана (5-НТР) [5, 6]. Основным геном считается *Tph2*, который экспрессируется в 5-НТ нейронах, тогда как *Tph1* экспрессируется исключительно в периферических клетках, таких как энтерохромаффинные клетки кишечника, тучные клетки и пинеалоциты эпифиза [5–9]. Однако транскрипты гена *Tph1* найдены в мозге крысы [10], мыши [11, 12] и человека [13–15], причем концентрации транскриптов *Tph1* и *Tph2*

были соизмеримыми. Стресс может усиливать экспрессию гена *Tph1* в мозге мышей [12].

Вопрос об экспрессии гена *Tph1* принципиально важен для понимания роли ТПГ2 и ТПГ1 в функционировании 5-НТ системы мозга в норме и при патологиях, поэтому основная цель нашей работы состояла в определении соотношения этих ферментов в мозге в норме и при патологии. Изучена экспрессия мРНК генов *Tph1* и *Tph2* в структурах головного мозга, содержащих тела 5-НТ нейронов (средний мозг), в которых экспрессируется ген *Tph2*, и окончания этих нейронов (кора, гиппокамп, стриатум и гипоталамус), в которых данный ген не экспрессируется, в норме и через 5 сут после активации иммунной системы мышей бактериальным липополисахаридом (ЛПС). Состояние иммунной системы оценивали по массе селезенки и тимуса, а 5-НТ системы — по уровню 5-НТ и его основного метаболита, 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-НИАА), а также по активности ТПГ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные и воздействия. Опыты проводили на мышах линии C57BL/6 (24 молодых самца в возрасте 4 недель с массой тела 16.7 ± 0.4 г). Выбор молодых животных обусловлен их повышенной чувствительностью к ЛПС и лабильностью 5-НТ системы мозга.

Для снятия группового эффекта животных сразу после получения рассаживали поодиночно в вентилируемые клетки Optimice (“Animal Care Systems, Inc.”, США) и содержали в течение всего эксперимента при температуре 24°C, влажности 45–50% и стандартном для вивария световом режиме (14 ч свет, 10 ч темнота). Стерильный корм и воду животные получали без ограничения. Все мыши были разделены на три выровненные по весу группы: интактную ($n = 8$, масса 16.4 ± 0.5 г), контрольную ($n = 8$, масса 17.1 ± 0.7 г) — мышам этой группы в/б вводили физиологический раствор; и опытную ($n = 8$, масса 16.7 ± 0.8 г) — мышам этой группы в/б вводили 2 мг/кг ЛПС (“Sigma-Aldrich”, Германия), растворенного в физиологическом растворе. Через 5 сут после введения физиологического раствора или ЛПС животных усыпляли углекислым газом, декапитировали, выделяли головной мозг, селезенку и тимус. Последнее взвешивали с точностью до мг на весах Ohaus AX124 (“Ohaus Corp.”, США). Из головного мозга выделяли структуры, содержащие окончания (переднюю кору, гиппокамп, стриатум, гипоталамус) и тела (средний мозг) 5-НТ нейронов, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C .

Биохимические протоколы. В работе использовали метод, позволяющий определять содержание 5-НТ, активность ТПГ и уровень мРНК целе-

вых генов в одних и тех же образцах ткани. Для сохранения активности ТПГ кору, стриатум и гипоталамус гомогенизировали в 250 мкл, гиппокамп в 300 мкл и средний мозг в 400 мкл холодного 50 мМ Трис-НСl, pH 7.6, содержащего 1 мМ дитиотреитола. Одну аликвоту (50 мкл) суспензии немедленно переносили в пробирку эппендорф (1.5 мл), содержащую 150 мкл 0.6 М HClO_4 , для экстракции 5-НТ и 5-НИАА. Другую аликвоту (100 мкл) суспензии немедленно переносили в пробирку эппендорф (1.5 мл), содержащую 500 мкл Trizol Reagent (“Ambion, Life Technologies”, США) для экстракции РНК. Остальной гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при $+4^\circ\text{C}$ и 12700 об./мин, чистый супернатант переносили в пробирки, хранили при -80°C и использовали для определения активности ТПГ2. Процедура гомогенизации в буфере и аликвотирования одной пробы занимает меньше 1 мин и не вызывает деградации ни 5-НТ, ни РНК.

Определение уровня 5-НТ и 5-НИАА. Смесь суспензии (50 мкл) и 0.6 М HClO_4 (150 мкл) центрифугировали в течение 20 мин при 12700 об./мин ($+4^\circ\text{C}$). Полученный супернатант разбавляли в 2 раза водой MilliQ и использовали для определения уровня 5-НТ и 5-НИАА с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Luna C18(2) (частицы 5 мкм, $L \times I.D = 75 \times 4.6$ мм, “Phenomenex”, США) и электрохимического детектора (750 мВ, DECADE II™ Electrochemical Detector; “Antec”, Нидерланды). Осадок растворяли в 0.1 М NaOH для определения концентрации общего белка в пробе по Брэдфорду (“BioRad”, США) согласно протоколу производителя. Концентрации 5-НТ и 5-НИАА в пробе определяли по площади пика с помощью программы LabSolution LG/GC (“Shimadzu Corp.”, Япония) и нормировали по калибровочной кривой, полученной с использованием стандартов 1, 2 и 3 нг для 5-НТ и 5-НИАА [16]. Содержание 5-НТ и 5-НИАА выражали в нг/мг белка.

Определение активности ТПГ2. Аликвоту супернатанта (15 мкл) инкубировали в течение 15 мин при 37°C в присутствии 1 мМ дитиотреитола, 0.4 мМ субстрата, *L*-триптофана (“Sigma-Aldrich”), 0.3 мМ кофактора — 6-метилтетрагидроптерина (“Sigma-Aldrich”), 0.3 мМ ингибитора декарбоксилазы — 3-гидроксibenзилгидразина (“Sigma-Aldrich”) и 5 ед. каталазы (“Sigma-Aldrich”), в конечном объеме 25 мкл. Реакцию останавливали, приливая 75 мкл 0.6 М HClO_4 , центрифугировали в течение 20 мин при 12700 об./мин ($+4^\circ\text{C}$). Чистый супернатант разбавляли в 2 раза водой MilliQ и использовали для определения уровня синтезированного 5-НТР с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Luna C18(2) (размер частиц 5 мкм, $L \times I.D = 75 \times 4.6$ мм, “Phenomenex”) и электро-

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных для проведения количественной ОТ-ПЦР в реальном времени

Ген	Праймер	Температура плавления, °C	Длина ампликона, п.н.	Эффективность амплификации
<i>Tph2</i>	5'-CATTCCTCGCACAATTCCAGTCG-3' 5'-AGTCTACATCCATCCCAACTGCTG-3'	62	239	1.8
<i>Tph1</i>	5'-ACAAACTCTACCCGACCCAC-3' 5'-CAGTTGCGGGATGTTGTCTT-3'	63	197	1.7
<i>Polr2a</i>	5'-GTTGTCTGGGCAGCAGAATGTAG-3' 5'-TCAATGAGACCTTCTCGTCCTCC-3'	63	188	1.9

химического детектора (750 мВ, DECADE II™ Electrochemical Detector; “Antec,” США) согласно [16]. Концентрации 5-НТР в пробе определяли по площади пика с помощью программы LabSolution LG/GC (“Shimadzu Corp.”) и нормировали по калибровочной кривой, полученной с использованием стандартов 50, 100 и 200 пмоль 5-НТР [16]. В контрольные пробирки добавляли те же реактивы, но не инкубировали, а немедленно приливали 75 мкл 0.6 М HClO₄. Аликвоту супернатанта (10 мкл) смешивали с 90 мкл 0.1 М NaOH и определяли белок по Брэдфорду (“BioRad”) согласно протоколу производителя. Активность ТПГ2 выражали в пмолях 5-НТР, синтезированных за 1 мин в пересчете на 1 мг белка (пмоль/мг/мин).

Выделение РНК и ОТ-ПЦР. РНК выделяли из аликвоты (100 мкл) гомогената с помощью Trizol Reagent (“Ambion, Life Technologies”, США) согласно протоколу производителя. Следы геномной ДНК удаляли, используя ДНКазу, свободную от РНКазы (“Promega”, США). Целостность РНК определяли с помощью электрофореза в 0.8%-ном агарозном геле. кДНК синтезировали с помощью набора R01-250 (“Биолабмикс”, Россия) согласно протоколу производителя. Концентрацию мРНК определяли методом количественной ОТ-ПЦР с помощью наборов R-402 (“Синтол”, Россия) и специфически подобранных праймеров (табл. 1). Использовали следующие условия: денатурация 94°C, 4 мин, (денатурация 94°C, 15 с; отжиг и элонгация при температуре отжига (табл. 1), 60 с; измерение флуоресценции – 80°C, 2 с) 40 циклов (“Синтол”, Россия). Праймеры подбирали таким образом, чтобы продукты (ампликоны) не включали интроны. Это условие необходимо для использования геномной ДНК мыши в качестве внешнего стандарта. Уровень экспрессии оценивали с использованием калибровочной кривой, построенной по известным концентрациям геномной ДНК мыши и нормировали на 100 транскриптов гена *Polr2a* в пробе, служащей внутренним стандартом [16–18]. Такой метод позволяет измерить реальное число копий кДНК целевых генов и гена домашнего хозяйства и нормировать экспрессию целевых генов на ген домашнего хозяйства [17].

Статистика. Результаты представляли как среднее ± ошибка среднего и анализировали с помощью однофакторного метода ANOVA. Сравнение *post hoc* проводили по Фишеру. Уровень значимости принят равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменение массы селезенки и тимуса через 5 суток после введения мышам физиологического раствора или ЛПС

Нами выявлены значительные различия в массе селезенки ($F(2,21) = 15.5, p < 0.001$) и тимуса ($F(2,21) = 36.9, p < 0.001$) у мышей разных групп. В группе мышей, которым вводили ЛПС (2 мг/кг), отмечено резкое увеличение массы селезенки и снижение массы тимуса через 5 сут после инъекции по сравнению с животными, которым вводили физиологический раствор (селезенка, $p < 0.001$; тимус, $p < 0.001$), или интактными мышами (селезенка, $p = 0.001$; тимус, $p < 0.001$) (рис. 1). При этом введение физиологического раствора не влияло на массу селезенки и тимуса, которые оставались такими же, как у интактных животных (селезенка, $p = 0.18$; тимус, $p = 0.84$) (рис. 1).

Изменения уровней 5-НТ и 5-Н1АА в структурах мозга мышей через 5 суток после введения физиологического раствора или ЛПС

Обнаружены значительные межгрупповые различия в уровне 5-НТ в гиппокампе и среднем мозге, 5-Н1АА в гипоталамусе и среднем мозге, в гиппокампе и гипоталамусе мышей (табл. 2). Однократное введение как физиологического раствора, так и ЛПС (2 мг/кг) приводило к увеличению уровня 5-НТ в гиппокампе и среднем мозге, уровня 5-Н1АА в среднем мозге, но к уменьшению уровня 5-Н1АА в гипоталамусе (табл. 2).

Изменения активности ТПГ2 в структурах мозга мышей через 5 суток после введения физиологического раствора или ЛПС

Как и ожидалось, активность ТПГ2 в коре, гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе мышей

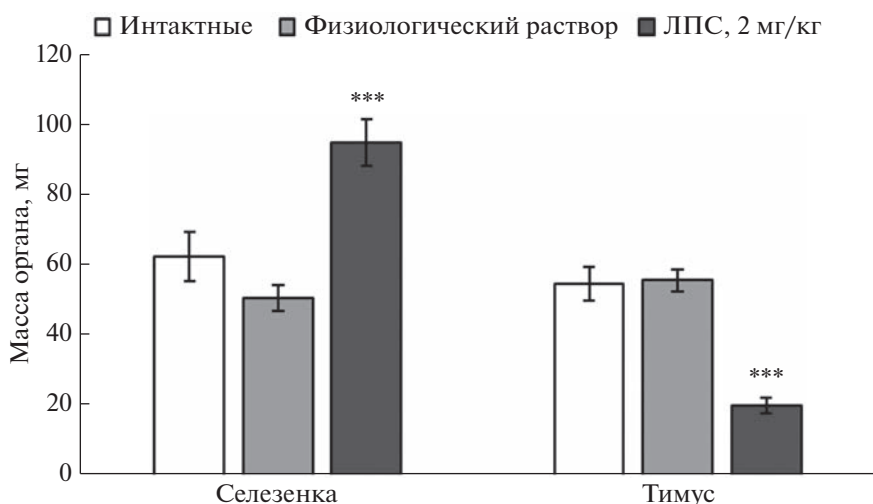


Рис. 1. Масса селезенки и тимуса у интактных мышей и через 5 дней после однократной в/б инъекции физиологического раствора или ЛПС в дозе 2 мг/кг. *** $p < 0.001$ по сравнению с интактными.

была ниже, чем в среднем мозге. Не выявлено межгрупповых различий в активности фермента в коре ($F(2,21) = 1.3$, $p = 0.29$), гиппокампе ($F(2,21) = 1.76$, $p = 0.2$), стриатуме ($F(2,21) = 1.57$, $p = 0.23$) и среднем мозге ($F(2,21) < 1$). Однако введение физиологического раствора и ЛПС снижало активность ТПГ2 в гипоталамусе ($F(2,21) = 8.88$, $p = 0.0016$) (рис. 2).

Изменения уровней мРНК генов *Tph1* и *Tph2* в структурах мозга мышей через 5 суток после введения физиологического раствора или ЛПС

Максимальный уровень транскриптов гена *Tph1* обнаружен в гиппокампе, в других структурах мозга он был в основном ниже (табл. 3). Введение

физиологического раствора и ЛПС значительно снизило экспрессию гена *Tph1* в коре головного мозга мышей (табл. 3).

Уровень транскриптов гена *Tph2* в коре, гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе был в несколько раз ниже, чем в среднем мозге. Ни физиологический раствор, ни ЛПС не влияли на экспрессию гена *Tph2* в исследованных структурах мозга (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами впервые оценены отдаленные последствия (5 суток) однократного введения ЛПС на уровень 5-НТ, 5-НИАА, активность ТПГ, экспрессию генов *Tph1* и *Tph2* в головном мозге мы-

Таблица 2. Уровни 5-НТ и 5-НИАА (нг/мг белка) в структурах мозга 4-недельных самцов мышей C57BL/6, интактных и через 5 суток после однократного введения физиологического раствора или липополисахарида

Структура мозга	Интактные мыши	Физиологический раствор	ЛПС, 2 мг/кг	<i>p</i>
5-НТ				
Кора	2.51 ± 0.22	3.15 ± 0.32	3.08 ± 0.15	$F(2,21) = 2.1$, $p = 0.15$
Гиппокамп	2.92 ± 0.16	3.67 ± 0.22**	3.14 ± 0.16#	$F(2,21) = 4.48$, $p = 0.02$
Стриатум	1.5 ± 0.1	2.45 ± 0.43	2.22 ± 0.13	$F(2,21) = 3.44$, $p = 0.051$
Гипоталамус	9.45 ± 1.13	7.66 ± 0.41	6.91 ± 0.33	$F(2,21) = 3.3$, $p = 0.057$
Средний мозг	3.88 ± 0.19	5.47 ± 0.3*	5.63 ± 0.38***	$F(2,21) = 10.3$, $p < 0.001$
5-НИАА				
Кора	1.02 ± 0.1	1.02 ± 0.13	1.1 ± 0.21	$F(2,21) < 1$
Гиппокамп	3.28 ± 0.16	3.18 ± 0.16	3.44 ± 0.38	$F(2,21) < 1$
Стриатум	1.38 ± 0.12	1.69 ± 0.21	1.72 ± 0.19	$F(2,21) = 1.1$, $p = 0.34$
Гипоталамус	3.45 ± 0.0.37	2.33 ± 0.29**	2.52 ± 0.21*	$F(2,21) = 5.77$, $p = 0.01$
Средний мозг	2.54 ± 0.15	3.23 ± 0.18*	3.7 ± 0.21***	$F(2,21) = 10.4$, $p < 0.001$

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$ по сравнению с интактными мышами.

$p < 0.05$ по сравнению с мышами, которым ввели физиологический раствор.

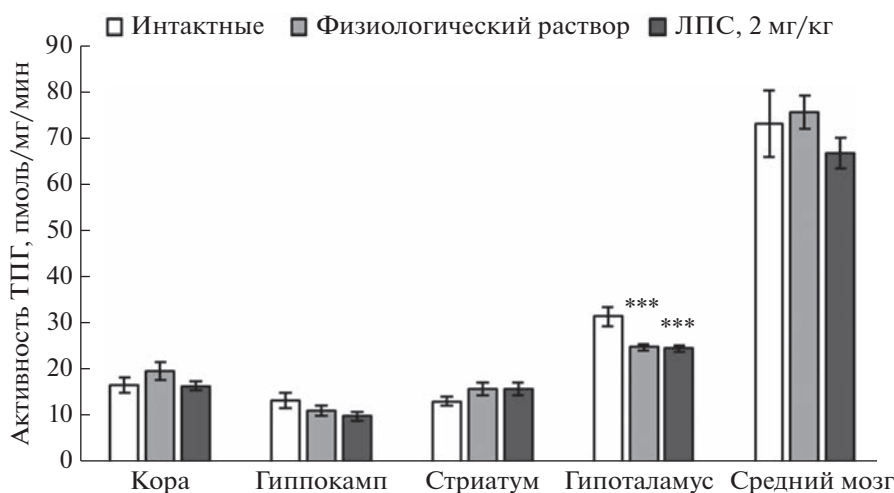


Рис. 2. Активность ТПГ (пмоль/мг/мин) в коре, гиппокампе, стриатуме, гипоталамусе и среднем мозге интактных мышей и через 5 дней после однократной в/б инъекции физиологического раствора или ЛПС (2 мг/кг). *** $p < 0.001$ по сравнению с интактными.

шей. Мы намеренно выбрали молодых животных, поскольку они более чувствительны к стрессу и инфекциям.

Однократное введение ЛПС (2 мг/кг) приводит к активации иммунной системы, которая сохраняется по крайней мере в течение 5 суток в виде увеличения массы селезенки и снижения массы тимуса по сравнению с интактными животными и животными, которым вводили физиологический раствор.

Нами обнаружено увеличение уровня 5-Н1АА и 5-НТ в среднем мозге, а также снижение уровня 5-Н1АА в гипоталамусе через 5 суток после введе-

ния ЛПС по сравнению с интактными животными. Важно отметить, что введение физиологического раствора вызывало изменения в уровне 5-НТ и 5-Н1АА в этих структурах, сходные с вызванными ЛПС. Это свидетельствует о том, что наблюдаемые изменения в уровнях 5-НТ и 5-Н1АА вызваны, скорее всего, отдаленными последствиями стресса, сопряженного с в/б инъекцией, чем с активацией иммунной системы. Действительно, ранее мы показали увеличение уровня 5-Н1АА в мозге мышей при эмоциональном стрессе [19].

Снижение уровня 5-Н1АА в гипоталамусе мышей, которым вводили физиологический раствор

Таблица 3. Уровни мРНК* генов *Tph1* и *Tph2* в структурах мозга 4-недельных самцов мышей C57BL/6 интактных и через 5 суток после однократного введения физиологического раствора или липополисахарида

Структура мозга	Интактные мыши	Физиологический раствор	ЛПС, 2 мг/кг	<i>p</i>
Tph1				
Кора	1.77 ± 0.68	0.18 ± 0.02**	0.21 ± 0.03**	$F(2,21) = 5.32, p = 0.013$
Гиппокамп	3.35 ± 1.34	7.02 ± 2.86	7.14 ± 0.3.11	$F(2,21) < 1$
Стриатум	0.18 ± 0.05	0.14 ± 0.03	0.44 ± 0.21	$F(2,21) = 1.6, p = 0.23$
Гипоталамус	0.12 ± 0.11	0.06 ± 0.04	1.85 ± 1.77	$F(2,21) < 1$
Средний мозг	0.26 ± 0.08	0.44 ± 0.11	0.3 ± 0.07	$F(2,21) = 1.1, p = 0.32$
Tph2				
Кора	9.57 ± 2.17	4.5 ± 0.58	6.2 ± 1.6	$F(2,21) = 2.63, p = 0.1$
Гиппокамп	9.04 ± 2.21	17.6 ± 5.8	11.45 ± 3.14	$F(2,21) = 1.2, p = 0.32$
Стриатум	3.88 ± 0.8	4.9 ± 0.0.63	6.29 ± 1.49	$F(2,21) = 1.34, p = 0.28$
Гипоталамус	0.96 ± 0.3	0.79 ± 0.14	3.9 ± 2.9	$F(2,21) < 1$
Средний мозг	63.56 ± 9.72	77.94 ± 6.51	76.84 ± 12.19	$F(2,21) < 1$

*Уровни мРНК рассчитывали как число копий на 100 копий мРНК гена *Polr2a*.
 ** $p < 0.01$ по сравнению с интактными мышами.

и ЛПС, по-видимому, вызвано снижением активности ТПГ2 и сопряженным снижением синтеза медиатора. В то же время, увеличение уровня 5-НТ и 5-Н1АА в среднем мозге мышей, которым вводили физиологический раствор и ЛПС, вероятно, не связано с увеличением синтеза медиатора, поскольку мы не выявили изменений активности ТПГ в данной структуре у этих мышей.

Длительные изменения в 5-НТ системе в ответ на введение физиологического раствора кажутся странными. Однако до нас никто не оценивал отдаленных последствий одной инъекции физиологического раствора на 5-НТ систему мозга. Можно предположить, что молодые мыши очень чувствительны к стрессу, вызванному всего одной инъекцией физиологического раствора, и его последствия сохраняются длительное время. Однако это предположение нуждается в дальнейшей проверке.

Главной целью нашего исследования было сравнение уровней транскриптов генов *Tph2* и *Tph1* в различных структурах головного мозга. В качестве внешнего стандарта мы использовали заданные концентрации геномной ДНК, что позволяет построить калибровочную кривую зависимости порогового цикла от исходного количества матрицы и, следовательно, определить абсолютную концентрацию транскриптов в исследуемых пробах [17, 18]. Измерение абсолютных значений концентрации транскриптов позволило нам не только оценить влияние введения физиологического раствора и ЛПС на экспрессию генов *Tph1* и *Tph2* в каждой структуре мозга по отдельности, но и оценить соотношение транскриптов этих генов в разных структурах.

Как и следовало ожидать, наибольшей концентрация транскриптов гена *Tph2* была в среднем мозге, где локализованы тела серотониновых нейронов и транскрибируется данный ген. Мы обнаружили также небольшие, но хорошо детектируемые концентрации транскриптов гена *Tph2* и в структурах, не содержащих тела 5-НТ нейронов (в коре, гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе), где теоретически этот ген не должен транскрибироваться. Мы не знаем причин присутствия мРНК гена *Tph2* в коре, гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе, однако можно предположить два гипотетических механизма появления транскриптов гена *Tph2* в этих структурах: аксональный транспорт мРНК данного гена из тел 5-НТ нейронов и наличие небольшого числа клеток, способных экспрессировать ген *Tph2*. Этот вопрос требует дальнейшего исследования.

Важно отметить, что концентрация транскриптов *Tph1* во всех исследованных структурах находится примерно на одинаковом и довольно низком, практически следовом, уровне по сравнению с концентрацией транскриптов гена *Tph2*. Этот контраст в экспрессии генов *Tph1* и *Tph2*

проявляется в полной мере в среднем мозге, где концентрация транскриптов гена *Tph2* в несколько сотен раз больше, чем гена *Tph1*. Этот результат хорошо согласуется с данными других авторов [8], которые не нашли мРНК гена *Tph1* [7] и белка ТПГ1 в мозге грызунов. Данные RNA-Seq показали, что в ядрах шва среднего мозга мыши уровень экспрессии генов *Tph2* и *Tph1* составляет 1680 и 0.8 ТРМ (число транскриптов генов *Tph2* и *Tph1* на миллион транскриптов) соответственно [20]. Более того, наши результаты хорошо согласуются с данными, согласно которым нокаут гена *Tph1* снижает уровень 5-НТ в мозге мышей всего на несколько процентов, тогда как нокаут гена *Tph2* драматически снижает уровень этого биогенного амина [9]. Можно предполагать, что в мозге мыши имеется небольшое число клеток, способных экспрессировать ТПГ1. В любом случае, вклад ТПГ1 в синтез 5-НТ в мозге мышей значительно ниже, чем ТПГ2.

Поскольку уровень мРНК гена *Tph1* возрастал в 1.8 раза через несколько часов после стресса, было высказано предположение о возможности повышения относительной роли ТПГ1 в мозге при патологиях [12]. В нашем исследовании мы моделировали патологическое состояние, вызванное введением ЛПС, и не выявили существенных изменений в экспрессии гена *Tph1* в структурах мозга. Синтез белка ТПГ1 может происходить только в телах 5-НТ нейронов. Поэтому о вкладе ТПГ1 и ТПГ2 в синтез 5-НТ в 5-НТ нейронах можно судить по относительной экспрессии генов *Tph1* и *Tph2* в среднем мозге, где локализованы тела 5-НТ нейронов. Поскольку экспрессия гена *Tph2* в этой структуре в несколько сотен раз превышает экспрессию *Tph1*, вклад ТПГ2 в синтез серотонина в 5-НТ нейронах во много раз превышает вклад ТПГ1. Даже стресс, который может увеличить экспрессию гена *Tph1* в 1.8 раза [12], не способен изменить доминирование ТПГ2 в синтезе 5-НТ.

Тем не менее, соизмеримые концентрации мРНК генов *Tph1* и *Tph2* найдены в мозге грызунов [10–12] и человека [13–15]. Проанализируем подробно эти результаты. В работах, выполненных на грызунах [10–12], использовали метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$, который не позволяет определить абсолютную концентрацию транскриптов, а оценивает только степень изменения концентрации при воздействии по сравнению с животными контрольной группы, уровень транскриптов у которых принимается за 1 (или 100) [21]. Поэтому измеренная методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ экспрессия разных генов вне зависимости от абсолютной концентрации их транскриптов всегда будет 1 (или 100), что мы и наблюдаем в работах [10–12]. Иными словами, одинаковость экспрессии генов *Tph1* и *Tph2* в мозге грызунов в этих работах является иллюзорной и

обусловлена особенностью метода. Авторы, изучающие экспрессию генов *Tph1* и *Tph2* в мозге человека [13–15], использовали модифицированный протокол, позволяющий оценить концентрацию мРНК целевого гена относительно гена домашнего хозяйства. В этих работах обнаружен высокий уровень мРНК гена *Tph1* в мозге человека. Поскольку анализировали посмертные образцы, то нельзя исключить, что относительно высокая экспрессия гена *Tph1* может быть обусловлена изменениями в мозге, вызванными агонией. Наконец, высокий уровень экспрессии гена *Tph1* в мозге может быть видовой особенностью человека. Недавно мы показали, что одинаковый уровень экспрессии генов *Tph1a*, *Tph1b* и *Tph2* в мозге является видовой особенностью рыб *Nothobranchius furzeri* [22] и *Danio rerio* [16].

Таким образом, нами получены три существенных результата. Во-первых, стресс (инъекция) оставляет продолжительный след (5 суток) на уровне метаболизма 5-НТ в мозге молодых мышей. Во-вторых, наибольший уровень мРНК гена *Tph2* наблюдается в среднем мозге, где расположены тела 5-НТ нейронов, тогда как в коре, гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе, где расположены их аксоны и окончания, уровень мРНК данного гена в несколько раз ниже. В-третьих, в мозге мышей в норме и при воспалении выявлены лишь следовые количества мРНК *Tph1*. Это свидетельствует о том, что ТПГ1, по-видимому, не играет существенной роли в синтезе 5-НТ в мозге мышей как в норме, так и при патологиях.

Мышей содержали и разводили в Российском национальном центре генетических ресурсов лабораторных животных, который поддерживается бюджетными проектами № FWNR-2022-0023 и RFMEFI62117X0015.

Выполнение данной работы поддержано Российским научным фондом (грант № 21-15-00035).

Содержание и экспериментальные процедуры проведены в соответствии с правилами Совета Европейского Парламента (Директива 2010/63/EU от 22 сентября 2010 г) и одобрены Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gaspar P., Lillesaar C. (2012) Probing the diversity of serotonin neurons. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* **367**, 2382–2394.
2. Willner P., Scheel-Krüger J., Belzung C. (2013) The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **37**, 2331–2371.
3. Hamon M., Blier P. (2013) Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **45**, 54–63.
4. Miller B.R., Hen R. (2015) The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. *Curr. Opin. Neurobiol.* **30**, 51–58.
5. Walther D.J., Peter J.U., Bashammakh S., Hörtnagl H., Voits M., Fink H., Bader M. (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science.* **299**, 76.
6. Walther D.J., Bader M. (2003) A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1673–1680.
7. Patel P.D., Pontrello C., Burke S. (2004) Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland. *Biol. Psychiatry.* **55**, 428–433.
8. Sakowski S.A., Geddes T.J., Thomas D.M., Levi E., Hatfield J.S., Kuhn D.M. (2006) Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Res.* **1085**, 11–18.
9. Savelieva K.V., Zhao S., Pogorelov V.M., Rajan I., Yang Q., Cullinan E., Lanthorn T.H. (2008) Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. *PLoS One.* **3**, e3301.
10. Megha K., Deshmukh P.S., Ravi A.K., Tripathi A.K., Abegaonkar M.P., Banerjee B.D. (2015) Effect of low-intensity microwave radiation on monoamine neurotransmitters and their key regulating enzymes in rat brain. *Cell Biochem. Biophys.* **73**, 93–100.
11. Igarashi K., Kuchiiwa T., Kuchiiwa S., Iwai H., Tomita K., Sato T. (2021) Kamishoyosan (a Japanese traditional herbal formula), which effectively reduces the aggressive biting behavior of male and female mice, and potential regulation through increase of Tph1, Tph2, and Esr2 mRNA levels. *Brain Res.* **1768**, 147580.
12. Browne C.A., O'Brien F.E., Connor T.J., Dinan T.G., Cryan J.F. (2012) Differential lipopolysaccharide-induced immune alterations in the hippocampus of two mouse strains: effects of stress. *Neurosci.* **6**, 237–248.
13. Zill P., Büttner A., Eisenmenger W., Möller H.J., Ackenheil M., Bondy B. (2007) Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: a post-mortem study. *J. Psychiatr. Res.* **41**, 168–173.
14. Zill P., Büttner A., Eisenmenger W., Müller J., Möller H.J., Bondy B. (2009) Predominant expression of tryptophan hydroxylase 1 mRNA in the pituitary: a postmortem study in human brain. *Neuroscience.* **159**, 1274–1282.
15. Sugden K., Tichopad A., Khan N., Craig I.W., D'Souza U.M. (2009) Genes within the serotonergic system are differentially expressed in human brain. *BMC. Neurosci.* **10**, 50.
16. Сорокин И.Е., Евсюкова В.С., Куликов А.В. (2022) Влияние короткого светового дня на поведение и серотониновую систему головного мозга рыб вида *Danio rerio*. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* **173**, 279–284.
17. Kulikov A.V., Naumenko V.S., Voronova I.P., Tikhonova M.A., Popova N.K. (2005) Quantitative RT-PCR of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as a standard. *J. Neurosci. Meth.* **141**, 97–101.

18. Науменко В.С., Куликов А.В. (2006) Количественное определение экспрессии гена 5-HT_{1A} серотонинового рецептора в головном мозге. *Молекуляр. биология*. **40**, 37–44.
19. Bazhenova E.Y., Bazovkina D.V., Kulikova E.A., Fursenko D.V., Khotskin N.V., Lichman D.V., Kulikov A.V. (2017) C1473G polymorphism in mouse tryptophan hydroxylase-2 gene in the regulation of the reaction to emotional stress. *Neurosci. Lett.* **640**, 105–110.
20. Bonthuis P.J., Huang W.C., Stacher Hörndli C.N., Ferris E., Cheng T., Gregg C. (2015) Noncanonical genomic imprinting effects in offspring. *Cell Rep.* **12**, 979–991.
21. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods*. **25**, 402–408.
22. Evsiukova V.S., Kulikova E.A., Kulikov A.V. (2021) Age-related alterations in the behavior and serotonin-related gene mRNA levels in the brain of males and females of short-lived turquoise killifish (*Nothobranchius furzeri*). *Biomolecules*. **11**, 1421.

Alterations in the Level of mRNA of *Tph1*, *Tph2* Genes, Tryptophan Hydroxylase Activity and Serotonin Metabolism in Mouse Brain 5 Days after Lipopolysaccharide Administration

D. V. Sherbakov¹, A. B. Arefieva¹, P. D. Komleva¹, A. E. Iz'urov¹, N. V. Khotskin¹,
D. V. Bazovkina¹, and A. V. Kulikov¹, *, **

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: v_kulikov@bionet.nsc.ru

**e-mail: avkulikov52@gmail.com

Tryptophan hydroxylases 1 and 2 (TPH1 and TPH2) play the key role in the synthesis of a neurotransmitter and hormone, serotonin (5-HT) in peripheral organs and in the brain, respectively. The main aim of the present study was to clarify the distribution of mRNA of *Tph1* and *Tph2* genes in brain structures in norm and after inflammation. The experiments were carried out on young (4 weeks old) males of C57BL/6 mice. The animals were divided into three groups: intact, control, injected ip with saline, and injected ip with 2 mg/kg of bacterial lipopolysaccharide (LPS). Markers of inflammation, spleen and thymus mass were assayed 5 days after the saline or LPS administration. In their frontal cortex, hippocampus, striatum, hypothalamus and midbrain the concentrations of 5-HT, its main metabolite, 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA), and TPH activity were assayed in using HPLC, while *Tph1* and *Tph2* mRNA were quantified by quantitative real-time RT-PCR. Dramatic increase of spleen mass and decrease of thymus mass 5 days after LPS administration was shown. Significant increase of 5-HT and 5-HIAA levels in midbrain as well as decrease of 5-HIAA concentration and TPH activity in hypothalamus in mice treated with LPS and saline compared with intact animals was revealed. The highest concentration of *Tph2* gene mRNA was observed in midbrain in 5-HT neuron bodies, while in this gene mRNA level was lower in 5-HT endings (cortex, hippocampus, striatum and hypothalamus). Trace amounts of *Tph1* mRNA was revealed in all studied brain structures in mice of the three groups. Thus, *Tph1* gene expression in the mouse brain is too low to significantly affect 5-HT synthesis in normal conditions and during inflammation.

Keywords: mice, tryptophan hydroxylase 1 и 2, serotonin, lipopolysaccharide, brain

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ: ОТ РЕПАРАЦИИ ДНК ДО МЕТАБОЛОМИКИ

УДК 578.2

ВОЗМОЖНОСТИ ИНТЕРФЕРОНА ЛЯМБДА КАК ИНГИБИТОРА SARS-CoV-2

© 2023 г. Л. А. Олейник^{а, *}, П. Г. Мадонов^а, М. Б. Пыхтина^а

^аНаучно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: larisaoleynik81@gmail.com

Поступила в редакцию 05.08.2022 г.

После доработки 06.10.2022 г.

Принята к публикации 06.10.2022 г.

Представлен обзор литературных данных относительно возможности применения интерферонов (ИФН) III типа против SARS-CoV-2. В работе использована база данных PubMed за период 2020–2022 гг., а также результаты собственных исследований фармакологических субстанций на основе рекомбинантного ИФН-λ1 и его пегилированной формы. Завершенные и продолжающиеся исследования позволяют позиционировать ИФН-λ в качестве эффективного терапевтического средства против SARS-CoV-2.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, рекомбинантный интерферон-λ1 человека, ПЭГ-интерферон-λ1, противовирусная активность

DOI: 10.31857/S0026898423020179, **EDN:** EEPAOI

ВВЕДЕНИЕ

Интерфероны (ИФН) – естественные противовирусные цитокины, необходимые для эффективной защиты в ходе раннего иммунного ответа. Вырабатываясь в ответ на вирусные инфекции, ИФН способствуют эндогенному противовирусному состоянию, индуцируя ИФН-стимулируемые гены (ISGs). ISGs снижают вирусную нагрузку, подавляя проникновение вируса в клетку, его репликацию внутри клетки и/или высвобождение из клетки [1, 2].

На сегодняшний день известно три типа ИФН: I (ИФН-α/β), II (ИФН-γ) и III (ИФН-λ). ИФН-λ – преобладающий тип ИФН, продуцируемый в эпителии слизистой оболочки, играет ключевую роль в защите хозяина при вирусных инфекциях легких [3–5]. С момента открытия ИФН-λ в 2003 году многое стало известно об этой группе цитокинов и их функциях в организме [6]. Исследование функций ИФН-λ подтвердили не только значительное сходство с противовирусной активностью ИФН I типа, реализующиеся по тем же сигнальным путям, но и отличительные особенности воздействия ИФН-λ на организм, связанные с огра-

ниченным распределением его рецепторов. В отличие от повсеместной экспрессии рецептора ИФН I типа, присутствующего практически во всех ядерных клетках, экспрессия рецептора ИФН-λ – IFNLR1 – происходит преимущественно в эпителиальных клетках слизистых оболочек, служащих анатомическими барьерами организма. Такое избирательное распределение экспрессии ИФН-λ препятствует проникновению через поверхность слизистой и кожи большинства патогенов из окружающей среды [7]. ИФН-λ, в отличие от ИФН I типа, не вызывает системной воспалительной реакции, а скорее обладает тканезащитным и противовоспалительным действием [8]. Отсутствие провоспалительных эффектов в тканях легких [9] считают одним из важных преимуществ ИФН-λ перед ИФН I типа.

Таким образом, ИФН-λ обеспечивает первый рубеж защиты, который затем вместе с ИФН-α формирует противовирусный ответ организма в целом. Феномен “сторожевой молекулы” присущ именно ИФН-λ, поскольку фактическое действие ИФН-α реализуется только через 48 ч после проникновения вируса [10]. В целом, ИФН III типа контролируют инфекцию на участках слизистого барьера, в то время как ИФН I типа важны для широкого системного инфекционного контроля.

Сокращения: ИФН – интерферон(ы); ЭЛИ – электронно-лучевая иммобилизация; ISGs (interferon-stimulated genes) – интерферонстимулируемые гены.

ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ УКЛОНЕНИЯ SARS-CoV-2 ОТ ПРОТИВОВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ

Коронавирус-2, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2), стал серьезной проблемой для здравоохранения во всем мире. Для прекращения пандемии вызванного им заболевания, COVID-19, а также его лечения необходимы новые тактические и стратегические подходы.

SARS-CoV-2 высокочувствителен к ингибирующему действию ИФН, в то же время к особенностям этого вируса относится способность обходить врожденный иммунный ответ. В настоящее время известно несколько стратегий уклонения SARS-CoV-2 от иммунной системы организма [11]. Одна из них — экранирование вирусной двухцепочечной РНК (дцРНК) SARS-CoV-2 в двумембранных везикулах, защищающих дцРНК от узнавания паттернраспознающим рецептором (PRR, pattern recognition receptor) [12]. Другая стратегия — ингибирование сигнальных путей, обеспечивающих продукцию и действие ИФН. В нескольких исследованиях было показано, что продукцию ИФН- β ингибирует ряд белков SARS-CoV-2: NSP1, NSP3, NSP5, NSP12, NSP13, NSP14, NSP15, ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, N и M [13–15]. Показано, что эти белки снижают опосредованную RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) активность промотора гена ИФН- β (*IFNB1*), что позволяет предположить, что они могут подавлять опосредованную RLR (RIG-I-like receptors) передачу сигналов [13, 16, 17]. Н. Xia и соавт. [17] сравнили ингибирующую активность коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), коронавируса-1 тяжелого острого респираторного (SARS-CoV-1) и SARS-CoV-2 в отношении продукции и передачи сигнала ИФН I типа и выявили, что белки NSP1 и NSP6 SARS-CoV-2 подавляют передачу сигналов ИФН I типа более эффективно, чем два других коронавируса. Одной из стратегий уклонения может быть блокирование сигналинга ИФН через подавление фосфорилирования транскрипционного фактора STAT1 [18]. Miorin с соавт. [19] показали, что SARS-CoV-2 эффективно блокирует ядерную транслокацию STAT1 и STAT2, ингибируя тем самым транскрипцию ISGs. D. Shin с соавт. [20] обнаружили, что уклонение SARS-CoV-2 от действия ИФН может быть обусловлено активностью папаинподобной протеазы (PL^{pro}), которая расщепляет убиквитинподобный модификатор ИФН-стимулируемого гена-15 (ISG15) — белка с высокой противовирусной активностью.

Коронавирусная инфекция подавляет выработку эндогенного ИФН и во многом определяет тяжесть клинических проявлений заболевания [21–23]. Scagnolari и др. [24] выявили, что у паци-

ентов с тяжелым течением COVID-19, которым требовалась механическая вентиляция легких, снижена экспрессия мРНК ИФН- λ (1–3), ИФН I типа и ISGs. Кроме того, сообщалось, что тяжелое течение COVID-19 может быть обусловлено наличием нейтрализующих аутоантител к ИФН [25, 26]. В то же время у некоторых пациентов с тяжелыми формами COVID-19 были повышены уровни ИФН- α , что может быть объяснено снижением чувствительности вируса к ИФН [27].

Представляет интерес также роль полиморфизма генов ИФН в ответе на вирусную инфекцию и их возможное влияние на тяжесть клинических проявлений COVID-19. Известно, что некоторые заболевания могут быть вызваны генетическими вариациями в компонентах иммунной системы, например в опосредованных ИФН сигнальных путях. В 2009 г. в результате трех независимых полногеномных ассоциативных исследований было выявлено, что однонуклеотидный полиморфизм rs12979860 в промоторной области гена ИФН- λ 3 (*IL28B*) в значительной степени ассоциирован со спонтанным клиренсом вируса гепатита С и устойчивым вирусологическим ответом на терапию хронического гепатита С [28–30]. Позднее выявили, что индивидуальные вариации гена *IL28B* определяют различия и в иммунном ответе на острые респираторные инфекции и на инфекцию SARS-CoV-2. Гомозиготные варианты генов, кодирующих ИФН- λ 3/4, могут коррелировать со снижением клиренса вируса у детей, больных острыми респираторными инфекциями [31]. J. Saponi-Cortes и др. [32] выявили связь полиморфизма rs12979860 гена ИФН- λ 4 (*IFNL4*) с симптоматической инфекцией COVID-19. В сравнении с контрольной группой, у пациентов с COVID-19 был сверхэкспрессирован Т-аллель rs12979860, который может быть фактором риска заражения и тяжелого течения COVID-19. Также обнаружено, что полиморфизмы: C/T rs1297860 гена *IL28B* и TT/ Δ G rs368234815 гена *IFNL4* — могут влиять на способность хозяина модулировать инфекцию SARS-CoV-2 без явного влияния на исход заболевания [33]. P. Rahimi с соавт. [34] продемонстрировали, что пациенты с “неблагоприятными” SNP в гене *IL28B* и *IFNL4* подвержены более тяжелому течению COVID-19 по сравнению с пациентами “благоприятных” генотипов. Взаимосвязь тяжести течения COVID-19 с определенными аллельными вариантами генов ИФН имеет важное клиническое значение и может использоваться для прогнозирования и оптимизации индивидуальных схем противовирусной терапии.

ИФН- λ КАК ИНГИБИТОР SARS-CoV-2

При вирусных заболеваниях верхних и нижних дыхательных путей первой линией защиты служит врожденная иммунная система респиратор-

торного эпителия, которая продуцирует ИФН- λ (ИФН- λ 1, - λ 2, - λ 3 и - λ 4), обеспечивающие быстрый иммунный ответ на респираторные вирусы [35].

В исследованиях S. Davidson и др. [9] и J. Fox с соавт. [36] показано, что первичные респираторные эпителиальные клетки трахеи мыши и линии эпителиальных клеток легких мыши реагируют как на ИФН I, так и III типа индукцией антивирусных генов. Несмотря на то, что эти клетки отвечают на оба типа цитокинов, они преимущественно индуцируют ИФН III типа в ответ на вирус гриппа A, респираторно-синцитиальный вирус, SARS-CoV-2 и другие [37, 38]. Появившиеся в последние десятилетия новые штаммы коронавируса ассоциированы с тяжелой инфекцией верхних и нижних дыхательных путей. Учитывая это, Beucher G. с соавт. [39] реконструировали первичный бронхиальный эпителий, полученный от взрослых и детских доноров, чтобы проследить динамику распространения SARS-CoV-2. Анализируя течение инфекции с помощью методов визуализации и ОТ-ПЦР в режиме реального времени, исследователи отметили ограничение репликации и распространение вируса в некоторых образцах. Этот фенотип чаще встречался в эпителии детей, чем взрослых, и коррелировал с ускоренным высвобождением ИФН III типа, в то время как блокирование экспрессии гена ИФН III типа с использованием системы CRISPR/Cas9 приводило к значительному увеличению инфицированных SARS-CoV-2 клеток. Эти данные свидетельствуют о важной роли ИФН- λ в противовирусной защите дыхательных путей. Что касается ИФН I типа (α и β), они не были обнаружены ни в супернатанте, ни при анализе транскриптома.

В настоящее время существует ряд доказательств того, что ИФН- λ обладает противовирусной активностью в отношении SARS-CoV-2 *in vitro* и *in vivo*. Эти наблюдения подчеркивают важную роль ИФН- λ в борьбе с инфекцией SARS-CoV-2 и его клиническими последствиями. Способность ИФН- λ активировать более узкий набор генов по сравнению с ИФН I типа в ограниченной группе клеток-мишеней, экспрессирующих IFNLR1, и отсутствие системного воспалительного ответа позволяют рассматривать этот тип ИФН перспективным терапевтическим противовирусным агентом. Решающим моментом интерферонотерапии считается время начала лечения. Недавно в ретроспективном исследовании 446 пациентов с COVID-19 показано, что применение ИФН- α на поздней стадии заболевания, когда вирусом инфицировано много тканей и органов, не дает должного терапевтического эффекта, в то время как ранняя интерферонотерапия благоприятно влияет на исход заболевания и выздоровление [40].

В работе U. Felgenhauer и др. [41] продемонстрировано противовирусное действие ИФН I (ИФН- α) и III (ИФН- λ) типов относительно SARS-CoV-2. Исследователи использовали две линии эпителиальных клеток млекопитающих и обнаружили, что оба цитокина дозозависимо ингибировали SARS-CoV-2. На основании полученных результатов они пришли к заключению, что SARS-CoV-2 чувствителен к экзогенному ИФН [41]. A. Vanderheiden и др. [42] показали, что обработка культуры клеток эпителия дыхательных путей человека ИФН I или III типа за 24 ч до заражения приводила к снижению уровня вирусной РНК в три раза, а репликация вируса уменьшалась на 90%. Обработка зараженной клеточной культуры ИФН также снижала вирусную нагрузку: значимый эффект проявлялся к третьим суткам эксперимента. В вышеупомянутом исследовании G. Beucher с соавт. [39] продемонстрировано, что обработка эпителия взрослых пациентов экзогенным ИФН III типа ограничивала инфекцию SARS-CoV-2. В проведенном S. Sohn с соавт. [43] исследовании ИФН- λ 1 значительно ограничивал продукцию SARS-CoV-2 в культуре первичных бронхиальных эпителиальных клеток человека. Предварительная обработка клеток эпителия легких человека ИФН I типа полностью блокировала продукцию вируса, а обработка ИФН- λ 1 зараженных клеток ингибировала репликацию вируса более чем на порядок. В экспериментах с трансгенными мышами, экспрессирующими ангиотензинконвертирующий фермент-2 человека (ACE2), авторы показали, что одна доза интраназально введенного ИФН- λ 1 приводила к снижению тяжести заболевания и смертности животных при заражении SARS-CoV-2. R. Dijkman с соавт. [44] провели поиск эффективной схемы лечения ближневосточного респираторного синдрома (MERS), вызванного соответствующим коронавирусом, препаратами ИФН- λ 1. Они использовали первичную культуру клеток дыхательного эпителия человека (hAECs) и продемонстрировали, что однократная доза ИФН- α и ИФН- λ в равной степени индуцировала экспрессию ISGs, в то время как двукратное увеличение дозировки препаратов ИФН вызывало повышение экспрессии ISGs лишь на культуре, обработанной ИФН- λ . В экспериментах на мышах также показана эффективность применения двухдозового режима ИФН- λ , а комбинация профилактических и отсроченных терапевтических режимов в полной мере защищала мышей от инфекции MERS-CoV.

L. Miorin и др. [19] оценили чувствительность SARS-CoV-2 к ИФН. Авторы инкубировали клетки Vero E6 с различными концентрациями ИФН I, II и III типов, после чего проводили заражение культуры вирусом. Оказалось, что предынкубация клеток Vero E6 с ИФН I типа резко снижала процент инфицированных клеток; наблюдали

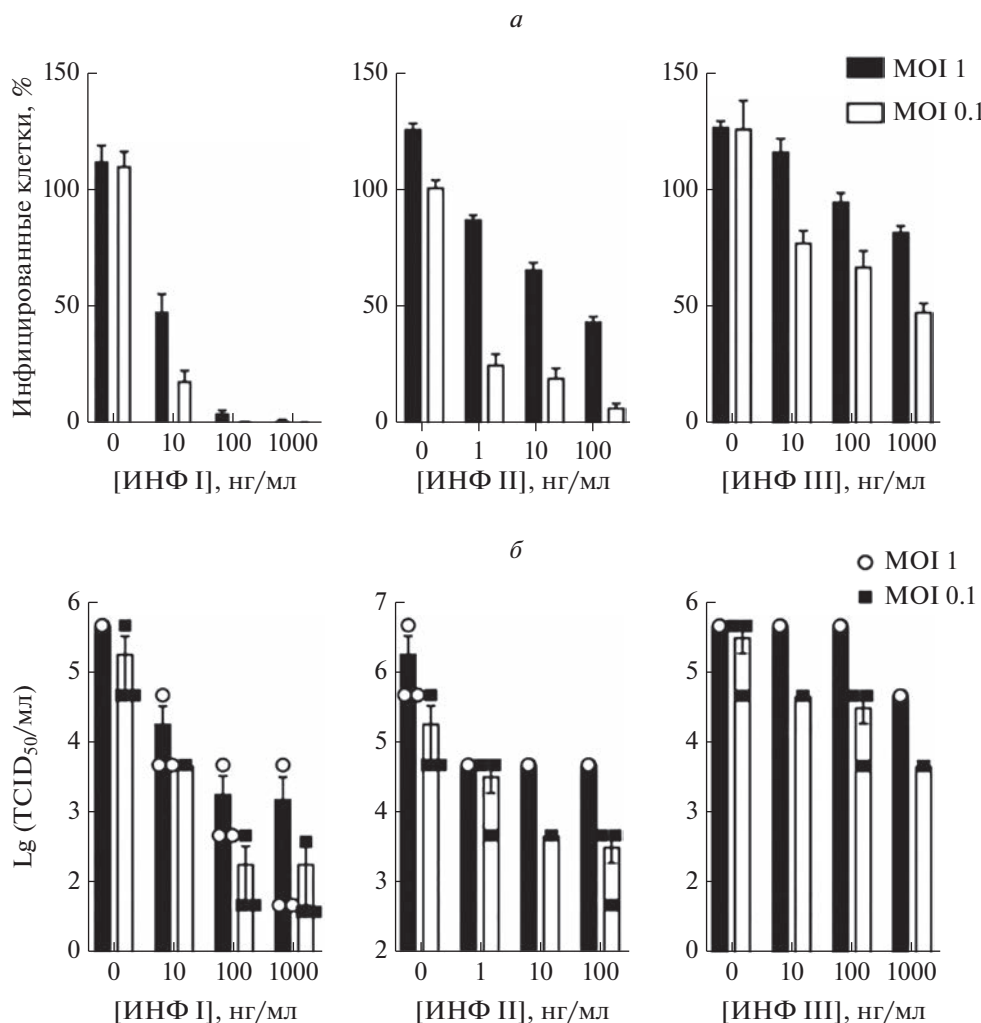


Рис. 1. Влияние интерферонов I, II и III типов на инфицированные SARS-CoV-2 клетки Vero E6. *а* – Процент инфицированных клеток Vero E6, рассчитанный как соотношение клеток, позитивных на вирусный белок нуклеопротеин (NP), к общему числу клеток (данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, $n = 3$). *б* – Анализ титров вируса, выраженных как TCID₅₀, в супернатантах клеток Vero E6 (данные представлены как среднее $\pm$ SEM, $n = 3$) [17, Creative Commons Attribution License 4.0 (CC BY)].

снижение и в случае предынкубации с ИФН II, в то время как для ИФН III типа регистрировали лишь незначительный ингибиторный эффект (рис. 1). Учитывая выраженный противовирусный эффект ИФН III типа относительно SARS-CoV-2, ранее продемонстрированный в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [45, 46], L. Miorin и соавт. предположили, что полученные ими результаты обусловлены низкой экспрессией рецепторов ИФН III типа клетками Vero E6.

Z. Chong с соавт. [47] в экспериментах на трех стандартных линиях мышей и линии мышей, трансгенной по ACE2 человека, показали, что интраназальное введение IFN- λ обеспечивает до- и постэкспозиционную защиту от заражения несколькими штаммами SARS-CoV-2, не вызывая обширного воспаления.

РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ИФН- λ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ COVID-19

Вышеприведенные данные свидетельствуют о высокой перспективности создания лекарственных средств на основе рекомбинантного ИФН- λ 1 человека для лечения COVID-19. Однако, несмотря на острую потребность в подобных противовирусных препаратах, в настоящее время на фармацевтическом рынке их нет. Уже показано, что лекарственные средства на основе рекомбинантных белков имеют хороший фармакокинетический профиль и устойчивы к ферментативным системам крови.

Одна из наиболее распространенных стратегий повышения стабильности белковых препаратов и увеличения времени их полувыведения из организма – химическая модификация целевых белков

Таблица 1. Ингибирование репликации SARS-CoV-2 в клетках Vero E6, предынкубированных с ИФН-λ1 или ПЭГ-ИФН-λ1^a

[ИФН-λ1], нг/мл	Сохранность монослоя, OD ₅₄₀	[ПЭГ-ИФН-λ1], нг/мл	Сохранность монослоя, OD ₅₄₀
K ^{-b}	1.25 ± 0.25 ^c	K ⁻	1.20 ± 0.23 ^c
42000.00	1.15 ± 0.20 ^c	108000.00	0.30 ± 0.11 ^d
14000.00	1.20 ± 0.20 ^c	36000.00	1.15 ± 0.21 ^c
4667.00	1.18 ± 0.15 ^c	12000.00	1.17 ± 0.21 ^c
1555.00	1.13 ± 0.15 ^c	4000.00	1.15 ± 0.18 ^e
518.00	1.19 ± 0.17 ^c	1333.00	1.05 ± 0.21 ^f
173.00	1.16 ± 0.18 ^c	444.00	0.95 ± 0.19 ^f
57.60	1.12 ± 0.15 ^c	148.00	0.91 ± 0.20 ^f
19.20	1.10 ± 0.14 ^e	49.40	0.85 ± 0.18 ^f
6.40	0.50 ± 0.11^g	16.50	0.51 ± 0.13^h
2.13	0.18 ± 0.10ⁱ	5.50	0.23 ± 0.08^h
0.71	0.21 ± 0.11 ⁱ	1.82	0.20 ± 0.07 ⁱ
0.23	0.18 ± 0.10 ⁱ	0.61	0.23 ± 0.08 ⁱ
K ^{+j}	0.14 ± 0.09 ⁱ	K ⁺	0.15 ± 0.10 ⁱ

^aВ таблице приведены данные из работы [52]. Учет результатов проводили микроскопией (по наличию вирусспецифического цитопатогенного действия) и с использованием теста метаболической активности клеток (МТТ-тест). Жирным шрифтом выделены статистически значимые результаты ($p < 0.05$).

^bОтрицательный контроль — клетки Vero E6, не инфицированные SARS-CoV-2.

^cПолная сохранность монослоя Vero E6.

^dПолная гибель монослоя в результате цитотоксического действия максимальной дозировки ПЭГ-ИФН-λ1.

^eЕдиничные фокусы вирусспецифического цитопатического действия.

^f20–45% вирусспецифического цитопатического действия.

^g40–60% вирусспецифического цитопатического действия.

^h50–85% вирусспецифического цитопатического действия.

ⁱПолная гибель монослоя Vero E6. ^jПоложительный контроль — клетки Vero E6, инфицированные SARS-CoV-2, но не обработанные ИФН-λ1; показания принимали за 100%.

и пептидов полиэтиленгликолем (ПЭГ) — пегилирование [48]. В настоящее время на фармацевтическом рынке циркулирует много таких препаратов (Pegasys, PEG-Intron, Neulasta, Esperoct, Pegridy и др.) и множество подобных соединений находится на этапе разработки и доклинических исследований. Компанией “ZymoGenetics” и “Bristol-Myers Squibb” (США) разработан препарат пегилированного ИФН-λ, предназначенный для парентерального введения, для профилактики вирусных гепатитов. Для этого соединения зарегистрирован более высокий профиль безопасности в сравнении с пегилированным ИФН-α [49]. Но на настоящий момент лекарственного препарата на основе ПЭГ-ИФН-λ на фармацевтическом рынке нет.

Химическая иммобилизация терапевтических белков в ряде случаев может быть успешно заменена технологией электронно-лучевой иммобилизации (ЭЛИ) [50]. Эта технология основана на применении направленного потока ускоренных электронов с широким диапазоном энергии (1–5 МэВ) и доз от 0.5 до 6 Мрад, а также γ-излучения и иммобилизации биологически активных молекул на низкомолекулярных водорастворимых носителях.

Применение такой технологии позволяет получать препараты белков, обладающие повышенной биодоступностью, сниженной токсичностью и сохраненной биологической активностью.

Мы тоже использовали технологию ЭЛИ при разработке пегилированной формы ИФН-λ1 в целях получения активной фармацевтической субстанции для ингибирования SARS-CoV-2. Лекарственный препарат на основе ПЭГ-ИФН-λ1 создан на базе Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия) и НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга (Томск, Россия) в содружестве с фармацевтической компанией “Сибирский центр фармакологии и биотехнологии” (Россия). Пегилирование проводили низкомолекулярным ПЭГ по технологии ЭЛИ [51]. Цитотоксичность полученного препарата ПЭГ-ИФН-λ1, проведенная на культуре клеток Vero E6, проявлялась лишь в максимальной из использованных концентраций — 108 мкг/мл, в то время как в три раза меньшая концентрация уже не оказывала достоверного повреждающего действия. При исследовании противовирусной активности обеих форм ИФН-λ1 в отношении SARS-CoV-2 в клетках Vero E6 обна-

ружили, что концентрация 50%-ного ингибирования (IC_{50}) для ПЭГ-ИФН- $\lambda 1$ составила $25.0 \pm \pm 6.5$ нг/мл, в то время как для рекомбинантного ИФН- $\lambda 1$ этот показатель составлял 7.3 ± 3.1 нг/мл ($p < 0.05$, тест Манна—Уитни) (табл. 1).

Таким образом, ингибирующая активность ПЭГ-ИФН- $\lambda 1$ на репликацию SARS-CoV-2 в клетках Vero E6 оказалась в 3 раза ниже, чем для непегилированной формы ИФН- $\lambda 1$. Известно, что модификации белковых молекул часто приводят к снижению их удельной активности за счет возрастающей стереоспецифической блокады, затрудняющей связывание с рецепторами [53, 54]. В то же время существенное повышение стабильности и увеличение времени циркуляции модифицированных белков зачастую компенсируют их сниженную биологическую активность.

В настоящее время проводятся исследования пегилированной формы ИФН- λ в качестве лекарственного средства против COVID-19. K. Dinopon с соавт. [55] на мышинной модели продемонстрировали, что ПЭГ-ИФН- $\lambda 1a$ человека существенно тормозит репликацию SARS-CoV-2 в эпителиальных клетках, а профилактическое или терапевтическое введение препарата значительно снижает вирусную нагрузку в тканях легких.

В исследовании J. Feld и др. [56] описано преимущество подкожного введения ПЭГ-ИФН- λ при лечении COVID-19 легкой и средней степени тяжести в течение 7 суток после появления симптомов или первого положительного теста при отсутствии симптомов. В то же время в другом рандомизированном плацебо-контролируемом исследовании на 120 пациентах с COVID-19 легкой и средней степени тяжести подкожные инъекции ПЭГ-ИФН- $\lambda 1$ в течение 72 ч после постановки диагноза не снижали вирусовыделение и не улучшали самочувствие больных [57]. Неоднозначность результатов клинических исследований подчеркивает необходимость дальнейшего изучения возможности применения ПЭГ-ИФН- λ для профилактики и лечения COVID-19.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему моменту закончен этап фундаментального, академического понимания роли ИФН- λ в отношении его противовирусной активности. Вполне обоснованно выглядит концепция, что ИФН- λ выполняет роль сторожевой молекулы эпителиальных барьеров и вносит ощутимый вклад в экстренную противовирусную защиту. По нашему мнению, сейчас наступает так называемый “этап внедрения” этой концепции. Очевидно, что повышение противовирусной защиты будет более эффективным при применении экзогенных ИФН, а не их индукторов. В условиях высоких рисков вирусных пандемий возникает оче-

видная потребность в разработке и производстве лекарственных препаратов на основе ИФН- λ . Принимая во внимание опыт использования в медицине ИФН I и II типов, можно утверждать, что наиболее перспективными будут модифицированные формы ИФН- λ — например, их пегилирование по электронно-лучевой или химической технологии в зависимости от требований по оптимальной фармакокинетике лекарственного препарата.

Написание настоящего обзора не потребовало специального финансирования.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schneider W.M., Chevillotte M.D., Rice C.M. (2014) Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* **32**, 513–545.
2. Tatura A.L., Baric R.S. (2012) SARS coronavirus pathogenesis: host innate immune responses and viral antagonism of interferon. *Curr. Opin. Virol.* **2**(3), 264–275.
3. Andreaskos E., Salagianni M., Galani I.E., Koltsida O. (2017) Interferon-lambdas: front-line guardians of immunity and homeostasis in the respiratory tract. *Front. Immunol.* **8**, 1232.
4. Dellgren C., Gad H.H., Hamming O.J., Melchjorsen J., Hartmann R. (2009) Human interferon- $\lambda 3$ is a potent member of the type III interferon family. *Genes Immun.* **10**(2), 125–131.
5. Galani I.E., Triantafyllia V., Eleminiadou E.E., Koltsida O., Stavropoulos A., Manioudaki M., Thanos D., Doyle S.E., Kotenko S.V., Thanopoulou K., Andreaskos E. (2017) Interferon- λ mediates nonredundant front-line antiviral protection against influenza virus infection without compromising host fitness. *Immunity*. **46**(5), 875–890.e6.
6. Donnelly R.P., Kotenko S.V. (2010) Interferon-lambda: a new addition to an old family. *J. Interferon Cytokine Res.* **30**(8), 555–564. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0078>
7. Mordstein M., Neugebauer E., Ditt V., Jessen B., Rieger T., Falcone V., Sorgeloos F., Ehl S., Mayer D., Kochs G., Schwemmle M., Günther S., Drosten C., Michiels T., Staeheli P. (2010) Lambda interferon renders epithelial cells of the respiratory and gastrointestinal tracts resistant to viral infections. *J. Virol.* **84**(11), 5670–5677.
8. Ye L., Schnepf D., Staeheli P. (2019) Interferon- λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **19**(10), 614–625.
9. Davidson S., McCabe T.M., Crotta S., Gad H.H., Hessel E.M., Beinke S., Hartmann R., Wack A. (2016) IFN λ is a potent anti-influenza therapeutic without the inflammatory side effects of IFN α treatment. *EMBO Mol. Med.* **8**(9), 1099–1112.
10. Jewell N.A., Cline T., Mertz S.E., Smirnov S.V., Flaño E., Schindler C., Grieves J.L., Durbin R.K., Kotenko S.V.,

- Durbin J.E. (2010) Lambda interferon is the predominant interferon induced by influenza A virus infection *in vivo*. *J. Virol.* **84**(21), 11515–11522. <https://doi.org/10.1128/JVI.01703-09>
11. Znaidia M., Demeret C., van der Werf S., Komarova A.V. (2022) Characterization of SARS-CoV-2 evasion: interferon pathway and therapeutic options. *Viruses*. **14**(6), 1247.
 12. Kumar S., Nyodu R., Maurya V.K., Saxena S.K. (2020) Host immune response and immunobiology of human SARS-CoV-2 infection. In: *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Ed. S. Saxena. Medical Virology: From Pathogenesis to Disease Control*. Springer, Singapore. 43–53. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4814-7_5
 13. Yuen C.K., Lam J.Y., Wong W.M., Mak L.F., Wang X., Chu H., Cai J.P., Jin D.Y., To K.K., Chan J.F., Yuen K.Y., Kok K.H. (2020) SARS-CoV-2 Nsp13, Nsp14, Nsp15 and Orf6 function as potent interferon antagonists. *Emerg. Microbes Infect.* **9**(1), 1418–1428.
 14. Lei X., Dong X., Ma R., Wang W., Xiao X., Tian Z., Wang C., Wang Y., Li L., Ren L., Guo F., Zhao Z., Zhou Z., Xiang Z., Wang J. (2020) Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. *Nat. Commun.* **11**(1), 3810.
 15. Shemesh M., Aktepe T.E., Deerrain J.M., McAuley J.L., Audsley M.D., David C.T., Purcell D.F.J., Urin V., Hartmann R., Moseley G.W., Mackenzie J.M., Schreiber G., Harari D. (2021) SARS-CoV-2 suppresses IFN β production mediated by NSP1, 5, 6, 15, ORF6 and ORF7b but does not suppress the effects of added interferon. *PLoS Pathog.* **17**(8), e1009800.
 16. Kouwaki T., Nishimura T., Wang G., Oshiumi H. (2021) RIG-I-like receptor-mediated recognition of viral genomic RNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 and viral escape from the host innate immune responses. *Front. Immunol.* **12**, 700926.
 17. Xia H., Cao Z., Xie X., Zhang X., Chen J.Y., Wang H., Menachery V.D., Rajsbaum R., Shi P.Y. (2020) Evasion of type I interferon by SARS-CoV-2. *Cell Rep.* **33**(1), 108234.
 18. Lokugamage K.G., Hage A., de Vries M., Valero-Jimenez A.M., Schindewolf C., Dittmann M., Rajsbaum R., Menachery V.D. (2020) Type I interferon susceptibility distinguishes SARS-CoV-2 from SARS-CoV. *J. Virol.* **94**(23), e01410-20.
 19. Miorin L., Kehrer T., Sanchez-Aparicio M.T., Zhang K., Cohen P., Patel R.S., Cupic A., Makio T., Mei M., Moreno E., Danziger O., White K.M., Rathnasinghe R., Uccellini M., Gao S., Aydiello T., Mena I., Yin X., Martin-Sancho L., Krogan N.J., Chanda S.K., Schotsaert M., Wozniak R.W., Ren Y., Rosenberg B.R., Fontoura B.M.A., Garcia-Sastre A. (2020) SARS-CoV-2 Orf6 hijacks Nup98 to block STAT nuclear import and antagonize interferon signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117**(45), 28344–28354.
 20. Shin D., Mukherjee R., Grewe D., Bojkova D., Baek K., Bhattacharya A., Schulz L., Wiedera M., Mehdi-pour A.R., Tascher G., Geurink P.P., Wilhelm A., van der Heden van Noort G.J., Ovaa H., Müller S., Knobloch K.P., Rajalingam K., Schulman B.A., Cinatl J., Hummer G., Ciesek S., Dikic I. (2020) Papain-like protease regulates SARS-CoV-2 viral spread and innate immunity. *Nature*. **587**(7835), 657–662.
 21. Hadjadj J., Yatim N., Barnabei L., Corneau A., Bous-sier J., Smith N., Pere H., Charbit B., Bondet V., Chen-evier-Gobeaux C., Breillat P., Carlier N., Gauzit R., Mor-bieu C., Pene F., Marin N., Roche N., Szwebel T.A., Merkling S.H., Treluyer J.M., Veyer D., Mouthon L., Blanc C., Tharaux P.L., Rozenberg F., Fischer A., Duffy D., Rieux-Laucat F., Kerneis S., Terrier B. (2020) Impaired type I interferon activity and inflam-matory responses in severe COVID-19 patients. *Science*. **369**(6504), 718–724.
 22. Blanco-Melo D., Nilsson-Payant B.E., Liu W.C., Uhl S., Hoagland D., Moller R., Jordan T.X., Oishi K., Panis M., Sachs D., Wang T.T., Schwartz R.E., Lim J.K., Al-brecht R.A., tenOever B.R. (2020) Imbalanced host re-sponse to SARS-CoV2 drives development of COVID-19. *Cell*. **181**(5), 1036–1045.e9.
 23. Schultze J.L., Aschenbrenner A.C. (2021) COVID-19 and the human innate immune system. *Cell*. **184**(7), 1671–1692.
 24. Scagnolari C., Pierangeli A., Frasca F., Bitossi C., Vis-cido A., Oliveto G., Scordio M., Mazzuti L., Di Carlo D., Gentile M., Solimini A., Ceccarelli G., Pugliese F., Mastroianni C.M., d’Ettorre G., Turriziani O., Anto-nelli G. (2021) Differential induction of type I and III interferon genes in the upper respiratory tract of pa-tients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Virus Res.* **295**, 198283.
 25. Bastard P., Orlova E., Sozaeva L., Levy R., James A., Schmitt M.M., Ochoa S., Kareva M., Rodina Y., Ger-vais A., Le Voyer T., Rosain J., Philippot Q., Neehus A.L., Shaw E., Migaud M., Bizien L., Ekwall O., Berg S., Beccuti G., Ghizzoni L., Thiriez G., Pavot A., Goujard C., Fremont M.L., Carter E., Rothenbuhler A., Linglart A., Mignot B., Comte A., Cheikh N., Hermine O., Breivik L., Husebye E.S., Humbert S., Rohrlisch P., Coaquette A., Vuoto F., Faure K., Mahlaoui N., Kotnik P., Battelino T., Trebušak Podkrajšek K., Kisand K., Ferré E.M.N., DiMaggio T., Rosen L.B., Burbelo P.D., McIntyre M., Kann N.Y., Shcherbina A., Pavlova M., Kolodkina A., Holland S.M., Zhang S.Y., Crow Y.J., Notarangelo L.D., Su H.C., Abel L., Anderson M.S., Jouanguy E., Neven B., Puel A., Casanova J.L., Lionakis M.S. (2021) Preexist-ing autoantibodies to type I IFNs underlie critical COVID-19 pneumonia in patients with APS-1. *J. Exp. Med.* **218**(7), e20210554.
 26. Bastard P., Rosen L.B., Zhang Q., Michailidis E., Hoffmann H.H., Zhang Y., Dorgham K., Philippot Q., Rosain J., Béziat V., Manry J., Shaw E., Haljasmägi L., Peterson P., Lorenzo L., Bizien L., Trouillet-Assant S., Dobbs K., de Jesus A.A., Belot A., Kallaste A., Cath-erinet E., Tandjaoui-Lambiotte Y., Le Pen J., Kerner G., Bigio B., Seeluthner Y., Yang R., Bolze A., Spaan A.N., Delmonte O.M., Abers M.S., Aiuti A., Casari G., Lampasona V., Piemonti L., Ciceri F., Bilguvar K., Lif-ton R.P., Vasse M., Smadja D.M., Migaud M., Hadjadj J., Terrier B., Duffy D., Quintana-Murci L., van de Beek D., Roussel L., Vinh D.C., Tangye S.G., Haerynck F., Dalmau D., Martinez-Picado J., Brodin P., Nussenz-weig M.C., Boisson-Dupuis S., Rodríguez-Gallego C., Vogt G., Mogensen T.H., Oler A.J., Gu J., Burbelo P.D., Cohen J.I., Biondi A., Bettini L.R., D’Angio M., Bon-fanti P., Rossignol P., Mayaux J., Rieux-Laucat F.,

- Husebye E.S., Fusco F., Ursini M.V., Imberti L., Sottini A., Paghera S., Quiros-Roldan E., Rossi C., Castagnoli R., Montagna D., Licari A., Marsegia G.L., Duval X., Ghosn J., Tsang J.S., Goldbach-Mansky R., Kisand K., Lionakis M.S., Puel A., Zhang S.Y., Holland S.M., Gorochov G., Jouanguy E., Rice C.M., Cobat A., Notarangelo L.D., Abel L., Su H.C., Casanova J.L. (2020) Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. **370**(6515), eabd4585.
27. Lucas C., Wong P., Klein J., Castro T.B.R., Silva J., Sundaram M., Ellingson M.K., Mao T., Oh J.E., Israelow B., Takahashi T., Tokuyama M., Lu P., Venkataraman A., Park A., Mohanty S., Wang H., Wyllie A.L., Vogels C.B.F., Earnest R., Lapidus S., Ott I.M., Moore A.J., Muenker M.C., Fournier J.B., Campbell M., Odio C.D., Casanovas-Massana A., Herbst R., Shaw A.C., Medzhitov R., Schulz W.L., Grubaugh N.D., Dela Cruz C., Farhadian S., Ko A.I., Omer S.B., Iwasaki A. (2020) Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. **584**(7821), 463–469.
 28. Ge D., Fellay J., Thompson A.J., Simon J.S., Shianna K.V., Urban T.J., Heinzen E.L., Qiu P., Bertelsen A.H., Muir A.J., Sulkowski M., McHutchison J.G., Goldstein D.B. (2009) Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. **461**(7262), 399–401.
 29. Suppiah V., Moldovan M., Ahlenstiel G., Berg T., Weltman M., Abate M.L., Bassendine M., Spengler U., Dore G.J., Powell E., Riordan S., Sheridan D., Smedile A., Fragomeli V., Muller T., Bahlo M., Stewart G.J., Booth D.R., George J. (2009) *IL28B* is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nat. Genet.* **41**(10), 1100–1104.
 30. Tanaka Y., Nishida N., Sugiyama M., Kurosaki M., Matsuura K., Sakamoto N., Nakagawa M., Korenaga M., Hino K., Hige S., Ito Y., Mita E., Tanaka E., Mochida S., Murawaki Y., Honda M., Sakai A., Hiasa Y., Nishiguchi S., Koike A., Sakaida I., Imamura M., Ito K., Yano K., Masaki N., Sugauchi F., Izumi N., Tokunaga K., Mizokami M. (2009) Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* **41**(10), 1105–1109.
 31. Rugwizangoga B., Andersson M.E., Kabayiza J.C., Nilsson M.S., Ármannsdóttir B., Aurelius J., Nilsson S., Hellstrand K., Lindh M., Martner A. (2019) *IFNL4* genotypes predict clearance of RNA viruses in Rwandan children with upper respiratory tract infections. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **9**, 340.
 32. Saponi-Cortes J.M.R., Rivas M.D., Calle-Alonso F., Sanchez J.F., Costo A., Martin C., Zamorano J. (2021) *IFNL4* genetic variant can predispose to COVID-19. *Sci. Rep.* **11**(1), 21185.
 33. Amodio E., Pipitone R.M., Grimaudo S., Immordino P., Maida C.M., Prestileo T., Restivo V., Tramuto F., Vitale F., Craxì A., Casuccio A. (2020) SARS-CoV-2 viral load, IFN λ polymorphisms and the course of COVID-19: an observational study. *J. Clin. Med.* **9**(10), 3315.
 34. Rahimi P., Tarharoudi R., Rahimpour A., Mosayebi Amroabadi J., Ahmadi I., Anvari E., Siadat S.D., Aghasadeghi M., Fateh A. (2021) The association between interferon lambda 3 and 4 gene single-nucleotide polymorphisms and the recovery of COVID-19 patients. *Virol. J.* **18**(1), 221.
 35. Kim H.J., Jo A., Jeon Y.J., An S., Lee K.M., Yoon S.S., Choi J.Y. (2019) Nasal commensal *Staphylococcus epidermidis* enhances interferon- λ -dependent immunity against influenza virus. *Microbiome*. **7**(1), 80.
 36. Fox J.M., Crabtree J.M., Sage L.K., Tompkins S.M., Tripp R.A. (2015) Interferon lambda upregulates IDO1 expression in respiratory epithelial cells after influenza virus infection. *J. Interferon Cytokine Res.* **35**(7), 554–562.
 37. Iwasaki A., Pillai P.S. (2014) Innate immunity to influenza virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* **14**(5), 315–328.
 38. Wang J., Oberley-Deegan R., Wang S., Nikrad M., Funk C.J., Hartshorn K.L., Mason R.J. (2009) Human alveolar type II cells secrete antiviral IL-29 (IFN- λ 1) in response to influenza A infection. *J. Immunol.* **182**(3), 1296–1304.
 39. Beucher G., Blondot M.L., Celle A., Pied N., Recordon-Pinson P., Esteves P., Faure M., Métifiot M., Lacomme S., Dacheux D., Robinson D.R., Längst G., Beaufils F., Lafon M.E., Berger P., Landry M., Malvy D., Trian T., Andreola M.L., Wodrich H. (2022) Bronchial epithelia from adults and children: SARS-CoV-2 spread via syncytia formation and type III interferon infectivity restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **119**(28), e2202370119.
 40. Wang N., Zhan Y., Zhu L., Hou Z., Liu F., Song P., Qiu F., Wang X., Zou X., Wan D., Qian X., Wang S., Guo Y., Yu H., Cui M., Tong G., Xu Y., Zheng Z., Lu Y., Hong P. (2020) Retrospective multicenter cohort study shows early interferon therapy is associated with favorable clinical responses in COVID-19 patients. *Cell Host Microbe*. **28**(3), 455–464.
 41. Felgenhauer U., Schoen A., Gad H.H., Hartmann R., Schaubmar A.R., Failing K., Drosten C., Weber F. (2020) Inhibition of SARS-CoV-2 by type I and type III interferons. *J. Biol. Chem.* **295**(41), 13958–13964.
 42. Vanderheiden A., Ralfs P., Chirkova T., Upadhyay A.A., Zimmerman M.G., Bedoya S., Aoued H., Tharp G.M., Pellegrini K.L., Manfredi C., Sorscher E., Mainou B., Lobby J.L., Kohlmeier J.E., Lowen A.C., Shi P.Y., Menachery V.D., Anderson L.J., Grakoui A., Bosinger S.E., Suthar M.S. (2020) Type I and type III interferons restrict SARS-CoV-2 infection of human airway epithelial cultures. *J. Virol.* **94**(19), e00985–20.
 43. Sohn S.Y., Hearing J., Mugavero J., Kirillov V., Gorbunova E., Helminiak L., Mishra S., Mackow E., Hearing P., Reich N.C., Kim H.K. (2021) Interferon-lambda intranasal protection and differential sex pathology in a murine model of SARS-CoV-2 infection. *mBio*. **12**(6), e0275621.
 44. Dijkman R., Verma A.K., Selvaraj M., Ghimire R., Gad H.H., Hartmann R., More S., Perlman S., Thiel V., Channappanavar R. (2022) Effective interferon lambda treatment regimen to control lethal MERS-CoV infection in mice. *J. Virol.* **96**(11), e0036422. <https://doi.org/10.1128/jvi.00364-22>
 45. Stanifer M.L., Kee C., Cortese M., Zumaran C.M., Triana S., Muenkner M., Kraeusslich H.G., Alexandrov T., Bartenschlager R., Boulant S. (2020) Critical role of type III interferon in controlling SARS-CoV-2

- infection in human intestinal epithelial cells. *Cell Rep.* **32**(1), 107863.
46. Dinno K.H., Leist S.R., Schäfer A., Edwards C.E., Martinez D.R., Montgomery S.A., West A., Yount B.L., Hou Y.J., Adams L.E., Gully K.L., Brown A.J., Huang E., Bryant M.D., Choong I.C., Glenn J.S., Gralinski L.E., Sheahan T.P., Baric R.S. (2020) A mouse-adapted SARS-CoV-2 model for the evaluation of COVID-19 medical countermeasures. *bioRxiv*. 2020.05.06.081497. <https://doi.org/10.1101/2020.05.06.081497>
 47. Chong Z., Karl C.E., Halfmann P.J., Kawaoka Y., Winkler E.S., Yu J., Diamond M.S. (2022) Nasally-delivered interferon- λ protects mice against upper and lower respiratory tract infection of SARS-CoV-2 variants including Omicron. *bioRxiv*. 2022.01.21.477296. <https://doi.org/10.1101/2022.01.21.477296>
 48. Yadav D., Dewangan H.K. (2021) PEGYLATION: an important approach for novel drug delivery system. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **32**(2), 266–280.
 49. Chan H.L.Y., Ahn S.H., Chang T.T., Peng C.Y., Wong D., Coffin C.S., Lim S.G., Chen P.J., Janssen H.L.A., Marcellin P., Serfaty L., Zeuzem S., Cohen D., Critelli L., Xu D., Wind-Rotolo M., Cooney E. (2016) Peginterferon lambda for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomized phase 2b study (LIRA-B). *J. Hepatol.* **64**(5), 1011–1019.
 50. Мадонов П.Г., Ершов К.И., Дубровин А.В., Заполцкий Е.Н., Мирошников П.Н., Шилова, М.А. Киншт Д.Н. (2013) Электронно-лучевая модификация препаратов белковой природы для улучшения их фармакологических свойств. *Медицина и образование в Сибири*. **4**, 83.
 51. Артамонов А.В., Бекарев А.А., Дыгай А.М., Жданов В.В., Киншт Д.Н., Мадонов П.Г., Шерстобоев Е.Ю. (2019) Пегилированный интерферон лямбда, обладающий высокой биодоступностью при пероральном применении, и способ его получения. Патент No. RU2678332C1, опубл. 2019.01.28.
 52. Мадонов П.Г., Святченко В.А., Легостаев С.С., Кихтенко Н.А., Котлярова А.А., Олейник Л.А., Байкалов Г.И., Удуг В.В. (2021) Противовирусная активность в отношении SARS-CoV-2 фармацевтической субстанции на основе иммобилизованного рекомбинантного человеческого интерферона лямбда-1. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. **84**(7), 15–20.
 53. Kubetzko S., Sarkar C.A., Plückthun A. (2005) Protein PEGylation decreases observed target association rates via a dual blocking mechanism. *Mol. Pharmacol.* **68**(5), 1439–1454.
 54. Grace M.J., Lee S., Bradshaw S., Chapman J., Spond J., Cox S., Delorenzo M., Brassard D., Wylie D., Cannon-Carlson S., Cullen C., Indelicato S., Voloch M., Borden D. (2005) Site of pegylation and polyethylene glycol molecule size attenuate interferon-alpha antiviral and antiproliferative activities through the JAK/STAT signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **280**(8), 6327–6336.
 55. Dinno K.H., Leist S.R., Schäfer A., Edwards C.E., Martinez D.R., Montgomery S.A., West A., Yount B.L. Jr., Hou Y.J., Adams L.E., Gully K.L., Brown A.J., Huang E., Bryant M.D., Choong I.C., Glenn J.S., Gralinski L.E., Sheahan T.P., Baric R.S. (2020) A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. *Nature*. **586**(7830), 560–566.
 56. Feld J.J., Kandel C., Biondi M.J., Kozak R.A., Zabor M.A., Lemieux C., Borgia S.M., Boggild A.K., Powis J., McCready J., Tan D.H.S., Chan T., Coburn B., Kumar D., Humar A., Chan A., O'Neil B., Noureldin S., Booth J., Hong R., Smookler D., Aleyadeh W., Patel A., Barber B., Casey J., Hiebert R., Mistry H., Choong I., Hislop C., Santer D.M., Lorne Tyrrell D., Glenn J.S., Gehring A.J., Janssen H.L.A., Hansen B.E. (2021) Peginterferon lambda for the treatment of outpatients with COVID-19: a phase 2, placebo-controlled randomised trial. *Lancet Respir. Med.* **9**(5), 498–510.
 57. Jagannathan P., Andrews J.R., Bonilla H., Hedlin H., Jacobson K.B., Balasubramanian V., Purington N., Kamble S., de Vries C.R., Quintero O., Feng K., Ley C., Winslow D., Newberry J., Edwards K., Hislop C., Choong I., Maldonado Y., Glenn J., Bhatt A., Blish C., Wang T., Khosla C., Pinsky B.A., Desai M., Parsonnet J., Singh U. (2021) Peginterferon lambda-1 α for treatment of outpatients with uncomplicated COVID-19: a randomized placebo-controlled trial. *Nat. Commun.* **12**(1), 1967.

Potential of Interferon Lambda as an Inhibitor of SARS-CoV-2

L. A. Oleinik^{1, *}, P. G. Madonov¹, and M. B. Pykhtina¹

¹Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: larisaoleynik81@gmail.com

The study provides an overview of scientific results on the feasibility of using type III interferons against SARS-CoV-2. We have analyzed data obtained from the PubMed electronic database for the period 2020–2022. The results of our own studies of pharmacological substances based on recombinant IFN- λ 1 and its pegylated form are also presented. Completed and ongoing investigations allow us to position IFN- λ as an effective therapeutic agent against SARS-CoV-2.

Keywords: SARS-CoV-2, recombinant human interferon- λ 1, PEG-interferon- λ 1, antiviral activity

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ: ОТ РЕПАРАЦИИ ДНК ДО МЕТАБОЛОМИКИ

УДК 577.151.42/45

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ДНК-ЗОНДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ПУТИ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ ДНК В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. И. В. Алексеева^а, А. А. Кузнецова^а, О. А. Кладова^а, В. О. Шендер^б, П. В. Шнайдер^б,
О. С. Федорова^а, Н. А. Кузнецов^{а, с, *}

^аИнститут химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

^бФедеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического
агентства России, Москва, 119435 Россия

^сНовосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 10.08.2022 г.

После доработки 09.09.2022 г.

Принята к публикации 09.09.2022 г.

Исследования механизмов сохранения генетической информации, проводимые с момента открытия систем репарации ДНК, обусловлены ключевой ролью повреждений ДНК в возникновении различных заболеваний, включая онкологические. До сих пор остается актуальным вопрос о связи между накоплением повреждений ДНК, сбоями в работе путей репарации ДНК и повышенным риском развития некоторых заболеваний. За последние несколько лет предприняты значительные усилия, направленные на разработку методов анализа активности ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК в клетках человека. Нами разработаны флуоресцентные ДНК-зонды, позволяющие определять в клеточных экстрактах уровень активности ключевых ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК, а именно ДНК-гликозилаз UNG2, SMUG1, MBD4, TDG, AAG, NEIL1, NTHL1 и OGG1 и AP-эндонуклеазы APE1. Чувствительность ДНК-зондов определяли на очищенных препаратах ферментов. Определение активности ферментов репарации в экстрактах клеточных линий опухолей яичников человека TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21 позволило выявить значительную вариабельность уровня активности ферментов в этих линиях клеток. Полученные результаты могут стать основой для создания тест-системы определения активности ключевых ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК в организме человека.

Ключевые слова: репарация ДНК, ферментативная активность, флуоресценция, ДНК-зонд, ДНК-гликозилаза, AP-эндонуклеаза

DOI: 10.31857/S0026898423020027, EDN: EELFGZ

ВВЕДЕНИЕ

Репарация ДНК – важный процесс поддержания целостности генома и, как следствие, генетической стабильности и жизнеспособности клеток. Эксцизионная репарация оснований ДНК (base excision repair, BER) – один из путей репарации, отвечающий за удаление из ДНК необъем-

ных повреждений, возникающих в таких процессах, как дезаминирование, алкилирование, окисление азотистых оснований, гидролиз *N*-гликозидных и фосфодиэфирных связей [1]. В исследованиях процесса BER *in vitro* показано существование двух альтернативных путей: “короткозаплаточного”, в котором замене подвергается только один нуклеотид, и “длиннозаплаточного”, где происходит достройка двух и более нуклеотидов [2–5]. В обоих случаях ДНК-гликозилаза, имеющая специфичность к определенному типу повреждений, удаляет поврежденное азотистое основание, после чего AP-эндонуклеаза APE1 гидролизует ДНК с образованием 3'-концевой ОН-группы [6]. Репарация отдельных окисленных азотистых оснований, инициированная бифункциональными гликозилазами (например, OGG1 и NEIL1-3),

Сокращения: OGG1 – 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза; AAG – алкиладенин-ДНК-гликозилаза; APE1 – AP-эндонуклеаза человека; MBD4 – метилцитозин-связывающий домен 4; TDG – тимин-ДНК-гликозилаза; NEIL1 – эндонуклеаза VIII; AP-сайт – апуриновый/апириимидиновый сайт; F – остаток (2*R*,3*S*)-2-(гидроксиметил)-3-гидрокситетрагидрофурана; εА – 1, *N*⁶-ε-этенаденин; охoG – 7,8-дигидро-8-оксогуанин; FRET – Förster resonance energy transfer (Фёрстеровский перенос энергии); Tg – тимидин-гликоль; FAM – 5(6)-карбокси-флуоресцеин; BHQ1 – black hole quencher; ps – тиофосфатная группа.

Таблица 1. Структура и специфичность использованных ДНК-зондов

Фермент	Структура поврежденного нуклеотида	ДНК-зонд
APE1	F	5'-FAM-GCTCA(F)GTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'
UNG2, SMUG1, MBD4, TDG	U	5'-FAM-GCTCA(U)GTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'
AAG	εA	5'-FAM-GCTCA(εA)GTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'
NEIL1, NTHL1	Tg	5'-FAM-GCTCA(Tg)GTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'
OGG1	охоG	5'-FAM-GCTCA(охоG)GTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'
Неспецифическое расщепление	C	5'-FAM-GCTCA(C)GTACAGAGCTGTTTTTCAGCTCTGTACGTGAGCps-BHQ1-3'

F — остаток (2*R*,3*S*)-2-(гидроксиметил)-3-гидрокситетрагидрофурана; εA — 1, *N*⁶-этенoadенозин; охоG — 7,8-дигидро-8-оксогуанозин; Tg — тимидингликоль; FAM — 5(6)-карбоксифлуоресцеин; BHQ1 — black hole quencher; ps — тиофосфатная группа.

может протекать по независимому от APE1 пути, в котором эти гликозилазы расщепляют AP-сайты по механизму β- или β/δ-элиминирования [7, 8]. ДНК-полимераза β (Polβ) катализирует удаление 5'-дезоксирибозофосфатного фрагмента (5'-dRP) и присоединяет к 3'-концевой ОН-группе неповрежденный нуклеотид, который должен быть лигирован на последней стадии BER для восстановления целостности сахарофосфатного остова [6].

Впервые результаты исследований, в которых предполагалось, что репарация ДНК играет важную роль в предотвращении развития онкологических заболеваний, были опубликованы в конце 1960-х годов [9, 10]. Однако до сих пор актуальным остается изучение полноценного функционирования путей репарации ДНК в клетках человека, а также связи между сбоями в этих механизмах и повышенным риском развития некоторых заболеваний [11].

Необходимо отметить, что первые предложенные методы анализа активности ферментов репарации ДНК, основанные на радиоактивном мечении [12, 13], гель-электрофорезе [14], хроматографии [15, 16] или на захвате парамагнитными шариками со стрептавидином [17], были весьма трудоемкими и обладали невысокой чувствительностью [14]. Кроме того, существенным недостатком этих подходов является необходимость использования специализированных реагентов [12, 13], оборудования [15] или выполнения сложных процедур [17]. Поэтому в последние годы все чаще применяются флуоресцентные методы, простые в использовании и обладающие высокой чувствительностью [18–20]. Одно из существенных преимуществ анализа ферментов репарации ДНК с помощью флуоресцентных зондов — возможность проведения анализа непосредственно в биологических средах, включая лизаты и intactные клетки [21–23]. Еще одним положительным фактором использования флуоресцентных зондов является их достаточно легкая адаптация к проведению параллельного анализа активности

нескольких ферментов [24, 25]. При этом флуоресцентные зонды, способные проникнуть в клетку, можно использовать и для прямой регистрации активности целевых ферментов непосредственно в клетках [24, 26]. В последние годы были предприняты значительные усилия, направленные на разработку методов анализа активности ферментов репарации ДНК [27] в различных клеточных линиях и тканях с помощью флуориметрии [28, 29], флуоресцентной микроскопии [25] и проточной цитометрии [30].

Нами разработаны флуоресцентные ДНК-зонды, позволяющие определять в клеточных экстрактах уровень активности ключевых ферментов эксцизионной репарации ДНК, а именно ДНК-гликозилаз UNG2, SMUG1, MBD4, TDG, AAG, NEIL1, NTHL1 и OGG1, и AP-эндонуклеазы APE1. Чувствительность ДНК-зондов определяли с использованием очищенных препаратов ферментов. Определение активности ферментов репарации в клеточных экстрактах линий опухолей яичников человека TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21 позволило апробировать ДНК-зонды и выявило значительную вариативность уровня активности ферментов в этих линиях. Результаты нашей работы могут стать основой для создания тест-системы анализа функционирования системы BER в клетках человека и проведения персонализированной терапии онкологических заболеваний.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Структура ДНК-зондов. Олигонуклеотидные ДНК-зонды (табл. 1) синтезированы на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (“Биоссет”, Новосибирск, Россия) с использованием коммерческих амидофосфитов 2'-дезоксирибонуклеозидов и CPG-носителей (“GlenResearch”, США). Синтезированные ДНК-зонды очищали с помощью ВЭЖХ на ионообменной колонке (PRP-X500 Hamilton Company (12–30 мкм) 3.9 × × 300 мм) и последующей обращенно-фазовой

хроматографии (Bondapak C18 (15–20 мкм) 3.9×300 мм, “Waters”, Ирландия). Концентрацию олигонуклеотидов в исходном растворе определяли по закону Бугера–Ламберта–Бера, используя значение коэффициента молярного поглощения олигонуклеотидов при длине волны 260 нм, рассчитанное по данным [31].

Определение чувствительности ДНК-зондов на очищенных препаратах ферментов. Калибровочные кривые, отражающие зависимость начальной скорости расщепления ДНК-зонда от концентрации целевого фермента, получали для каждого из представленных зондов (кроме зонда, содержащего неповрежденное основание) с использованием рекомбинантных ферментов. Очищенные препараты ферментов получены по ранее опубликованным методикам: AP-эндонуклеаза APE1 согласно [32, 33], 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза OGG1 [34, 35], урацил-ДНК-гликозилаза SMUG1 [36], алкиладенин-ДНК-гликозилаза AAG [37] и эндонуклеаза VIII NEIL1 [38]. Кинетические кривые получали при взаимодействии 1×10^{-6} М ДНК-зонда и 1×10^{-6} , 5×10^{-7} , 1×10^{-7} , 5×10^{-8} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} М целевого фермента, специфичного к данному зонду. В случае калибровочных кривых для монофункциональных ДНК-гликозилаз SMUG1 и AAG в реакционной смеси присутствовала AP-эндонуклеаза APE1 в концентрации 1×10^{-6} М, гидролизующая AP-сайты, образованные действием монофункциональных ДНК-гликозилаз. Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции FAM регистрировали при температуре 37°C на спектрофлуориметре Infinite 200 Pro (“Tecan”, Швейцария). Каждая кинетическая кривая представляет собой результат усреднения минимум трех экспериментальных кривых. Эксперименты проводили в 50 мМ Трис-НСl-буфере pH 7.5, содержащем 50 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, 7% глицерина. Возбуждение флуоресценции проводили на длине волны 485 нм, изменение интенсивности флуоресценции ДНК-зонда регистрировали на длине волны 520 нм в интервале времени 15–3600 с.

Начальную скорость расщепления ДНК-зондов при заданной концентрации фермента рассчитывали, используя начальные линейные участки кинетических кривых. Зависимость начальной скорости от концентрации ферментов имела линейный вид, что позволяет использовать полученные зависимости в качестве калибровочных кривых для оценки концентрации целевых ферментов в клеточном экстракте.

Клеточные линии. Для анализа активности ферментов репарации ДНК с помощью ДНК-зондов использовали линии клеток рака яичника человека TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21. Клетки культивировали в среде DMEM

(“Gibco”, “ThermoFisher Scientific”, США) с 10%-ной фетальной сывороткой крупного рогатого скота (“Gibco”, “ThermoFisher”), 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Клетки механически снимали с поверхности культурального флакона, осаждали центрифугированием (1000 об./мин, 2 мин), ресуспендировали в растворе PBS и центрифугировали повторно (1000 об./мин, 2 мин). Данную процедуру повторяли дважды.

Приготовление клеточного экстракта. Лизис клеток проводили в буфере: 10 мМ Трис-НСl pH 7.5, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 0.5% CHAPS, 10% глицерин, 0.1 мМ PMSF, 0.5 мМ β-меркаптоэтанол. К клеточному осадку добавляли 150 мкл лизирующего буфера, выдерживали на льду в течение 30 мин., затем центрифугировали (14500 об./мин, 10 мин). Общую концентрацию белка в полученном экстракте измеряли по методу Брэдфорда (концентрация белков, как правило, составляла 1–1.5 мкг/мкл). Клеточный экстракт готовили непосредственно перед проведением флуоресцентного анализа активности ферментов.

Определение оптимального общего количества белка в клеточном экстракте. Клетки линии TOV112 лизировали в буфере (10 мМ Трис-НСl pH 7.5, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 0.5% CHAPS, 10% глицерин, 0.1 мМ PMSF, 0.5 мМ β-меркаптоэтанол). Общая концентрация белка, измеренная по методу Брэдфорда, составила 1.1 мкг/мкл. Регистрировали изменения интенсивности флуоресценции реакционных смесей, содержащих 1×10^{-6} М ДНК-зонд и клеточный экстракт в концентрации 50, 25, 10, 5 мкг/мкл по общему белку. Спектры флуоресценции регистрировали в 50 мМ Трис-НСl-буфере pH 7.5, содержащем 50 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, 7% глицерина при 37°C отдельно для каждого типа ДНК-зонда. Каждая кинетическая кривая, представленная на рисунках, получена усреднением не менее трех экспериментальных кривых.

Определение активности ферментов BER в клеточном экстракте. Пробы готовили в 100 мкл буферного раствора, содержащего 50 мМ Трис-НСl pH 7.5, 50 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, 7% глицерина и клеточный экстракт в концентрации 20 мкг/мкл по общему белку. ДНК-зонд, содержащий поврежденный нуклеотид определенного типа (табл. 1), добавляли к клеточному экстракту до конечной концентрации 1×10^{-6} М. Перемешивание (5 с, амплитуда кругового перемешивания 1 мм) и регистрацию FRET-сигнала проводили, используя спектрофлуориметр Infinite 200 Pro (“Tecan”) при 37°C. Длина волны возбуждения флуоресценции составляла $\lambda_{ex} = 485$ нм, эмиссию регистрировали при $\lambda_{em} = 520$ нм. Максимальное время реакции 3600 с. Каждый эксперимент повторяли трижды.

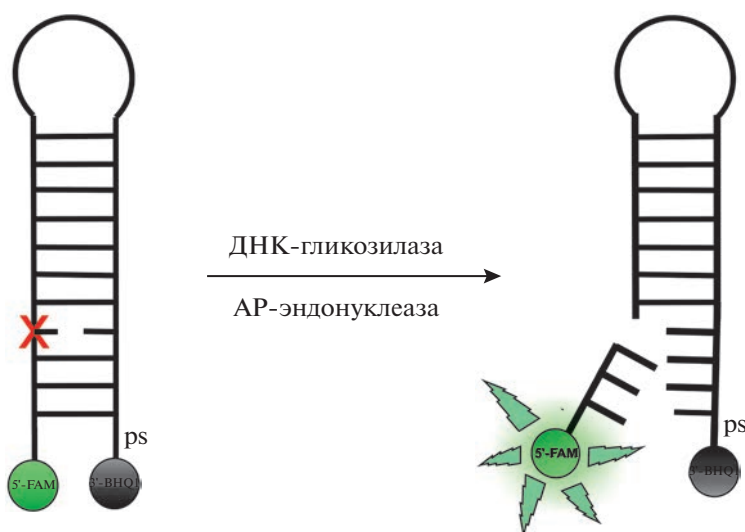


Рис. 1. Схематическое изображение ДНК-зонда, используемого в работе, и пути генерирования FRET-сигнала в тест-системе анализа активности ферментов пути BER в клеточных экстрактах. X — повреждение, специфичное для анализируемого фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы предложили подход к определению активности ряда ферментов BER с использованием флуоресцентно меченных ДНК-дуплексов, содержащих поврежденный нуклеотид [39]. В качестве поврежденных нуклеотидов использовали 7,8-дигидро-8-оксогуанозин (охоG), 5,6-дигидроуридин (DHU), уридин (U), 1, N^6 -этенoadенозин (εA) и апуриновый/апиримидиновый сайт (AP-сайт). Набор ДНК-зондов, содержащих эти повреждения, позволил охарактеризовать активность нескольких ферментов репарации человека: AP-эндонуклеазы APE1; 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы OGG1; алкиладенин-ДНК-гликозилазы AAG; ДНК-гликозилаз UNG2, SMUG1, MBD4 и TDG, специфически узнающих урацил в ДНК; ДНК-гликозилаз NEIL1 и NTHL1, узнающих 5,6-дигидроуридин. Активность AP-эндонуклеазы APE1 определяли с использованием ДНК-зонда, содержащего химически стабильный аналог AP-сайта — остаток (2R,3S)-2-(гидроксиметил)-3-гидрокситетрагидрофурана (F-сайт).

Анализ активности ферментов репарации ДНК с помощью дуплексных ДНК-зондов в линиях опухолевых клеток человека различного гистологического происхождения, а именно A549, HeLa, MCF7, WT-7, HEK293T и HKC8, показал, что дуплексные ДНК-зонды, содержащие охоG и εA, расщепляемые ферментами OGG1 и AAG, соответственно, не обладают чувствительностью, достаточной для регистрации активности [39]. Полученные данные свидетельствовали о том, что дуплексные ДНК-зонды не могут использоваться для определения активности в клеточном экстракте, полученном менее чем из 10^6 клеток. Кроме того, время анализа было ограничено 2000 с для предот-

вращения неспецифической деградации ДНК-зонда клеточными нуклеазами.

В связи с выявленными недостатками мы провели оптимизацию структуры ДНК-зондов, направленную на улучшение их устойчивости к неспецифической деградации в клеточных экстрактах. ДНК-зонды, используемые в данной работе (рис. 1), представляли собой самокомплементарные олигонуклеотиды, несущие FRET-пару FAM/BHQ1 на концах цепи, а также содержащие повреждение, специфичное для определенного фермента или группы ферментов (табл. 1). В качестве поврежденных нуклеотидов использовали 7,8-дигидро-8-оксогуанозин (охоG), тимидингликоль (Tg), уридин (U), 1, N^6 -этенoadенозин (εA) и F-сайт. Для предотвращения 3'–5'-экзонуклеазной деградации ДНК-зондов в клеточном экстракте 3'-концевой межнуклеотидный фосфатный остаток заменили тиофосфатной группой (ps).

Специфическое узнавание поврежденного нуклеотида и его удаление ДНК-гликозилазой с последующим расщеплением сахарофосфатного остова сопровождается значительным ростом сигнала флуоресценции FAM. Необходимо отметить, что для расщепления AP-сайтов, образующихся под действием монофункциональных ДНК-гликозилаз, в реакционной смеси должна присутствовать AP-эндонуклеаза. Кроме того, известно, что AP-эндонуклеаза APE1 стимулирует активность ДНК-гликозилаз человека [40, 41], поэтому при анализе активности всех ДНК-гликозилаз в реакционную смесь добавляли APE1 в одинаковой концентрации 1.0 мкМ.

На рис. 2 представлены кинетические кривые, характеризующие расщепление ДНК-зондов ДНК-гликозилазами OGG1, NEIL1, AAG,

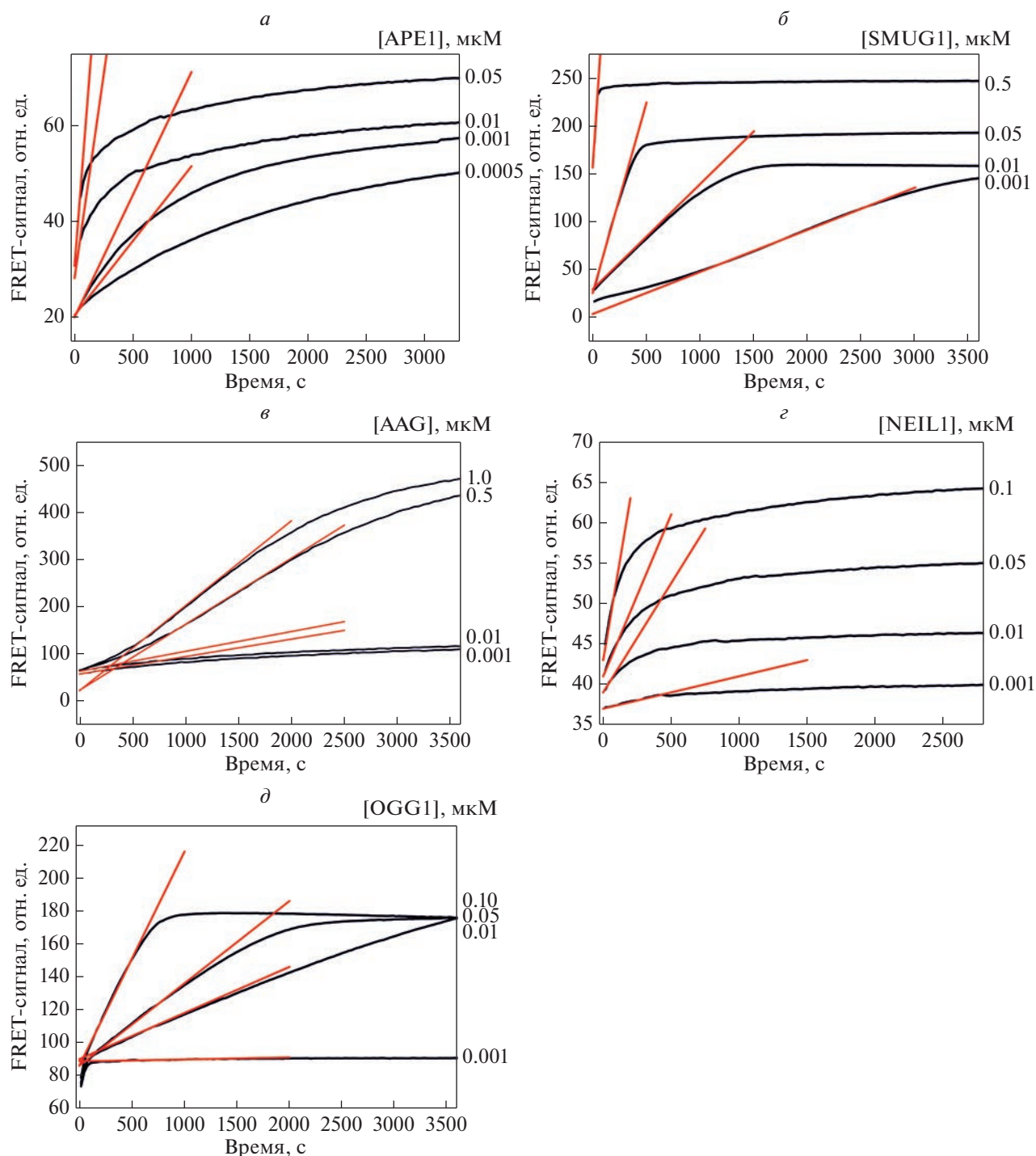


Рис. 2. Кинетические кривые, характеризующие расщепление ДНК-зондов, содержащих F (а), U (б), εA (в), Tg (г) и ohoG (д), при взаимодействии с очищенными препаратами ферментов APE1, SMUG1, AAG, NEIL1 и OGG1 соответственно.

SMUG1 и AP-эндонуклеазой APE1. Концентрация ДНК-зонда во всех экспериментах составляла 1.0 мкМ. Кинетические кривые, характеризующие активность AP-эндонуклеазы человека APE1, получали с использованием очищенного препарата фермента с концентрацией 5×10^{-10} – 1×10^{-6} М. В случае кривых для ДНК-гликозилаз использо-

вали также очищенные препараты фермента с концентрацией 1×10^{-9} – 1×10^{-6} М, но в реакционную смесь добавляли AP-эндонуклеазу человека APE1 в концентрации 1.0 мкМ.

Начальную скорость расщепления ДНК-зондов оценивали путем линейаризации (или линей-

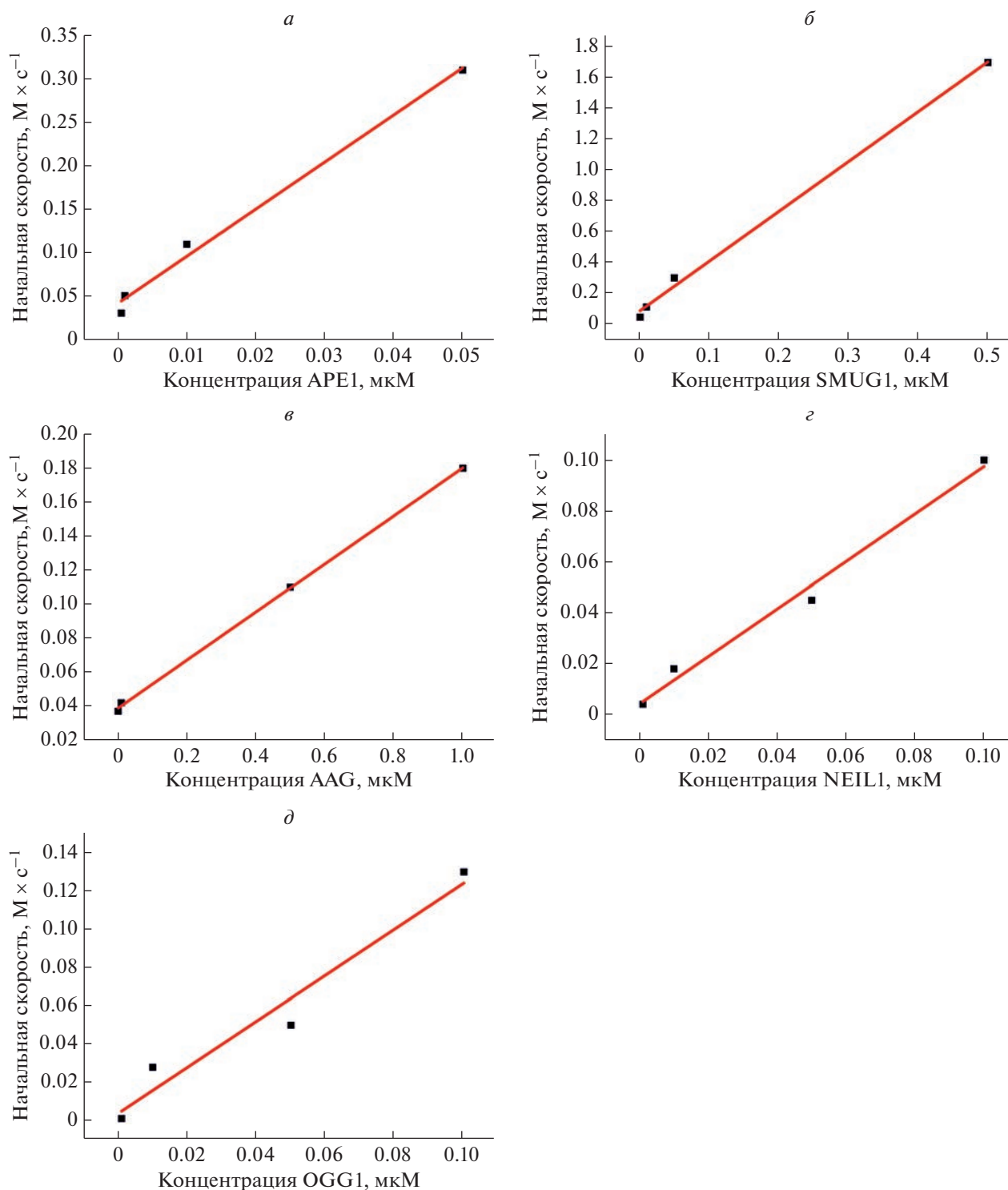


Рис. 3. Зависимость начальной скорости накопления продукта от концентрации APE1 (а), SMUG1 (б), AAG (в), NEIL1 (г) и OGG1 (д).

ной аппроксимации) начального участка кинетических кривых (рис. 3). Зависимость начальной скорости от концентрации фермента имела линейный вид и позволила определить концентрацию целевого фермента в клеточном экстракте.

Чтобы определить количество общего белка, оптимальное для анализа, сравнили относительную активность ферментов в экстрактах клеток линии TOV112, содержащих 5, 10, 25 и 50 мкг общего белка (рис. 4). Для всех типов ДНК-зондов

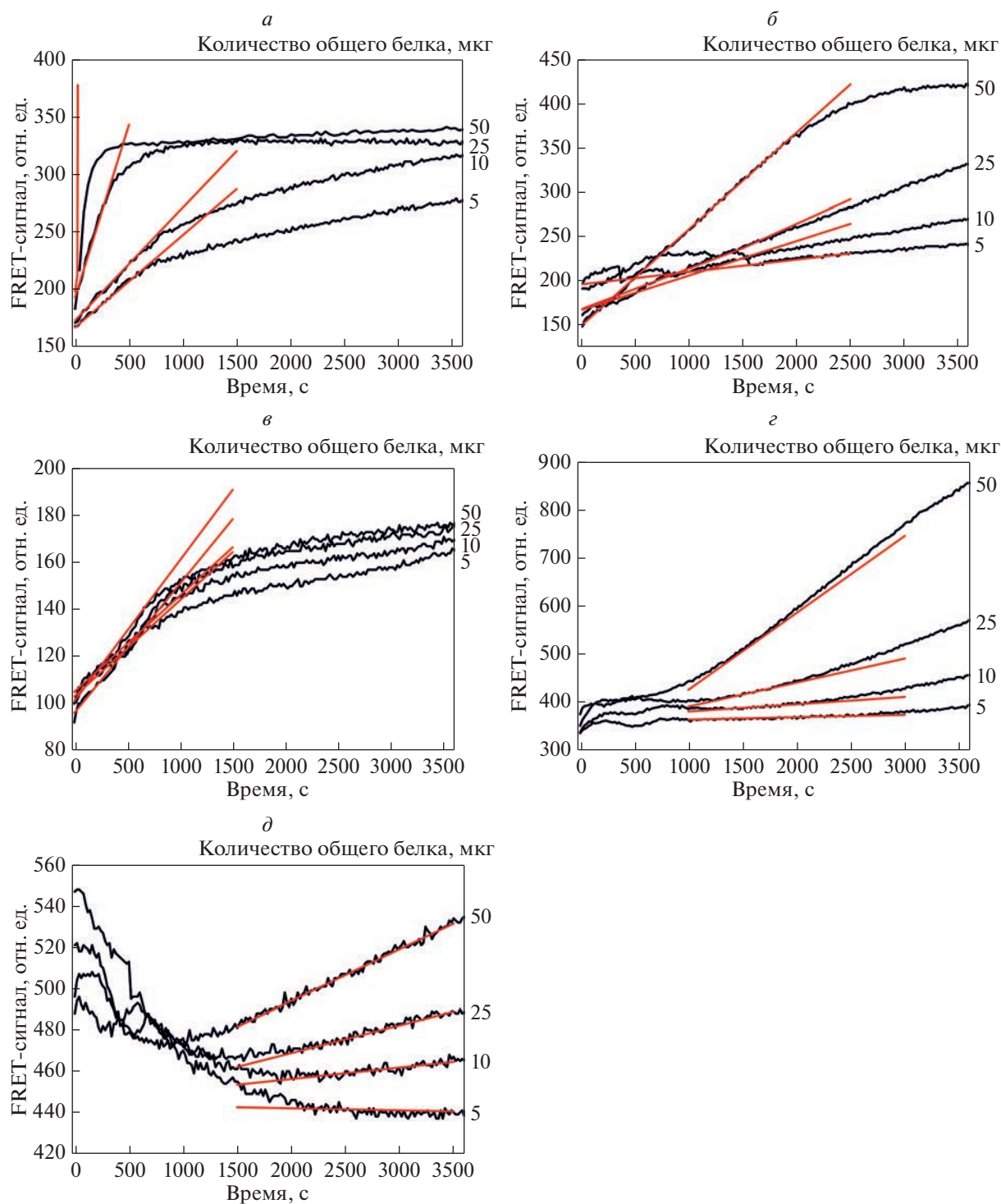


Рис. 4. Определение оптимального для анализа количества общего белка в клеточном экстракте на примере линии клеток TOV112. Кинетические кривые, характеризующие расщепление ДНК-зондов, содержащих F (а), U (б), εA (в), Tg (г) и ohoG (д), в клеточных экстрактах, содержащих 5, 10, 25 и 50 мкг общего белка.

получены кинетические кривые, свидетельствующие об увеличении FRET-сигнала после добавления клеточного экстракта. Начальные участки кинетических кривых аппроксимировали линейным уравнением, что позволило определить на-

чальную скорость расщепления ДНК-зонда. Зависимость начальной скорости расщепления ДНК-зондов от концентрации общего белка в экстракте имела линейный вид в случае ДНК-зондов, содержащих F, U, Tg и ohoG (рис. 5). Од-

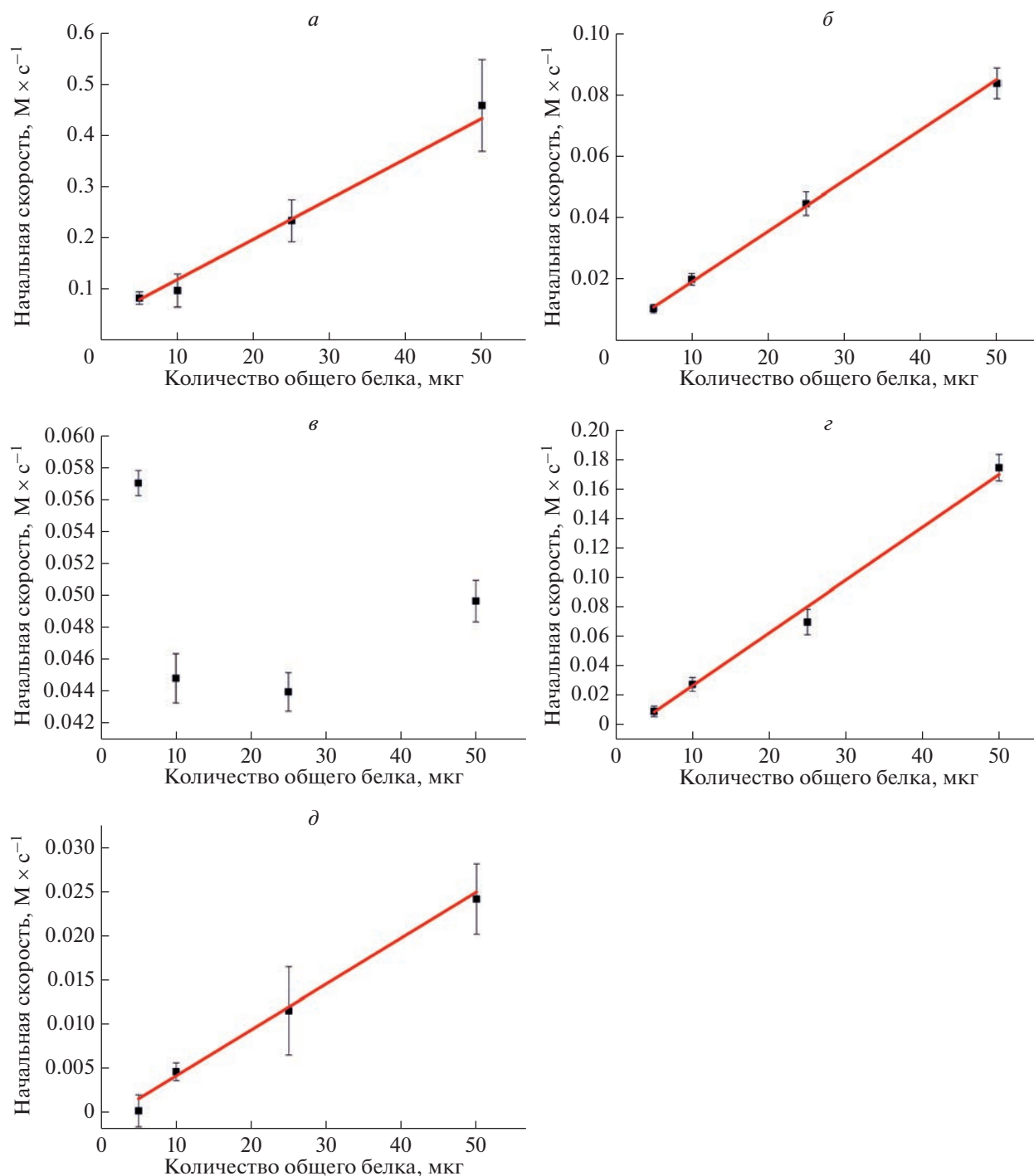


Рис. 5. Зависимость начальной скорости расщепления ДНК-зондов, содержащих F (а), U (б), εA (в), Tg (г) и oхoG (д), при взаимодействии с клеточным экстрактом линии клеток TOV112 при различных концентрациях общего белка (5, 10, 25 и 50 мкг/мкл).

нако в случае εA-зонда начальная скорость роста FRET-сигнала не коррелировала с концентрацией белков в клеточном экстракте. Следует отметить, что удаление εA, в отличие от F, U, Tg и oхoG, из ДНК может проходить по двум независимым механизмам: BER с помощью фермента AAG [37,

42, 43], приводящего к удалению поврежденного основания и генерации AP-сайта, и прямой репарации алкилированных нуклеотидов с помощью ДНК-диоксигеназы АВН2 [44, 45] за счет окисления алкильного заместителя и его последующей деградации, приводящей к восстановлению струк-

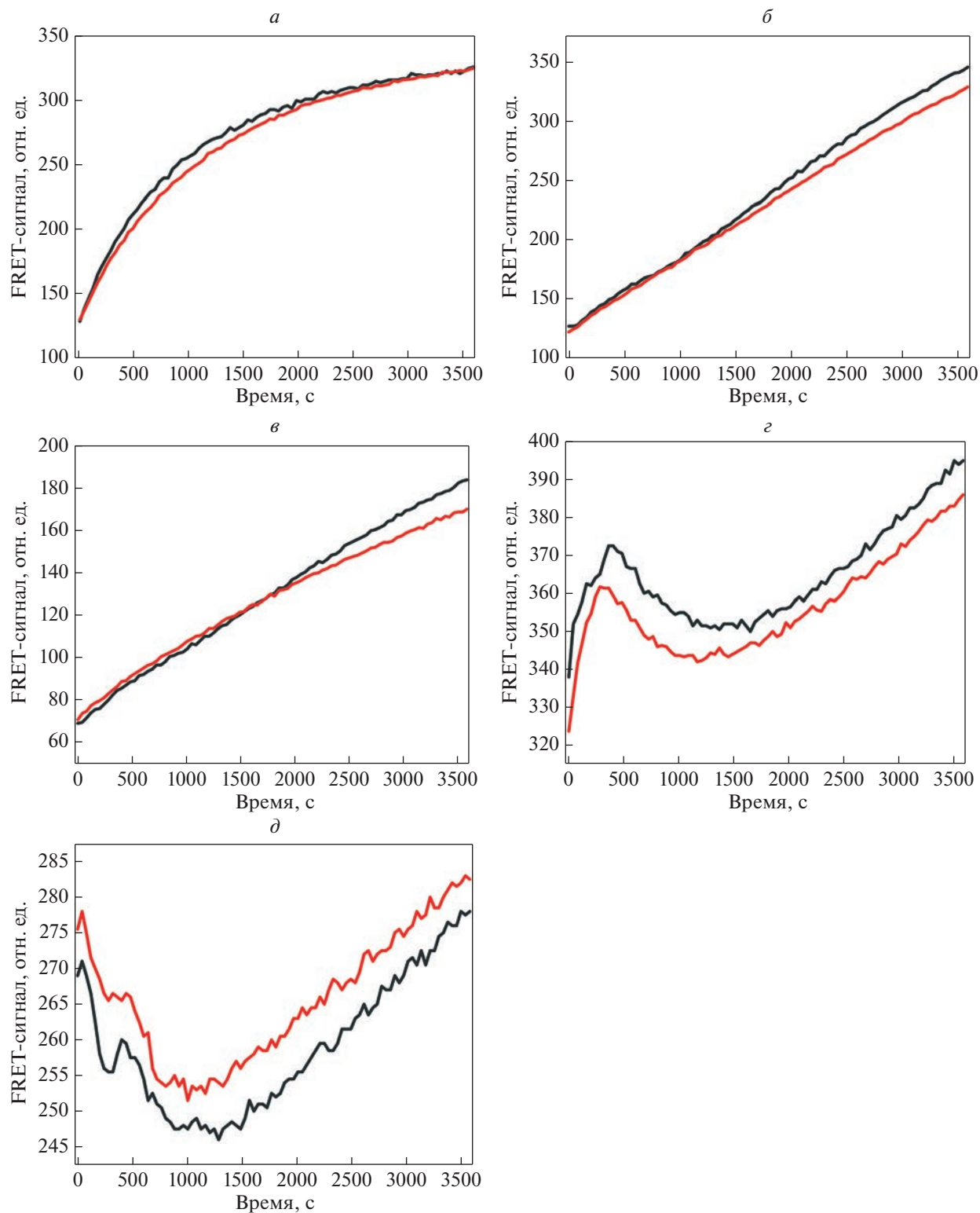


Рис. 6. Кинетические кривые, характеризующие расщепление ДНК-зондов, содержащих F (а), U (б), εA (в), Tg (г) и ohoG (д), при взаимодействии с экстрактом клеточной линии SCO3 (черный цвет — ядерная фракция, красный — общий экстракт).

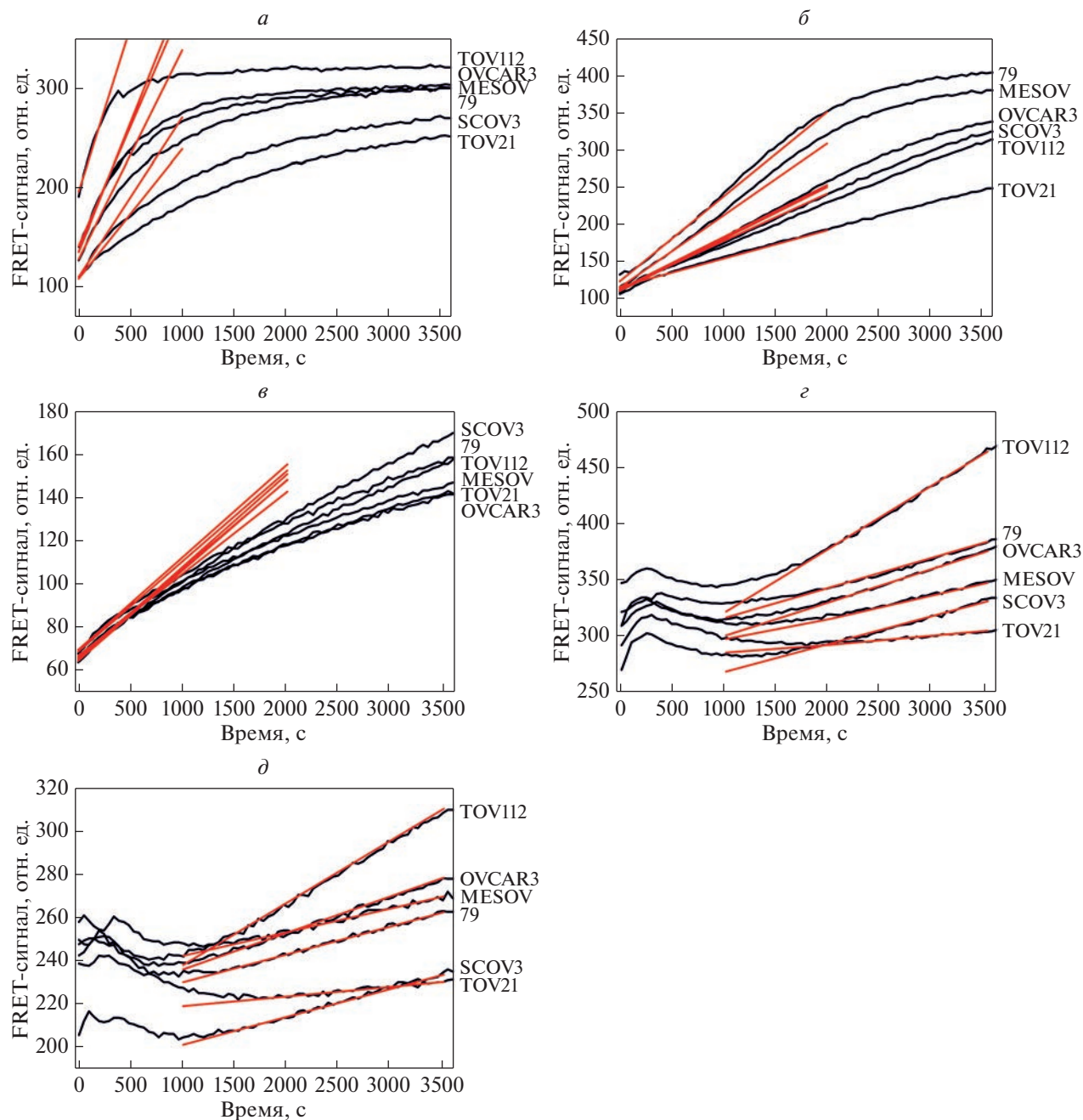


Рис. 7. Кинетические кривые, характеризующие расщепление ДНК-зондов, содержащих F (а), U (б), εA (в), Tg (г) и ohoG (д), при взаимодействии с экстрактами клеточных линий TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21.

туры неповрежденного аденозина в составе ДНК. Можно предположить, что совместное узнавание εA-зонда ферментами, входящими в независимые пути удаления повреждения из ДНК, приводит к усложнению интерпретации полученных данных.

На основании полученных данных во всех дальнейших экспериментах по определению активности целевых ферментов использовали 25 мкг общего белка для ДНК-зонда каждого типа. Таким образом, для анализа активности с использованием

пяти ДНК-зондов суммарно требуется не менее 125 мкг общего белка. Однако необходимо отметить, что 125 мкг белка можно получить при лизисе ~100000 клеток (в зависимости от линии клеток), что свидетельствует о перспективности данного метода для определения активности ферментов репарации в относительно небольшом числе клеток, например, полученных из крови человека с целью определения репарационного статуса организма.

Таблица 2. Концентрации целевых ферментов в клеточных экстрактах линий рака яичников человека TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21

Линия клеток	Концентрация ферментов BER, нМ				
	APE1	UDG	AAG	NEIL1/NTH1	OGG1
TOV112	47 ± 5	5.1 ± 0.9	10.3 ± 0.7	42 ± 3	12.6 ± 1.5
TOV21	16 ± 3	2.2 ± 0.5	7.1 ± 0.9	3.3 ± 0.2	2.2 ± 0.5
79	26 ± 4	14.5 ± 4.3	7.7 ± 1.2	19 ± 5	5.8 ± 1.2
SCOV3	20 ± 4	3.7 ± 0.9	8.0 ± 0.5	15 ± 3	6.0 ± 0.8
MESOV	33 ± 7	5.5 ± 1.4	7.3 ± 0.8	12 ± 5	4.8 ± 0.9
OVCAR3	31 ± 8	4.1 ± 0.8	6.8 ± 0.6	21 ± 5	7.4 ± 1.7

На следующем этапе с использованием линии SCOV3 сравнили активность ферментов пути BER в полном клеточном экстракте и в экстракте предварительно выделенной ядерной фракции. Интересно отметить, что кинетические кривые, характеризующие расщепление всех типов ДНК-зондов белками общего и ядерного экстрактов, имели сходный вид, что свидетельствует о возможности проводить анализ ферментов, используя общий клеточный экстракт (рис. 6).

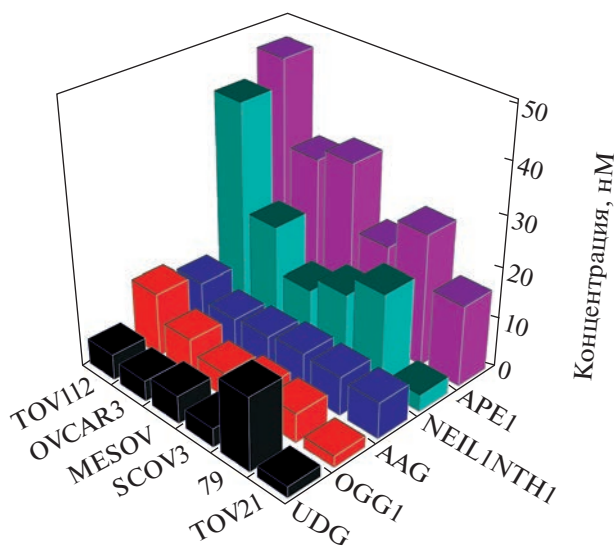
Затем на примере нескольких линий клеток опухоли яичника человека (TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21) провели сравнительный анализ активности тестируемых ферментов репарации в общих клеточных экстрактах. Для каждой клеточной линии получили кинетические кривые, характеризующие расщепление ДНК-зондов (рис. 7), и определили начальную ско-

рость расщепления. На основании начальных скоростей расщепления ДНК-зондов и калибровочных кривых, полученных с использованием очищенных препаратов ферментов, оценили концентрации целевых ферментов в экстрактах (табл. 2, рис. 8).

Сравнение полученных данных выявило значительную вариабельность оценочной концентрации ферментов репарации в различных клеточных линиях. Так, например, концентрация APE1 в линии TOV112 была более чем в 2 раза выше, чем в линиях TOV21 и SCOV3. Необходимо также отметить существенно более высокую оценочную концентрацию ферментов, отвечающих за удаление окисленных пиримидинов (Tg-зонд), в клетках линии TOV112. При этом эффективность удаления алкилированных нуклеотидов на примере εА-зонда была примерно одинаковой во всех использованных клеточных линиях. Однако, как отмечено ранее, эффективность репарации алкилированных азотистых оснований, включая εА, может проходить по двум независимым путям, что осложняет интерпретацию полученных данных. Обнаружено, что клетки линии TOV21 обладают пониженной репарационной активностью на ДНК-зондах всех типов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что понимание механизмов разных путей репарации ДНК значительно расширилось за последнее время, многие инструменты, позволяющие изучать функционирование отдельных участников этих процессов, все еще нуждаются в улучшении. Нами разработаны флуоресцентные ДНК-зонды, с помощью которых можно определять в клеточных экстрактах уровень активности ключевых ферментов BER — ДНК-гlicosилаз и AP-эндонуклеазы APE1. Определение активности ферментов репарации в клеточных экстрактах нескольких линий рака яичников человека позволило апробировать

**Рис. 8.** Концентрация ферментов репарации в экстракте клеточных линий рака яичника человека TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3 и TOV21.

ДНК-зонды и выявило значительную вариабельность уровня активности ферментов в этих линиях клеток.

Полученные данные показывают перспективность предложенного метода, учитывая простоту применения и анализа полученных данных. Результаты нашей работы могут стать основой для создания тест-системы определения активности ключевых ферментов BER в живых организмах. Учитывая множество преимуществ флуоресцентных методов, существует большой потенциал для расширения этой области, предоставляющей инструменты, столь необходимые для определения индивидуального репарационного статуса организма пациента. Будущие персонализированные методы лечения, связанные с применением ДНК-модифицирующих химических препаратов, несомненно, должны быть взаимосвязаны с эффективностью работы ферментов, отвечающих за удаление ДНК-повреждений, вызываемых конкретными препаратами, у каждого конкретного пациента.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00018) и при частичной поддержке бюджетного финансирования № 121031300041-4.

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. Krokan H.E., Bjørås M. (2013) Base excision repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, a012583.
2. Dianov G., Price A., Lindahl T. (1992) Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 1605–1612.
3. Matsumoto Y., Bogenhagen D.F. (1994) Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6187–6197.
4. Frosina G., Fortini P., Rossi O., Carrozzino F., Raspaglio G., Cox L.S., Lane D.P., Abbondandolo A., Dogliotti E. (1996) Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 9573–9578.
5. Klungland A., Lindahl T. (1997) Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J.* **16**, 3341–3348.
6. Kim Y.-J., Wilson D.M. III (2012) Overview of base excision repair biochemistry. *Curr. Mol. Pharmacol.* **5**, 3–13.
7. Wiederhold L., Leppard J.B., Kedar P., Karimi-Busheri F., Rasouli-Nia A., Weinfeld M., Tomkinson A.E., Izumi T., Prasad R., Wilson S.H. (2004) AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol. Cell.* **15**, 209–220.
8. Das A., Wiederhold L., Leppard J.B., Kedar P., Prasad R., Wang H., Boldogh I., Karimi-Busheri F., Weinfeld M., Tomkinson A.E., Wilson S.H., Mitra S. (2006) NEIL2-initiated, APE-independent repair of oxidized bases in DNA: evidence for a repair complex in human cells. *DNA Repair (Amst.)* **5**, 1439–1448.
9. Cleaver J.E. (1968) Defective repair replication of DNA in *Xeroderma pigmentosum*. *DNA Repair (Amst.)* **3**, 183–187.
10. Setlow R.B., Regan J.D., German J., Carrier W.L. (1969) Evidence that *Xeroderma pigmentosum* cells do not perform the first step in the repair of ultraviolet damage to their DNA. *DNA Repair (Amst.)* **3**, 188–195.
11. Helleday T., Eshtad S., Nik-Zainal S. (2014) Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 585–598.
12. Grin I.R., Konorovsky P.G., Nevinsky G.A., Zharkov D.O. (2009) Heavy metal ions affect the activity of DNA glycosylases of the Fpg family. *Biochemistry.* **74**, 1253–1259.
13. Kreklau E.L., Limp-Foster M., Liu N., Xu Y., Kelley M.R., Erickson L.C. (2001) A novel fluorometric oligonucleotide assay to measure O 6-methylguanine DNA methyltransferase, methylpurine DNA glycosylase, 8-oxoguanine DNA glycosylase and abasic endonuclease activities: DNA repair status in human breast carcinoma cells overexpressing. *Nucl. Acids Res.* **29**, 2558–2566.
14. Dianov G.L. (2003) Monitoring base excision repair by *in vitro* assays. *Toxicology.* **193**, 35–41.
15. Weiss J.M., Goode E.L., Ladiges W.C., Ulrich C.M. (2005) Polymorphic variation in hOgg1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. *Mol. Carcinog.* **42**, 127–141.
16. Lee A.J., Hodges N.J., Chipman J.K. (2005) Interindividual variability in response to sodium dichromate-induced oxidative DNA damage: role of the Ser 326 Cys polymorphism in the DNA-repair protein of 8-oxo-7,8-dihydro-2v-deoxyguanosine DNA glycosylase 1. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **14**, 497–505.
17. Xia L., O'Connor T.R. (2001) DNA glycosylase activity assay based on streptavidin paramagnetic bead substrate capture. *Anal. Biochem.* **298**, 322–326.
18. Liu B., Yang X., Wang K., Tan W., Li H., Tang H. (2007) Real-time monitoring of uracil removal by uracil-DNA glycosylase using fluorescent resonance energy transfer probes. *Anal. Biochem.* **366**, 237–243.
19. Wang X., Hou T., Lu T., Li F. (2014) Autonomous exonuclease iii-assisted isothermal cycling signal amplification: a facile and highly sensitive fluorescence DNA glycosylase activity assay. *Anal. Chem.* **86**, 9626–9631.
20. Chen C., Zhou D., Tang H., Liang M., Jiang J. (2013) A sensitive, homogeneous fluorescence assay for detection of thymine DNA glycosylase activity based on ex-

- onuclease-mediated amplification. *Chem. Commun.* **49**, 5874.
21. Cao X., Sun Y., Lu P., Zhao M. (2020) Fluorescence imaging of intracellular nucleases – a review. *Anal. Chim. Acta.* **1137**, 225–237.
 22. Mirbahai L., Kershaw R.M., Green R.M., Hayden R.E., Meldrum R.A., Hodges N.J. (2010) Use of a molecular beacon to track the activity of base excision repair protein OGG1 in live cells. *DNA Repair (Amst)*. **9**, 144–152.
 23. Belhadj S., Rentsch A., Schwede F., Paquet-Durand F. (2021) Fluorescent detection of PARP activity in unfixed tissue. *PLoS One*. **16**, 1–13.
 24. Torchinsky D., Michaeli Y., Gassman N.R., Ebenstein Y. (2019) Simultaneous detection of multiple DNA damage types by multi-colour fluorescent labelling. *Chem. Commun.* **55**, 11414–11417.
 25. Hu J., Liu M.-H., Li Y., Tang B., Zhang C.-Y. (2018) Simultaneous sensitive detection of multiple DNA glycosylases from lung cancer cells at the single-molecule level. *Chem. Sci.* **9**, 712–720.
 26. Maksimenko A., Ishchenko A.A., Sanz G., Laval J., Elder R.H., Saparbaev M.K. (2004) A molecular beacon assay for measuring base excision repair activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 240–246.
 27. Pearl L.H., Schierz A.C., Ward S.E., Al-Lazikani B., Pearl F.M.G. (2015) Therapeutic opportunities within the DNA damage response. *Nat. Rev. Cancer*. **15**, 166–180.
 28. Zhang Y., Li C.-C., Zhang X., Xu, Q., Zhang C.-Y. (2020) Development of oxidation damage base-based fluorescent probe for direct detection of DNA methylation. *Anal. Chem.* **92**, 10223–10227.
 29. Liu G., He W., Liu C. (2019) Sensitive detection of uracil-DNA glycosylase (UDG) activity based on terminal deoxynucleotidyl transferase-assisted formation of fluorescent copper nanoclusters (CuNCs). *Talanta*. **195**, 320–326.
 30. Suggitt M., Fearnley J., Swaine D., Volpato M., Phillips R., Bibby M., Loadman P., Anderson D., Anderson D. (2003) Comet assay and flow cytometry analysis of DNA repair in normal and cancer cells treated with known mutagens with different mechanisms of action. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* **2**, 13–29.
 31. Fasman G.D. (1975) *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. 3rd ed. Cleveland: CRC Press.
 32. Мирошникова А.Д., Кузнецова А.А., Кузнецов Н.А., Федорова О.С. (2016) Термодинамика конформационных переходов АП-эндонуклеазы человека APE1 при взаимодействии с ДНК. *Acta Naturae*. **8**, 103–110.
 33. Kuznetsova A.A., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. (2018) Kinetic features of 3'-5' exonuclease activity of human AP-endonuclease APE1. *Molecules*. **23**, 2101.
 34. Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. (2014) Step-by-step mechanism of DNA damage recognition by human 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Biochim. Biophys. Acta*. **1840**, 387–395.
 35. Кузнецов Н.А., Коваль В.В., Федорова О.С. (2011) Механизмы ферментативного катализа и узнавания поврежденных участков ДНК 8-оксогуанан-ДНК-гликозилазой человека hOGG1. *Биохимия*. **76**, 118–130.
 36. Kuznetsova A.A., Iakovlev D.A., Misovets I.V., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. (2017) Pre-steady-state kinetic analysis of damage recognition by human single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase SMUG1. *Mol. Biosyst.* **13**, 2638–2649.
 37. Kuznetsov N.A., Kiryutin A.S., Kuznetsova A.A., Panov M.S., Barsukova M.O., Yurkovskaya A.V., Fedorova O.S. (2017) The formation of catalytically competent enzyme-substrate complex is not a bottleneck in lesion excision by human alkyladenine DNA glycosylase. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **35**, 950–967.
 38. Kladova O.A., Grin I.R., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A., Zharkov D.O. (2019) Conformational dynamics of damage processing by human DNA glycosylase NEIL1. *J. Mol. Biol.* **431**, 1098–1112.
 39. Кладова О.А., Яковлев Д.А., Гройсман Р., Ищенко А.А., Сапарбаев М.К., Федорова О.С., Кузнецов Н.А. (2020) Определение сравнительной активности ключевых ферментов эксцизионной репарации оснований в клеточных экстрактах. *Биохимия*. **8**, 480–489.
 40. Kladova O.A., Alekseeva I.V., Saparbaev M., Fedorova O.S., Kuznetsov N.A. (2020) Modulation of the apurinic/aprimidinic endonuclease activity of human APE1 and of its natural polymorphic variants by base excision repair proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 7174.
 41. Kladova O.A., Bazlekova-Karaban M., Baccannais S., Piétrement O., Ishchenko A.A., Matkarimov B.T., Iakovlev D.A., Vasenko A., Fedorova O.S., Le Cam E. (2018) The role of the N-terminal domain of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1, APE1, in DNA glycosylase stimulation. *DNA Repair (Amst)*. **64**, 10–25.
 42. Saparbaev M., Langouet S., Privezentzev C.V., Guengerich F.P., Cai H., Elder R.H., Laval J. (2002) 1,N(2)-ethenoguanine, a mutagenic DNA adduct, is a primary substrate of *Escherichia coli* mismatch-specific uracil-DNA glycosylase and human alkylpurine-DNA-N-glycosylase. *J. Biol. Chem.* **277**, 26987–26993.
 43. O'Brien P.J., Ellenberger T. (2004) Dissecting the broad substrate specificity of human 3-methyladenine-DNA glycosylase. *J. Biol. Chem.* **279**, 9750–9757.
 44. Ringvoll J., Moen M.N., Nordstrand L.M., Meira L.B., Pang B., Bekkelund A., Dedon P.C., Bjelland S., Samson L.D., Falnes P.Ø. (2008) AlkB homologue 2-mediated repair of ethenoadenine lesions in mammalian DNA. *Cancer Res.* **68**, 4142–4149.
 45. Kuznetsov N.A., Kanazhevskaya L.Y., Fedorova O.S. (2021) DNA demethylation in the processes of repair and epigenetic regulation performed by 2-ketoglutarate-dependent DNA dioxygenases. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 10540.

DNA Probes for Analysis the Activity of Key Enzymes of the Base Excision DNA Repair Pathway in Human Cells

I. V. Alekseeva¹, A. A. Kuznetsova¹, O. A. Kladova¹, V. O. Shender², P. V. Schneider²,
O. S. Fedorova¹, and N. A. Kuznetsov^{1, 3, *}

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, 119435 Russia*

³*Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

The important role of DNA damage in the occurrence of various diseases, including cancer, stimulates studies of the mechanisms of genetic information stability, carried out since the discovery of DNA repair systems. The question of the relationship between the accumulation of DNA damage, disorders in DNA repair pathways, and an increased risk of diseases developing still remains relevant. Over the past few years, significant efforts have been made to develop methods for analyzing the activity of DNA repair enzymes in human cells. In this work, we developed fluorescent DNA probes that allow us to determine the activity of key enzymes of base excision DNA repair in cell extracts, namely DNA glycosylases UNG2, SMUG1, MBD4, TDG, AAG, NEIL1, NTHL1, and OGG1 and AP endonuclease APE1. The sensitivity of DNA probes was determined on purified enzyme preparations. Determination of the activity of repair enzymes in cell extracts of the human ovarian tumor lines TOV112, 79, OVCAR3, MESOV, SCOV3, and TOV21 revealed a significant variability in the level of enzyme activity in these cell lines. Obtained results can become the test system platform for analyzing the activity of the base excision DNA repair system in the human body.

Keywords: DNA repair, enzyme activity, fluorescence, DNA probe, DNA glycosylase, AP endonuclease

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.152.3

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СТАБИЛЬНОСТЬ ТРИМЕРНОЙ ФОРМЫ 2'-ДЕЗОКСИУРИДИН-5'- ТРИФОСФАТНУКЛЕОТИДГИДРОЛАЗЫ *Escherichia coli*

© 2023 г. А. В. Юдкина^{а, б, 1}, Е. А. Коваленко^{с, 1}, А. В. Ендуткин^а, Е. П. Панфёрова^а,
А. А. Кириленко^с, А. А. Коханенко^с, Д. О. Жарков^{а, б, *}

^аИнститут химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

^бНовосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

^сТомский государственный университет, Томск, 634050 Россия

*e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 29.07.2022 г.

После доработки 16.08.2022 г.

Принята к публикации 16.08.2022 г.

Фермент 2'-дезоксиуридин-5'-трифосфатнуклеотидгидролаза (Dut), гидролизующий dUTP до dUMP и пирофосфата, предотвращает ошибочное включение dUMP в ДНК из метаболического пула dUTP и рассматривается как перспективная фармакологическая мишень для антиметаболической терапии. Активный фермент Dut представляет собой тример, связывающий субстрат в межсубъединичной области. С использованием высокоскоростной наномасштабной дифференциальной сканирующей флуориметрии (nanoDSF) нами изучено влияние различных физико-химических факторов на стабильность тримера Dut *Escherichia coli*. В отличие от мономерных белков температурная денатурация Dut происходит в два этапа, первый из которых соответствует распаду тримера до мономерных субъединиц. Показано, что основной вклад в стабилизацию тримера вносят гидрофобные взаимодействия и водородные связи на интерфейсах взаимодействия между субъединицами. Тример Dut частично стабилизируется при связывании нуклеотидных лигандов. В целом метод nanoDSF удобен для скрининга низкомолекулярных соединений, способных дестабилизировать активный тример Dut.

Ключевые слова: dUTPаза, белок-белковые взаимодействия, олигомеризация, дифференциальная сканирующая флуориметрия

DOI: 10.31857/S0026898423020246, EDN: EEJRNT

В процессе жизнедеятельности организма ДНК постоянно подвергается спонтанной химической модификации даже при нормальных физиологических условиях [1]. Для предотвращения неблагоприятных последствий повреждения ДНК в клетке существуют системы репарации, которые узнают и удаляют поврежденные звенья ДНК, сохраняя генетическую информацию [2]. Кроме того, неканонические нуклеотиды в геномной ДНК могут появляться в результате включения ДНК-полимеразами из пула моонуклеотидов, где они возникают при повреждении или присутствуют как метаболиты. Последнее особенно характерно для dUMP — основания Uга в норме в геномной ДНК отсутствуют, но могут появляться либо за счет дезаминирования оснований Сут, либо (с гораздо более высокой ча-

стотой) при включении dUMP из пула dUTP — метаболического предшественника dTTP [3, 4].

Для предотвращения ошибочного включения dUMP в ДНК клеточный пул dUTP строго контролируется 2'-дезоксиуридин-5'-трифосфатнуклеотидгидролазой (Dut; [КФ 3.6.1.23]), которая катализирует реакцию гидролиза dUTP до dUMP и пирофосфата [5, 6]. Отсутствие активности Dut приводит к дисбалансу внутриклеточного пула dUTP/dTTP, в результате чего в геномной ДНК накапливается dUMP. Удаление dUMP системами репарации приводит к образованию большого числа одонуклеотидных брешей и, во многих случаях, двухцепочечных разрывов, что приводит к гибели активно делящихся клеток [3, 4]. Штаммы *Escherichia coli* с дефицитом гена *dut* нежизнеспособны в отсутствие рекомбинации [7–9], а мыши с нокаутом *dut* (*dut*^{−/−}) погибают на ранней стадии эмбрионального развития [10]. В связи с

¹ Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

этим белок Dut в настоящее время рассматривается как перспективная фармакологическая мишень для антиметаболической терапии инфекций и злокачественных новообразований.

Анализ последовательностей и пространственных структур белков Dut показывает, что их можно разделить на два класса — гомотримерные, обнаруживаемые в большинстве живых организмов, и реже встречающиеся гомодимерные [5, 6]. Хорошо изученные ферменты Dut *E. coli* и человека относятся к белкам первого класса. Получение кристаллических структур Dut высокого разрешения, в том числе в комплексе с субстратом [11–18], позволило установить многие аспекты каталитического механизма этого фермента. Гидролиз субстрата инициируется нуклеофильной атакой по атому P^α dUTP молекулой воды, активированной консервативным остатком Asp активного центра фермента. Связывание субстрата в каталитически компетентной конформации достигается за счет взаимодействия трифосфатного фрагмента субстрата с ионом Mg²⁺, выступающим в роли кофермента, и микроокружением активного центра [15, 19, 20]. Формирование симметричного гомотримера критически важно для каталитической активности Dut, поскольку связывание субстрата происходит в межсубъединичной области, и каждый активный центр сформирован консервативными аминокислотными остатками всех трех субъединиц [21]. В последнее время разработка соединений, направленных на дестабилизацию белковых комплексов, представляет собой активно развивающуюся область фармакологической химии [22, 23], и малые молекулы, дестабилизирующие тример Dut, могли бы послужить основой для конструирования новых лекарственных средств.

Несмотря на то что механизм действия тримера Dut хорошо охарактеризован, само образование активного тримера изучено гораздо хуже. В настоящей работе с использованием метода высокоскоростной наномасштабной дифференциальной сканирующей флуориметрии (nanoDSF [24–26]) исследовано влияние различных физико-химических факторов на стабильность тримера Dut *E. coli*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В работе использовали штаммы *E. coli* BL21(DE3) Star (F[−] *ompT hsdS_B* (r_B[−]m_B[−]) *gal dcm lon rne131* λ_{DE3}) (“ThermoFisher Scientific”, США) и DH5α (F[−] *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17*(r_K[−]m_K⁺), λ[−]) (“New England Biolabs”, США), плазмиды pBlueScript II SK(−) (“Agilent Technologies”, США) и pET-23c(+) (“Merck”, Германия), рестриктазы BamHI, EcoRV,

FauNDI, ДНК-лигазу бактериофага T4 (все “Сибэнзим”, Россия), dUTP, dUMP, dAMP, dCMP, dGMP и dTMP (“Биосан”, Россия).

Клонирование гена *dut* *E. coli*. Последовательность гена *dut* *E. coli* была амплифицирована с одиночной колонии штамма DH5α с использованием праймеров 5'-TTTTTTTGATATCATATGAAAAAATCGACGTTAAGATTTC-3' и 5'-TTTTTTTGATATCGGATCCTGACGACCAGAGTGACCAAAG-3' и клонирована в вектор pBlueScript II SK(−) по сайту EcoRV. После подтверждения последовательности секвенированием по Сэнгеру фрагмент размером 456 п.н., содержащий ген *dut*, переклонировали в вектор pET-23c(+) по фланкирующим целевой ген сайтам NdeI (FauNDI) и BamHI. Полученная плазмида pET-23c-Dut кодирует белок Dut, несущий на C-конце пептид His₆, под промотором РНК-полимеразы бактериофага T7.

Выделение белка Dut. Клетки *E. coli* BL21(DE3) Star, трансформированные плазмидой pET-23c-Dut, выращивали при 37°C на среде LB в присутствии соответствующего антибиотика до оптической плотности OD₆₀₀ = 0.8. Экспрессию индуцировали добавлением изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида до концентрации 1 мМ. Клетки культивировали в течение 3 ч при 37°C, затем осаждали центрифугированием при 6000 g в течение 20 мин при 10°C. Дальнейшие процедуры проводили на льду или при 4°C. Биомассу ресуспендировали в 50 мМ Трис-НСl-буфере (рН 7.5), содержащем 500 мМ NaCl (буфер А). Клетки разрушали ультразвуком, суспензию центрифугировали при 14000 g в течение 30 мин при 4°C. Супернатант пропускали через фильтр с размером пор 0.45 мкм и наносили на сорбент IMAC SepFast (“BioToolomics”, Великобритания), насыщенный ионами Ni²⁺. Сорбент промывали буфером А и проводили элюцию градиентом 50–500 мМ имидазола в буфере А. Фракции, содержащие целевой белок, разбавляли 4 объемами буфера В (50 мМ Трис-НСl рН 7.5, 1 мМ дитиотреитол и 1 мМ EDTA) и наносили на сорбент Q-сефарозу (“Danaher”, США), уравновешенную буфером В с добавлением 100 мМ NaCl. Сорбент промывали буфером В и вели элюцию градиентом 100–1000 мМ NaCl в буфере В. Наиболее гомогенные фракции, содержащие целевой белок, объединяли, диализовали против буфера, содержащего 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 100 мМ NaCl, 50%-ный глицерин, хранили при −20°C. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop One (“ThermoFisher Scientific”). Выход целевого белка составил 17.4 мг с 1 л культуры.

Кинетика гидролиза dUTP. Реакционная смесь содержала 0.5 нМ Dut (по мономерной форме), 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 5 мМ MgCl₂ и 100 мМ NaCl, концентрацию dUTP варьировали в диапа-

зоне 0.5–100 мкМ. Реакцию вели при 37°C в течение 5 мин и останавливали прогреванием в течение 2 мин при 95°C. Продукты реакции анализировали методом высокоэффективной обращеннофазовой жидкостной хроматографии с использованием хроматографа Милихром А-02, оборудованного колонкой ProntoSIL-120-5-C18 (“Эконова”, Россия). Буфер для нанесения пробы содержал 50 мМ ацетат триэтиламмония, для элюции использовали 0–50%-ный градиент ацетонитрила при скорости подачи 150 мкл/мин и температуре 35°C. Поглощение измеряли на длине волны 260 нм. Хроматограммы анализировали в программе МультиХром-СПЕКТР путем измерения площади под пиками dUMP и dUTP. Скорости образования продукта описывали уравнением Михаэлиса–Ментен, параметры уравнения определяли из данных пяти независимых экспериментов нелинейной регрессией гиперболической функции в программе SigmaPlot v11.0 (SPSS, США).

Измерения методом высокоскоростной nanoDSF. Зависимость собственной флуоресценции белка от температуры измеряли при возбуждении на длине волны 280 нм и испускании на длинах волн 330 и 350 нм на установке Tycho (“Nanotemper Technologies”, Германия) в буфере, содержащем 25 мМ Na-фосфатный буфер (pH 7.5) и 1 или 5 мкМ Dut (по тримерной форме). Измерения производили в капилляре объемом 10 мкл при скорости нагрева 0.5°C/с. В качестве основного измеряемого параметра использовали соотношение флуоресценции на длинах волн 350 и 330 нм (F_{350}/F_{330}), которое не зависит от концентрации белка и чувствительно к окружению остатков Trp [27]. Влияние концентрации NaCl изучали в том же буфере, но с равномерно возрастающей концентрацией NaCl от 0 до 1 М с шагом 100 мМ и концентрацией Dut 5 мкМ. Влияние гидрофобных взаимодействий исследовали в том же буфере, дополнительно содержащем 100 мМ NaCl и этанол в концентрации 0–20%. Влияние молекулярного краудинга изучали аналогичным способом, при этом массовую долю полиэтиленгликоля со средней молекулярной массой 4000 Да (ПЭГ 4000) варьировали от 0 до 30%. Значение pH, оптимальное для тримеризации, подбирали, используя Na-фосфатный буфер с диапазоном pH 4.0–8.8 в присутствии 100 мМ NaCl. При изучении связывания dNMP с тримером Dut в смеси присутствовали 100 мМ NaCl и, при необходимости, 5 мМ $MgCl_2$; лиганды добавляли в концентрации 0–30 мМ (dUMP) или 10 мМ (прочие dNMP). Все данные получены по результатам двух–четырех независимых экспериментов. Параметры плавления рассчитывали с использованием программы MoltenProt [26] и собственного программного обеспечения прибора Tycho.

Структурный анализ. Межмолекулярные взаимодействия в тримере Dut анализировали с использованием программ PISA [28] и GETAREA [29]. Для визуализации структур использовали программу PyMol (“Schrödinger”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование гена dut и выделение рекомбинантного белка Dut E. coli

Ген *dut* амплифицировали из геномной ДНК *E. coli* и клонировали в вектор pET-23с для последующей продукции белка с С-концевым гексагистидиновым пептидом. Анализ структур тримера Dut в свободном виде и в комплексе с dUTP и его аналогами [11, 12, 14, 15, 17, 18] показывает, что пептид His₆ на С-конце мономера не будет мешать ассоциации субъединиц в тример и проявлению ферментативной активности. Индуцированный синтез Dut в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3) Star при 37°C проходил эффективно с высоким содержанием белка в растворимой фракции. После металлхелатной аффинной хроматографии и анионообменной хроматографии целевой белок молекулярной массой ~18 кДа (расчетная молекулярная масса мономера Dut 17.7 кДа) был более чем на 95% гомогенен (рис. 1а). Значения кинетических параметров реакции гидролиза dUTP, измеренных в условиях стационарной кинетики методом высокоэффективной обращеннофазовой жидкостной хроматографии (рис. 1б) составили $7.2 \pm 0.2 \text{ с}^{-1}$ для k_{cat} и $0.63 \pm 0.08 \text{ мкМ}$ для K_M , что близко к опубликованным данным [15, 19, 20] и свидетельствует об эффективной сборке Dut в каталитически активный тример.

Характеристика температурной денатурации белка Dut методом nanoDSF

Факторы, влияющие на стабильность тримера Dut, изучали с использованием метода nanoDSF, основанного на переходах интенсивности флуоресценции белка при повышении температуры [24–26]. Формально денатурация белка в режиме, характерном для высокоскоростной nanoDSF ($>10^\circ\text{C}/\text{мин}$), не является равновесной, но из-за очень малых объемов анализируемого образца процесс приближается к равновесному, что позволяет использовать температуру перехода между состояниями с разной флуоресценцией как величину, характеризующую плавление белковой глобулы. Флуоресценция белков обусловлена в основном флуоресценцией боковых радикалов остатков Trp, а ее изменение при плавлении — изменением окружения (в основном, полярности окружения) этих остатков [30]. Известные структуры тримера Dut демонстрируют уникальное расположение триптофанов: каждый мономер

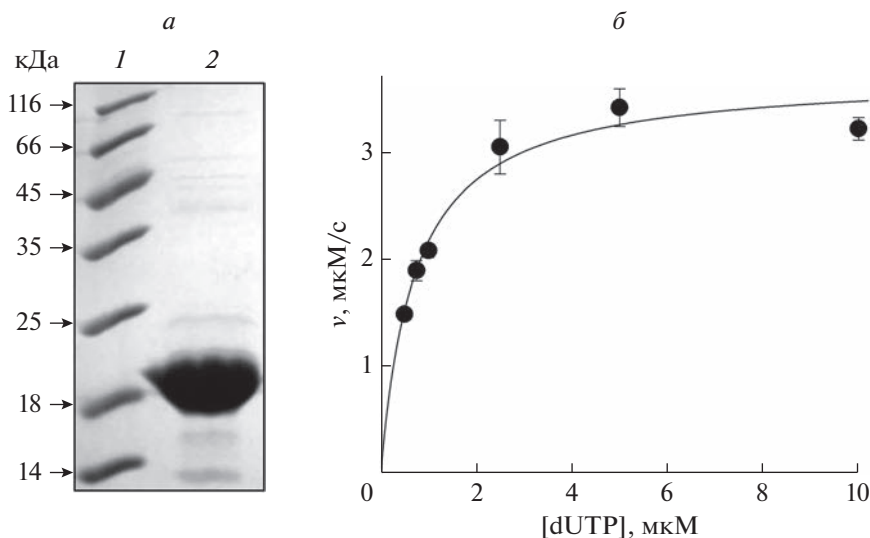


Рис. 1. Выделение и ферментативная активность Dut. *a* – Фотография геля, окрашенного кумасси голубым, после анализа препарата Dut (дорожка 2) электрофорезом в системе Лэмбли. 1 – Набор маркеров молекулярной массы. *б* – Зависимость скорости реакции гидролиза dUTP ферментом Dut от концентрации субстрата. Приведены средние значения и стандартная ошибка, вычисленные по пяти независимым экспериментам, кривая соответствует зависимости Михаэлиса–Ментен $v = k_{\text{cat}}[E]_0[S]/(K_M + [S])$.

Dut содержит всего один остаток Тгр, которые при сборке белка в тример располагаются в межсубъединичной полости, контактируя друг с другом (рис. 2*а*). Доступная растворителю поверхность каждого остатка составляет $12.9 \text{ \AA}^2$ (5.4% относительно усредненной доступности в трипептиде Gly-Tgr-Gly), что позволяет классифицировать Тгр в тримере Dut как внутренний. Таким образом, можно ожидать, что с повышением температуры интенсивность флуоресценции Тгр будет меняться при распаде тримера Dut, а затем при денатурации мономера.

На рис. 2*б* показаны кривые изменения флуоресценции белка Dut при плавлении. В отличие от мономерного белка – бычьего сывороточного альбумина (БСА; рис. 2*б*, врезка), у которого наблюдался единственный температурный переход при 62.1 С, на кривых плавления Dut присутствовали два перехода, первый из которых сопровождался повышением, а второй – снижением флуоресценции. Ввиду того, что мономер Dut содержит единственный остаток Тгр, весьма вероятно, что первый переход (и соответствующая ему температура плавления T_1) представляет собой диссоциацию субъединиц тримера Dut, в то время как второй переход (T_2) представляет собой плавление мономерных субъединиц. Альтернативные объяснения первого температурного перехода (например, общее изменение структуры внутренней части тримера без распада всего комплекса) маловероятны ввиду большого изменения флуоресценции, которое почти в 2 раза превосходит изменение при втором переходе или при плавлении

БСА. Температуры T_1 и T_2 , определенные в соответствии с равновесной моделью трех состояний и не предполагающей равновесия эмпирической моделью трех состояний [26], отличались незначительно ($T_1 = 62.5 \text{ С}$, $T_2 = 76.7 \text{ С}$ для равновесной модели, $T_1 = 61.2 \text{ С}$, $T_2 = 78.8 \text{ С}$ для эмпирической модели для кривой на рис. 2*б*). Далее использовали эмпирическую модель, поскольку она давала меньшее отклонение от экспериментальных данных. При использовании двух концентраций белка (1 и 5 мкМ) профили флуоресценции совпадали (рис. 2*б*), что указывает на стабильность тримера в этом концентрационном диапазоне в начальных условиях. Помимо точек температурных переходов, при анализе кривых плавления принимали во внимание значение максимума флуоресценции, который зависит от концентрации и удельной интенсивности флуоресценции промежуточного состояния (мономера Dut).

Тример Dut преимущественно стабилизируется гидрофобными взаимодействиями и водородными связями

Для изучения факторов, влияющих на стабильность тримера Dut, сначала определили зависимость вида кривых плавления от ионной силы раствора (рис. 3). Рост концентрации NaCl (0– $\pm 1000 \text{ мМ}$) сопровождался заметным повышением значения T_1 с (61.2 до 75.8 С). Наблюдалось также изменение T_2 , однако оно имело меньший масштаб (повышение с 79.7 до 84.4 С). Значения

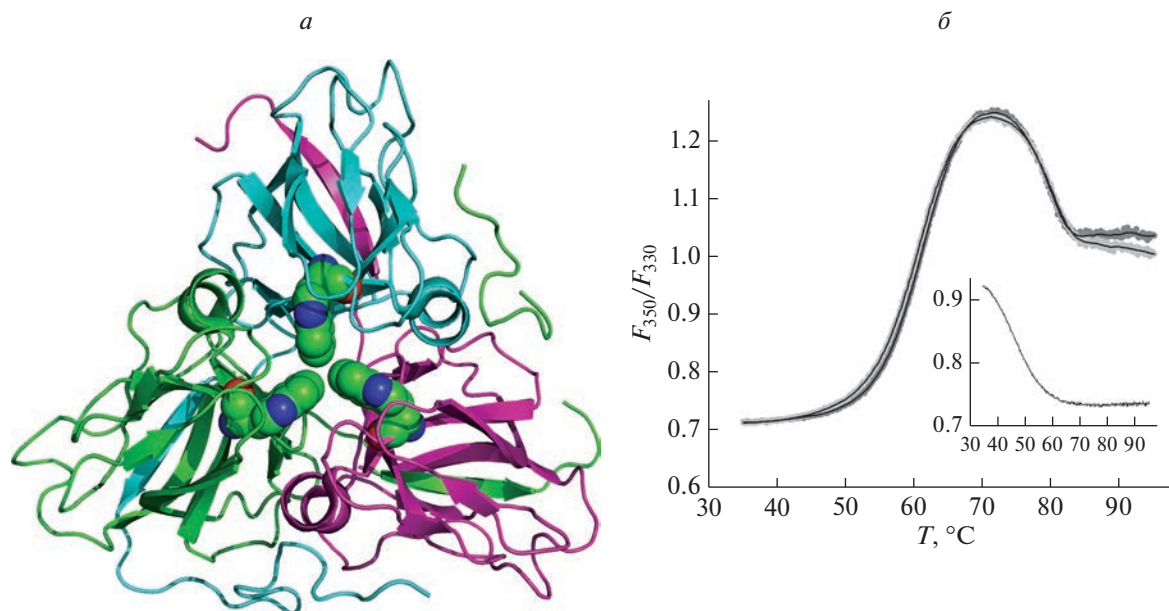


Рис. 2. *а* — Расположение остатков Тгр в структуре Dut (номер в базе данных Protein Data Bank 6HDE [18]). *б* — График зависимости интенсивности флуоресценции Dut от температуры при концентрациях белка по тримеру 1 мкМ (темно-серые точки) и 5 мкМ (светло-серые точки) в отсутствие NaCl. Точками обозначены результаты отдельных измерений, линиями — сглаженный профиль зависимости. На врезке изображен аналогичный график денатурации бычьего сывороточного альбумина в тех же условиях.

максимума флуоресценции при этом снижались практически симметрично с повышением T_1 (рис. 3б). Такая картина характерна для ситуации, при которой с ростом ионной силы относительная концентрация промежуточного состояния снижается из-за сближения T_1 и T_2 при незначительном изменении удельной интенсивности флуоресценции промежуточного состояния. Таким образом, возрастание ионной силы раствора ведет к стабилизации тримера Dut.

Совершенно иная картина наблюдалась при повышении гидрофобности раствора за счет увеличения концентрации в нем этанола. Влияние этанола на стабильность тримера Dut исследовали в диапазоне концентраций 0–20% (v/v), где отсутствует явное влияние на структуру и растворимость глобулярных белков [31]. При концентрации этанола 30% и выше в растворе Dut наблюдалось выпадение осадка. При повышении концентрации этанола наблюдалось выраженное снижение температуры диссоциации тримера — с 65.4 до 48.2°C (рис. 3в). При этом снижалось также значение максимума флуоресценции, что, очевидно, объясняется повышением гидрофобности окружения остатков Тгр в водно-органическом растворителе. На начальных участках кривых плавления ($T \leq 40^\circ\text{C}$) флуоресценция образцов с разным содержанием этанола не отличалась, что подтверждает низкую доступность остатков Тгр в составе тримера для растворителя. Эти данные свидетельствуют о значительном снижении

стабильности тримерной формы Dut при повышении концентрации этанола. В совокупности с повышением стабильности тримера при возрастании ионной силы это говорит о критической роли гидрофобных взаимодействий для ассоциации субъединиц Dut.

Вклад в стабилизацию тримера могут вносить также водородные связи, однако из-за того, что при сольватации поверхности они замещаются на связи с водой, в среднем каждая водородная связь на интерфейсах в белок-белковых комплексах вносит лишь около -0.5 ккал/моль [28]. Водородные связи, необходимые для межсубъединичного взаимодействия, могут появляться или исчезать при изменении состояния ионизации боковых радикалов аминокислотных остатков. Для установления pH-оптимума существования Dut в тримерном состоянии измеряли профили температурной диссоциации тримера Dut в диапазоне pH 4.0–8.8 (рис. 3г). Значения T_1 увеличивались с повышением pH и достигали стабильности при $\text{pH} \geq 6.4$. Дестабилизация тримера при снижении pH была сходной с дестабилизацией при увеличении гидрофобности среды. Как и в случае NaCl, значения максимальной флуоресценции изменялись практически симметрично с изменением T_1 , однако это изменение имело меньшую амплитуду. Таким образом, максимальная стабильность тримера Dut наблюдается при околофизиологических значениях pH. Наблюдаемое значение pH для перехода между менее стабильной и более

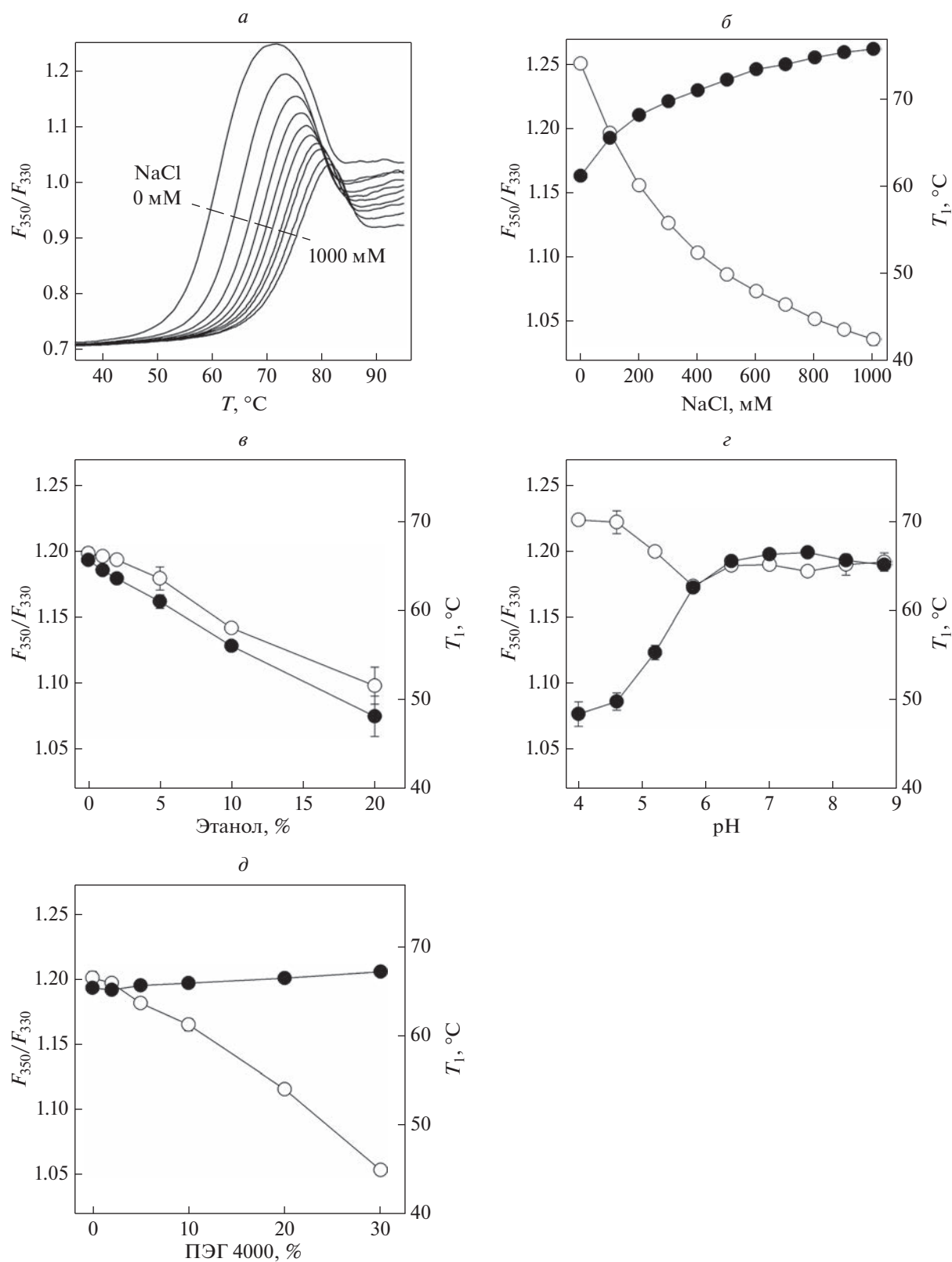


Рис. 3. Факторы, влияющие на стабильность тримера Dut. а – Кривые плавления Dut при различных концентрациях NaCl (0–1000 mM, шаг 100 mM). б–д – Графики зависимости температуры диссоциации тримера Dut (T_1 , черные кружки) и максимума флуоресценции (белые кружки) от концентрации NaCl (б), концентрации этанола (в), pH (г) и концентрации ПЭГ 4000 (д). Для удобства сравнения оси T_1 и F_{350}/F_{330} на графиках б–д имеют одинаковый масштаб. Приведены средние значения и стандартная ошибка, вычисленные по двум–четырем независимым экспериментам.

Таблица 1. Теоретически рассчитанные характеристики интерфейсов взаимодействия между субъединицами тримера Dut^a

Субъединицы, образующие интерфейс	Площадь, Å ²	ΔG° образования, ккал/моль ^b	Число водородных связей	Число солевых мостиков
A + B	2326.3	–27.8	37	6
B + C	2085.0	–22.3	41	5
A + C	1847.4	–27.0	27	3

^a Расчетные значения по структуре 6HDE [18], полученные в программе PISA [28].

^b Энергия сольватации без учета вклада водородных связей и ионных взаимодействий.

стабильной формой тримера составляет около 5.7, что ближе всего к значению pK_a бокового радикала His (~6.0). В структуре Dut остатки His76 и His94 образуют межсубъединичные водородные связи с остатками Ser100 и Asp137/Thr139, соответственно. Возможно, изменение состояния их ионизации влияет на стабильность тримера.

Расчеты на основе опубликованных структур подтверждают важную роль гидрофобных взаимодействий и водородных связей в стабилизации тримера Dut (табл. 1). Образование тримера сопровождается значительным выигрышем в предсказанной энергии сольватации/десольватации поверхности (-25.7 ± 3.0 ккал/моль на каждый из трех интерфейсов взаимодействия). Также на интерфейсах наблюдается значительное число водородных связей, энергетический вклад которых в стабилизацию тримера несколько уступает гидрофобным взаимодействиям (-17.5 ± 3.6 ккал/моль из расчета -0.5 ккал/моль/связь [28]). Число солевых мостиков на интерфейсах взаимодействия в тримере Dut невелико и с учетом того, что каждый из них в среднем вносит -0.3 ккал/моль, они лишь незначительно стабилизируют комплекс. Интересно, что гибкие “хвосты” каждой субъединицы в кристаллической структуре тримера демонстрируют определенную гетерогенность взаимодействия с соседними субъединицами, что проявляется в кажущейся неэквивалентности интерфейсов (табл. 1) и теоретически может вызывать вариабельность микроскопических констант взаимодействия каждого из трех активных центров с субстратом.

Живые клетки содержат высокие концентрации различных макромолекул, что зачастую приводит к усилению межмолекулярных взаимодействий за счет снижения объема, доступного молекулам белка (эффект молекулярного краудинга). Для анализа этого эффекта в молекулярно-биологических системах часто используют инертные неструктурированные высокомолекулярные соединения, например, полиэтиленгликоль. Добавление ПЭГ 4000 практически не влияло на стабильность тримера Dut, однако вызывало сниже-

ние максимума флуоресценции, сравнимое с эффектом этанола (рис. 3d). Возможно, это связано с меньшей доступностью воды для остатков Trp в мономере Dut в условиях молекулярного краудинга.

Стабильность тримера Dut в присутствии нуклеотидных лигандов

Сродство Dut к продукту реакции – dUMP, и к ряду других несубстратных нуклеотидных лигандов составляет порядка 0.2–10 мМ [17, 19]. Для определения влияния лигандов в нуклеотидсвязывающем центре на стабильность тримера Dut оценили температурную денатурацию Dut в присутствии 0.1–30 мМ dUMP (рис. 4a). В возрастающих концентрациях dUMP умеренно стабилизировал тример (T_1 повышалась с 66.2°C в отсутствие dUMP до 72.8°C в присутствии 30 мМ dUMP). Параллельно с этим снижался максимальный уровень флуоресценции. Поскольку в структуре Dut в нуклеотидсвязывающем центре находится также каталитический ион Mg^{2+} , сравнили плавление Dut в присутствии и в отсутствие $MgCl_2$, однако профили денатурации оказались практически идентичными (данные не приведены).

Сравнение влияния разных dNMP на стабильность тримера Dut при фиксированной концентрации (10 мМ) показало, что степень стабилизации убывает в порядке dUMP > dAMP > dTMP ~ dGMP ~ dCMP. При этом наибольшее влияние на максимальную флуоресценцию оказывали dTMP и dCMP, слабо стабилизирующие тример. Возможное взаимодействие лигандов нуклеотидной и другой природы с мономером Dut требует отдельного исследования. Общая флуоресценция образцов в присутствии лигандов снижалась в 4–5 раз, что, очевидно, связано с поглощением растворами нуклеотидов на длине волны 280 нм, использованной для возбуждения флуоресценции Dut.

Таким образом, нами показано, что метод высокоскоростной наномасштабной дифференциальной сканирующей флуориметрии можно успешно

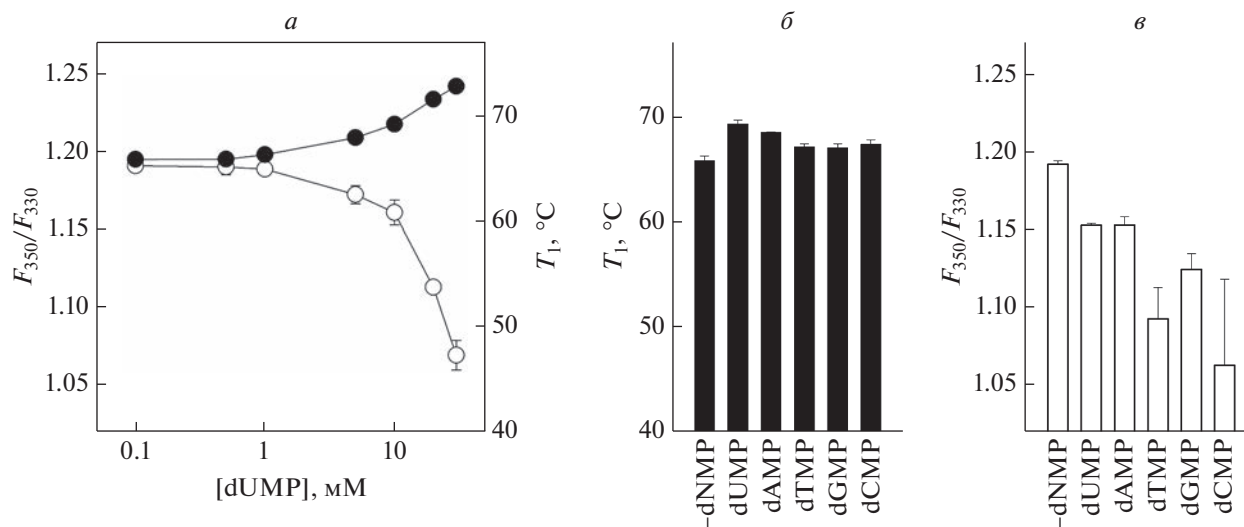


Рис. 4. Стабильность тримера Dut в присутствии нуклеотидных лигандов. *a* – Графики зависимости температуры диссоциации тримера Dut (T_1 , черные кружки) и максимума флуоресценции (белые кружки) от концентрации dUMP. *б, в* – Температура диссоциации тримера Dut (*б*) и максимум флуоресценции (*в*) в присутствии разных dNMP (10 mM). Оси T_1 и F_{350}/F_{330} имеют тот же масштаб, что и на рис. 3. Приведены средние значения и стандартная ошибка, определенные по трем–четырем независимым экспериментам.

применять для анализа стабильности каталитически активной тримерной формы белка Dut – жизненно важного фермента бактерий и эукариот. Основной вклад в стабилизацию тримера вносят гидрофобные взаимодействия и водородные связи. В настоящее время существует большой интерес к поиску низкомолекулярных соединений, разрушающих или стабилизирующих интерфейсы белок-белковых взаимодействий, как возможных фармакологических средств [22, 23]. Метод nanoDSF дает удобный инструмент для скрининга соединений на способность нарушать стабильность тримера Dut с целью поиска новых аниметаболитов для борьбы с бактериальными инфекциями.

Исследование поддержано Программой развития Томского государственного университета (Приоритет-2030). Структурный анализ выполнен при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение 075-15-2022-263). Секвенирование ДНК выполнено сотрудниками ЦКП “Геномика” СО РАН.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lindahl T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. **362**, 709–715.
- Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., Ellenberger T. (2006) DNA repair and mutagenesis. Washington, D.C.: ASM Press, 1118 pp.
- Berger S.H., Pittman D.L., Wyatt M.D. (2008) Uracil in DNA: consequences for carcinogenesis and chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 697–706.
- Kavli B., Slupphaug G., Krokan H.E. (2021) Genomic uracil in biology, immunity and cancer. In: *DNA Damage, DNA Repair and Disease*. Eds Dizdaroglu M., Lloyd R.S. London: Royal Soc. Chem., p. 220–248.
- Persson R., Cedergren-Zeppezauer E.S., Wilson K.S. (2001) Homotrimeric dUTPases: structural solutions for specific recognition and hydrolysis of dUTP. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2**, 287–300.
- Vértessy B.G., Tóth J. (2009) Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases. *Acc. Chem. Res.* **42**, 97–106.
- Kouzminova E.A., Kuzminov A. (2004) Chromosomal fragmentation in dUTPase-deficient mutants of *Escherichia coli* and its recombinational repair. *Mol. Microbiol.* **51**, 1279–1295.
- Kouzminova E.A., Kuzminov A. (2006) Fragmentation of replicating chromosomes triggered by uracil in DNA. *J. Mol. Biol.* **355**, 20–33.
- Ting H., Kouzminova E.A., Kuzminov A. (2008) Synthetic lethality with the *dut* defect in *Escherichia coli* reveals layers of DNA damage of increasing complexity due to uracil incorporation. *J. Bacteriol.* **190**, 5841–5854.
- Pálinkás H.L., Rácz G.A., Gál Z., Hoffmann O.I., Tihanyi G., Róna G., Gócsa E., Hiripi L., Vértessy B.G. (2019) CRISPR/Cas9-mediated knock-out of dUTPase in *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist.* **31**, 101–110.

- Pase in mice leads to early embryonic lethality. *Biomolecules*. **9**, 136.
11. Cedergren-Zeppezauer E.S., Larsson G., Nyman P.O., Dauter Z., Wilson K.S. (1992) Crystal structure of a dUTPase. *Nature*. **355**, 740–743.
 12. Larsson G., Svensson L.A., Nyman P.O. (1996) Crystal structure of the *Escherichia coli* dUTPase in complex with a substrate analogue (dUDP). *Nat. Struct. Biol.* **3**, 532–538.
 13. Mol C.D., Harris J.M., McIntosh E.M., Tainer J.A. (1996) Human dUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a β hairpin and active sites formed by three separate subunits. *Structure*. **4**, 1077–1092.
 14. González A., Larsson G., Persson R., Cedergren-Zeppezauer E. (2001) Atomic resolution structure of *Escherichia coli* dUTPase determined *ab initio*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**, 767–774.
 15. Barabás O., Pongrácz V., Kovári J., Wilmanns M., Vértessy B.G. (2004) Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase. *J. Biol. Chem.* **279**, 42907–42915.
 16. Varga B., Barabás O., Kovári J., Tóth J., Hunyadi-Gulyás É., Klement É., Medzihradsky K.F., Tölgyesi F., Fidy J., Vértessy B.G. (2007) Active site closure facilitates juxtaposition of reactant atoms for initiation of catalysis by human dUTPase. *FEBS Lett.* **581**, 4783–4788.
 17. Kovári J., Barabás O., Varga B., Békési A., Tölgyesi F., Fidy J., Nagy J., Vértessy B.G. (2008) Methylene substitution at the α – β bridging position within the phosphate chain of dUDP profoundly perturbs ligand accommodation into the dUTPase active site. *Proteins*. **71**, 308–319.
 18. Benedek A., Temesváry-Kis F., Khatanbaatar T., Levles I., Surányi É.V., Szabó J.E., Wunderlich L., Vértessy B.G. (2019) The role of a key amino acid position in species-specific proteinaceous dUTPase inhibition. *Biomolecules*. **9**, 221.
 19. Larsson G., Nyman P.O., Kvassman J.-O. (1996) Kinetic characterization of dUTPase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**, 24010–24016.
 20. Mustafi D., Bekesi A., Vértessy B.G., Makinen M.W. (2003) Catalytic and structural role of the metal ion in dUTP pyrophosphatase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **100**, 5670–5675.
 21. Fiser A., Vértessy B.G. (2000) Altered subunit communication in subfamilies of trimeric dUTPases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 534–542.
 22. Arkin M.R., Wells J.A. (2004) Small-molecule inhibitors of protein–protein interactions: Progressing towards the dream. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 301–317.
 23. Petta I., Lievens S., Libert C., Tavernier J., De Bosscher K. (2016) Modulation of protein–protein interactions for the development of novel therapeutics. *Mol. Ther.* **24**, 707–718.
 24. Senisterra G., Chau I., Vedadi M. (2012) Thermal denaturation assays in chemical biology. *Assay Drug Dev. Technol.* **10**, 128–136.
 25. Magnusson A.O., Szekrenyi A., Joosten H.-J., Finnigan J., Charnock S., Fessner W.-D. (2019) nanoDSF as screening tool for enzyme libraries and biotechnology development. *FEBS J.* **286**, 184–204.
 26. Kotov V., Mlynek G., Vesper O., Pletzer M., Wald J., Teixeira-Duarte C.M., Celia H., Garcia-Alai M., Nussberger S., Buchanan S.K., Morais-Cabral J.H., Loew C., Djinoic-Carugo K., Marlovits T.C. (2021) In-depth interrogation of protein thermal unfolding data with MoltenProt. *Protein Sci.* **30**, 201–217.
 27. Eftink M.R. (1994) The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophys. J.* **66**, 482–501.
 28. Krissinel E., Henrick K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797.
 29. Fraczekiewicz R., Braun W. (1998) Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules. *J. Comput. Chem.* **19**, 319–333.
 30. Vivian J.T., Callis P.R. (2001) Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys. J.* **80**, 2093–2109.
 31. Yoshikawa H., Hirano A., Arakawa T., Shiraki K. (2012) Effects of alcohol on the solubility and structure of native and disulfide-modified bovine serum albumin. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 1286–1291.

Factors Affecting the Stability of the Trimer of 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate Nucleotide Hydrolase from *Escherichia coli*

A. V. Yudkina^{1, 2}, E. A. Kovalenko³, A. V. Endutkin¹, E. P. Panferova¹, A. A. Kirilenko³,
A. A. Kokhanenko³, and D. O. Zharkov^{1, 2, *}

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

³*Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia*

*e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru

To prevent erroneous incorporation of dUMP into DNA from the dUTP metabolic pool, all living cells contain 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate nucleotide hydrolase (Dut), an enzyme that hydrolyzes dUTP to dUMP

and pyrophosphate. Dut is considered a promising pharmacological target for antimetabolite therapy. Enzymatically active Dut is a trimer that binds the substrate at the interface between the subunits. Here we use high-speed nanoscale differential scanning fluorimetry (nanoDSF) to study how various physicochemical factors affect the stability of the *E. coli* Dut trimer. Unlike for monomeric proteins, thermal denaturation of Dut occurred in two stages, the first of which corresponds to the dissociation of the trimer to monomeric subunits. Hydrophobic interactions and hydrogen bonds at the interfaces between subunits contributed most to trimer stabilization. The Dut trimer was partially stabilized upon binding of nucleotide ligands. In general, nanoDSF is a convenient assay for screening low molecular weight compounds for their ability to destabilize the active Dut trimer.

Keywords: dUTPase, protein–protein interactions, oligomerization, differential scanning fluorimetry

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.113.(7+4):547.327

НОВЫЕ ЦВИТТЕР-ИОННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ: ПОЛУЧЕНИЕ И КОМПЛЕМЕНТАРНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ

© 2023 г. Д. Э. Патрушев^{a, b, 1}, Е. А. Буракова^{a, b, 1}, С. Н. Бизяев^{a, b, c, 1},
А. А. Фокина^{a, b}, Д. А. Стеценко^{a, b, *}

^aФизический факультет Новосибирского государственного университета,
Новосибирск, 630090 Россия

^bИнститут цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

^cИнститут органической химии им. Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: stetsenkoda@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 31.07.2022 г.

После доработки 05.09.2022 г.

Принята к публикации 05.09.2022 г.

Описаны новые цвиттер-ионные производные олигонуклеотидов, содержащие 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-сульфонилфосфорамидную группу. Автоматизированный синтез этих соединений осуществлен по β -цианэтильной амидофосфитной схеме с использованием реакции Штаудингера между 2-трифторацетил-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-сульфонилизидом и фосфиттриэфиром в составе олигонуклеотида, привитого к полимерному носителю. 1,2,3,4-Тетрагидроизохинолин-7-сульфонилфосфорамидная группа (ТНІQ) оказалась устойчивой в условиях стандартного синтеза олигонуклеотидов, включая удаление защитных групп с отщеплением олигонуклеотида от полимерного носителя обработкой смесью концентрированных водных растворов аммиака и метиламина (1:1) при нагревании. Получены олигонуклеотиды, модифицированные от одной до пяти ТНІQ-групп в различных положениях. Цвиттер-ионный характер полученных производных отражался в различной подвижности в условиях денатурирующего электрофореза в ПААГ. Термическая устойчивость дуплексов олигодезоксинуклеотидов, содержащих ТНІQ-группы, с комплементарными ДНК и РНК слабо отличалась от устойчивости природных дуплексов ДНК:ДНК и ДНК:РНК. Полученные результаты позволяют предположить возможность использования олигонуклеотидов, модифицированных цвиттер-ионными ТНІQ-группами, в качестве антисмысловых терапевтических агентов.

Ключевые слова: цвиттер-ион, антисмысловые олигонуклеотиды, твердофазный синтез, реакция Штаудингера, сульфонилазиды

DOI: 10.31857/S0026898423020180, EDN: EEIRJW

ВВЕДЕНИЕ

Интерес к производным олигонуклеотидов как к терапевтическим агентам повышается с каждым годом [1–3]. Для этого есть несколько причин, а именно, олигонуклеотиды способны комплементарно связываться с нуклеиновыми кислотами, прежде всего с РНК живых клеток, и воздействовать на экспрессию генов, что, как правило, не могут лекарственные средства на основе малых молекул [4]. К настоящему времени получено множество производных олигонуклеотидов, применяемых в так называемой антисмыс-

ловой терапии [5, 6], которые, исходя из различий в механизме действия, можно разделить на две основные группы, а именно, на пространственные блокаторы функции РНК [7], в частности, корректоры сплайсинга [8], и на активаторы клеточных нуклеаз, в основном РНКазы Н [9]. Из числа последних наиболее широко используются олигонуклеотиды с модифицированной фосфатной группой, прежде всего тиофосфатные производные [10]. Популярность этих производных вызвана, с одной стороны, относительной простотой получения и повышенной устойчивостью к ферментативному расщеплению, а с другой — свойствами тиофосфатной группы (облегченное проникновение в клетки за счет связывания со специфическими рецепторами и эффективная

¹ Авторы, внесшие равный вклад в работу.

Сокращения: DMTr — 4,4'-диметокситритил; ТЕАА — ацетат триэтиламмония; ТНІQ — 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-сульфонилфосфорамидная группа.

транслокация в ядра клеток), а также улучшенной фармакокинетикой и фармакодинамикой тиофосфатных производных по сравнению с другими аналогами ДНК и РНК [11]. Эти благоприятные свойства обусловлены повышенной аффинностью тиофосфатных олигонуклеотидов к белкам [12]. Обратной стороной высокого сродства к белкам является повышенная токсичность данных производных [13]. Для снижения неспецифической токсичности и повышения селективности антисмыслового действия актуальной остается разработка новых аналогов фосфодиэфирной связи, лишенных недостатков тиофосфатной группы, но не потерявших ее достоинств. Примером может служить предложенная недавно мезилфосфорамидная группа [14, 15]. Взаимодействие тиофосфатных олигонуклеотидов с белками, как считается, обусловлено нековалентными ван-дер-ваальсовыми (гидрофобными) взаимодействиями [12, 16], хотя недавно была выдвинута оригинальная гипотеза о ведущей роли в улучшенном проникновении в клетки динамического образования несимметричных дисульфидных мостиков между тиофосфатными группами олигонуклеотида и остатками цистина в белках [17]. Особый интерес вызывают аналоги фосфатной группы, способные к взаимодействию с аминокислотными остатками в белках за счет как ионных (электростатических), так и гидрофобных взаимодействий. К их числу можно отнести цвиттер-ионные группировки, несущие как отрицательный, так и положительный заряд. Известно большое число катионных модификаций межнуклеотидной группы и гетероциклических оснований или углеводного остатка в олигонуклеотидах [18, 19]. В ряде производных природные фосфодиэфиры сочетаются с модифицированными фосфатами, несущими положительно заряженные группы [20]. Показано возрастание устойчивости некоторых цвиттер-ионных олигонуклеотидов к ферментативному гидролизу [21], повышение сродства к ДНК [22] и улучшение проникновения в клетки [20]. Можно предположить, что аналоги олигонуклеотидов, сочетающие цвиттер-ион с гидрофобной группой, будут способны взаимодействовать с более широким спектром аминокислотных остатков в составе белков: не только катионных (Lys, Arg, His), но и анионных (Asp и Glu) и неполярных (Trp, Phe, Leu, Ile, Val).

Этим условиям отвечает 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-сульфонилфосфорамидная группа (ТНІQ), сочетающая вторичную алифатическую аминогруппу с рК_а около 10 в насыщенном цикле с бензольным кольцом при сульфонилфосфорамидной связи, отрицательно заряженной при физиологических значениях рН [14, 23].

Известно, что химическая модификация часто снижает способность олигонуклеотида к компле-

ментарному связыванию [24]. Поэтому представляет интерес замещение по крайней мере части фосфодиэфирных связей в олигонуклеотиде цвиттер-ионными группами с целью повышения прочности образующегося комплементарного комплекса за счет компенсации электростатического отталкивания между цепями [22]. Ранее мы предложили использовать для стабилизации G-квадруплексов путем уменьшения электростатического отталкивания незаряженные фосфорилгуанидиновые группы [25] и цвиттер-ионные алифатические сульфонилфосфорамидные группы, содержащие в боковой цепи остаток четвертичного аммония [26]. В дальнейшем Су и соавт. показали, что эта цвиттер-ионная группировка повышает устойчивость комплементарного дуплекса с ДНК и РНК, и триплекса с ДНК [27]. В то же время выявлено преимущество ароматической тозилфосфорамидной группы [23] в реальном биологическом приложении [28].

В данной работе мы синтезировали новые олигодезоксинуклеотиды, содержащие в одном или нескольких межнуклеотидных положениях цвиттер-ионные ТНІQ-группы и провели эксперименты по термической денатурации дуплексов олигонуклеотидов, модифицированных ТНІQ, с комплементарными ДНК и РНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез олигонуклеотидов проводили с помощью автоматического синтезатора ДНК/РНК ASM-800 производства ООО “Биоссет” (Новосибирск, Россия) согласно доработанному протоколу твердофазного амидофосфитного синтеза в стандартных реакторах объемом 12–50 мкл в масштабе 0.1–0.4 мкмоль из соответствующих дезоксирибонуклеозид-3'-β-цианэтил-*N,N*-диизопропиламидофосфитов и полимерных носителей на основе пористого стекла с размером пор 500 Å с привитыми дезоксирибонуклеозидами от компании “Sigma Aldrich” (США). В качестве защитных групп для экзоциклических аминогрупп азотистых оснований использовали: А – бензоил, С – ацетил, и G – изобутирил. 4,4'-Диметокситритильную (DMTr) группу с 5'-конца нуклеозида, иммобилизованного на полимере, удаляли обработкой 3%-ной дихлоруксусной кислотой в хлористом метиле. Конденсацию амидофосфитов проводили в присутствии активатора 5-этилтио-1*H*-тетразола (0.25 М раствор в ацетонитриле). Для кепирования непрореагировавших 5'-гидроксильных групп использовали стандартные растворы Cap A и Cap B. Для введения 2-трифторацетил-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-сульфамидной группы по межнуклеотидному фосфату вместо окисления иодом использовали реакцию Штаудингера с 2-трифторацетил-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-сульфонилазидом (0.2 М раствор

в ацетонитриле) в течение 30 мин [17, 21]. Соответствующий сульфонилазид получен из коммерческого сульфонилхлорида компании “Alfa Aesar” (США) и азид натрия в ацетонитриле.

Олигонуклеотиды синтезировали в режиме без сохранения 5'-DMTr-группы и отщепляли от полимера обработкой реагентом АМА (смесь (1 : 1) 28% водного аммиака и 40% водного метиламина) при 55°C в течение 15 мин. Также одновременно удаляли трифторацетильную группу с атома азота тетрагидроизохинолинового кольца, β-цианэтильные защитные группы с фосфатов и ацильные защитные группы с азотистых оснований А, С и G. При этом избегали побочной реакции, связанной с присоединением акрилонитрила к вторичной аминогруппе изохинолинового кольца, которая имеет место при использовании только аммиака. После удаления летучих компонентов с помощью вакуум-концентратора Concentrator Plus (“Eppendorf”, Германия) олигонуклеотиды растворяли в 50%-ном ацетонитриле и осаждали, добавляя 10-кратный объем 30%-го перхлората лития в ацетоне с выдерживанием при –20°C в течение 15 мин. Осадок отделяли центрифугированием, промывали 2 раза ацетоном и высушивали в течение 10 мин на воздухе при комнатной температуре. Далее олигонуклеотиды растворяли в 50%-ном ацетонитриле и определяли концентрацию по оптической плотности раствора при $\lambda = 260$ нм с помощью УФ-спектрофотометра NanoPhotometer N80Touch (“Implen”, Германия).

Аналитическую обращенно-фазовую (ОФ) ВЭЖХ проводили на приборе Милихром А-02 ООО “Эко-нова” (Новосибирск, Россия) на колонке Pronto-sil C18 5 мкм 2 × 75 мм в градиенте элюента Б (ацетонитрил : вода = 1 : 1) в 20 мМ ацетате триэтиламмония, рН 7.0 (элюент А) от 0 до 50% за 30 мин, скорость потока 0.1 мл/мин.

Аналитический электрофорез проводили в 20%-ном ПААГ толщиной 0.4 мм в следующих условиях: акриламид – *N,N*-метилен-бисакриламид (30 : 1), 8 М мочевины, 90 мМ Трис-борат, рН 8.3, 2 мМ Na₂EDTA. Олигонуклеотиды наносили в растворе, содержащем 8 М мочевины, 0.05%-ный ксиленианол FF и 0.05%-ный бромфеноловый синий. Полосы визуализировали, окрашивая гель раствором 500 мг/л красителя Stains-All (“Sigma Aldrich”) в формамиде с последующей отмывкой дистиллированной водой. Гели фотографировали на приборе ChemiDoc MP (“Bio-Rad”, США).

Олигонуклеотиды выделяли с помощью электрофореза в 20%-ном денатурирующем ПААГ толщиной 1.2 мм в аналогичных условиях с последующей элюцией 0.3 М перхлоратом натрия и обессоливанием путем гель-фильтрации на колонке NAP-25 с сорбентом Sephadex G-25

(“GE Healthcare”, Великобритания) в виде натриевой соли и лиофилизировали на лиофильной сушилке “Labconco” (США).

Молекулярные массы олигонуклеотидов определяли с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF на приборе Ultraflex III TOF/TOF (“Bruker Daltonics”, Германия). Масс-спектры олигонуклеотидов получали в линейном режиме отрицательных ионов прибора в диапазоне m/z от 500 до 16000. Да при частоте импульсов 25 Гц, ускоряющим напряжением 25.0 кВ и времени задержки экстракции ионов 120 нс. Образцы олигонуклеотидов растворяли до концентрации 0.1 мМ в водном буфере, содержащем 20 мМ ТЕАА и 60% ацетонитрила. Объем анализируемого образца составлял 10 мкл. Отобранную пробу (0.7 мкл) смешивали на подложке (Ground Steel или AnchorChip) с 0.7 мкл раствора матрицы, приготовленного согласно базовому протоколу производителя. Матрицей для ионизации служил 2,6-дигидроксиацетофенон (2,6-DHAP) с добавлением дигидроцитрата аммония. Итоговый масс-спектр получали суммированием 8–20 одиночных спектров по 100 импульсов лазера на точку. Калибровку прибора проводили с использованием калибровочных стандартов компании “Bruker”, а также набора олигонуклеотидов с известными массами. Молекулярные массы олигонуклеотидов рассчитывали, используя наборы экспериментальных значений m/z , определенные для каждого анализируемого образца.

¹H и ¹³C ЯМР-спектры 2-трифторацетил-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-сульфонилазида записывали в Институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН на приборах AV-400 и DRX-500 (“Bruker”).

Температуры плавления дуплексов олигонуклеотидов, содержащих TНIQ-группы, с комплементарными ДНК и РНК измеряли на спектрофотометре UV-1900i (“Shimadzu”, Япония) в буфере следующего состава: 10 мМ какодилат натрия, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, рН 7. Концентрация олигонуклеотида и матрицы – по 5 мкМ.

Синтез 2-трифторацетил-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-сульфонилазида. К 0.975 г (4.5 ммоль) 2-трифторацетил-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-сульфонилхлорида (“Alfa Aesar”) и 0.27 г азид натрия в стеклянной колбе (50 мл) добавляли 12 мл сухого ацетонитрила и оставляли при перемешивании на магнитной мешалке на 24 ч. Осадок хлорида натрия отфильтровывали, растворитель удаляли в вакууме и кристаллизовали продукт из бензола. Выход азид в виде бесцветных кристаллов 0.9 г (90%). ¹H ЯМР, 300 МГц (δ, м.д., CD₃CN): 1.92 (p, *J* = 2.4 Гц, CHD₂CN), 3.05 (t, 2H, *J* = 5.9 Гц, H4), 3.84 (t, 2H, *J* = 5.9 Гц, H3), 4.83 (s, 2H, H1), 7.48 (dd, 1H, *J*_{1,2} = 8.1; 2.6 Гц, H6), 7.79 (m, 1H, H5), 7.86 (s, 1H, *W*_{1/2} = 5 Гц, H8).

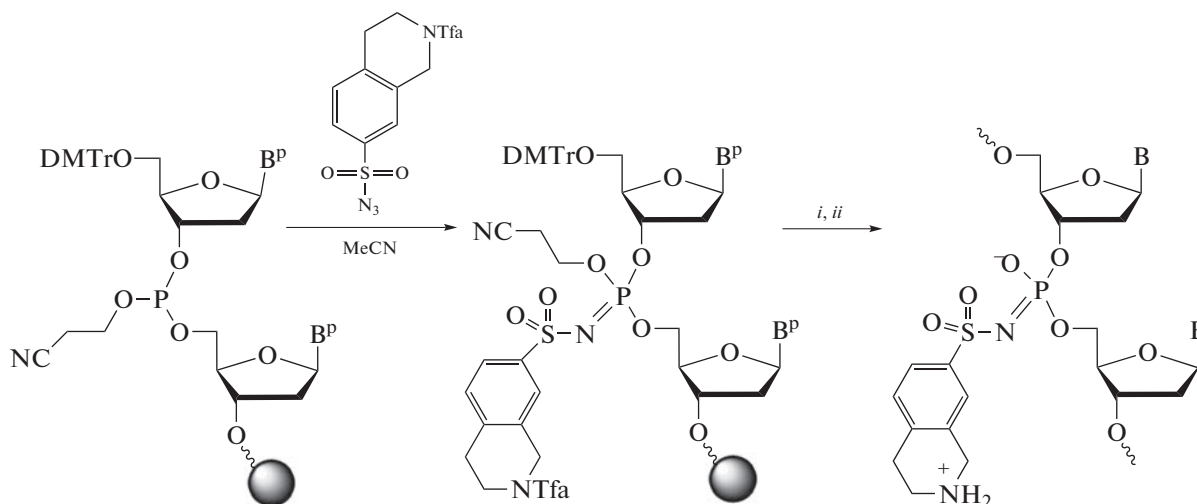


Рис. 1. Синтез олигонуклеотидов с 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-сульфонилфосфорамидной группой (THIQ) по реакции Штаудингера. Обозначения: *i* – завершение синтеза ДНК; *ii* – конц. водн. (~28%) NH_3 – конц. водн. (~40%) MeNH_2 (1:1), 55°C, 15 мин. B^P/B – защищенные (P) или незащищенные азотистые основания А(бензоил), С(ацетил) или G(изобутирил); Tfa – трифторацетил.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использование амидофосфитной схемы твердофазного синтеза обеспечивает, как правило, эффективное получение олигонуклеотидов с модифицированными фосфатными группами [29]. Для модификации фосфата требуется замена обычного окисления P(III) в P(V) иной реакцией, например, реакцией тионирования (сульфуризации) для получения тиофосфатной группы [30]. Мы показали, что реакция Штаудингера между остатком β -цианэтилфосфита в составе олигонуклеотида, привитого к полимерному носителю, и различными органическими азидами, в том числе сульфониазидами, является удобным способом введения различных аналогов фосфатной группы по межнуклеотидному положению [31–35]. Использование сульфониазидов, которые легко получают из азида натрия и соответствующих сульфонилхлоридов (более 250 из которых коммерчески доступны), позволяет получить широкий спектр сульфонилфосфорамидных производных олигонуклеотидов [14, 23, 27, 34, 35]. Впервые олигодезоксинуклеотиды с ароматической сульфонилфосфорамидной группой, а именно, 4-ацетиламинобензолсульфонилфосфорамидной, были получены Dieter Heindl и соавт. в середине 2000-х [36, 37]; тогда же кратко, без приведения каких-нибудь деталей, отмечено незначительное влияние данной группы на устойчивость комплементарного дуплекса с ДНК. В наших работах приведены новые примеры олигонуклеотидов с сульфонилфосфорамидными группами: тозилфосфорамидной [23], мезилфосфорамидной [14] и другими [26, 34, 35], и показано, что введение данных групп относительно слабо отражается на устойчивости комплементарного комплекса с

ДНК и, в меньшей степени, с РНК, что в дальнейшем подтверждено другими группами [27, 38]. Также показан анионный характер сульфонилфосфорамидной группы при физиологическом значении pH около 7, что делает данную группу близким аналогом фосфата. Наиболее изученными из полученных производных оказались мезилфосфорамидные олигонуклеотиды (μ), которые показали себя эффективными антисмысловыми [15, 39–42] и иммуномодулирующими агентами [43]. В то же время олигонуклеотиды, полностью замещенные по всем межнуклеотидным положениям мезилфосфорамидными группами, подобно малым интерферирующим РНК, для наиболее полного проявления своего терапевтического потенциала, по-видимому, нуждаются в дополнительных трансфекционных агентах, таких как катионные липосомы [39, 41]. Это свидетельствует в пользу того, что мезилфосфорамидная группа слабее взаимодействует с белками, чем тиофосфатная. Поэтому поиск новых сульфонилфосфорамидных производных, способных преодолеть это ограничение, сохраняет свою актуальность [34, 35, 40].

В данной работе мы впервые синтезировали олигонуклеотиды, содержащие 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-сульфонилфосфорамидную группу (THIQ, или θ), цвиттер-ионный характер которой обусловлен присутствием вторичной аминогруппы в насыщенном кольце, которая имеет pK_a около 10 и поэтому должна быть протонирована при физиологических значениях pH (рис. 1), и исследовали влияние данной группы на устойчивость комплементарных комплексов, формируемых модифицированными олигонуклеотидами.

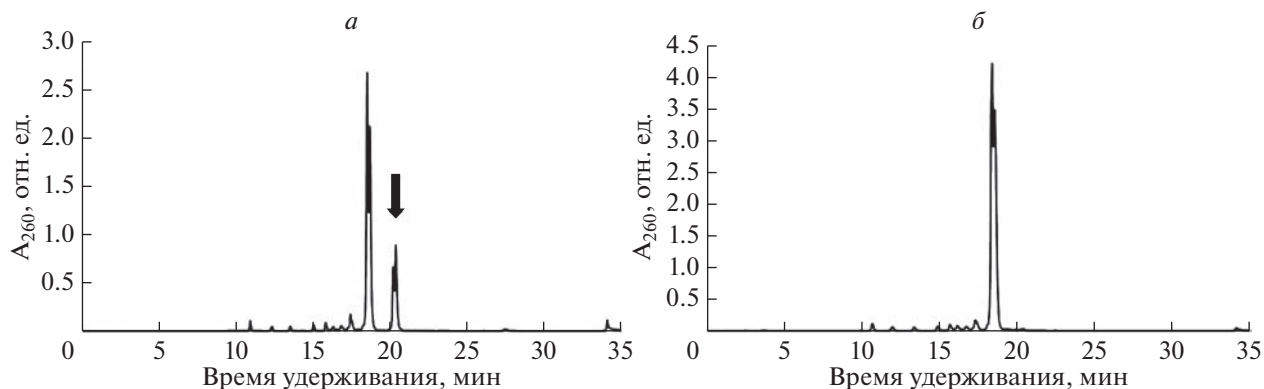


Рис. 2. Профили элюции оф-ВЭЖХ олигонуклеотида 5'-d(TTTTTT) в зависимости от способа деблокирования. *a* – При обработке конц. водн. (~28%) аммиаком, 55°C, 1 ч. *б* – При обработке смесью конц. водн. (~28%) аммиака и конц. водн. (~40%) метиламина (1:1 об.). Стрелкой указан побочный продукт присоединения акрилонитрила по вторичной аминогруппе кольца.

Необходимый сульфонилазид, легко получаемый реакцией 2-трифторацетил-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-сульфонилхлорида с азидом натрия, представляет собой кристаллическое вещество, хорошо растворимое в ацетонитриле. Полученный раствор стабилен при хранении при комнатной температуре в автоматическом синтезаторе ДНК и активно вступает в реакцию Штаудингера в процессе олигонуклеотидного синтеза (рис. 1). Отработка условий синтеза олигонуклеотидов на гексатимидилатной модели выявила побочную реакцию при отщеплении от полимера и деблокировании олигонуклеотида при помощи аммиака. В случае монозамещения с 3'-конца на хроматограмме присутствовал пик побочного продукта с большим временем удерживания в виде пары диастереомеров, аналогично основному продукту (рис. 2*a*). Примеси была приписана формула β -цианэтильного аддукта, образующегося в результате присоединения по Михаэлю акрилонитрила, полученного при β -элиминировании защитной 2-цианэтильной группы с фосфата, к вторичной аминогруппе кольца. Побочная реакция минимизирована заменой аммиака на реагент АМА: смесь концентрированного водного аммиака и концентрированного (40%) водного метиламина (1 : 1). По-видимому, повышенной нуклеофильности метиламина по сравнению с аммиаком вполне достаточно, чтобы эффективно улавливать акрилонитрил, образующийся при деблокировании, не затрагивая вторичную аминогруппу. Получив удовлетворительный результат с одной модификацией (рис. 2*б*), мы перешли к синтезу мультизамещенных олигонуклеотидов.

Показано (рис. 3), что ТНІQ-группа имеет достаточно гидрофобный характер, чтобы служить “якорем” для обращенно-фазовой хроматографии. Времена удерживания олигонуклеотидов, содержащих 1, 2, 3, 4 и 5 ТНІQ-групп, существен-

но различаются. Также различаются времена удерживания соответствующих диастереомеров (2ⁿ, где *n* – число модификаций фосфатной группы): одна ТНІQ-группа – два пика диастереомеров (профиль 1), две ТНІQ-группы – четыре пика диастереомеров (профиль 2) и т.д. (рис. 3).

Далее были синтезированы набор из шести модифицированных олигонуклеотидов на основе единой последовательности 5'-d(CTC CCA GGC TCA AAT) с ТНІQ-группами в различных положениях. Аналитическая оф-ВЭЖХ в случае протяженных олигонуклеотидов, как правило, выявляет один основной пик (рис. 4) без выраженного разделения диастереомеров, как у коротких последовательностей (рис. 3).

Аналитический электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях показал удовлетворительную чистоту полученных олигонуклеотидов, сравнимую с чистотой контрольных олигонуклеотидов (рис. 5), что говорит о достаточно высокой конверсии реакции Штаудингера. Присутствие возрастающего числа ТНІQ-групп инкрементально снижает подвижность олигонуклеотидов в геле ввиду цвиттер-ионной природы данной модификации из-за компенсации заряда от одного до, в пределе, пяти (рис. 5*a*, дорожки 6–10), тогда как подвижность монозамещенных олигонуклеотидов слабо зависит от положения цвиттер-ионной группы (дорожки 5 и 6). Это свидетельствует в пользу того, что вторичная аминогруппа в кольце остается протонированной в Трис-боратном буфере с рН 8.3, что компенсирует отрицательный заряд сульфонилфосфорамидной группы (рис. 1). В то же время, даже олигонуклеотид с ТНІQ-группами во всех межнуклеотидных положениях сохраняет подвижность в геле, что говорит о ненулевом суммарном заряде (рис. 5*a*, дорожка 10). При этом, в отличие от электронейтральной фосфорилгуанидиновой модификации [44], олигонуклеотиды

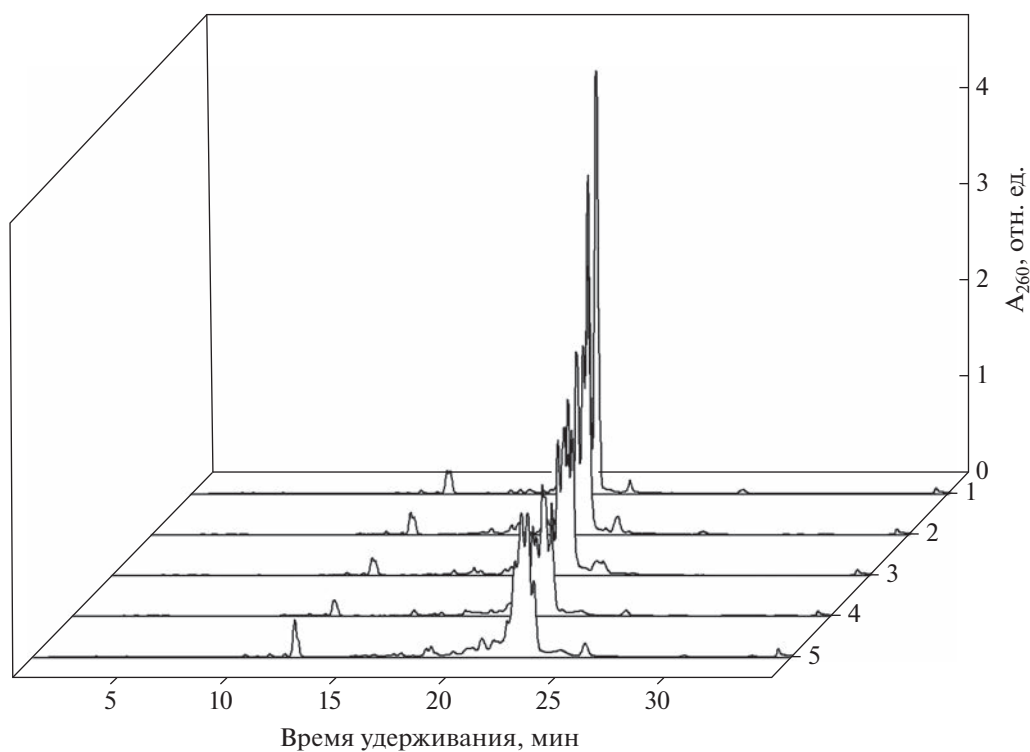


Рис. 3. Профили элюции оф-ВЭЖХ олиготимидилатов, полизамещенных ТНІQ-группами: (1) 5'-Т^θТТ ТТТ; (2) 5'-Т^θТ^θТ ТТТ; (3) 5'-Т^θТ^θТ^θ ТТТ; (4) 5'-Т^θТ^θТ^θ Т^θТТ; и (5) 5'-Т^θТ^θТ^θ Т^θТ^θТ; θ – 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-сульфонильная группа (ТНІQ).

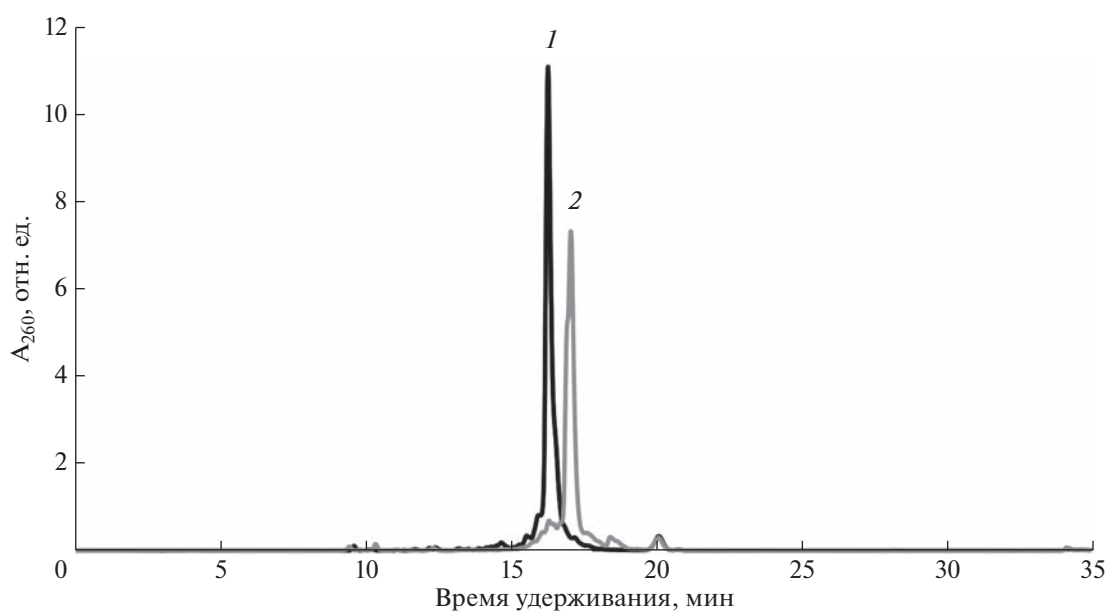


Рис. 4. Профиль элюции оф-ВЭЖХ модифицированных 15-звенных олигонуклеотидов: (1) 5'-d(СТС ССА GG^θС ТСА ААТ); и (2) 5'-d(С^θТС ССА GGC ТСА АА^θТ).

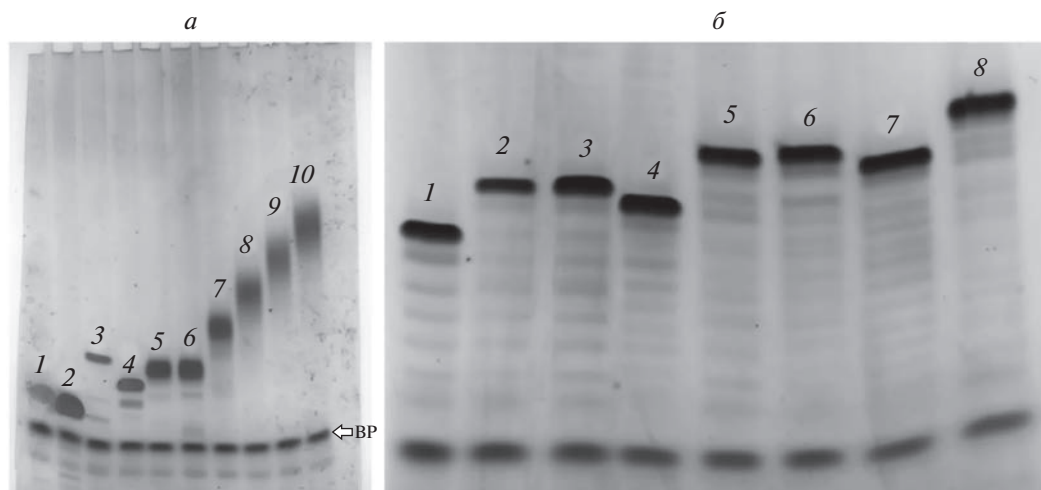


Рис. 5. Аналитический электрофорез в денатурирующем ПААГ ТНІQ-модифицированных олигонуклеотидов. *a* – Олиготимидилаты с 1–5 модификациями: контроль dT₅ (1); контроль dT₆ (2); контрольные олигонуклеотиды другой структуры с одной цвиттер-ионной группой различной основности (3 и 4); 5'-d(TTTT^θT), формальный заряд –5 (5); 5'-d(T^θTT TTT), формальный заряд –4 (6); 5'-d(T^θT^θT TTT), формальный заряд –3 (7); 5'-d(T^θT^θT^θT TTT), формальный заряд –2 (8); 5'-d(T^θT^θT^θT^θT TTT), формальный заряд –1 (9); 5'-d(T^θT^θT^θT^θT^θT TTT), формальный заряд 0 (10). *б* – 15-звенные олигонуклеотиды: 5'-d(CTC CCA GGC TCA AAT) (немодифицированный контроль) (1); 5'-d(CTC CCA GGC TCA AA^θT) (0.05 о.е.) (2); 5'-d(CTC CCA GGC TCA AA^θT) (0.1 о.е.) (3); 5'-d(CTC CCA GG^θC TCA AAT) (4); 5'-d(CTC CCA GGC TCA A^θT) (5); 5'-d(C^θTC CCA GGC TCA AA^θT) (6); 5'-d(CTC CCA GG^θC TCA AA^θT) (7); 5'-d(CTC CCA GGC TCA A^θT) (8). θ – ТНІQ-группа; BP – бромфеноловый синий. Окрашивание Stains-All.

даже с несколькими ТНІQ-группами способны эффективно окрашиваться красителем Stains-All. Следует указать на размывание полос в геле с накоплением ТНІQ-групп в последовательности, связанное, возможно, с присутствием нескольких ионных форм с различным суммарным зарядом.

Вклад ТНІQ-групп в подвижность 15-звенных олигонуклеотидов с 1–3 цвиттер-ионными пропорционально менее выражен, чем у гексатимидилатов, но также инкрементален (рис. 5б, дорожки 2–8) и зависит от положения модификаций в последовательности (см. например, дорожки 3–4 и 5–7). Кроме того, большая длина олигонуклеотидов и, соответственно, больший

суммарный отрицательный заряд балансируют “размывающий” эффект ТНІQ-групп, что позволяет полосам в геле оставаться четкими. Поэтому именно гель-электрофорез использовали для выделения гомогенных θ-олигонуклеотидов, включающих все четыре природных азотистых основания А, С, G и Т.

Влияние числа и положения ТНІQ-групп на термическую стабильность дуплексов, образуемых модифицированными олигонуклеотидами с комплементарными ДНК и РНК, определяли, используя последовательности на основе 15-звенного олигонуклеотида 5'-d(CTC CCA GGC TCA AAT) (табл. 1). Обнаружен в целом незначительный эф-

Таблица 1. Термическая стабильность дуплексов олигонуклеотидов, модифицированных 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-сульфонилфосфорамидными группами (ТНІQ) с комплементарными ДНК и РНК

Последовательность олигонуклеотида, 5'→3'	T_M , °C	ΔT_M , °C	ΔT_M мод. ⁻¹ , °C
d(CTC CCA GGC TCA AAT)	60.0	—	—
d(CTC CCA GGC TCA AA ^θ T)	60.0	—	—
d(CTC CCA GG ^θ C TCA AAT)	60.1	+0.1	+0.1
d(CTC CCA GG ^θ C TCA AA ^θ T)	60.6	+0.6	+0.3
d(CTC CCA GGC TCA AAT)	64.4	—	—
d(CTC CCA GGC TCA AA ^θ T)	63.7	–0.7	–0.7
d(CTC CCA GG ^θ C TCA AAT)	63.8	–0.6	–0.6
d(CTC CCA GG ^θ C TCA AA ^θ T)	64.2	–0.2	–0.1

Условия: 10 mM какодилат натрия, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4, концентрации олигонуклеотида и матрицы 5 мкМ; θ – ТНІQ-группа.

эффект цвиттер-ионных модификаций на температуру плавления дуплексов: слабо положительный в случае ДНК и незначительно дестабилизирующий в случае РНК. Можно заключить, что негативное влияние объемной и относительно “жесткой” бициклической модификации ТНІQ-группы может быть отчасти компенсировано позитивным вкладом цвиттер-иона, что приводит к значениям T_m , близким к полученным в случае наименее стерически объемной мезилфосфорамидной группы, имеющей чисто анионный характер [14].

В заключение, при помощи разработанной ранее методики автоматизированного твердофазного синтеза по β -цианэтильной амидофосфитной схеме с использованием реакции Штаудингера с 2-трифторацетил-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-7-сульфонилазидом были получены и охарактеризованы новые производные олигонуклеотидов, содержащие цвиттер-ионную ТНІQ, или θ , группу, и выявлено незначительное влияние данной группы на термическую устойчивость дуплексов, образуемых модифицированными олигонуклеотидами с комплементарными ДНК и РНК, что позволяет рассматривать данные производные в качестве перспективных кандидатов для дальнейшего изучения как потенциальных антисмысловых терапевтических агентов.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 22-13-00212) и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (проект Новосибирского государственного университета FSUS-2020-0035).

Опыты с участием животных или человека не проводились.

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Curreri A., Sankholkar D., Mitragotri S., Zhao Z. (2022) RNA therapeutics in the clinic. *Bioeng. Transl. Med.* e10374.
2. Halloy F., Biscans A., Bujold K.E., Debacker A., Hill A.C., Lacroix A., Luige O., Strömberg R., Sundstrom L., Vogel J., Ghidini A. (2021) Innovative developments and emerging technologies in RNA therapeutics. *RNA Biol.* **19**, 313–332.
3. Zhou L.Y., Qin Z., Zhu Y.H., He Z.Y., Xu T. (2019) Current RNA-based therapeutics in clinical trials. *Curr. Gene Ther.* **19**, 172–196.
4. Quemener A.M., Centomo M.L., Sax S.L., Panella R. (2022) Small drugs, huge impact: the extraordinary impact of antisense oligonucleotides in research and drug development. *Molecules.* **27**, 536.
5. Crooke S.T., Liang X.H., Baker B.F., Crooke R.M. (2021) Antisense technology: a review. *J. Biol. Chem.* **296**, 100416.
6. Crooke S.T., Baker B.F., Crooke R.M., Liang X.H. (2021) Antisense technology: an overview and prospectus. *Nat. Rev. Drug Discov.* **20**, 427–453.
7. Arzumanov A., Walsh A.P., Rajwanshi V.K., Kumar R., Wengel J., Gait M.J. (2001) Inhibition of HIV-1 Tat-dependent trans activation by steric block chimeric 2'-O-methyl/LNA oligoribonucleotides. *Biochemistry.* **40**, 14645–14654.
8. Arechavala-Gomez V., Khoo B., Aartsma-Rus A. (2014) Splicing modulation therapy in the treatment of genetic diseases. *Appl. Clin. Genet.* **7**, 245–252.
9. Crooke S.T. (2017) Molecular mechanisms of antisense oligonucleotides. *Nucl. Acid Ther.* **27**, 70–77.
10. Eckstein F. (2014) Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. *Nucl. Acid Ther.* **24**, 374–387.
11. Shen W., De Hoyos C.L., Migawa M.T., Vickers T.A., Sun H., Low A., Bell T.A. 3rd, Rahdar M., Mukhopadhyay S., Hart C.E., Bell M., Riney S., Murray S.F., Greenlee S., Crooke R.M., Liang X.H., Seth P.P., Crooke S.T. (2019) Chemical modification of PS-ASO therapeutics reduces cellular protein-binding and improves the therapeutic index. *Nat. Biotechnol.* **37**, 640–650.
12. Crooke S.T., Vickers T.A., Liang X.H. (2020) Phosphorothioate modified oligonucleotide-protein interactions. *Nucl. Acids Res.* **48**, 5235–5253.
13. Shen W., De Hoyos C.L., Sun H., Vickers T.A., Liang X.H., Crooke S.T. (2018) Acute hepatotoxicity of 2' fluoro-modified 5-10-5 gapmer phosphorothioate oligonucleotides in mice correlates with intracellular protein binding and the loss of DBHS proteins. *Nucl. Acids Res.* **46**, 2204–2217.
14. Челобанов Б.П., Буракова Е.А., Прохорова Д.В., Фокина А.А., Стеценко Д.А. (2017) Новые производные олигодезоксинуклеотидов, содержащие межнуклеотидную N-(метансульфонил)-фосфорамидную (мезилфосфорамидную) группу. *Биоорг. химия.* **43**, 644–649.
15. Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Vlassov V.V., Altman S., Zenkova M.A., Stetsenko D.A. (2019) Methyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates: improved biochemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **116**, 1229–1234.
16. Liang X.H., Shen W., Sun H., Kinberger G.A., Prakash T.P., Nichols J.G., Crooke S.T. (2016) Hsp90 protein interacts with phosphorothioate oligonucleotides containing hydrophobic 2'-modifications and enhances antisense activity. *Nucl. Acids Res.* **44**, 3892–3907.
17. Laurent Q., Martinet R., Moreau D., Winssinger N., Sakai N., Matile S. (2021) Oligonucleotide phosphorothioates enter cells by thiol-mediated uptake. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **60**, 19102–19106.
18. Meng M., Ducho C. (2018) Oligonucleotide analogues with cationic backbone linkages. *Beilstein J. Org. Chem.* **14**, 1293–1308.
19. Danielsen M.B., Wengel J. (2021) Cationic oligonucleotide derivatives and conjugates: a favorable approach for enhanced DNA and RNA targeting oligonucleotides. *Beilstein J. Org. Chem.* **17**, 1828–1848.
20. Yanachkov I., Zavizion B., Metelev V., Stevens L.J., Tabatadze Y., Yanachkova M., Wright G., Krichevsky A.M., Tabatadze D.R. (2017) Self-neutralizing oligonucleotides with enhanced cellular uptake. *Org. Biomol. Chem.* **15**, 1363–1380.

21. Meng M., Schmidtgal B., Ducho C. (2018) Enhanced stability of DNA oligonucleotides with partially zwitterionic backbone structures in biological media. *Molecules*. **23**, 2941.
22. Schmidtgal B., Kuepper A., Meng M., Grossmann T.N., Ducho C. (2018) Oligonucleotides with cationic backbone and their hybridization with DNA: interplay of base pairing and electrostatic attraction. *Chem. Eur. J.* **24**, 1544–1553.
23. Прохорова Д.В., Челобанов Б.П., Буракова Е.А., Фокина А.А., Стеценко Д.А. (2017) Новые производные олигодезоксирибонуклеотидов, содержащие межнуклеотидную *N*-тозилфосфорамидную группу: синтез и взаимодействие с комплементарными последовательностями ДНК и РНК. *Биоорган. химия*. **43**, 45–50.
24. Freier S.M., Altman K.H. (1997) The ups and downs of nucleic acid duplex stability: structure-stability studies on chemically-modified DNA:RNA duplexes. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4429–4443.
25. Su Y., Fujii H., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fujii M., Stetsenko D.A., Filichev V.V. (2019) Neutral and negatively charged phosphate modifications altering thermal stability, kinetics of formation and monovalent ion dependence of DNA G-quadruplexes. *Chem. Asian J.* **14**, 1212–1220.
26. Su Y., Edwards P.J.B., Stetsenko D.A., Filichev V.V. (2020) The importance of phosphates for DNA G-quadruplex formation: evaluation of zwitterionic G-rich oligodeoxynucleotides. *ChemBioChem*. **21**, 2455–2466.
27. Su Y., Bayarjargal M., Hale T.K., Filichev V.V. (2021) DNA with zwitterionic and negatively charged phosphate modifications: formation of DNA triplexes, duplexes and cell uptake studies. *Beilstein J. Org. Chem.* **17**, 749–761.
28. Su Y., Raguraman P., Veedu R.N., Filichev V.V. (2022) Phosphorothioate modification improves exon-skipping of antisense oligonucleotides based on sulfonyl phosphoramidates in mdx mouse myotubes. *Org. Biomol. Chem.* **20**, 3790–3797.
29. Beaucage S.L., Caruthers M.H. (1981) Deoxynucleoside phosphoramidites – a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **22**, 1859–1862.
30. Stec W.J., Zon G., Egan W., Stec B. (1984) Automated solid-phase synthesis, separation, and stereochemistry of phosphorothioate analogs of oligodeoxyribonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 6077–6079.
31. Купрюшкин М.С., Апухтина В.С., Васильева С.В., Пышный Д.В., Стеценко Д.А. (2015) Новый простой и удобный метод получения олигонуклеотидов, содержащих остатки пирена или холестерина. *Изв. Акад. Наук. Сер. Хим.* **64**, 1678–1681.
32. Левина А.С., Репкова М.Н., Челобанов Б.П., Бесуднова Е.В., Мазуркова М.А., Стеценко Д.А., Зарытова В.Ф. (2017) Влияние способа доставки на противовирусную активность фосфодиэфирных, тиофосфатных и фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов в клетках MDCK, инфицированных вирусом птичьего гриппа А (H5N1). *Молекуляр. биология*. **51**, 717–723.
33. Lomzov A.A., Kupryushkin M.S., Shernyukov A.V., Nekrasov M.D., Dovydenko I.S., Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V. (2019) Diastereomers of a mono-substituted phosphoryl guanidine trideoxyribonucleotide: isolation and properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **513**, 807–811.
34. Буракова Е.А., Держалова А.Ш., Челобанов Б.П., Фокина А.А., Стеценко Д.А. (2019) Новые производные олигонуклеотидов, содержащие *N*-(сульфонил)-фосфорамидные группы. *Биоорган. химия*. **45**, 662–668.
35. Derzhalova A., Markov O., Fokina A., Shiohama Y., Zatsepin T., Fujii M., Zenkova M., Stetsenko D. (2021) Novel lipid-oligonucleotide conjugates containing long-chain sulfonyl phosphoramidate groups: synthesis and biological properties. *Appl. Sci.* **11**, 1174.
36. Heindl D. Polynucleotide containing a phosphate mimetic. Canadian Patent 2627208, September 12, 2006.
37. Heindl D., Kessler D., Schube A., Thuer W., Giraut A. (2008) Easy method for the synthesis of labeled oligonucleotides. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **52**, 405–406.
38. Santorelli A., Gothelf K.V. (2022) Conjugation of chemical handles and functional moieties to DNA during solid phase synthesis with sulfonyl azides. *Nucl. Acids Res.* **50**, 7235–7246.
39. Patutina O.A., Gaponova (Miroshnichenko) S.K., Sen'kova A.V., Savin I.A., Gladikh D.V., Burakova E.A., Fokina A.A., Maslov M.A., Shmendel' E.V., Wood M.J.A., Vlassov V.V., Altman S., Stetsenko D.A., Zenkova M.A. (2020) Mesyl phosphoramidate backbone modified antisense oligonucleotides targeting miR-21 with enhanced in vivo therapeutic potency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117**, 32370–32379.
40. Hammond S.M., Sergeeva O.V., Melnikov P.A., Zatsepin T.S., Stetsenko D.A., Wood M.J.A. (2021) Mesyl phosphoramidate oligonucleotides as potential splice switching agents: impact of backbone structure on activity and intracellular localization. *Nucl. Acid Ther.* **31**, 190–200.
41. Anderson B.A., Freestone G.C., Low A., De-Hoyos C.L., Iii W.J.D., Østergaard M.E., Migawa M.T., Fazio M., Wan W.B., Berdeja A., Scandalis E., Burel S.A., Vickers T.A., Crooke S.T., Swayze E.E., Liang X., Seth P.P. (2021) Towards next generation antisense oligonucleotides: mesylphosphoramidate modification improves therapeutic index and duration of effect of gapmer antisense oligonucleotides. *Nucl. Acids Res.* **49**, 9026–9041.
42. Zhang L., Liang X.H., De Hoyos C.L., Migawa M., Nichols J.G., Freestone G., Tian J., Seth P.P., Crooke S.T. (2022) The combination of mesyl-phosphoramidate inter-nucleotide linkages and 2'-*O*-methyl in selected positions in the antisense oligonucleotide enhances the performance of RNaseH1 active PS-ASOs. *Nucl. Acid Ther.* **32**, 5.
<https://doi.org/10.1089/nat.2022.0005>
43. Останин А.А., Леплина О.Ю., Буракова Е.А., Тыринова Т.В., Фокина А.А., Проскурина А.С., Богачев С.С., Стеценко Д.А., Черных Е.Р. (2020) CpG олигонуклеотиды с модифицированными фосфатными группами индуцируют созревание миелоидных дендритных клеток человека *in vitro*. *Вавиловский журн. генетики и селекции*. **24**, 653–660.
44. Fokina A., Wang M., Ilyina A., Klabenkova K., Burakova E., Chelobanov B., Stetsenko D. (2018) Analysis of new charge-neutral DNA/RNA analogues phosphoryl guanidine oligonucleotides (PGO) by gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **555**, 9–11.

New Zwitterionic Oligonucleotides: Preparation and Complementary Binding**D. E. Patrushev^{1, 2}, E. A. Burakova^{1, 2}, S. N. Bizyaev^{1, 2, 3}, A. A. Fokina^{1, 2}, and D. A. Stetsenko^{1, 2, *}**¹ *Department of Physics, Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*² *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*³ *Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia***e-mail: stetsenkoda@bionet.nsc.ru*

New zwitter-ionic oligonucleotide derivatives containing 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-7-sulfonyl phosphoramidate group are described. Automated synthesis of these compounds was carried out according to the β -cyanoethyl phosphoramidite scheme using the Staudinger reaction between 2-trifluoroacetyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-7-sulfonyl azide and phosphite triester within an oligonucleotide grafted to a polymer support. 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline-7-sulfonyl phosphoramidate group (THIQ) proved to be stable under the conditions of standard oligonucleotide synthesis, including the removal of protective groups and cleavage of the oligonucleotide from the polymer support by treatment with a mixture of concentrated aqueous solutions of ammonia and methylamine (1 : 1) at 55°C. Oligonucleotides modified by one to five THIQ groups in various positions were obtained. The zwitter-ionic character of the obtained derivatives was reflected in their different mobility under conditions of denaturing PAGE. The thermal stability of the duplexes of oligodeoxynucleotides containing THIQ groups with complementary DNA and RNA differed only slightly from that of natural DNA:DNA and DNA:RNA duplexes. The results obtained suggest the possible use of oligonucleotides modified with zwitterionic THIQ groups as antisense therapeutic agents.

Keywords: zwitter-ion, antisense oligonucleotide, solid-phase synthesis, Staudinger reaction, sulfonyl azide

ЭВОЛЮЦИОННАЯ, ПОПУЛЯЦИОННАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНОМИКА, ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 575.174.015.3:616-00

ПОВЫШЕННЫЕ ЧАСТОТЫ АЛЛЕЛЕЙ –174G И –572C ГЕНА *IL6* В ПОПУЛЯЦИЯХ КОРЕННЫХ НАРОДОВ СИБИРИ ПО СРАВНЕНИЮ С РУССКИМИ

© 2023 г. Л. Э. Табиханова^а, *, Л. П. Осипова^а, Т. В. Чуркина^а, С. С. Ковалев^а,
М. Л. Филипенко^б, Е. Н. Воронина^б

^аФедеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

^бИнститут химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: tabikhan@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 27.07.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 29.09.2022 г.

Исследование полиморфизма генов иммунного ответа и воспаления в геногеографическом контексте относится к актуальным направлениям в изучении популяций человека. В представленной работе определены частоты полиморфных вариантов –174G/C (rs1800795) и –572C/G (rs1800796) гена *IL6*, кодирующего провоспалительный цитокин интерлейкин-6 (IL-6), в популяциях коренного населения Сибири. Впервые показано, что частоты аллелей –174G и –572C, обуславливающих усиленный воспалительный ответ, а также ассоциированных с рядом заболеваний, в этнических выборках бурят, телеутов, якутов, долган и тувинцев статистически значимо выше, чем у русских, проживающих в Сибири, и занимают промежуточное положение между частотами в европейских и восточноазиатских группах. Высказано предположение об адаптивной роли указанных аллельных вариантов при переселении человека из Африки на Евразийский континент. Однако, в связи с отходом от традиционного образа жизни и нарастанием антропогенного загрязнения окружающей среды, в коренных сибирских популяциях, вероятно, повышен риск заболеваний, в основе патогенеза которых лежит воспаление.

Ключевые слова: цитокины, *IL6*, генетический полиморфизм, rs1800795, rs1800796, ПЦР в режиме реального времени, коренные народы Сибири, буряты, телеуты, якуты, долганы, тувинцы, русские

DOI: 10.31857/S0026898423020210, **EDN:** EEINAT

Воспаление характеризуется как защитно-приспособительная гомеостатическая реакция организма на повреждение или действие раздражителя физической, химической или биологической, в том числе аллергической, природы [1]. Воспалительный ответ направлен на устранение продуктов и агентов повреждения и максимальное восстановление организма. Однако воспаление может играть важную роль в индукции различных заболеваний: онкологических, сердечно-сосудистых, аутоиммунных и других [2–8].

Процесс воспаления регулируется про- и противовоспалительными цитокинами — небольшими белковыми молекулами, которые обеспечивают межклеточное взаимодействие, определяют выживаемость клеток, стимуляцию или подавление их роста, дифференцировку, функциональную активность и апоптоз, а также обеспечивают согласованность действия иммунной, эндокрин-

ной и нервной систем в нормальных условиях и в ответ на патологические воздействия. Интерлейкин-6 (IL-6) относится к провоспалительным цитокинам и функционирует как регулятор иммунного ответа и медиатор воспаления [9, 10].

Еще одну важную роль IL-6 выявили в связи с пандемией новой коронавирусной инфекции — COVID-19. Уровень IL-6 в крови больных стали рассматривать в качестве значимого прогностического маркера тяжести заболевания с развитием так называемого “цитокинового шторма” [11, 12].

Степень выраженности воспаления, его характер, течение и исход зависят не только от патогенного потенциала раздражителя, но и от реактивности организма [1], которую во многом определяют генетические факторы. Ген *IL6* локализован на коротком плече хромосомы 7 (7p15.3) и содержит 5 экзонов и 4 интрона, общей протяженностью 1183 п.н. Наиболее изучены полиморфные ло-

кусы –174G/C (rs1800795) и –572C/G (rs1800796) в промоторном регионе гена *IL6*.

Аллель –174G (rs1800795) *IL6* приводит к значительному повышению активности промотора по сравнению с вариантом –174C и, как следствие, к усиленной экспрессии гена [13]. Вариант –572C (rs1800796) *IL6* также ассоциирован с повышенными уровнями экспрессии *IL6* в сравнении с носителями аллеля –572G [14, 15].

Варианты –174G и –572C, обеспечивающие повышенную выработку IL-6, ассоциированы с рядом заболеваний, в основе патогенеза которых лежит воспаление. Показано, что их носители чаще страдают болезнями печени [16] и имеют повышенный риск заболевания туберкулезом [15, 17]. Аллель –174G считается фактором риска плоскоклеточного рака легкого и хронической обструктивной болезни легких [18], рака и фундальной атрофии желудка [19], рака яичников [20], внутриутробной инфекции плода [21], развития церебральной атриовенозной мальформации [22] и ассоциирован с риском развития сахарного диабета 2 типа [23, 24]. Аллель –572C также связан с ишемическим инсультом у мужчин – коренных жителей Западной Африки [25].

Однако литературные данные о связи полиморфизма –174G/C гена *IL6* с риском развития злокачественных новообразований остаются противоречивыми [26] и межпопуляционные различия в частотах аллелей могут быть одной из причин имеющихся противоречий [27]. Показано, что для лиц татарской этнической принадлежности постменопаузального возраста гомозиготный генотип –174G/–174G служит маркером пониженного риска развития рака яичников [28], а у европеоидов, больных неалкогольным стеатогепатитом и гепатокарциномой, частота *IL6* –174G значительно ниже, чем у здоровых людей [5, 29, 30]. Этот вариант может быть протективным относительно недифференцированной дисплазии соединительной ткани [31]. Установлена защитная роль аллеля –572C *IL6* для развития эндокардитов [32]. Возможно, межэтнические различия в эффектах полиморфных вариантов гена *IL6* на развитие заболеваний связаны с особенностями распределения частот аллелей других генов, продукты которых опосредуют действие IL-6, например гена трансмембранного рецептора IL-6 – *IL6R* [16, 33].

Знание характера географического распределения вариантов *IL6* –174G и *IL6* –572C важно для понимания процесса формирования генофондов популяций и влияния на него адаптивной ценности аллелей в различных условиях проживания [34]. Изменения окружающей среды, связанные с отходом от традиционного образа жизни, а также антропогенное воздействие на природу могут модулировать приспособительную значимость

аллелей, в связи с чем особенно актуальными становятся популяционные исследования в этой области. В настоящее время накоплен большой объем знаний по распределению полиморфных вариантов гена *IL6* в разных странах и у разных этнических групп, в том числе в России [34–38]. Заметим, что для коренных популяций Сибири этот вопрос малоизучен.

В представленной работе приведены результаты исследования частот аллелей *IL6* –174G и *IL6* –572C в сибирских выборках в сравнении с русскими, а также с некоторыми другими популяциями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выборки участников исследования. Генетический материал для данного исследования был собран во время экспедиций лаборатории популяционной этногенетики в 2000–2019 гг. В исследовании принимали участие добровольцы, практически здоровые на момент исследования, подписавшие “Информированное согласие”. Кровь у испытуемых брали с соблюдением Международных правил ВОЗ (https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44298/9789241599252_eng.pdf?sequence=1). Перед сдачей крови каждый испытуемый заполнял специально разработанную демографическую анкету, в которой уточнял национальную принадлежность предков до 3–4 поколения. На основании собранной информации было сформировано 8 выборок населения Южной и Восточной Сибири. Лица бурятской национальности, не имеющие иноэтнических предков, проживающие в селах Алханай и Орловский Агинского Бурятского округа (АБО) Забайкальского края, вошли в группу восточных бурят ($N = 133$). Этнические буряты Эхирит-Булагатского района Усть-Ордынского Бурятского округа (УОБО) Иркутской области ($N = 273$) составили западную выборку. В исследование были включены телеуты Беловского района Кемеровской области ($N = 117$). Сформированы также две этнические группы якутов: Нюрбинская (из проживающих в селах Нюрбачан и Сюльцы Нюрбинского улуса; $N = 109$) и Усть-Алданская (из жителей села Дюпсы Усть-Алданского улуса; $N = 99$). Жители города Дудинка, поселков Волочанка и Усть-Авам Таймырского Долгано-Ненецкого района Красноярского края, относящие себя к долганскому этносу, составили группу долган ($N = 179$). Сельская выборка коренных жителей Сибири включала этнических тувинцев г. Кызыла ($N = 301$). Наконец, в восьмую группу были включены лица, называющие себя русскими, проживающие в Забайкальском крае ($N = 65$), Иркутской области ($N = 67$) и Туве ($N = 24$). Большую часть выборки составили представители русского старожильческого населения, не одно поколение проживающего в Сибири. Следует отметить, что некоторые

Таблица 1. Структуры праймеров и зондов, использованных для генотипирования однонуклеотидных замен в гене *IL6*

Локус	Праймеры	Зонды ^a
–174G/C, rs1800795	5'-AGGAAGAGTGGTTCTGCTTCT-3' 5'-TGGGGCTGATTGGAAACCT-3'	5'-Fam-CTTTAGCATGGCAAGACACA-BHQ2-3' 5'-Hex-CTTTAGCATCGCAAGACACA-BHQ2-3'
–572C/G, rs1800796	5'-CATCTGAGTTCTTGTGTGTTCTG-3' 5'-CGAGACGCCTTGAAGTAACTG-3'	5'-Hex-CAACAGCCCCTCACAGG-BHQ2-3' 5'-Fam-CAACAGCCGCTCACAGG-BHQ2-3'

^aFam(фосфорамидит) и Hex (гексахлорфлуоресцеин) – флуоресцентные красители (флуорофоры); BHQ2 (Black Hole Quenchers 2) – гаситель флуоресценции для ПЦР в реальном времени.

лица, составляющие 5% выборки, указали среди своих предков, помимо русских, также представителей других европейских национальностей: украинцев, белорусов, поляков, немцев и т.д. В описываемую группу не были включены потомки смешанных браков русских с представителями народов Кавказа или коренных сибирских этносов.

Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов: ПЦР в режиме реального времени. Тотальную ДНК выделяли из лейкоцитарной фракции венозной крови стандартным методом фенол–хлороформной экстракции [39] с использованием набора для выделения ДНК из цельной крови (ООО “БиоСилика”, Россия). Генотипирование однонуклеотидных замен –174G/C (rs1800795) и –572C/G (rs1800796) проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфным участкам ДНК. Структуру праймеров и зондов подбирали по последовательностям, доступным в базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), с использованием программ UGENE (version 1.14, <http://ugene.unipro.ru/>) и Oligo Analyzer (version 1.0.3, <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) (табл. 1).

Амплификацию проводили в объеме 25 мкл, ПЦР-смесь включала: 300 нМ каждого праймера, 100 нМ TaqMan-зонды, 65 мМ Трис-НCl (pH 8.9), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 2.5 мМ MgCl₂, 0.05% Tween-20, 0.2 мМ dNTPs, 0.5–10 нг ДНК и 0.5 U Taq-ДНК-полимеразы (hot-start, “Biosan”, Латвия). ПЦР проводили в следующих условиях: начальная денатурация 3 мин при 96°C; затем 46 циклов, включавших денатурацию при 96°C в течение 5 с, отжиг праймеров и последующую элонгацию при 61°C в течение 30 с (каждый шаг сопровождался регистрацией флуоресцентного сигнала при длине волны эмиссии флуорофоров Fam (517нм) и Hex (549 нм)).

Статистическая обработка результатов. Популяционные частоты аллельных вариантов определяли на основе наблюдаемых частот генотипов. Соответствие эмпирически наблюдаемого распределения частот генотипов теоретически ожидаемому распределению, равновесному по закону

Харди–Вайнберга, проверяли с использованием критерия Пирсона (χ^2 ; при p (H–W) > 0.05 равновесие выполняется, где p (H–W) – значение вероятности отклонения от равновесного распределения Харди–Вайнберга). Оценку достоверности различий в частотах аллелей между исследованными выборками проводили по критерию χ^2 с применением поправки Йейтса на непрерывность; при $p < 0.025$ (с поправкой на множественность сравнения: $0.025 = 0.05/2$) результаты считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты генотипирования *IL6* –174G/C (rs1800795) и *IL6* –572C/G (rs1800796) в выборках бурят, телеутов, якутов, долган, тувинцев и русских приведены в табл. 2.

Наблюдаемое распределение частот генотипов обоих полиморфных локусов в исследованных выборках соответствовало ожидаемому распределению при равновесии Харди–Вайнберга. Частоты аллелей –174G и –572C в изученных выборках, а также в некоторых этнических группах, описанных в литературе [35], и сравнение популяций (p -value) представлены в табл. 3 и 4.

Показано, что частота аллеля –174G *IL6* в выборке русских соответствует его частоте в европейских группах [35]. Коренные народы Сибири статистически значимо отличаются большей частотой встречаемости этого полиморфизма по сравнению с русскими и описанными в литературе европейскими популяциями и более низкой по сравнению с рядом популяций Восточной Азии: китайцами, японцами и вьетнамцами, – в которых этот показатель близок к 100%.

В изученных нами выборках сибирских этносов частота аллеля –572C *IL6* статистически значимо выше, чем в группах русских и европейцев. Промонстрированы статистически значимые различия сибирских выборок от восточноазиатских популяций, у которых этот показатель еще выше.

Таким образом, по частоте встречаемости вариантов –174G и –572C гена *IL6* популяции коренных народов Сибири расположены между ев-

Таблица 2. Распределение генотипов *IL6* в выборках коренных народов Сибири и русских

Полиморфизм ^a			Буряты		Телеуты	Якуты		Долганы	Тувинцы	Русские
			восточные	западные		Нюрбинский улус	Усть-Алданский улус			
–174G/C, rs1800795	распределение генотипов, <i>n</i> (%)	G/G	113 (85.6)	241 (88.3)	87 (75.0)	91 (93.8)	88 (94.6)	143 (82.6)	266 (89.9)	54 (34.8)
		G/C	18 (13.6)	30 (11.0)	28 (24.1)	5 (5.1)	5 (5.4)	29 (16.8)	28 (9.4)	70 (45.2)
		C/C	1 (0.8)	2 (0.7)	1 (0.9)	1 (1.1)	0	1 (0.6)	2 (0.7)	31 (20.0)
	<i>N</i> , ppl		132	273	116	97	93	173	296	155
	<i>p</i> (H–W)		0.952	0.861	0.839	0.729	0.975	0.937	0.830	0.621
–572C/G, rs1800796	Распределение генотипов, <i>n</i> (%)	G/G	35 (26.3)	86 (32.3)	46 (39.3)	23 (21.1)	17 (17.2)	65 (36.3)	90 (29.9)	120 (76.9)
		G/C	65 (48.9)	119 (44.8)	57 (48.7)	62 (56.9)	56 (56.6)	92 (51.4)	159 (52.8)	34 (21.8)
		C/C	33 (24.8)	61 (22.9)	14 (12.0)	24 (22.0)	26 (26.2)	22 (12.3)	52 (17.3)	2 (1.3)
	<i>N</i> , ppl		133	266	117	109	99	179	301	156
	<i>p</i> (H–W)		0.883	0.391	0.787	0.404	0.391	0.556	0.499	0.952

^a*N*, ppl – объем выборки, число человек; *n* – численность; *p* (H–W) – значение вероятности отклонения от равновесного распределения Харди–Вайнберга.

ропейцами и выборками из Восточной Азии. Такая же тенденция была выявлена нами ранее в исследованиях полиморфизмов в других функционально значимых генах [40, 41].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Понимание особенностей распределения частот полиморфных вариантов –174G/C (rs1800795) и –572C/G (rs1800796) гена *IL6*, кодирующего провоспалительный цитокин IL-6, у коренного населения различных регионов мира важно как для фундаментальных популяционно-генетических исследований, так и в медицинском аспекте. В результате проведенного нами скрининга в этнических группах бурят, телеутов, якутов, долган и тувинцев впервые определены частоты аллелей *IL6* –174G и *IL6* –572C, ассоциированных с повышением продукции IL-6, усиленным воспалительным ответом, а также с рядом заболеваний. Показано, что в выборках коренных сибирских этносов частоты обоих изученных вариантов статистически значимо выше, чем у русских, и ниже, чем у восточноазиатских народов, то есть занимают промежуточное положение.

Интересно, что у коренного населения Африки частота варианта –174G *IL6* составляет 100%, близка к этому значению она и в азиатских странах. В популяциях Европы она ниже – вплоть до преобладания аллельного варианта –174C гена *IL6*, который “отвечает” за сниженную выработку провоспалительного цитокина [35]. С.А. Боринская и соавт. [34] высказали предположение, что в европейских популяциях снижение частоты ал-

леля –174G *IL6* стало следствием адаптации к новым условиям проживания: умеренный климат со сниженной нагрузкой патогенами, – то есть со снижением давления отбора. Аналогично географическое распределение и варианта –572C *IL6*, определяющего высокий уровень транскрипции гена. В африканских странах частота этого аллеля составляет около 10%, еще ниже она у коренных популяций Европы – до 5%, но значительно увеличена у народов Азии – 80% и выше [35].

На основании публикации суммарных индексов нагрузки патогенами, рассчитанных по историческим данным для девяти инфекционных заболеваний (лейшманиоз, трипаносомоз, малярия, шистосоматоз, филяриатоз, проказа, лихорадка денге, тиф и туберкулез) [42], С.А. Боринская и соавт. [34] обнаружили, что частота варианта –174G *IL6*, определяющего высокоуровневую экспрессию белка и сильный воспалительный ответ, положительно коррелирует с индексом нагрузки патогенами. Вероятно, в процессе расселения человека с африканского континента в Азию оба варианта *IL6*: –174G и –572C – имели адаптивные преимущества.

Известно, что в некоторых случаях, особенно после “выхода” человека из репродуктивного возраста, усиленный ответ организма на патогенный раздражитель может давать и негативные эффекты, запуская патологические процессы (в том числе канцерогенез), поддерживая хроническое воспаление, лежащее в основе метаболических, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и неопластических заболеваний у пожилых людей [43]. Можно предположить, что в связи с нарастанием

Таблица 3. Частота аллеля – 174G *IL6* в некоторых популяциях (этнических группах) и сравнение популяций

Популяция/этническая группа	N, ppl	Частота —174G, %	Сравнение популяций (p-value) ^a								тувинцы	долганы	русские
			буряты		телеуты	якуты							
			восточные	западные		Нюрбинский улус	Усть-Алданский улус						
Восточные буряты Западные буряты Телеуты Якуты (Нюрбинский улус) Якуты (Усть-Алданский улус) Долганы Тувинцы Русские Восточной Сибири Китайцы дай (Сишунбаньна, Китай) ^b Китайцы хань (Пекин, Китай) ^b Южные китайцы хань (Китай) ^b Японцы (Токио, Япония) ^b Кинь (вьеты) (Хошимин, Вьетнам) ^b Финны (Финляндия) ^b Англичане и шотландцы ^b Иберы (Испания) ^b Тосканцы (Италия) ^b	132	92.4		0.549	0.071	0.111	0.043	0.638	0.276				
	273	93.8	0.549		0.003	0.238	0.099	0.151	0.652				
	116	87.1	0.071	0.003		0.001	<0.001	0.175	<0.001				
	97	96.4	0.111	0.238	0.001		0.835	0.030	0.417				
	93	97.3	0.043	0.099	<0.001	0.835		0.010	0.189				
	173	91	0.638	0.151	0.175	0.030	0.010		0.047				
	296	94.6	0.276	0.652	<0.001	0.417	0.189	0.047					
	155	57.4	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001				
	93	100	<0.001	0.001	<0.001	0.026	0.071	<0.001	0.002				
	103	100	<0.001	<0.001	<0.001	0.018	0.054	<0.001	0.001				
	105	100	<0.001	<0.001	<0.001	0.017	0.051	<0.001	0.001				
	104	100	<0.001	<0.001	<0.001	0.017	0.053	<0.001	0.001				
	99	99.5	<0.001	0.002	<0.001	0.069	0.185	<0.001	0.005				
	99	54.5	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.740			
91	58.8	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.701				
107	65.0	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.074				
107	64.5	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.094				

^aЖирным шрифтом выделены значения $p < 0.025$, при которых различия считались статистически значимыми.

^bПриведены данные консорциума “The 1000 Genomes Project Consortium” [35].

Таблица 4. Частота аллеля –572С II.6 в некоторых популяциях (этнических группах) и сравнение популяций

Популяция/этническая группа	N, ppl	Частота —572С, %	Сравнение популяций (p-value) ^a								тувинцы	русские
			буряты		телеуты	якуты		долганы				
			восточные	западные		Нюрбинский улус	Усть-Алданский улус					
Восточные буряты Западные буряты Телеуты Якуты (Нюрбинский улус) Якуты (Усть-Алданский улус) Долганы Тувинцы Русские Восточной Сибири Китайцы дай (Сишуан-банья, Китай) ^b Китайцы хань (Пекин, Китай) ^b Южные китайцы хань, (Китай) ^b Японцы (Токио, Япония) ^b Кинь (вьеты) (Хошимин, Вьетнам) ^b Финны (Финляндия) ^b Англичане и шотландцы ^b Иберы (Испания) ^b Тосканцы (Италия) ^b	133	49.2		0.334	0.005	0.847	0.300	0.007	0.154	< 0.001		
	266	45.3	0.334		0.025	0.224	0.033	0.036	0.630	< 0.001		
	117	36.3	0.005	0.025	0.003	0.003	0.003	< 0.001	0.061	< 0.001		
	109	50.5	0.847	0.224	0.003		0.473	0.004	0.099	< 0.001		
	99	54.5	0.300	0.033	< 0.001			< 0.001	0.010	< 0.001		
	179	38.0	0.007	0.036	0.740	0.004	< 0.001		0.099	< 0.001		
	301	43.7	0.154	0.630	0.061	0.099	0.010	0.099		< 0.001		
	156	12.2	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		
	93	82.3	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		
	103	71.8	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		
	105	78.6	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		
	104	82.2	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		
	99	80.8	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001		
	99	5.1	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.012		
91	3.8	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.003			
107	5.1	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.009			
107	5.1	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.009			

^aЖирным шрифтом выделены значения $p < 0.025$, при которых различия считались статистически значимыми.
^bПриведены данные консорциума “The 1000 Genomes Project Consortium” [35].

антропогенного загрязнения окружающей среды, провоцирующего воспалительные реакции, риск ассоциированных с воспалением заболеваний также будет увеличиваться в этнических группах с повышенными частотами аллелей –174G и –572C гена *IL6*. Однако для проверки этой гипотезы необходимы дополнительные медико-генетические исследования в различных популяциях с большим объемом выборок, а также изучение частот аллельных вариантов не только *IL6*, но и других функционально значимых генов воспалительного профиля.

Авторы выражают благодарность к.б.н. Т.М. Карафет, к.б.н. Д.В. Личман, Н.А. Вавиловой, Н.А. Молетотовой, М.Р. Воронковой, к.б.н. С.С. Сангаеву и А.О. Лихачевой за участие в экспедициях. За активное содействие в сборе биоматериала тувинцев авторы признательны д.б.н. У.Н. Кавайоол и сотрудникам ГБУЗ Республики Тыва “Республиканский центр медицинской профилактики”, г. Кызыл.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ИЦиГ СО РАН (№ FWNR-2022-0021).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Висмонт Ф.И. (2006) *Воспаление (патофизиологические аспекты)*. Учебно-методическое пособие. Минск: БГМУ, 48 с.
2. Kidane D., Chae W.J., Czochor J., Eckert K.A., Glazer P.M., Bothwell A.L., Sweasy J.B. (2014) Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **49**, 116–139. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.875514>
3. Becker C., Fantini M.C., Schramm C., A Lehr H.A., Wirtz S., Nikolaev A., Burg J., Strand S., Kiesslich R., Huber S., Ito H., Nishimoto N., Yoshizaki K., Kishimoto T., Galle P.R., Blessing M., Rose-John S., Neurath M.F. (2004) TGF- β suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 *trans*-signaling. *Immunity*. **21**, 491–501. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.020>
4. Stephens O.W., Zhang Q., Qu P., Zhou Y., Chavan Sh., Tian E., Williams D.R., Epstein J., Barlogie B., Shaughnessy J.D. (2012) An intermediate risk multiple myeloma subgroup is defined by sIL-6r: levels synergistically increase with incidence of SNP rs2228145 and 1q21 amplification. *Blood*. **119**, 503–512. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-367052>
5. Giannitrapani L., Soresi M., Giacalone A., Campagna M.E., Marasà M., Cervello M., Marasà S., Montalto G. (2011) IL-6 –174G/C polymorphism and IL-6 serum levels in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *OMICS*. **15**, 183–186. <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0093>
6. Aukrust P., Ueland T., Lien E., Bendtzen K., Müller F., Andreassen A.K., Nordøy I., Aass H., Espevik T., Simonsen S., Frøland S.S., Gullestad L. (1999) Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* **83**, 376–382. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(98\)00872-8](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(98)00872-8)
7. Muscaritoli M., Molino A., Bollea M.R., Fanelli F.R. (2009) Malnutrition and wasting in renal disease, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. **12**, 378–383. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32832c7ae1>
8. Тийс Р.П., Осипова Л.П. (2022) Интерлейкин-6: его роль в организме, генетический полиморфизм и значение при некоторых заболеваниях (литературный обзор). *Медицинская генетика*. **21**(1), 14–27. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.01.14-27>
9. Fernández-Real J.M., Broch M., Vendrell J., Richart C., Ricart W. (2000) Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 1334–1339. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.3.6555>
10. Brauersreuther V., Viviani G.L., Mach F., Montecucco F. (2012) Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **18**(8), 727–735.
11. Coomes E.A., Haghighyan H. (2020) Interleukin-6 in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.* **30**, 1–9. <https://doi.org/10.1002/rmv.2141>
12. Rodríguez-Hernández M.A., Carneros D., Núñez-Núñez M., Coca R., Baena R., López-Ruiz G.M., Cano-Serrano M.E., Martínez-Tellería A., Fuentes-López A., Praena-Fernandez J.M., Garbers C., Hernández-Quero J., García F., Rose-John S., Bustos M. (2022) Identification of IL-6 signalling components as predictors of severity and outcome in COVID-19. *Front. Immunol.* **13**, 891456. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.891456>
13. Fishman D., Faulds G., Jeffery R., Mohamed-Ali M., Yudkin J.S., Humphries S., Woo P. (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J. Clin. Invest.* **102**, 1369–1376. <https://doi.org/10.1172/JCI2629>
14. Brull D.J., Montgomery H.E., Sanders J., Dhamrait S., Luong L., Rumley A., Lowe G.D., Humphries S.E. (2001) Interleukin-6 gene –174G>C and –572G>C promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass sur-

- gery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1458–1463.
<https://doi.org/10.1161/hq0901.094280>
15. Zhang G., Zhou B., Wang W., Zhang M., Zhao Y., Wang Z., Yang L., Zhai J., Feng C.G., Wang J., Chen X. (2012) A functional single-nucleotide polymorphism in the promoter of the gene encoding interleukin 6 is associated with susceptibility to tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **205**, 1697–1704.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jis266>
 16. Wang X., Zhenghui Yan Zh., Ye Q. (2019) Interleukin-6 gene polymorphisms and susceptibility to liver diseases. *Medicine* (Baltimore). **98**, e18408.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018408>
 17. Wang H., Caishuang Pang C., Zeng N., Wan Ch., Shen Y., Wen F. (2017) Association between the IL-6 gene polymorphism and tuberculosis risk: a meta-analysis. *Infect. Drug Resist.* **10**, 445–454.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S144296>
 18. Гордеева Л.А., Мун С.А., Воронина Е.Н., Поленок Е.Г., Магати́на А.Д., Титов В.А., Рагожина С.Е., Вафин И.А., Романова Е.Л., Глушков А.Н. (2018) Ассоциации полиморфизма в генах цитокинов с риском плоскоклеточного рака легкого у мужчин в зависимости от длительности курения. *Экологическая генетика*. **16**, 60–69.
<https://doi.org/10.17816/ecogen16160-69>
 19. Белковец А.В., Курилович С.А., Максимов В.Н., Раги́но Ю.И., Щербакова Л.В., Черемисина О.В., Чердынцева Н.В., Андрюшина Н.А., Воевода М.И. (2018) Полиморфизм генов воспалительных цитокинов IL6 и IL1B у пациентов с раком желудка в клиническом исследовании “случай-контроль.” *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. **4**(152), 9–17.
 20. Hefler L.A., Grimm C., Ackermann S., Malur S., Radjabi-Rahat A.R., Leodolter S., Beckmann M.W., Zeillinger R., Koelbl H., Tempfer C.B. (2003) An interleukin-6 gene promoter polymorphism influences the biological phenotype of ovarian cancer. *Cancer Res.* **63**, 3066–3068.
 21. Кан Н.Е., Сироткина Е.А., Тютюнник В.Л., Донников А.Е., Быстрицкий А.А., Кадочникова В.В., Маркелова Е.Г., Курчакова Т.А., Вересова А.А. (2015) Диагностическая роль клинических и молекулярно-генетических предикторов внутриутробной инфекции. *Акушерство и гинекология*. **4**, 44–49.
 22. Эркинова С.А., Киселев В.С., Стрельников Н.В., Орлов К.Ю., Дубовой А.В., Воронина Е.Н., Филиппенко М.Л. (2016) Исследование ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов с развитием артериовенозных мальформаций. *Технологии живых систем*. **13**(6), 62–66.
 23. Huth C., Heid I.M., Vollmert C., Gieger C., Grallert H., Wolford J. K., Langer B., Thorand B., Klopp N., Hamid Y.H., Pedersen O., Hansen T., Lyssenko V., Groop L., Meisinger C., Döring A., Löwel H., Lieb W., Hengstenberg C., Rathmann W., Martin S., Stephens J.W., Ireland H., Mather H., Miller G.J., Stringham H.M., Boehnke M., Tuomilehto J., Boeing H., Möhlig M., Spranger J., Pfeiffer A., Wernstedt I., Niklason A., López-Bermejo A., Fernández-Real J.M., Hanson R.L., Gallart L., Vendrell J., Tsiavou A., Hatzigelaki E., Humphries S.E., Wichmann H.E., Herder C., Illig T. (2006) IL6 gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes: joint analysis of individual participants' data from 21 studies. *Diabetes*. **55**(10), 2915–2921.
<https://doi.org/10.2337/db06-0600>
 24. Свечникова Е.В., Спицына А.В., Немчанинова О.Б., Лыкова С.Г., Максимова Ю.В., Максимов В.Н. (2018) Общие генетические аспекты псориаза и сахарного диабета 2-го типа. *Медицинский альманах*. **3**, 124–127.
 25. Akinyemi R., Arnett D.K., Tiwari H.K., Ovbiagele B., Sarfo F., Srinivasasainagendra V., Irvin M.R., Adeoye A., Perry R.T., Akpalu A., Jenkins C., Owolabi L., Obiako R., Wahab K., Sanya E., Komolafe M., Fawale M., Adebayo P., Osaigbovo G., Sunmonu T., Olowoyo P., Chukwuonye I., Obiabo Y., Akpa O., Melikam S., Saulson R., Kalaria R., Ogunniyi A., Owolabi M., SIREN Investigators (2017) Interleukin-6 (IL-6) rs1800796 and cyclin dependent kinase inhibitor (CDKN2A/CDKN2B) rs2383207 are associated with ischemic stroke in indigenous West African men. *J. Neurol. Sci.* **15**(379), 229–235.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2017.05.046>
 26. Peng X., Shi J., Sun W., Ruan X., Guo Y., Zhao L., Wang J., Li B. (2018) Genetic polymorphisms of IL-6 promoter in cancer susceptibility and prognosis: a meta-analysis. *Oncotarget*. **5**, 12351–12364.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.24033>
 27. Capurso C., Solfrizzi V., D'Introno A., Colacicco A.M., Capurso S.A., Capurso A., Panza F. (2004) Interleukin 6 –174G/C promoter gene polymorphism and sporadic Alzheimer's disease: geographic allele and genotype variations in Europe. *Exp. Gerontol.* **39**, 1567–1573.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.07.006>
 28. Мингажева Э.Т., Прокофьева Д.С., Валова Я.В., Нургалиева А.Х., Валиев Р.Р., Романова А.Р., Фатиханова Р.Р., Сакаева Д.Д., Хуснутдинова Э.К. (2019) Роль полиморфных вариантов генов иммунного ответа и воспаления в патогенезе рака яичников у женщин разного этнического происхождения. *Медицинская генетика*. **18**(10), 10–20.
<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.10.10-20>
 29. Carulli L., Canedi I., Rondinella S., Lombardini S., Ganazzi D., Fargion S., De Palma M., Lonardo A., Ricchi M., Bertolotti M., Carulli N., Loria P. (2009) Genetic polymorphisms in non-alcoholic fatty liver disease: interleukin-6 –174G/C polymorphisms associated with non-alcoholic steatohepatitis. *Dig. Liver Dis.* **41**, 823–828.
<https://doi.org/10.1016/j.dld.2009.03.005>
 30. Курбатова И.В., Топчиева Л.В., Дуданова О.П. (2016) Экспрессия генов каспаз 3, 6, 8 и 9 в лейкоцитах периферической крови и концентрация IL-6 и TNF-α в плазме крови у носителей разных геноти-

- пов по полиморфному маркеру –174G>C гена *IL6*, ассоциированному с риском развития неалкогольного стеатогепатита. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. **162**(9), 356–361.
31. Бен Салха М., Репина Н.Б., Дмитриева М.Н. (2018) Методы диагностики послеоперационного спаечного процесса в малом тазу у женщин с хронической тазовой болью на фоне недифференцированной дисплазии соединительной ткани. *Вестник Авиценны*. **20**(1), 13–19.
<https://doi.org/10.25005/2074-0581-2018-20-1-13-19>
 32. Бахарева Ю.С., Максимов В.Н., Иванова А.А., Чапаева Н.Н., Айдагулова С.В., Воевода М.И. (2022) Полиморфизмы генов-кандидатов, связанные с клинико-гемостазиологическими характеристиками эндокардитов разной этиологии. *Бюллетень сибирской медицины*. **21**(1), 6–13.
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2022-1-6-13>
 33. Топчиева Л.В., Курбатова И.В., Дуданова О.П., Соколовская А.А., Шиповская А.А. (2017) Полиморфизм генов провоспалительных цитокинов (*TNF*, *IL6*) и их рецепторов (*TNFRSF1A*, *TNFRSF1B*, *IL6R*) и неалкогольная жировая болезнь печени. *Труды Карельского научного центра РАН*. **5**, 3–22.
<https://doi.org/10.17076/eb568>
 34. Borinskaya S.A., Gureev A.S., Orlova A.A., Sanina E.D., Kim A.A., Gasemianrodsari F., Shirmanov V.I., Balanovsky O.P., Rebrikov D.V., Koshechkin A.V., Yanovsky N.K. (2013) Allele frequency distributions of –174G/C polymorphism in regulatory region of interleukin 6 gene (*IL6*) in Russian and worldwide populations. *Russ. J. Genet.* **49**(1), 98–109.
<https://doi.org/10.7868/S0016675813010037>
 35. The 1000 Genomes Project Consortium. (2012) An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. **491**, 56–65.
<https://doi.org/10.1038/nature11632>
 36. Самгина Т.А., Животова Г.А., Назаренко П.М., Полоников А.В. (2017) Роль полиморфизмов генов цитокинов в развитии острого панкреатита: анализ межгенных и генно-средовых взаимодействий. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. **27**(3), 27–33.
<https://doi.org/10.22416/1382-4376-2017-27-3-27-33>
 37. Минушкина Л.О., Асейчева О.Ю., Кочкина М.С., Никитин А.Г., Затейщиков Д.А. (2017) Генетический полиморфизм генов цитокинов системы воспаления и состояние сосудистой стенки у больных артериальной гипертензией. *Артериальная гипертензия*. **23**(2), 103–111.
<https://doi.org/10.18705/1607-419X-2017-23-2-103-111>
 38. Зотова И.В., Бровкина А.Н., Фаттахова Э.Н., Никитина А.Н., Носиков В.В., Бражник В.А., Затейщиков Д.А. (2015) Генетический полиморфизм факторов системы воспаления, ассоциированные с тромбозомболическими осложнениями мерцательной аритмии. *Российский кардиологический журн.* **20**(10), 35–41.
<https://doi.org/10.15829/1560-4071-2015-10-35-41201>
 39. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd edition). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1626 p.
 40. Tabikhanova L.E., Osipova L.P., Voronina E.N., Bragin A.O., Filipenko M.L. (2019) Polymorphism of lipid exchange genes in some populations of South and East Siberia. *Vavilov J. Genet. Breed.* **23**(8), 1011–1019.
<https://doi.org/10.18699/VJ19.578>
 41. Табиханова Л.Э., Осипова Л.П., Чуркина Т.В., Воронина Е.Н., Филипенко М.Л. (2022) Полиморфизм гена *TCF7L2* в популяциях пяти этносов Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. **26**(2), 188–195.
<https://doi.org/10.18699/VJGB-22-23>
 42. Murray D.R., Schaller M. (2010) Historical prevalence of infectious diseases within 230 geopolitical regions: a tool for investigating origins of culture. *J. Cross-Cultural Psychol.* **1**, 99–108.
<https://doi.org/10.1177/0022022109349510>
 43. Cole S.W., Arevalo J.M., Manu K., Telzer E.H., Kiang L., Bower J.E., Irwin M.R., Fuligni A.J. (2011) Antagonistic pleiotropy at the human *IL6* promoter confers genetic resilience to the pro-inflammatory effects of adverse social conditions in adolescence. *Dev. Psychol.* **47**, 1173–1180.
<https://doi.org/10.1037/a0023871>

Increased Frequencies of –174G and –572C *IL6* Alleles in Populations of Indigenous Peoples of Siberia Compared to Russians

L. E. Tabikhanova^{1, *}, L. P. Osipova¹, T. V. Churkina¹, S. S. Kovalev¹,
M. L. Filipenko², and E. N. Voronina²

¹The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russian

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russian

*e-mail: tabikhan@bionet.nsc.ru

The study of immune response and inflammation gene polymorphism in a genogeographic context is a relevant direction in the study of human populations. Here, in the indigenous populations of Siberia the frequen-

cies of polymorphic variants –174G/C (rs1800795) и –572C/G (rs1800796) of the *IL6* gene encoding the proinflammatory cytokine IL-6 were determined. For the first time, it was shown that the frequencies of –174G and –572C alleles, which determine increased inflammatory response and also associated with several diseases were statistically significantly higher in ethnic groups of Buryats, Teleuts, Yakuts, Dolgans and Tuvinians than in Russians living in Siberia. These values were in the intermediate position between those in European and East-Asian groups. We suppose the adaptive role of these *IL6* genetic variants in the human settlement from Africa to the Eurasian continent. However, due to the departure from the traditional way of life and increasing anthropogenic environmental pollution, the risk of diseases whose pathogenesis is based on inflammation in indigenous Siberian populations is probably increased.

Keywords: cytokines, *IL6*, genetic polymorphism, rs1800795, rs1800796, real-time PCR, Siberian indigenous peoples, Buryats, Teleuts, Yakuts, Dolgans, Tuvinians, Russians

ЭВОЛЮЦИОННАЯ, ПОПУЛЯЦИОННАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНОМИКА, ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.2

ПРОФИЛИРОВАНИЕ микроРНК (8-мерных), НАЦЕЛЕННЫХ НА ГЕНЫ, СВЯЗАННЫЕ С РАЗВИТИЕМ САХАРНОГО ДИАБЕТА ТИПА 2 И ГИПЕРТРОФИИ СЕРДЦА¹

© 2023 г. К. Hussain^a, A. Ishtiaq^a, I. Mushtaq^a, I. Murtaza^a, *

^aSignal Transduction Laboratory, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Quaid-i-Azam University, Islamabad, 45320 Pakistan

*e-mail: irambch@qau.edu.pk

Поступила в редакцию 23.05.2022 г.

После доработки 26.07.2022 г.

Принята к публикации 26.07.2022 г.

Сахарный диабет типа 2 (СД2) и гипертрофия сердца входят в первую десятку причин смертности во всем мире. СД2 и гипертрофия сердца — тесно связанные друг с другом хронические заболевания, ведущие к таким тяжелым осложнениям, как инсульт, инфаркт миокарда, ретинопатия, нефропатия и ампутация конечностей. Стратегии, основанные на анализе микроРНК (miR), наряду с другими подходами, считаются наиболее эффективными для раннего выявления хронических заболеваний, а также могут использоваться в терапии СД2 и сердечной гипертрофии. Так, проведены клинические испытания эффективности микроРНК в терапии опухолей. МикроРНК представляют собой одноцепочечные (некодирующие) последовательности из 20–22 нуклеотидов, которые комплементарно связываются со своей мРНК-мишенью, подавляя экспрессию белка на посттранскрипционном уровне. Для проверки генов, связанных с заболеванием, и сортировки общих для двух заболеваний микроРНК, таких как miR-30-5p, 101-3p.2, 190-5p, 506-3p, 9-5p, 128-3p, 137, 96-5p, 7-5p, 107, 101-3p.1, 98-5p, 124-3p.2, 124-3p.1, 16-5p, 15-5p, 497-5p, 424-5p, 195-5p, 1271-5p, let-7-5p, используют такие биоинформатические базы данных, как OMIM, реестр тестирования генов (GTR), TargetScan и ShinyGO. С помощью этих баз данных проводят также поиск микроРНК, мишени которых найдены более чем в одном гене, связанном с заболеванием, в каждом патологическом состоянии. При гипертрофии сердца к таким микроРНК относятся miR-19-3p, 183-5p.2, 153-3p, 372-3p, 302-3p, 520-3p, 373-3p, 129-5p, 144-3p, 139-5p, а в случае СД2 — miR-27-3p, 206, 1-3p, 181-5p. Эти данные могут быть полезными при выборе микроРНК для исследовательских проектов. Однако это потребует дополнительной валидации с использованием анализа экспрессии микроРНК, применения миметиков микроРНК и анти-микроРНК, чтобы проверить их потенциал при гипертрофии сердца и СД2.

Ключевые слова: микроРНК, сахарный диабет типа 2, гипертрофия сердца, нефропатия

DOI: 10.31857/S0026898423020088, **EDN:** EEGWYK

Profiling of Targeted miRNAs (8-nt) for the Genes Involved in Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiac Hypertrophy

K. Hussain¹, A. Ishtiaq¹, I. Mushtaq¹, and I. Murtaza¹, *

¹Signal Transduction Laboratory, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Quaid-i-Azam University, Islamabad, 45320 Pakistan

*e-mail: irambch@qau.edu.pk

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) and cardiac hypertrophy (CH) are among the top ten leading cause of deaths, worldwide. T2DM and cardiac hypertrophy are the chronic diseases, have close association and direct life-threatening complications like stroke, myocardial infarction, retinopathy, nephropathy, and limb ampu-

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

tation. In addition to other medical approaches, miRNAs-based strategy is considered most efficient for early detection of chronic diseases and also has potential for the treatment of T2DM and cardiac hypertrophy like it is being used for cancer in clinical trials. MicroRNAs (miRNAs) are single stranded (non-coding) of 20 to 22 nucleotides sequences which bind to their target mRNA upon the complimentary basis, to silence the protein expression at post transcriptional level. Bioinformatic databases are used like online mendelian inheritance in man (OMIM), gene testing registry (GTR), TargetScan and ShinyGO for validation of disease linked genes and sorting the common miRNAs in both diseases, such as miR-30-5p/ 101-3p.2/ 190-5p/ 506-3p/ 9-5p/ 128-3p/ 137/ 96-5p/ 7-5p/ 107/ 101-3p.1/ 98-5p/ 124-3p.2/ 124-3p.1/ 16-5p/ 15-5p/ 497-5p/ 424-5p/ 195-5p/ 1271-5p, let-7-5p. Aforementioned databases were also used for the miRNAs which have more than one disease linked genes target in each pathological condition. Such miRNAs for cardiac hypertrophy are: miR-19-3p/ 183-5p.2/ 153-3p/ 372-3p/ 302-3p/ 520-3p/ 373-3p/ 129-5p/ 144-3p/ 139-5p and for T2DM are: miR-27-3p/ 206/ 1-3p/ 181-5p. This finding would be helpful for the appropriate selection of miRNAs and to design applicable research project in future. It will require more validation by using the miRNAs expression analysis, mimic, and anti-miRNA approach to check their potential against cardiac hypertrophy and T2DM.

Keywords: miRNAs, type 2 diabetes mellitus, cardiac hypertrophy, nephropathy

ЭВОЛЮЦИОННАЯ, ПОПУЛЯЦИОННАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНОМИКА, ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 575.116.4:577.25:612.143:616-092.9

ГЕНЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПОВЫШЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС ЛИНИИ НИСАГ К СТРЕССУ

© 2023 г. Л. А. Федосеева^{a, 1}, С. Э. Смоленская^{a, 1}, А. Л. Маркель^{a, b}, О. Е. Редина^{a, *}

^aИнститут цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

^bНовосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: oredina@ngs.ru

Поступила в редакцию 02.08.2022 г.

После доработки 16.08.2022 г.

Принята к публикации 22.08.2022 г.

Крысы линии НИСАГ с наследуемой индуцируемой стрессом артериальной гипертензией характеризуются повышенной стресс-реактивностью гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпатoadреналовой систем. Изучены генетические основы повышенной восприимчивости гипертензивных крыс НИСАГ к воздействию стресса. Секвенирование транскриптомов надпочечников гипертензивных крыс линии НИСАГ и нормотензивных крыс WAG выявило девять дифференциально экспрессирующихся генов в локусе хромосомы X, ассоциация которого с приростом уровня артериального давления и концентрации кортикостерона в плазме крови при воздействии мягкого эмоционального стресса, а также с увеличенным весом надпочечников у крыс НИСАГ была показана ранее. Анализ функций белков, кодируемых этими генами, позволил предположить, что в локусе хромосомы X геном, с наибольшей вероятностью связанным с повышенным уровнем стресс-чувствительности крыс НИСАГ, может быть ген *Sms*, кодирующий сперминсинтазу.

Ключевые слова: гипертония, стресс, надпочечник, RNA-Seq, крысы линии НИСАГ

DOI: 10.31857/S0026898423020076, **EDN:** EEDYSX

ВВЕДЕНИЕ

Эмоциональный стресс активирует симпатoadреналовую и гипоталамо-гипофизарно-адренортикальную системы, вызывая повышение уровня кортикостерона и адреналина в плазме крови [1]. Крысы линии НИСАГ с наследуемой индуцируемой стрессом артериальной гипертензией характеризуются повышенной стресс-реактивностью гипоталамо-гипофизарно-адренортикальной и симпатoadреналовой систем [2]. Крысы НИСАГ получены в результате селекции из аутбредного стока крыс Wistar по признаку значительного повышения уровня артериального давления (АД) в ответ на действие мягкого эмоционального стресса, обусловленного получасовым ограничением подвижности (рестрикцией) в тесной проволочной клетке [3]. Базаль-

ный уровень АД у крыс НИСАГ, составляющий 170–175 мм рт. ст., в условиях рестрикционного стресса резко повышается до 200–220 мм рт. ст., что является отличительной особенностью крыс этой линии. У контрольных нормотензивных крыс линии WAG (Wistar Albino Glaxo) такой стресс не вызывает статистически значимого изменения уровня АД.

Анализ локусов количественных признаков (QTL, quantitative trait locus), проведенный нами ранее с использованием самцов F₂ (НИСАГ × WAG) в возрасте 3–4 мес., позволил выявить генетические локусы, ассоциированные с проявлением ряда физиологических и патофизиологических особенностей фенотипа гипертензивных крыс линии НИСАГ. В том числе определены три QTL (на хромосомах 11, 15 и X), присутствие аллелей крыс НИСАГ в которых ассоциировано с увеличением уровня АД при воздействии рестрикционного стресса [4]. В этих районах хромосом могут находиться гены, обуславливающие повышение АД при стрессе. Логично предположить, что некоторые из этих генов могут быть ключевыми для формирования гипертензивного статуса у крыс НИСАГ.

¹ Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы. Сокращения: НИСАГ — линия крыс с наследуемой индуцируемой стрессом артериальной гипертензией; WAG — линия крыс Wistar Albino Glaxo; АД — артериальное давление; QTL — локус количественных признаков; ДЭГ — дифференциально экспрессирующиеся гены; ПЦР — полимеразная цепная реакция; RGD — база данных Rat Genome Database.

С целью определения генов-кандидатов часто используют поиск дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), локализованных в QTL, что существенно увеличивает вероятность выявления генов, вовлеченных в контроль изучаемых фенотипических характеристик [5, 6]. Однако найти связь некоторых признаков, в том числе и изучаемого нами признака прироста уровня АД при стрессе, с уровнем экспрессии определенных генов напрямую практически невозможно. Эта проблема решается через определение вспомогательного фенотипа (intermediate phenotype), т.е. признака, который имеет отношение к регуляции проявления основного признака и картируется в те же генетические районы хромосом. Использование вспомогательного фенотипа значительно повышает вероятность нахождения искомых генов, включая гены с плейотропным эффектом на изучаемые признаки [7].

Из трех локусов, ассоциированных с увеличением уровня АД при стрессе, ковариация с другими признаками, изучаемыми в нашей работе и физиологически связанными с регуляцией АД, найдена только для QTL на хромосоме X. Этот локус, ассоциированный с повышением уровня АД при стрессе, перекрывается с локусами, ассоциированными с такими признаками, как “прирост концентрации кортикостерона в плазме крови при стрессе” и “вес надпочечников” [4]. Присутствие аллелей НИСАГ в данном локусе ассоциировано со статистически значимым увеличением значений всех трех признаков.

Нейроэндокринные изменения, вызванные стрессом, могут влиять на уровень АД и другие признаки, в том числе и на морфометрические показатели ряда органов-мишеней [8–10]. Надпочечник считается ключевым звеном в развитии реакции на стрессовые воздействия [11]. В надпочечнике синтезируются кортикостероидные гормоны и катехоламины, которые регулируют большой спектр жизненно важных функций организма, включая ответ на стрессовые стимулы, водно-солевой гомеостаз, сердечно-сосудистую систему, а также уровень АД [12, 13]. Учитывая, что размер надпочечников может быть связан с продукцией важнейших гормонов, таких как кортикостерон [14–16], альдостерон [17] и адреналин, можно предположить, что в найденном нами на хромосоме X локусе действительно могут находиться гены, участвующие в генетическом контроле активности надпочечника, способные приводить как к изменению его веса, так и влиять на увеличение концентрации гормонов и уровня АД при стрессе. Выявление таких генов-кандидатов и стало целью данной работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. В работе использовали самцов крыс гипертензивной линии НИСАГ/Icgn (Наследуемая Индуцируемая Стрессом Артериаль-

ная Гипертензия) и нормотензивной линии WAG/GSto-Icgn (Wistar Albino Glaxo) в возрасте 3 мес. Работа выполнена на базе Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН. Крыс содержали в стандартных условиях, воду и сбалансированный корм давали без ограничения. Базальное систолическое АД измеряли непрямым методом на хвосте (tail-cuff method) при легком эфирном наркозе, чтобы избежать эмоционального стресса, связанного с проведением измерения. Измерение АД при стрессе проводили на ненаркотизированных крысах после помещения их на 30 мин в проводочную клетку-цилиндр (рестрикционный стресс). Анализ транскриптома (RNA-Seq) проводили в группах из трех животных. Уровень базального систолического АД у этих крыс НИСАГ составил 171.7 ± 1.22 мм рт. ст., а у крыс WAG 116.33 ± 1.86 мм рт. ст. Подтверждение результатов RNA-Seq методом ПЦР с детекцией в реальном времени (РВ-ПЦР) проводили в группах из семи животных. Уровень базального систолического АД составил 174.3 ± 1.3 мм рт. ст. у крыс НИСАГ и 122.1 ± 1.8 мм рт. ст. у крыс WAG. Во всех экспериментах крыс декапитировали через 6 дней после измерения АД, выделяли надпочечники и хранили их в RNA Later (“Qiagen”, США) при -70°C до использования.

Эксперименты выполнены в соответствии с Международными правилами проведения работ с использованием животных и одобрены комитетом по биоэтике ИЦиГ СО РАН.

RNA-Seq проводили как описано ранее [18]. Надпочечники крыс пересылали в ЗАО “Гено-аналитика” (Россия), где проводили пробоподготовку, полногеномное секвенирование транскриптома и биоинформатический анализ данных для определения ДЭГ. Все образцы анализировали как биологические повторы.

Фракцию мРНК получали из общей РНК с использованием набора Dynabeads mRNA Purification Kit (“Ambion”, США) согласно протоколу фирмы. Библиотеки кДНК получали с использованием NEBNext mRNA Library Prep Reagent Set for Illumina (“New England Biolabs”, США). Секвенирование библиотек кДНК проводили на платформе Illumina (более 10 млн ридов для каждого образца). Файлы в формате “fastq” использовали для картирования на референсный геном (Rnor_5.0\|rn5), представленный на сайте Rat Genome Sequencing Consortium (RGSC), при помощи программы TopHat2 [19]. Аннотацию генов проводили в базе данных NCBI RefSeq. Качество картированных данных оценивали с использованием модуля CollectRnaSeqMetrics в пакете программ Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). С помощью программ Cufflinks/Cuffdiff определяли уровни экспрессии ге-

Таблица 1. Праймеры, использованные в ПЦР с детекцией в режиме реального времени

Символ гена	Праймеры, 5' → 3'		Длина ПЦР-фрагмента, п.н.
	прямой	обратный	
<i>Gapdh</i>	GTGCCAGCCTCGTCTCATA	TCGTTGATGGCAACAATGTCC	123
<i>Rpl30</i>	CATCTTGGCGTCTGATCTTG	TCAGAGTCTGTTTGTACCCC	143
<i>Sms</i>	GTGAAGCGATTACCACCCATA	CCAAGTCACTCTCTGCCAAAT	205
<i>Tmem35a</i>	GGACTATCAAGTTGACCCCCA	AGGGTCATGACAATGCCACA	172

нов и оценивали различия между ними [20] с учетом поправки на множественные сравнения. Гены относили к ДЭГ при значении $q < 0.05$. Ассоциацию ДЭГ с заболеваниями определяли с использованием данных, представленных в базе Rat Genome Database (RGD, <http://rgd.mcw.edu/>). Определение однонуклеотидных полиморфизмов описано в [21].

QTL-анализ. Проведение QTL-анализа описано ранее [4]. Работу проводили на самцах крыс F₂ (НИСАГ × WAG) в возрасте 3 мес. ($n = 103$). Анализ сцепления проводили с помощью программ MAPMAKER/EXP 3.0 и MAPMAKER/QTL 1.1.

РВ-ПЦР. Суммарную РНК выделяли из надпочечников крыс и обрабатывали ДНКазой с помощью набора SV Total RNA Isolation system (“Promega”, США) согласно рекомендациям производителя. Обратную транскрипцию проводили в растворе объемом 50 мкл, содержащем 1 мкг выделенной РНК, 0.25 нмоль праймеров (N₉ — случайные нонануклеотидные праймеры, “Биосан”, Россия), 36 мкл буфера для обратной транскрипции и 40 ед. акт. обратной транскриптазы MoMLV (“Вектор-Бест”, Россия) и 0.4 мМ смеси dNTP. кДНК синтезировали в течение 1 ч при 37°C, затем 30 мин при 42°C и 10 мин при 50°C. Фермент инактивировали, прогревая смесь в течение 5 мин при 75°C. Из каждого образца отбирали и смешивали по 5 мкл кДНК. Усредненный раствор использовали в РВ-ПЦР в качестве кДНК-стандарта для построения калибровочных кривых.

РВ-ПЦР проводили на амплификаторе iQ5 (“Bio-Rad”, США) с использованием красителя SYBR Green I. Олигонуклеотидные праймеры подбирали с помощью программы PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), их последовательности приведены в табл. 1.

Протокол РВ-ПЦР: прогрев 1 мин, 95°C; далее 40 основных циклов — 15 с при 95°C, 20 с при 63°C, 20 с при 72°C. Флуоресценцию продуктов ПЦР регистрировали в течение 10 с при 83°C; кривую плавления записывали в интервале от 63 до 94°C. В качестве генов сравнения использовали гены *Gapdh* и *Rpl30*. ПЦР проводили не менее 2 раз с каждым образцом кДНК. По калибровочным кривым, полученным с использованием разведений кДНК-стандарта, определяли относи-

тельное содержание изучаемых кДНК. Эту величину для целевых генов относили к среднему геометрическому значению количества кДНК генов сравнения в тех же образцах, определяя межлинейные различия в уровнях экспрессии изучаемых генов.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью *t*-теста Стьюдента с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Данные представлены в виде средних арифметических значений и ошибки среднего ($M \pm SEM$), уровень экспрессии у контрольных крыс линии WAG принят за 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Описание эффектов аллелей крыс НИСАГ и WAG в локусе хромосомы X, ассоциированном с приростом уровня АД при стрессе, с весом надпочечников, а также с приростом концентрации кортикостерона в плазме крови при стрессе, представлено в табл. 2.

Надпочечник — один из основных органов, которому уделяют внимание при изучении комплексной природы развития гипертонической болезни, либо изменений нейроэндокринного профиля в ответ на стрессовые воздействия [22–24]. Учитывая взаимное расположение локусов, представленных на рис. 1, можно предположить, что в обсуждаемом нами районе хромосомы X могут находиться несколько генов, ассоциированных с изучаемыми признаками. Эти гены могут быть тесно сцепленными и оказывать влияние на какой-либо из перечисленных признаков, но существует вероятность нахождения в первой половине локуса также и генов с плеiotропным действием на все три признака. Во второй половине локуса могут находиться гены с плеiotропным действием на два признака (вес надпочечников и прирост уровня АД при стрессе).

Результаты RNA-Seq-анализа позволили выявить в этом локусе девять генов, дифференциально экспрессирующихся в надпочечниках крыс НИСАГ и WAG (табл. 3). Уровень транскрипции семи из них в надпочечниках крыс НИСАГ был ниже, чем у крыс WAG. Локализация ДЭГ в QTL показана на рис. 1.

Таблица 2. Эффекты аллелей крыс НИСАГ и WAG в QTL, ассоциированных с признаками вес надпочечников, прирост АД и концентрации кортикостерона в плазме крови при стрессе, в группе самцов F₂ (НИСАГ × WAG) в возрасте 3–4 мес.

Маркер в пике локуса, Mb ^Δ	Протяженность локуса, Mb ^Δ	LOD-балл	P chromosome-wise	Генотип	
				H/H	W/W
				<i>M</i> ± SEM <i>n</i>	<i>M</i> ± SEM <i>n</i>
Прирост АД					
DXRat93—DXRat34 (88.6—101.5)	42—118	2.30	0.025	38.2 ± 3.0** 44	25.9 ± 2.4 57
Вес надпочечников					
DXRat93 (88.6)	34—116	1.78	0.05	37.61 ± 0.75** 44	34.90 ± 0.59 58
Прирост концентрации кортикостерона в плазме крови					
DXRat26- DXRat93 (45.1—88.6)	28—126	1.62	0.05	2.48 ± 0.11* 43	2.11 ± 0.10 57

H/H — гомозигота по аллелям крыс НИСАГ; W/W — гомозигота по аллелям крыс WAG; ^ΔMb — млн п. н.; **p* < 0.05, ***p* < 0.01 — по сравнению с W/W.

В базе данных RGD гены, представленные в табл. 3, не аннотированы как гены, ассоциированные с гипертонической болезнью. Однако известно, что несколько генов (*Sms*, *Pnpla4*, *Nexmif*) связаны с развитием заболеваний нервной системы, а ген *Gk* ассоциирован с развитием сосудистых заболеваний.

Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что только мРНК гена *Prrgl* содержит за-

мену в 3'-нетранслируемой области (rs199067204, 26T > C), которая встречается не только у крыс НИСАГ, но и у нескольких других как гипертензивных, так и нормотензивных линий крыс [21]. Соответственно, эта замена не должна быть ассоциирована с развитием гипертонии у крыс НИСАГ.

Для выявления возможных генов-кандидатов, ассоциированных с изучаемыми признаками, рассмотрим известные функции генов, диффе-

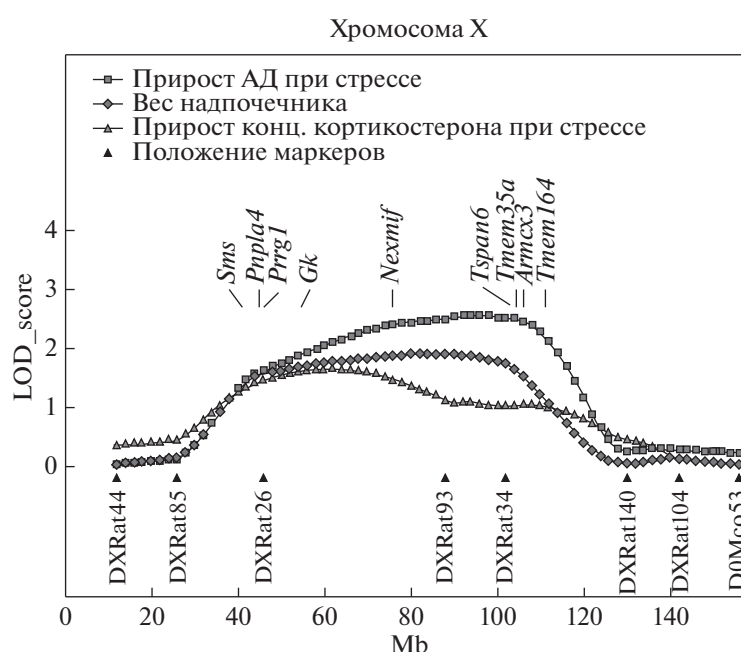


Рис. 1. Локализация генов, дифференциально экспрессирующихся в надпочечниках крыс НИСАГ и WAG, на хромосоме X в QTL, ассоциированном с весом надпочечников, с увеличением концентрации кортикостерона в плазме крови при стрессе и с увеличением уровня АД при стрессе. Mb — млн.п.н. от начала хромосомы.

Таблица 3. Гены, дифференциально экспрессирующиеся в надпочечниках крыс НИСАГ и WAG и локализованные в QTЛ на хромосоме X, ассоциированным с весом надпочечников, с повышением концентрации кортикостерона в плазме крови при стрессе, а также с повышением уровня АД при стрессе

Символ гена	ID гена	Положение гена, млн п.н.*	Уровень экспрессии у крыс НИСАГ, ФРКМ	Уровень экспрессии у крыс WAG, ФРКМ	НИСАГ/WAG, log ₂ (кратность изменения)	q	Кодируемый белок
<i>Sms</i> [#]	363469	40.7	19.68	28.66	−0.54	0.027	Сперминсинтаза (spermine synthase)
<i>Pnpla4</i> ^Δ	363471	45.7	5.01	2.79	0.84	0.042	Белок 4, содержащий пататин-подобный фосфолипазный домен (patatin-like phospholipase domain-containing 4)
<i>Prrgl</i>	363472	45.9	5.07	8.36	−0.72	0.018	Богатый пролином белок 1, содержащий Gla-домен (proline rich and Gla domain 1)
<i>Gkl</i> ^Δ	79223	54.4	1.68	2.61	−0.63	0.043	Глицеринкиназа (glycerol kinase)
<i>Nexmf</i> [#]	302396	75.7	7.12	9.81	−0.46	0.048	Фактор удлинения и миграции нейритов (neurite extension and migration factor)
<i>Tspan6</i>	302313	104.6	18.03	28.71	−0.67	0.002	Тетраспанин 6 (tetraspanin 6)
<i>Tmem35a</i>	308134	105.0	2.6	1.5	0.75	0.052	Трансмембранный белок 35a (transmembrane protein 35a)
<i>Armcx3</i>	367902	105.4	33.18	48.07	−0.53	0.018	X-сцепленный белок 3 с повтором armadillo repeat containing, X-linked 3
<i>Tmem164</i>	367763	112.4	24.89	34.63	−0.48	0.038	Трансмембранный белок 164 (transmembrane protein 164)

*Положение генов на хромосоме X (млн.п.н. от начала хромосомы).
#Гены, ассоциированные с заболеваниями нервной системы.
ΔГены, ассоциированные с развитием сосудистых заболеваний.
ФРКМ — fragments per kilobase of transcript per million mapped reads.

ренциально экспрессирующихся в надпочечниках крыс НИСАГ и WAG и локализованных в QTL на хромосоме X.

Ген *Sms* кодирует сперминсинтазу, которая синтезирует спермин, используя спермидин в качестве субстрата [25]. Спермидин и спермин относятся к полиаминам, которые индуцируются в ответ на воздействие таких стрессирующих факторов, как изменение осмолярности, нагревание, активные формы кислорода, ультрафиолет, психологический стресс. Спермин предотвращает образование супероксида, оказывая антиокислительное и противовоспалительное действие [26]. Показано, что спермин может противодействовать эффектам синтетического глюкокортикоида дексаметазона в гепатоцитах [27] и ингибировать индуцированный дексаметазоном апоптоз тимоцитов [28].

Считается, что полиамины могут опосредовать ответ на стресс путем позитивной регуляции экспрессии генов, участвующих в ответе на стрессовые факторы, что может объяснять их протективное действие против различных видов стресса [29]. Спермидин и спермин играют важную роль в регуляции ионных каналов, включая каналы, опосредующие возбуждающую синаптическую передачу в мозге млекопитающих, каналы, регулирующие мембранный потенциал и гомеостаз ионов калия в клетках всего организма, а также каналы, которые влияют на внутриклеточные сигнальные пути кальция и транспорт ионов натрия [30–32]. Спермин более эффективно взаимодействует с каналами, чем спермидин, поэтому снижение количества или активности сперминсинтазы и изменение соотношения этих двух полиаминов может влиять на уровень сигнала или мембранный потенциал во многих клетках, что, в свою очередь, может влиять на состояние всего организма [25].

Учитывая это, можно предположить, что снижение уровня транскрипции гена *Sms* может приводить к уменьшению количества сперминсинтазы и, возможно, спермина, что будет снижать способность организма противодействовать эффектам глюкокортикоидов, увеличивать уровень окислительного стресса, а также нарушать регуляцию работы ионных каналов. Известно, что все эти эффекты провоцируют повышение уровня АД и развитие гипертензии [33, 34].

Мутации в гене *SMS* человека, приводящие к снижению активности сперминсинтазы, вызывают развитие X-сцепленного синдрома Снайдера–Робинсона (Snyder–Robinson syndrome) [25], для которого характерны различные патологические проявления, включая гипотонию, судороги и остеопороз [35]. Эти факты подтверждают, что сперминсинтаза вовлечена в регуляцию АД. Роль кортизола в развитии синдрома Снайдера–Робинсона до настоящего времени не изучена, но

известно, что на развитие остеопороза может влиять повышенный уровень кортизола (гиперкортицизм) [36], а судороги часто сопровождаются состоянием стресса и увеличением уровня кортизола (для обзора см. [37]). На моделях синдрома Снайдера–Робинсона показано, что дефицит сперминсинтазы приводит к нарушению функций митохондрий, вызывает дисфункцию лизосом и окислительный стресс [38].

Снижение активности сперминсинтазы, как правило, сопровождается накоплением спермидина. Физиологические последствия этого процесса в настоящее время не до конца понятны и во многом противоречивы. У крыс Dahl с солечувствительной гипертензией (Dahl salt-sensitive rats) обогащение пищевого рациона спермидином приводило к снижению системного АД и уменьшению гипертрофии сердца [39]. Однако в исследованиях, проведенных на моделях синдрома Снайдера–Робинсона, при накоплении спермидина в условиях сниженной активности сперминсинтазы наблюдается аномальный катаболизм спермидина, что приводит к генерации токсичных метаболитов, вызывающих дефекты лизосом и окислительный стресс [38].

Данные о функциональной роли сперминсинтазы позволяют нам предположить, что снижение уровня транскрипции гена *Sms* в надпочечниках крыс НИСАГ, вероятно, может увеличивать стресс-чувствительность организма и влиять на все три признака, ассоциированные нами с локусом на хромосоме X. Статистически значимое снижение уровня транскрипции гена *Sms* в надпочечниках крыс НИСАГ подтверждено методом РВ-ПЦР (рис. 2).

Ген *Pnpla4* кодирует фермент, обладающий фосфолипазной [40] и трансацилазной [41] активностями. Он вовлечен в регуляцию гомеостаза триглицеридов в клетках [40] и способствует накоплению в них ретиновых эфиров [41], предшественников ретинола и ретиноевой кислоты [42]. Ретиновые эфиры являются формой запасаения витамина А. Известно, что глюкокортикоиды увеличивают концентрацию ретинола и ретинолсвязывающих белков в плазме крови за счет снижения концентраций витамина А, ретинола и ретиновых эфиров в органах (легкие и печень), которые выполняют функцию депо для этих веществ [43]. Снижение концентрации ретиновых эфиров при воздействии стресса (ультрафиолетовое облучение) показано и в эпидермисе мышей [44]. Продолжительный иммобилизационный стресс приводит к увеличению веса надпочечника и снижению концентрации ретинола в плазме крови и ретиновых эфиров в некоторых тканях [45]. Однако хронический иммобилизационный стресс вызывает тканезависимые изменения содержания витамина А. В отличие от

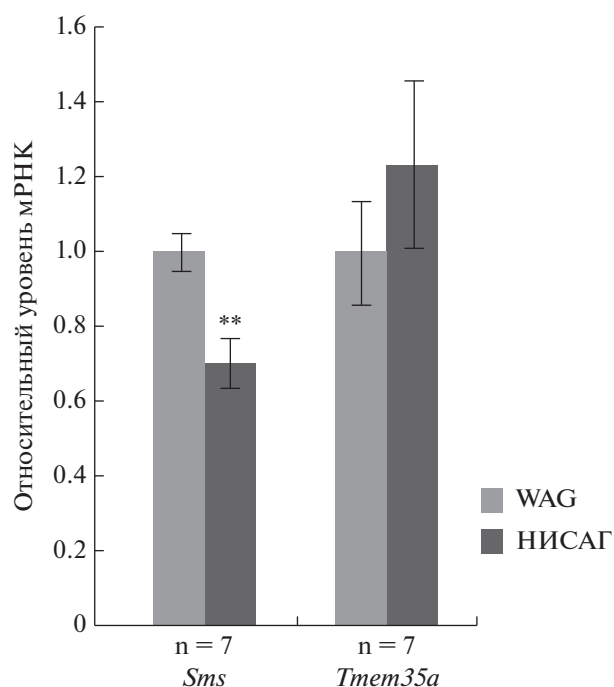


Рис. 2. Сравнение уровня транскрипции генов в надпочечниках гипертензивных крыс НИСАГ и контрольных крыс WAG. ** $p = 0.004$.

других тканей (печень, почки) в надпочечниках крыс, подвернутых хроническому иммобилизационному стрессу, наблюдали аккумуляцию витамина А [46]. Отмеченное нами повышение уровня транскрипции гена *Pnpla4* у крыс НИСАГ хорошо согласуется с этими данными. Мы можем предполагать, что увеличение экспрессии *Pnpla4* может быть связано с генетически детерминированным повышением активности коры надпочечников у крыс НИСАГ, т.е. быть следствием стрессовой ситуации, направленным на восстановление гомеостаза, но не причиной повышения стресс-чувствительности крыс НИСАГ.

Функции белка, кодируемого геном *Prrg1*, изучены недостаточно, однако показано, что уровень транскрипции *Prrg1* увеличивается при экспериментально индуцированном процессе кальцификации сосудов крыс [47]. В эпителиальных клетках глаза человека уровень транскрипции гена *Prrg1* повышается при воздействии дексаметазона [48]. Таким образом, маловероятно, что снижение уровня транскрипции гена *Prrg1* может быть связано с увеличением стресс-реактивности. Скорее наоборот, можно предположить, что снижение уровня транскрипции гена *Prrg1* в надпочечниках крыс НИСАГ по сравнению с WAG может быть компенсаторным и направленным на смягчение процессов, вызванных генетически детерминированным повышением активности гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы у крыс НИСАГ.

Ген *Gk* кодирует глицеринкиназу, недостаток которой приводит к дисфункции надпочечников. Дефицит глицеринкиназы, возникающий в результате делеции, рассматривают как рецессивное заболевание, сцепленное с X хромосомой, при котором наблюдается задержка развития, адренкортикальная недостаточность и гипоплазия надпочечников [49]. Таким пациентам для коррекции состояния требуется экзогенное введение стероидов и соли. Известно, что недостаток глицеринкиназы приводит к снижению синтеза глицерофосфолипидов и, соответственно, стероидогенеза, а также лимитирует превращение холестерина в прегненолон — предшественник глюкокортикоидов, синтезируемых в коре надпочечников. При этом снижение продукции кортизола сопровождается снижением сигнала обратной связи, поступающего в гипофиз, что приводит к увеличению синтеза АКТГ и гипертрофии пучковой зоны надпочечников. Снижение синтеза минералокортикоидов в клубочковой зоне надпочечников может приводить к развитию гипонатриемии [50]. Показано, что делеция гена глицеринкиназы приводит к развитию гиперлипидемии [51]. Количество мРНК и активность глицеринкиназы хорошо коррелируют между собой и регулируются симпатической нервной системой [52]. Учитывая все сказанное, можно предположить, что снижение уровня транскрипции гена *Gk*, показанное в нашей работе, может быть адаптивным и способствовать снижению как уровня синтеза стероидов, так и реабсорбции ионов натрия и, соответственно, препятствовать чрезмерному повышению АД у крыс НИСАГ.

Функции белка, кодируемого геном *Nexmif*, связаны с развитием нервной системы. У носителей мутации данного гена наблюдается снижение интеллекта [53, 54]. Показано, что экспериментально смоделированная потеря функции этого гена в культивируемых нейронах гиппокампа крыс приводит к нарушению роста дендритов и аксонов, что предполагает участие гена в развитии нейронов и функциях мозга [53]. У некоторых пациентов с мутациями в гене *Nexmif*, наряду с когнитивными нарушениями, наблюдаются гипотония и стероидзависимый нефротический синдром [55], который поддается лечению кортикостероидами. Таким образом, функции белка, кодируемого геном *Nexmif*, могут быть связаны как с уровнем кортикостерона, так и с регуляцией уровня АД у крыс НИСАГ, однако, найденное нами снижение уровня транскрипции этого гена у крыс НИСАГ предполагает, что его действие может быть направлено на снижение уровня кортикостерона и АД, но не на увеличение стресс-чувствительности.

Ген *Tspan6* кодирует белок тетраспанин 6, влияющий на свойства постсинаптической мембраны. Функции тетраспанина 6 в надпочечниках

неизвестны. В гиппокампе мышей с нокаутом гена *Tspan6* усиливается синаптическая передача и снижается долгосрочное потенцирование [56], что, как считают, может быть следствием постоянно повышенного базального уровня синаптической трансмиссии. Такой эффект “закупоренного” синапса наблюдается при повышении уровня синтеза белков, усиливающих синаптическую передачу [57, 58]. Зависит ли уровень экспрессии тетраспанина 6 от уровня глюкокортикоидов и может ли этот белок участвовать в регуляции АД не установлено, однако показано, что тетраспанин 6 участвует в регуляции нескольких сигнальных путей [59, 60], что делает ген *Tspan6* потенциально интересным для дальнейшего изучения.

Изменения в концентрации ионов натрия вызывают ряд функциональных и структурных изменений в клубочковой зоне коры надпочечников, затрагивающих синтез альдостерона, симпатическую иннервацию, а также размеры клубочковой зоны. Эти процессы сопровождаются координированным изменением уровня синтеза белка TUF1, кодируемого геном *TMEM35* [17]. Увеличение количества мРНК *TMEM35* наблюдали в клетках клубочковой зоны коры надпочечников и после воздействия ангиотензина II [17]. *Tmem35* признан важным фактором, необходимым для нормальной активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы; делеция этого гена влияет на функционирование систем, ассоциированных с ответом на рестрикционный стресс [61]. Обнаруженное нами повышение уровня транскрипции гена *Tmem35a* в надпочечниках крыс НИСАГ по сравнению с WAG хорошо согласуется с повышенным уровнем ангиотензина II в плазме крови крыс НИСАГ [62]. Согласно известным функциям белка, кодируемого геном *Tmem35a*, этот ген можно рассматривать как ген-кандидат, ассоциированный как с приростом уровня АД при стрессе, так и с изменением веса надпочечников крыс НИСАГ. Однако различия в уровне транскрипции гена *Tmem35a*, установленные методом RNA-Seq, характеризуются пограничным уровнем статистической значимости (табл. 3), а результаты РВ-ПЦР выявили значительную вариабельность измерений, что при 20%-ной межлинейной разнице в уровне транскрипции не позволило говорить о значимых межлинейных различиях в уровне транскрипции гена *Tmem35a* (рис. 2). Вероятно, сложность подтверждения значимости различий может быть связана с низким уровнем экспрессии данного гена (табл. 3). Тем не менее, существует мнение, что даже небольшие изменения в уровне экспрессии генов могут быть причиной значительных биологических эффектов [63]. В связи с этим, вероятно, все же следует обратить внимание на ген *Tmem35a*, как на потенциальный ген-кандидат для дальней-

шего изучения его роли в развитии стресс-чувствительной гипертензии у крыс НИСАГ.

Белок, кодируемый геном *Armcx3*, является интегральным мембранным белком, функции которого изучены недостаточно. Известно, что этот белок локализован на мембране митохондрий и регулирует их перемещение и распределение в нейронах [64]. Этот белок относится к маркерам старения, уровень его экспрессии с возрастом снижается [65]. О возможной связи гена *Armcx3* с регуляцией уровня АД можно судить по результатам работы, в которой показано, что в условиях экспериментально индуцированной гипертензии (2-Kidney 1-Clip) уровень экспрессии гена *Armcx3* в средней мозговой артерии кроликов снижался статистически значимо [66].

Ген *Tmem164* кодирует трансмембранный белок, функции которого изучены недостаточно и не ассоциированы с регуляцией уровня АД.

Обсуждение известных функций белков, кодируемых генами, представленными в табл. 3, показывает, что наиболее вероятным геном-кандидатом в локусе на хромосоме X, ассоциированном с повышенной стресс-чувствительностью крыс НИСАГ, можно считать ген *Sms*, кодирующий сперминсинтазу. Однако протяженность описанного нами локуса предполагает, что в нем могут находиться несколько генов, ассоциированных с генетическим контролем проявления изучаемых признаков (вес надпочечника, прирост концентрации кортикостерона и уровня АД при воздействии эмоционального стресса). Согласно нашему обсуждению, дальнейшего исследования заслуживает еще один ген — *Tmem35a*. Кроме того, функции ряда рассмотренных нами генов в надпочечниках изучены слабо либо не изучены совсем. Возможно, дальнейшее их исследование позволит выявить дополнительные гены, связанные с повышенной чувствительностью к стрессу.

Авторы выражают благодарность ЗАО “Гено-аналитика” (Россия) за помощь в секвенировании транскриптома и выполнение первичного биоинформатического анализа.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект № 22-14-00082).

В работе соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lin W., Wang W., Shao F. (2003) New animal model of emotional stress: behavioral, neuroendocrine and immunological consequences. *Chinese Sci. Bull.* **48**, 1565–1568.

2. Markel A.L., Redina O.E., Gilinsky M.A., Dymshits G.M., Kalashnikova E.V., Khvorostova Y.V., Fedoseeva L.A., Jacobson G.S. (2007) Neuroendocrine profiling in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension. *J. Endocrinol.* **195**, 439–450.
3. Markel A.L. (1992) Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension. *Genet. Hypertens.* **218**, 405–407.
4. Redina O.E., Smolenskaya S.E., Maslova L.N., Markel A.L. (2013) The genetic control of blood pressure and body composition in rats with stress-sensitive hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* **35**, 484–495.
5. Lee S.J., Liu J., Qi N., Guarnera R.A., Lee S.Y., Cicila G.T. (2003) Use of a panel of congenic strains to evaluate differentially expressed genes as candidate genes for blood pressure quantitative trait loci. *Hypertens. Res.* **26**, 75–87.
6. Hoffman P., Tabakoff B. (2005) Gene expression in animals with different acute responses to ethanol. *Addict. Biol.* **10**, 63–69.
7. Jacob H.J., Kwitek A.E. (2002) Rat genetics: attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 33–42.
8. Markel A.L., Maslova L.N., Shishkina G.T., Bulygina V.V., Machanova N.A., Jacobson G.S. (1999) Developmental influences on blood pressure regulation in ISIAH rats. *Dev. Hypertens. Phenotype: Basic Clin. Stud.* **19**, 493–526.
9. Tamashiro K.L., Nguyen M.M., Ostrander M.M., Gardner S.R., Ma L.Y., Woods S.C., Sakai R.R. (2007) Social stress and recovery: implications for body weight and body composition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**, R1864–R1874.
10. de Souza D.B., Silva D., Silva C.M.C., Sampaio F.J.B., Costa W.S., Cortez C.M. (2011) Effects of immobilization stress on kidneys of Wistar male rats: a morphometrical and stereological analysis. *Kidney Blood Press. Res.* **34**, 424–429.
11. Antonov Y.V., Alexandrovich Y.V., Redina O.E., Gilinsky M.A., Markel A.L. (2016) Stress and hypertensive disease: adrenals as a link. Experimental study on hypertensive ISIAH rat strain. *Clin. Exp. Hypertens.* **38**, 415–423.
12. De Champlain J., Van Ameringen M.R. (1972) Regulation of blood pressure by sympathetic nerve fibers and adrenal medulla in normotensive and hypertensive rats. *Circ. Res.* **31**, 617–628.
13. Lewicka S., Nowicki M., Vecsei P. (1998) Effect of sodium restriction on urinary excretion of cortisol and its metabolites in humans. *Steroids.* **63**, 401–405.
14. Skelton F.R., Bernardis L.L. (1966) Effect of age, sex, hypophysectomy and gonadectomy on plasma corticosterone levels and adrenal weights following the administration of ACTH and stress. *Experientia.* **22**, 551–552.
15. Tizabi Y., Aguilera G. (1992) Desensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis following prolonged administration of corticotropin-releasing hormone or vasopressin. *Neuroendocrinology.* **56**, 611–618.
16. Willenberg H.S., Bornstein S.R., Dumser T., Ehrhart-Bornstein M., Barocka A., Chrousos G.P., Scherbaum W.A. (1998) Morphological changes in adrenals from victims of suicide in relation to altered apoptosis. *Endocr. Res.* **24**, 963–967.
17. Tran P.V., Georgieff M.K., Engeland W.C. (2010) Sodium depletion increases sympathetic neurite outgrowth and expression of a novel *TMEM35* gene-derived protein (TUF1) in the rat adrenal zona glomerulosa. *Endocrinology.* **151**, 4852–4860.
18. Fedoseeva L.A., Klimov L.O., Ershov N.I., Alexandrovich Y.V., Efimov V.M., Markel A.L., Redina O.E. (2016) Molecular determinants of the adrenal gland functioning related to stress-sensitive hypertension in ISIAH rats. *BMC Genomics.* **17**(Suppl 14), 989.
19. Kim D., Perteau G., Trapnell C., Pimentel H., Kelley R., Salzberg S.L. (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* **14**, R36.
20. Trapnell C., Hendrickson D.G., Sauvageau M., Goff L., Rinn J.L., Pachter L. (2013) Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat. Biotechnol.* **31**, 46–53.
21. Ершов Н.И., Маркель А.Л., Редина О.Е. (2017) Однонуклеотидные полиморфизмы, специфичные для гипертензивных крыс линии НИСАГ. *Бюхимия.* **82**, 344–356.
22. Friese R.S., Mahboubi P., Mahapatra N.R., Mahata S.K., Schork N.J., Schmid-Schonbein G.W., O'Connor D.T. (2005) Common genetic mechanisms of blood pressure elevation in two independent rodent models of human essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* **18**, 633–652.
23. Romero D.G., Plonczynski M.W., Welsh B.L., Gomez-Sanchez C.E., Zhou M.Y., Gomez-Sanchez E.P. (2007) Gene expression profile in rat adrenal *zona glomerulosa* cells stimulated with aldosterone secretagogues. *Physiol. Genomics.* **32**, 117–127.
24. Liu X., Serova L., Kvetnansky R., Sabban E.L. (2008) Identifying the stress transcriptome in the adrenal medulla following acute and repeated immobilization. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1148**, 1–28.
25. Pegg A.E., Michael A.J. (2010) Spermine synthase. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 113–121.
26. Løvaas E. (1995) Hypothesis: spermine may be an important epidermal antioxidant. *Med. Hypotheses.* **45**, 59–67.
27. Pittner R.A., Bracken P., Fears R., Brindley D.N. (1986) Spermine antagonises the effects of dexamethasone, glucagon and cyclic AMP in increasing the activity of phosphatidate phosphohydrolase in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* **207**, 42–46.
28. Hegardt C., Andersson G., Oredsson S.M. (2001) Different roles of spermine in glucocorticoid- and Fas-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* **266**, 333–341.
29. Rhee H.J., Kim E.J., Lee J.K. (2007) Physiological polyamines: simple primordial stress molecules. *J. Cell. Mol. Med.* **11**, 685–703.
30. Fleidervish I.A., Libman L., Katz E., Gutnick M.J. (2008) Endogenous polyamines regulate cortical neuronal excitability by blocking voltage-gated Na⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 18994–18999.
31. Kurata H.T., Diraviyam K., Marton L.J., Nichols C.G. (2008) Blocker protection by short spermine analogs:

- refined mapping of the spermine binding site in a Kir channel. *Biophys. J.* **95**, 3827–3839.
32. Pegg A.E. (2009) Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*. **61**, 880–894.
 33. Vaziri N.D., Wang X.Q., Oveisi F., Rad B. (2000) Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension*. **36**, 142–146.
 34. Lou Y., Zhang F., Luo Y., Wang L., Huang S., Jin F. (2016) Serum and glucocorticoid regulated kinase 1 in sodium homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, pii: E1307.
 35. Schwartz C.E., Peron A., Kutler M.J. (1993–2022) Snyder-Robinson syndrome. In: GeneReviews.® Eds Adam M.P., Everman D.B., Mirzaa G.M., Pagon R.A., Wallace S.E., Bean L.J.H., Gripp K.W., Amemiya A. [Internet]. Seattle (WA): Univ. Washington, Seattle.
 36. Chiodini I., Scillitani A. (2008) Role of cortisol hypersecretion in the pathogenesis of osteoporosis. *Recenti Prog. Med.* **99**, 309–313.
 37. Cano-Lopez I., Gonzalez-Bono E. (2019) Cortisol levels and seizures in adults with epilepsy: a systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **103**, 216–229.
 38. Li C., Brazill J.M., Liu S., Bello C., Zhu Y., Morimoto M., Cascio L., Pauly R., Diaz-Perez Z., Malicdan M.C.V., Wang H., Boccuto L., Schwartz C.E., Gahl W.A., Borkerkoel C.F., Zhai R.G. (2017) Spermine synthase deficiency causes lysosomal dysfunction and oxidative stress in models of Snyder-Robinson syndrome. *Nat. Commun.* **8**, 1257.
 39. Huynh K. (2017) Basic research: cardioprotective benefits of dietary spermidine. *Nat. Rev. Cardiol.* **14**, 65.
 40. Hermansson M., Hänninen S., Hokynar K., Somerharju P. (2016) The PNPLA-family phospholipases involved in glycerophospholipid homeostasis of HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta*. **1861**, 1058–1065.
 41. Gao J.G., Shih A., Gruber R., Schmuth M., Simon M. (2009) GS2 as a retinol transacylase and as a catalytic dyad independent regulator of retinyl ester accretion. *Mol. Genet. Metab.* **96**, 253–260.
 42. O'Byrne S.M., Blaner W.S. (2013) Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *J. Lipid Res.* **54**, 1731–1743.
 43. Georgieff M.K., Radmer W.J., Sowell A.L., Yeager P.R., Blaner W.S., Gunter E.W., Johnson D.E. (1991) The effect of glucocorticosteroids on serum, liver, and lung vitamin A and retinyl ester concentrations. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **13**, 376–382.
 44. Sorg O., Tran C., Carraux P., Didierjean L., Saurat J. (1999) Retinol and retinyl ester epidermal pools are not identically sensitive to UVB irradiation and anti-oxidant protective effect. *Dermatology*. **199**, 302–307.
 45. Takase S., Goda T., Yokogoshi H., Hoshi T. (1992) Changes in vitamin A status following prolonged immobilization (simulated weightlessness). *Life Sci.* **51**, 1459–1466.
 46. Nakano K., Morita A. (1982) Redistribution of vitamin A in tissues of rats with imposed chronic confinement stress. *Br. J. Nutr.* **47**, 645–652.
 47. Jiang Z.M., Wu X.J., Liu Y., Du X.H., Shen S.J., Xu L.Y., Sun W.X. (2013) Changes of gene expression profiles across different phases of vascular calcification in rats. *Genet. Mol. Res.* **12**, 5945–5957.
 48. Gupta V., Galante A., Soteropoulos P., Guo S., Wagner B.J. (2005) Global gene profiling reveals novel glucocorticoid induced changes in gene expression of human lens epithelial cells. *Mol. Vis.* **11**, 1018–1040.
 49. Korkut S., Baştuğ O., Raygada M., Hatipoğlu N., Kurtoglu S., Kendirci M., Lyssikatos C., Stratakis C.A. (2016) Complex glycerol kinase deficiency and adrenocortical insufficiency in two neonates. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* **8**, 468–471.
 50. Seltzer W.K., Firminger H., Klein J., Pike A., Fennessey P., McCabe E.R. (1985) Adrenal dysfunction in glycerol kinase deficiency. *Biochem. Med.* **33**, 189–199.
 51. Huq A.H., Lovell R.S., Ou C.N., Beaudet A.L., Craig W.J. (1997) X-linked glycerol kinase deficiency in the mouse leads to growth retardation, altered fat metabolism, autonomous glucocorticoid secretion and neonatal death. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1803–1809.
 52. Festuccia W.T., Guerra-Sá R., Kawashita N.H., Garófalo M.A., Evangelista E.A., Rodrigues V., Kettelhut I.C., Migliorini R.H. (2003) Expression of glycerokinase in brown adipose tissue is stimulated by the sympathetic nervous system. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **284**, R1536–1541.
 53. Van Maldergem L., Hou Q., Kalscheuer V.M., Rio M., Doco-Fenzy M., Medeira A., de Brouwer A.P., Cabrol C., Haas S.A., Cacciagli P., Moutton S., Landais E., Motte J., Colleaux L., Bonnet C., Villard L., Dupont J., Man H.Y. (2013) Loss of function of *KIAA2022* causes mild to severe intellectual disability with an autism spectrum disorder and impairs neurite outgrowth. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 3306–3314.
 54. de Lange I.M., Helbig K.L., Weckhuysen S., Møller R.S., Velinov M., Dolzhanskaya N., Marsh E., Helbig I., Devinsky O., Tang S., Mefford H.C., Myers C.T., van Paesschen W., Striano P., van Gassen K., van Kempen M., de Kovel C.G., Piard J., Minassian B.A., Nezarati M.M., Pessoa A., Jacquette A., Maher B., Balestrini S., Sisodiya S., Warde M.T., De St Martin A., Chelly J., EuroEPINOMICS-RES MAE working group, van 't Slot R., Van Maldergem L., Brilstra E.H., Koeleman B.P. (2016) *De novo* mutations of *KIAA2022* in females cause intellectual disability and intractable epilepsy. *J. Med. Genet.* **53**, 850–858.
 55. Kuroda Y., Ohashi I., Naruto T., Ida K., Enomoto Y., Saito T., Nagai J., Wada T., Kurosawa K. (2015) Delination of the *KIAA2022* mutation phenotype: two patients with X-linked intellectual disability and distinctive features. *Am. J. Med. Genet. A*. **167**, 1349–1353.
 56. Salas I.H., Callaerts-Vegh Z., Arranz A.M., Guix F.X., D'Hooge R., Esteban J.A., De Strooper B., Dotti C.G. (2017) Tetraspanin 6: a novel regulator of hippocampal synaptic transmission and long term plasticity. *PLoS One*. **12**, e0171968.
 57. Zhong L., Cherry T., Bies C.E., Florence M.A., Gerges N.Z. (2009) Neurogranin enhances synaptic strength through its interaction with calmodulin. *EMBO J.* **28**, 3027–3039.
 58. Stein V., House D.R., Bredt D.S., Nicoll R.A. (2003) Postsynaptic density-95 mimics and occludes hippocampal long-term potentiation and enhances long-term depression. *J. Neurosci.* **23**, 5503–5506.
 59. Matsuda A., Suzuki Y., Honda G., Muramatsu S., Matsuzaki O., Nagano Y., Doi T., Shimotohno K., Ha-

- rada T., Nishida E., Hayashi H., Sugano S. (2003) Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF- κ B and MAPK signaling pathways. *Oncogene*. **22**, 3307–3318.
60. Wang Y., Tong X., Omoregie E.S., Liu W., Meng S., Ye X. (2012) Tetraspanin 6 (*TSPAN6*) negatively regulates retinoic acid-inducible gene I-like receptor-mediated immune signaling in a ubiquitination-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **287**, 34626–34634.
 61. Kennedy B.C., Dimova J.G., Dakoji S., Yuan L.L., Gewirtz J.C., Tran P.V. (2016). Deletion of novel protein TMEM35 alters stress-related functions and impairs long-term memory in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **311**, R166–178.
 62. Дубинина А.Д., Антонов Е.В., Федосеева Л.А., Пивоварова Е.Н., Маркель А.Л., Иванова Л.Н. (2016) Ренин-ангиотензин-альдостероновая система у крыс линии НИСАГ (ISIAH) со стресс-индуцированной артериальной гипертензией. *Вавиловский журн. генетики и селекции*. **20**, 954–958.
 63. Sato S., Hasegawa M., Fujimoto M., Tedder T.F., Takehara K. (2000) Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J. Immunol.* **165**, 6635–6643).
 64. López-Doménech G., Serrat R., Mirra S., D'Aniello S., Somorjai I., Abad A., Vitteira N., García-Arumí E., Alonso M.T., Rodríguez-Prados M., Burgaya F., Andreu A.L., García-Sancho J., Trullas R., García-Fernández J., Soriano E. (2012) The Eutherian *Armcx* genes regulate mitochondrial trafficking in neurons and interact with Miro and Trak2. *Nat. Commun.* **3**, 814.
 65. Althubiti M., Lezina L., Carrera S., Jukes-Jones R., Giblett S.M., Antonov A., Barlev N., Saldanha G.S., Pritchard C.A., Cain K., Macip S. (2014) Characterization of novel markers of senescence and their prognostic potential in cancer. *Cell Death Dis.* **5**, e1528.
 66. Ong W.Y., Ng M.P., Loke S.Y., Jin S., Wu Y.J., Tanaka K., Wong P.T. (2013) Comprehensive gene expression profiling reveals synergistic functional networks in cerebral vessels after hypertension or hypercholesterolemia. *PLoS One*. **8**, e68335.

Genes Associated with Increased Stress Sensitivity in Hypertensive ISIAH Rats

L. A. Fedoseeva¹, S. E. Smolenskaya¹, A. L. Markel^{1, 2}, and O. E. Redina^{1, *}

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: oredina@ngs.ru

ISIAH rats with inherited stress-induced arterial hypertension are characterized by increased stress reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal and sympathoadrenal systems. The aim of this work was to study the genetic basis of increased susceptibility to stress in hypertensive ISIAH rats. Sequencing of the adrenal transcriptomes of hypertensive ISIAH and normotensive WAG rats revealed 9 differentially expressed genes (DEGs) in the X chromosome locus, which was previously associated with an increase in blood pressure and plasma corticosterone concentrations under mild emotional stress, and also with increased adrenal weight in ISIAH rats. An analysis of the functions of the proteins encoded by these DEGs suggested that the *Sms* gene encoding spermine synthase is the most likely candidate gene in the X chromosome locus associated with an increased level of stress susceptibility in ISIAH rats.

Keywords: hypertension, stress, adrenal gland, RNA-Seq, ISIAH rat strain

ЭВОЛЮЦИОННАЯ, ПОПУЛЯЦИОННАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНОМИКА, ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.214

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С КАЛЬЦИЕВЫМИ ПРОЦЕССАМИ В ГИППОКАМПЕ МЫШЕЙ, ПОД ВЛИЯНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА¹

© 2023 г. М. Б. Павлова^а *, Д. А. Смагин^б, Н. Н. Кудрявцева^б, Н. А. Дюжикова^а, **

^аИнститут физиологии им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 199034 Россия

^бИнститут цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: pavlova@infran.ru

**e-mail: dyuzhikova@infran.ru

Поступила в редакцию 05.08.2022 г.

После доработки 24.08.2022 г.

Принята к публикации 07.09.2022 г.

Используя данные полного транскриптомного анализа, исследовали изменение экспрессии генов, кодирующих белки, вовлеченные в процессы кальциевой регуляции, в гиппокампе самцов мышей с симптомами депрессии, вызванными хроническим социальным стрессом. Экспрессия генов *Cacna1g*, *Cacnb3*, *Camk1g*, *Camk2d*, *Camk2n2*, *Caly*, *Caln1*, *S100a16*, *Slc24a4* в гиппокампе депрессивных животных была выше, а экспрессия генов *Cacna2d1*, *Cacng5*, *Grin2a*, *Calm2* — ниже, чем в контроле. Наибольшее число значимых корреляционных взаимосвязей выявлено между экспрессией гена *Calm2*, имеющего наибольшую транскрипционную активность, и других дифференциально экспрессируемых генов. Предполагается, что под влиянием хронического социального стресса происходит нарушение кальциевой сигнализации в гиппокампе мышей. Обсуждается участие в этом процессе гена *Calm2* и генов *Camk1g*, *Camk2d* и *Camk2n2*.

Ключевые слова: дифференциально экспрессируемые гены, кальциевая сигнализация, хронический социальный стресс, депрессивноподобное состояние, гиппокамп, мыши

DOI: 10.31857/S0026898423020192, **EDN:** EEDPRC

ВВЕДЕНИЕ

Депрессия — многофакторное заболевание, вызванное взаимодействием социальных, психологических и физиологических факторов, является одним из наиболее распространенных психических расстройств [1]. Молекулярно-генетическим механизмам депрессии посвящено большое количество исследований. Активно ведутся поиски генов, ассоциированных с депрессией [2–4]. Многообразие выявляемых генов согласуется с представлением о депрессии, как о сложном гетерогенном заболевании, включающем самые разнообразные нейрофизиологические процессы [5–7].

Известно, что механизмы большинства психоэмоциональных расстройств, в том числе депрессии [8–10] и неврологических заболеваний [11–15], связаны с нарушениями кальциевого гомеостаза в центральной нервной системе. Показано, что ионы кальция регулируют различные процессы нормальной жизнедеятельности клетки [16, 17].

Они выполняют функцию вторичных посредников, запуская важнейшие внутриклеточные сигнальные каскады в ответ на внешние стимулы [18] посредством взаимодействия с кальций-связывающим белком кальмодулином [19–21]. При этом в нервной ткани кальциевая сигнализация играет особую роль в деполяризации мембраны и в синаптической активности [22, 23], обеспечивая пластичность нейронов, процессы обучения и памяти [24].

Различные заболевания, вызванные нарушением кальциевых процессов, принято обозначать общим термином кальциопатии. А нарушения в работе потенциалзависимых кальциевых каналов, вызванные дисфункцией субъединиц ионного канала и/или регулирующих их белков, называют кальциевыми каналопатиями, которые, наряду с дисфункцией регуляторных путей и митохондрией, составляют основу кальциопатий [25].

Важную роль в механизмах психических расстройств, в частности депрессии [15, 26, 27], играет гиппокамп — один из центральных отделов лимбической системы, непосредственно участвующий в процессах нейрогенеза, формирования

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898423020192 для авторизованных пользователей.

эмоций, консолидации памяти, в реакции организма на стресс [28, 29]. Поэтому цель нашей работы состояла в выявлении генов, экспрессия которых в гиппокампе изменяется под влиянием хронического социального стресса и которые кодируют белки, принимающие участие в регуляции кальциевых процессов. Мы использовали данные транскриптомного анализа (RNA-seq) гиппокампа самцов мышей, находившихся под влиянием хронического социального стресса, приводящего к развитию депрессивноподобного состояния [30, 31].

Предполагалось, что изучение степени и направленности изменений экспрессии отдельных генов, связанных с кальциевыми процессами в клетках гиппокампа, позволит приблизиться к пониманию Ca^{2+} -зависимых молекулярных механизмов формирования депрессивноподобного состояния у мышей, вызванного влиянием хронического социального стресса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. Эксперименты проводили на половозрелых самцах мышей линии C57BL/6J в возрасте 2.5–3 мес. и массой тела 26–28 г. Воду и корм (гранулы) животные получали в достаточном количестве. Световой режим был равен 12 : 12 ч. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с международными правилами и стандартами работы с животными (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes). Протокол эксперимента № 9 одобрен Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Март, 24, 2010, N 613).

Формирование депрессивноподобного состояния у самцов мышей. Депрессивноподобное состояние формировали, используя модель хронического социального стресса [31, 32]. Животных попарно помещали в экспериментальные клетки, разделенные пополам прозрачной перегородкой с отверстиями, что позволяло мышам видеть, слышать, воспринимать запахи друг друга (сенсорный контакт), но предотвращало физическое взаимодействие. Ежедневно во второй половине дня (с 15 до 17 ч) перегородку убрали, что приводило к агонистическим взаимодействиям. В течение первых 2–3 дней выявляли победителей, ежедневно демонстрирующих агрессивное поведение, и особей, терпящих поражение при взаимодействии с одним и тем же партнером. В дальнейшем ежедневно побежденного самца после теста пересаживали в новую клетку к незнакомому агрессивному партнеру, сидящему за перегородкой. Если интенсивные атаки со стороны нападающей особи во время теста агонистических взаимодействий длились более 3 мин, то взаимодействие самцов прекращали, устанавливая между

ними перегородку во избежание повреждения партнера. В других случаях тест продолжали до 10 мин. После 3 нед эксперимента у самцов с повторным опытом социальных поражений развивалось депрессивноподобное состояние [31].

Для нейрогеномного исследования отбирали животных с отрицательным опытом поражений и выраженным депрессивным расстройством, сопровождающимся тревогой, страхом, сниженной двигательной активностью (далее — депрессивные мыши). В качестве альтернативного варианта для выявления специфики изменений использовали также животных контрастной социальной группы — с положительным опытом побед в межсамцовых конфронтациях, показывающих агрессивное поведение (далее — агрессивные мыши) во время теста.

Опытные группы депрессивных и агрессивных мышей декапитировали на следующий день после последней конфронтации. Контролем служили самцы без последовательного опыта агонистических взаимодействий. Гиппокампы выделяли согласно анатомическому атласу Allen Mouse Brain Atlas [<http://mouse.brain-map.org/static/atlas>] один и тот же исследователь. Все пробы маркировали, помещали в раствор для предотвращения деградации РНК (RNAlater) и хранили при температуре -70°C до секвенирования.

Транскриптомный анализ. Образцы гиппокампа самцов мышей отправляли в ЦКП “Геноаналитика” для секвенирования транскриптома (<http://genoanalytica.ru/>, Москва, Россия). Анализировали по три животных каждой группы. Секвенировали каждый образец отдельно. мРНК выделяли с использованием набора Dynabeads RNA Purification Kit (“Ambion”, США). Библиотеки кДНК конструировали с использованием протокола NEBNext для Illumina (“NEB”, США). Библиотеки кДНК секвенировали на платформе Illumina HiSeq 1500 (“Illumina Sequencing”, США). В последующий анализ брали только аннотированные гены. Уровень экспрессии генов оценивали в единицах FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) с использованием программы Cufflinks.

Категории генных онтологий списков дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ) определяли с использованием биоинформатического Интернет-ресурса. Дифференциально экспрессируемыми считали гены, уровень экспрессии которых статистически значимо различался ($p < 0.05$) при сравнении депрессивных и контрольных мышей; агрессивных и контрольных; депрессивных и агрессивных. Решение о статистической значимости различий принимали также с использованием поправки на множественные сравнения (q -значения — p -значения, скорректированные по методу Беньямини–Хохберга (FDR)). Катего-

Таблица 1. ДЭГ, участвующие в регуляции кальциевых процессов в гиппокампе мышей с альтернативным опытом социального поведения

Ген	Кодируемый белок*	Д vs К	А vs К	Д vs А
<i>Cacna1a</i>	Кальциевый канал, потенциалзависимый, тип P/Q, альфа-1А субъединица		▼	Δ
<i>Cacna1b</i>	Кальциевый канал, потенциалзависимый, N-тип, альфа-1В субъединица			Δ
<i>Cacna1g</i>	Кальциевый канал, потенциалзависимый, Т-тип, альфа-1G субъединица	ΔΔΔ		ΔΔΔ*
<i>Cacna1h</i>	Кальциевый канал, потенциалзависимый, Т-тип, альфа-1H субъединица			ΔΔ*
<i>Cacna1i</i>	Кальциевый канал, потенциалзависимый, альфа-1I субъединица			Δ
<i>Cacna2d1</i>	Кальциевый канал, потенциалзависимый, альфа-2/дельта-1 субъединица	▼		▼▼▼*
<i>Cacnb1</i>	Кальциевый канал, потенциалзависимый, бета-1 субъединица			Δ
<i>Cacnb3</i>	Кальциевый канал, потенциалзависимый, бета-3 субъединица	Δ		ΔΔΔ*
<i>Cacng2</i>	Кальциевый канал, потенциалзависимый, гамма-2 субъединица		▼▼	ΔΔΔ*
<i>Cacng3</i>	Кальциевый канал, потенциалзависимый, гамма-3 субъединица			Δ
<i>Cacng5</i>	Кальциевый канал, потенциалзависимый, гамма-5 субъединица	▼		▼▼▼*
<i>Calb1</i>	Кальбиндин 1, кальций-связывающий белок			▼
<i>Calcoco1</i>	Кальций-связывающий белок 1, домен со свернутыми спиралями			Δ
<i>Calm2</i>	Кальмодулин 2, кальций-связывающий белок	▼		▼
<i>Caln1</i>	Кальнейрон 1, кальций-связывающий белок 8	Δ		ΔΔ*
<i>Caly</i>	Кальцион, нейронспецифический везикулярный трансмембранный белок	Δ		
<i>Camk1g</i>	Кальций/кальмодулинзависимая протеинкиназа I гамма	Δ		ΔΔΔ*
<i>Camk2d</i>	Кальций/кальмодулинзависимая протеинкиназа II дельта	ΔΔΔ*		ΔΔ*
<i>Camk2n2</i>	Ингибитор 2 кальций/кальмодулинзависимой протеинкиназы II	ΔΔ		ΔΔΔ*
<i>Hpcal4</i>	Гиппокальцин, подобный 4, кальций-связывающий белок			Δ
<i>Ppp3r1</i>	Протеинфосфатаза 3, кальцийнейрин В, тип I, Са/кальмодулинзависимая			▼▼
<i>S100a16</i>	S100 кальций-связывающий белок A16	ΔΔ		Δ
<i>Slc24a2</i>	Транспортный белок-переносчик ионов Na/K/Ca, семейство 24, член 2			▼
<i>Slc24a4</i>	Транспортный белок-переносчик ионов Na/K/Ca, семейство 24, член 4	Δ		
<i>Grin2a</i>	Глутаматный ионотропный рецептор NMDA 2A (проницаем для Ca ²⁺)	▼▼		▼▼
<i>Grin2c</i>	Глутаматный ионотропный рецептор NMDA 2C (проницаем для Ca ²⁺)			Δ
Всего генов	26	13	2	24

*Источник: <http://string-db.org>Примечание: Δ – повышение экспрессии: Δ – $p < 0.05$, ΔΔ – $p < 0.01$, ΔΔΔ – $p < 0.001$; ▼ – снижение экспрессии: ▼ – $p < 0.05$, ▼▼ – $p < 0.01$, ▼▼▼ – $p < 0.001$, * $q < 0.05$. Д – депрессивные мыши; К – контрольные; А – агрессивные.

рии генных онтологий списков ДЭГ оценивали с использованием Интернет-ресурсов:

1) “STRING: functional protein association networks” (<http://string-db.org>);

2) “GeneCards: The human gene database” (<https://genecards.org>);

3) “MalaCards: Human disease database” (<https://malacards.org>).

Изначально внимание в нашей работе было сконцентрировано на 75 генах, которые кодируют белки, участвующие в различных клеточных процессах, связанных с Ca²⁺ – от транспорта Ca²⁺ через ионные каналы, меняющего его внутриклеточную концентрацию – до запуска Ca²⁺/кальмодулинзависимых сигнальных каскадов посредством активации соответствующих ферментов. Список этих

генов приведен в табл. S1 (см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/2/supp_Pavlova_rus.pdf).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами обнаружены различия в наборе ДЭГ, а также в направленности и выраженности изменений экспрессии генов в гиппокампе мышей с альтернативным (негативным и позитивным) опытом социальных взаимодействий.

Экспрессия 26 из 75 проанализированных генов у депрессивных мышей значимо отличалась от экспрессии в группах контрольных и агрессивных особей (табл. 1). Эти гены кодируют функционально различные белки, участвующие

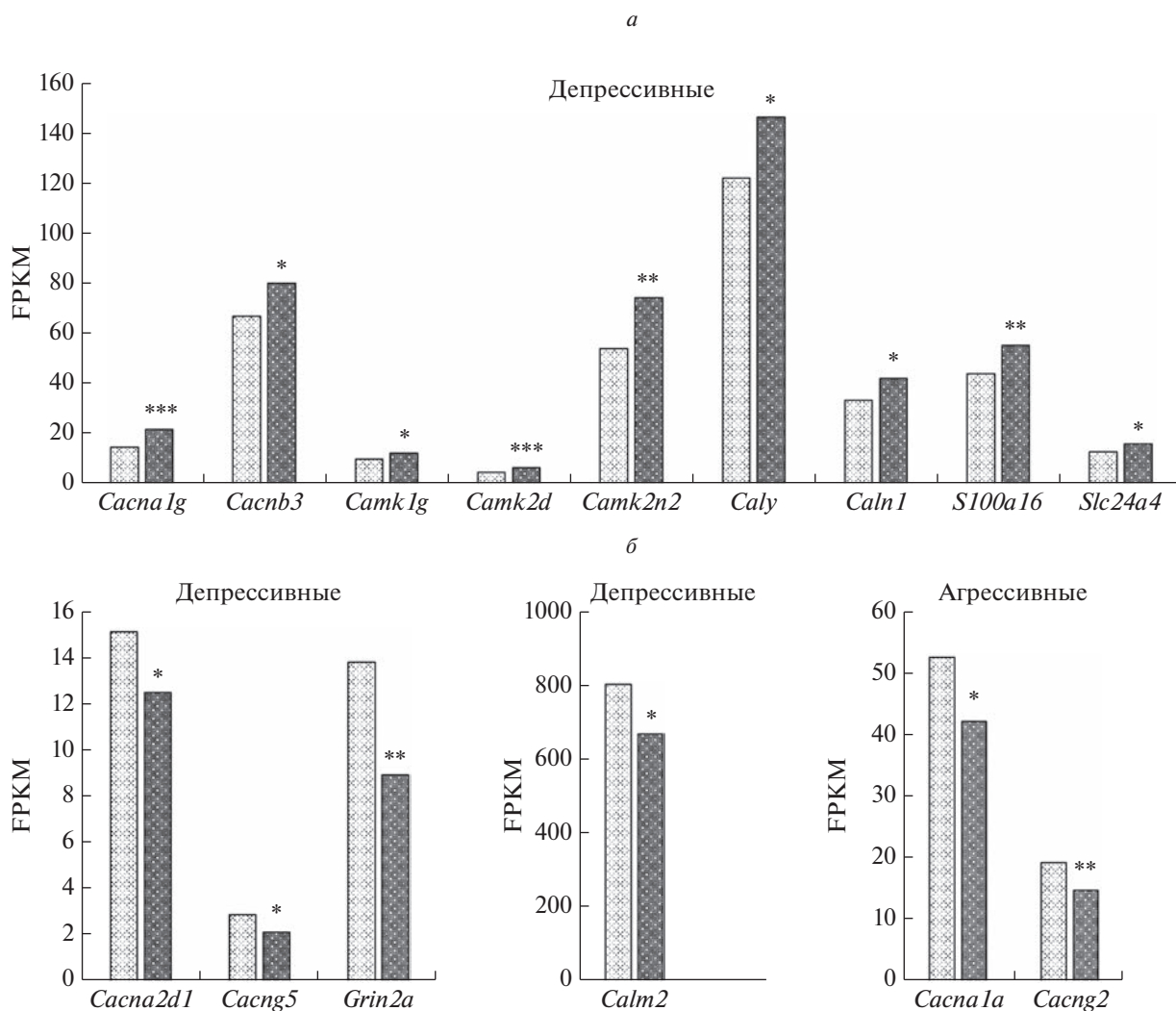


Рис. 1. Повышение (а) и понижение (б) экспрессии ДЭГ, связанных с регуляцией кальциевых процессов в гиппокампе агрессивных и депрессивных мышей. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ — по сравнению с контролем; светлый столбик — контрольные животные; темный столбик — опытные.

в процессах кальциевой сигнализации: 11 генов (*Cacna1a*, *Cacna1b*, *Cacna1g*, *Cacna1h*, *Cacna1i*, *Cacna2d1*, *Cacnb1*, *Cacnb3*, *Cacng2*, *Cacng3*, *Cacng5*) кодируют белки потенциалзависимых кальциевых каналов; семь генов (*Calb1*, *Calcoco1*, *Calm2*, *Caln1*, *Hpcal4*, *Ppp3r1*, *S100a16*) — кальций-связывающие белки; один ген (*Caly*) кодирует нейрон-специфичный белок кальцион, необходимый для максимального высвобождения Ca^{2+} ; три гена (*Camk1g*, *Camk2d*, *Camk2n2*) кодируют Ca^{2+} /кальмодулинзависимые протеинкиназы I γ , II δ и ингибитор протеинкиназы II; два гена (*Slc24a2*, *Slc24a4*) — это гены белков-переносчиков Na/K/Ca; два гена (*Grin2a*, *Grin2c*) кодируют субъединицы 2A и 2C глутаматного рецептора NMDA с высокой проницаемостью для Ca^{2+} .

Сравнение экспрессии генов у депрессивных и агрессивных мышей (Д vs А) выявило различия в

экспрессии 24 генов. Экспрессия 17 из этих генов (*Cacna1*, *Cacna1b*, *Cacna1g*, *Cacna1h*, *Cacna1i*, *Cacnb1*, *Cacnb3*, *Cacng2*, *Cacng3*, *Calcoco1*, *Caln1*, *Camk1g*, *Camk2d*, *Camk2n2*, *Hpcal4*, *S100a16*, *Grin2c*) у депрессивных животных была выше, чем у агрессивных, а остальные семь генов (*Cacna2d1*, *Cacng5*, *Calb1*, *Calm2*, *Ppp3r1*, *Slc24a2*, *Grin2a*) экспрессировались на более высоком уровне у агрессивных особей (табл. 1).

У депрессивных животных экспрессия 13 генов статистически значимо отличалась от экспрессии у контрольных животных (рис. 1; табл. 1). В частности, экспрессия 9 генов (*Cacna1g*, *Cacnb3*, *Camk1g*, *Camk2d*, *Camk2n2*, *Caly*, *Caln1*, *S100a16*, *Slc24a4*) повысилась, а четырех (*Cacna2d1*, *Cacng5*, *Grin2a*, *Calm2*) снизилась. Экспрессия двух генов (*Cacng2*, *Cacna1a*) у агрессивных животных снизилась по сравнению с контролем, не выявлены

Таблица 2. Коэкспрессия ДЭГ в гиппокампе самцов мышей[#]

Ген	<i>Cacna1g</i>	<i>Camk1g</i>	<i>Camk2n2</i>	<i>Caln1</i>	<i>Calm2</i>
<i>Cacna1g</i>	—	0.812**	0.844**	0.903***	–0.853**
<i>Cacnb3</i>	0.791*	0.796*	0.795*	0.826**	–0.845**
<i>Camk1g</i>	0.812**	—	0.891**	0.949***	–0.927***
<i>Camk2d</i>	0.678*	0.560	0.697*	0.648	–0.703*
<i>Camk2n2</i>	0.844**	0.891**	—	0.941***	–0.953***
<i>Caly</i>	0.571	0.666	0.654	0.697*	–0.784*
<i>Caln1</i>	0.903***	0.949***	0.941***	—	–0.942***
<i>S100a16</i>	0.869**	0.750*	0.719*	0.851**	–0.756*
<i>Slc24a4</i>	0.790*	0.644	0.566	0.719*	–0.704*
<i>Cacna2d1</i>	–0.634	–0.830**	–0.783*	–0.861**	0.717*
<i>Cacng5</i>	–0.317	–0.398	–0.137	–0.283	0.287
<i>Grin2a</i>	–0.670*	–0.832**	–0.812**	–0.801**	0.851**
<i>Calm2</i>	–0.853**	–0.927***	–0.953***	–0.942***	—
<i>Cacna1a</i>	0.573	0.689*	0.640	0.608	–0.614
<i>Cacng2</i>	0.620	0.826**	0.651	0.671*	–0.683*
<i>n</i>	9	10	9	11	12

[#]Представлены данные для пяти генов с максимальным количеством корреляционных связей.

Примечание. Приведены значения коэффициента корреляции Пирсона. Жирным выделены статистически значимые корреляции: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; *n* – количество значимых корреляций.

гены, экспрессия которых увеличилась под влиянием стресса (рис. 1, табл. 1).

Корреляционный анализ экспрессии 15 ДЭГ, представленных на рис. 1, выявил различия в степени и направленности корреляционных связей между ними (табл. 2; подробные данные представлены в табл. S2, см. дополнительные материалы).

Обнаружена разнонаправленная корреляционная связь между двумя группами генов, экспрессия которых изменилась у депрессивных мышей. Так ДЭГ, экспрессия которых повысилась (*Cacna1g*, *Cacnb3*, *Camk1g*, *Camk2d*, *Camk2n2*; *Caly*, *Caln1*, *S100a16*, *Slc24a4*), проявили, с одной стороны, только положительную корреляционную связь (либо ее отсутствие) между собой, а с другой – только отрицательную связь (либо ее отсутствие) с ДЭГ, экспрессия которых понизилась (*Cacna2d1*, *Cacng5*, *Grin2a*, *Calm2*). Выявлена только положительная корреляционная связь между ДЭГ со сниженной экспрессией (либо ее отсутствием). Экспрессия гена *Cacng5* не коррелировала с экспрессией других генов (табл. S2, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/2/supp_Pavlova_rus.pdf).

Выявлена положительная корреляционная связь между двумя ДЭГ кальциевых каналов (*Cacna1a* и *Cacng2*), экспрессия которых изменилась у агрессивных мышей. Эти данные свидетельствуют о том, что субъединицы белков кальциевых каналов, кодируемые этими генами, координированно

участвуют в регуляции кальциевых процессов в гиппокампе агрессивных мышей (табл. S2).

У пяти из 15 генов (*Cacna1g*, *Camk1g*, *Camk2n2*, *Caln1*, *Calm2*) мышей альтернативных поведенческих групп обнаружено максимальное количество корреляционных связей, в том числе высокозначимых ($p < 0.01$ или $p < 0.001$), между собой и с остальными генами (табл. 2). Максимальное количество корреляционных связей с другими генами выявлено у гена *Calm2*, причем большинство из этих связей были отрицательными (табл. 2).

С целью получения дополнительных сведений о характере взаимодействия этих 15 ДЭГ в регуляции кальциевых процессов проанализировали функциональные ассоциативные взаимосвязи белков, кодируемых этими генами, с использованием базы данных STRING (<http://string-db.org>). Ассоциативные взаимосвязи белков, кодируемых 11 из 15 ДЭГ, представлены на рис. 2.

Эта схема указывает на возможную ключевую роль ДЭГ *Calm2*, *Camk1g*, *Camk2d*, *Camk2n2*, а также гена *Grin2a*, кодирующего альфа-субъединицу глутаматного рецептора NMDA с высокой проницаемостью для Ca^{2+} , в формировании возможных путей регуляции работы кальциевых каналов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе впервые показано изменение экспрессии генов, кодирующих белки, связанные с регуляцией процессов кальциевой сигнализа-

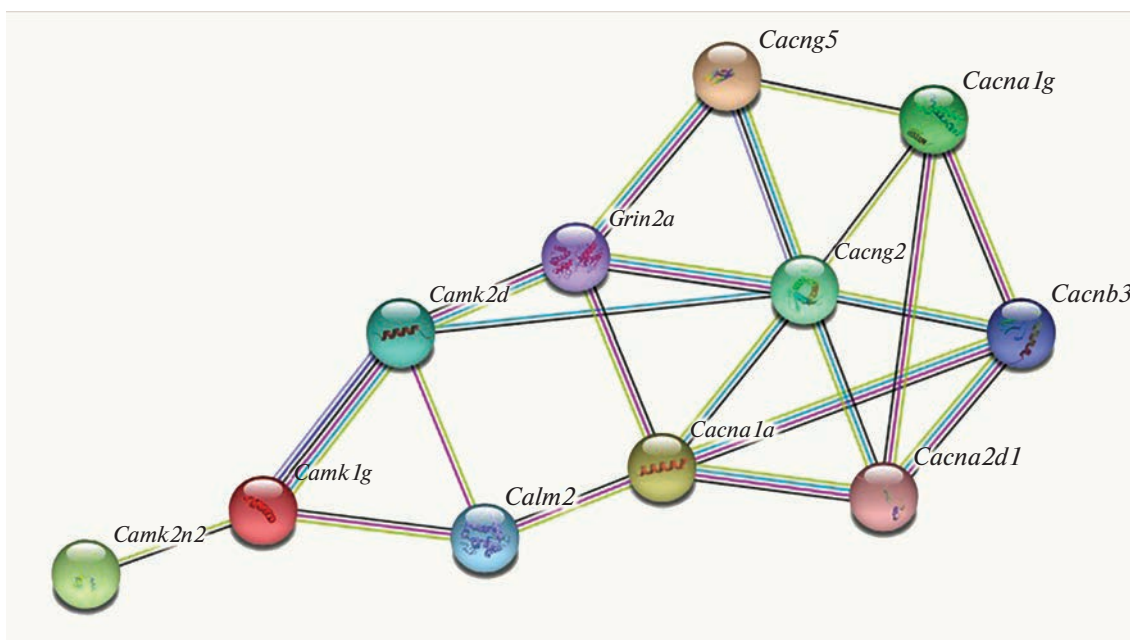


Рис. 2. Функциональные ассоциативные взаимосвязи 11 белков, кодируемых ДЭГ (по данным STRING (<http://string-db.org>)).

ции в гиппокампе самцов мышей, подвергнутых воздействию хронического социального стресса. Полученные результаты согласуются с экспериментальными свидетельствами участия гиппокампа, как одного из центральных звеньев лимбической системы мозга, в реакции организма на хронический социальный стресс [28, 29, 33, 34] и в патогенезе различных психических заболеваний — аутизма, тревожных расстройств, шизофрении и, в том числе, депрессии [26, 27, 35–39].

Нами показано, что реакция на хронический социальный стресс у животных обеих опытных групп сопровождается специфическим изменением экспрессии ассоциированных с кальциевыми процессами генов в гиппокампе. Причем картина изменений более выражена у депрессивных мышей, рассматриваемых в качестве модели депрессивной психопатологии у человека [30, 31]. Так у депрессивных животных изменилась (по сравнению с контролем) экспрессия 13 из 15 исследованных генов, а у агрессивных только двух, но экспрессия этих двух генов не изменилась у депрессивных мышей (рис. 1; табл. 1, столбцы Д vs К; А vs К).

Однако сравнение двух групп животных с альтернативным опытом социального поведения выявило различия в экспрессии 24 генов (табл. 1, столбец Д vs А). По-видимому, при сравнении агрессивных и депрессивных особей проявилась разнонаправленность изменений экспрессии в этих группах по сравнению с контролем.

Следует отметить, что эту модель использовали также для изучения экспрессии других групп генов в гиппокампе и получили схожие результа-

ты. Так, в тех же условиях в гиппокампе агрессивных мышей изменилась экспрессия пяти генов, кодирующих белки коллагена, у депрессивных — 15 генов; только два гена были общими в обеих группах животных, при этом экспрессия изменялась разнонаправленно [40]. Изучение глутаматергических генов выявило изменение экспрессии только одного из них у агрессивных мышей и семи — у депрессивных [41]. Эти результаты, наряду с фактами, полученными в данной работе, свидетельствуют о том, что депрессивные животные более подвержены негативному влиянию хронического социального стресса на экспрессию различных генов в гиппокампе.

Именно мембранные потенциалзависимые кальциевые каналы играют наиболее значимую роль в кальциевой сигнализации, поскольку проходящие через них ионы Ca^{2+} влияют на множество внутриклеточных процессов, таких как проведение электрических импульсов в нейронах, синаптическая передача, регуляция секреторных клеточных механизмов, активация Ca^{2+} -зависимых каскадных процессов, экспрессия генов [23, 42–44]. Считается, что потенциалзависимые каналы неактивны и активируются при деполяризации мембраны и сдвиге потенциала в положительную область, открывая поток ионов Ca^{2+} в клетку [45, 46]. Показано, что неконтролируемое воздействие хронического стресса изменяет структуру дендритов в гиппокампе и приводит к более высокой кальциевой нагрузке на клетки при деполяризации [28].

Нами выявлена разная направленность изменений экспрессии шести генов, кодирующих белки потенциалзависимых каналов, у животных обеих опытных групп (рис. 1), а также разные степень и направление (положительное/отрицательное) корреляционных связей этих генов между собой и с другими генами (табл. S2, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/2/supp_Pavlova_rus.pdf). Так, например, обнаружена положительная корреляционная связь экспрессии гена *Cacna1g* с 9 другими ДЭГ и увеличение экспрессии этого гена у депрессивных животных. Вместе с тем, ген *Cacna2d1* (принадлежащий к этому же семейству), экспрессия которого снизилась, связан отрицательной корреляционной зависимостью с пятью генами. Выявлено снижение экспрессии гена *Cacng5* и отсутствие его корреляционных связей с другими ДЭГ. Эти результаты не позволяют получить детальную картину совместной регуляции кальциевых процессов ДЭГ потенциалзависимых кальциевых каналов, но могут свидетельствовать о различном характере их участия в условиях хронического социального стресса.

Под влиянием хронического социального стресса, вызывающего депрессивноподобное состояние, у животных изменялась экспрессия не только генов, кодирующих белки субъединиц кальциевых каналов, но также ряда других генов, ответственных за продукцию белков, которые подключаются к процессу регуляции кальциевой сигнализации в клетке на разных ее этапах. Показано изменение экспрессии генов, кодирующих кальций-связывающие белки, в том числе кальмодулин, кальций/кальмодулинзависимые протеинкиназы, ингибитор протеинкиназы, трансмембранные белки, регулирующие поступление Ca^{2+} в клетку, белки-транспортеры (рис. 1; табл. 1).

Интересны данные, полученные для гена *Calm2*, кодирующего кальций-связывающий белок кальмодулин (кальций-модулирующий белок). Во-первых, экспрессия этого гена в гиппокампе (>800 FPKM) многократно превышает экспрессию других генов (рис. 1). Во-вторых, у этого гена обнаружено самое большое количество корреляционных связей с другими ДЭГ — 10 положительных и две отрицательных (табл. 2).

Кальмодулину, ответственному за передачу сигналов Ca^{2+} /кальмодулинзависимым протеинкиназам, принадлежит ключевая роль в патогенезе нейropsychических расстройств [47]. Активность Ca^{2+} /кальмодулинзависимых протеинкиназ наиболее выражена в тканях мозга, где они отвечают за целый ряд функций, регулируя процессы синаптической пластичности, экспрессию генов и ремоделирование цитоскелета. Обсуждается роль Ca^{2+} /кальмодулинзависимых протеинкиназ в развитии депрессии у человека и депрессивноподобных состояний у животных [48]. Показано,

что комплекс Ca^{2+} /кальмодулин способен инактивировать потенциалзависимые кальциевые каналы при поступлении избытка Ca^{2+} в клетку, что позволило ввести термин “кальмодуляция”, означающий регуляцию активности кальциевых каналов кальмодулином [49].

Снижение экспрессии гена *Calm2* и повышение экспрессии генов *Camk1g*, *Camk2d* и *Camk2n2*, функционально связанных с *Calm2*, в сочетании с выявленными корреляционными связями с другими генами свидетельствует о значительных изменениях в работе кальций/кальмодулинзависимого протеинкиназного комплекса и опосредованной им системы внутриклеточной кальциевой сигнализации в гиппокампе животных, вызванных хроническим социальным стрессом.

Полученные результаты позволяют рассматривать эти гены в качестве ключевых в регуляции кальцийзависимой сигнальной системы в гиппокампе в условиях хронического социального стресса, что косвенно подтверждается ассоциативными связями кодируемых ими белков.

Обнаруженное нами значительное снижение экспрессии гена *Grin2a* в группе депрессивных мышей дополняет картину изменений активности других ДЭГ в гиппокампе (рис. 1). Ген *Grin2a* кодирует один из белков глутамат-управляемых Ca^{2+} -проницаемых ионных каналов, он играет ключевую роль в механизмах определенных видов памяти и обучения [50]. Этот ген связан положительной корреляционной связью с геном *Calm2* и отрицательной — с шестью генами, в число которых входят гены *Camk1g*, *Camk2d*, *Camk2n2*, а также ген *Caln1*, кодирующий белок семейства кальмодулинов, что говорит о координации активности *Grin2a* и перечисленных генов в гиппокампе этой группы мышей.

Полученные нами данные могут свидетельствовать о возможности развития в гиппокампе мышей кальциопатии, в том числе кальциевой каналопатии, связанных с нарушением процессов кальциевой сигнализации под влиянием хронического социального стресса.

В настоящее время особое внимание привлекают гены, входящие в группу *Cacna*. Эти гены кодируют белки потенциалзависимых кальциевых каналов, которые рассматривают в качестве ключевых и универсальных в патогенезе целого ряда психонейропатологий [51–55]. Так, например, с аутизмом ассоциированы четыре гена — *Cacna1b*, *Cacna1g*, *Cacna1h* и *Cacna1i*, экспрессия которых, как показано в нашем исследовании, изменилась у депрессивных животных. Этот факт согласуется с результатами другой работы, выполненной на этой поведенческой модели [41, 56], в которой выявлено повышение экспрессии генов, связанных с аутистическими проявлениями у депрессивных мышей.

Таблица 3. Гены-кандидаты психонейропатологий человека, участвующие в регуляции кальциевых процессов

Ген	Психонейропатология
<i>CACNA1A</i>	Эпилепсия. Аутизм. Болезнь Хантингтона. Расстройство аутистического спектра. Шизофрения. Болезнь Паркинсона. Большое депрессивное расстройство. Биполярное расстройство. Большое аффективное расстройство. Умственная отсталость и глобальная задержка развития. Спинально-мозжечковая атаксия. Мигрень. Эпилептическая энцефалопатия
<i>CACNA1B</i>	Шизофрения. Биполярное расстройство. Синдром Тимоти. Эпилепсия. Аутизм. Расстройство аутистического спектра. Большое депрессивное расстройство. Психоз. Спинально-мозжечковая атаксия. Эпилептическая энцефалопатия
<i>CACNA1G</i>	Эпилепсия. Синдром Тимоти. Расстройство аутистического спектра. Аутизм. Паркинсонизм. Шизофрения. Эпилепсия. Умственная отсталость и глобальная задержка развития, в том числе в тяжелой форме. Спинально-мозжечковая атаксия
<i>CACNA1H</i>	Эпилепсия. Аутизм. Расстройство аутистического спектра. Синдром Тимоти. Биполярное расстройство. Шизофрения. Психоз. Умственная отсталость и глобальная задержка развития. Семейная гемиплегическая мигрень
<i>CACNA1I</i>	Эпилепсия. Шизофрения. Расстройство аутистического спектра. Болезнь Хантингтона. Умственная отсталость и глобальная задержка развития. Аутизм
<i>CACNA2D1</i>	Синдром Тимоти. Эпилепсия. Шизофрения. Расстройство аутистического спектра. Аутизм. Шизофрения. Биполярное расстройство. Большое депрессивное расстройство. Умственная отсталость и глобальная задержка развития
<i>CACNB1</i>	Расстройство аутистического спектра. Аутизм. Большое депрессивное расстройство. Эпилепсия. Болезнь Хантингтона
<i>CACNB3</i>	Биполярное расстройство. Синдром гиперактивности с дефицитом внимания
<i>CACNG2</i>	Шизофрения. Эпилепсия. Биполярное расстройство. Большое депрессивное расстройство. Умственная отсталость. Нарушение умственного развития
<i>CACNG3</i>	Эпилепсия. Расстройство аутистического спектра
<i>CACNG5</i>	Шизофрения. Биполярное расстройство. Болезнь Паркинсона. Эпилепсия
<i>CALB1</i>	Болезнь Хантингтона. Болезнь Альцгеймера. Болезнь Паркинсона. Шизофрения. Биполярное расстройство. Эпилепсия. Деменция. Расстройство аутистического спектра
<i>CALCOCO1</i>	Шизофрения. Паническое расстройство
<i>CALM2</i>	Болезнь Альцгеймера. Большое депрессивное расстройство
<i>CALN1</i>	Шизофрения. Аутизм
<i>CALY</i>	Шизофрения. Синдром гиперактивности с дефицитом внимания. Большое депрессивное расстройство. Посттравматическое стрессорное расстройство. Ментальная депрессия. Маразм. Паническое расстройство. Аутизм. Деменция. Биполярное расстройство. Расстройство аутистического спектра. Эпилепсия
<i>CAMK1G</i>	Болезнь Альцгеймера. Болезнь Хантингтона. Шизофрения
<i>CAMK2D</i>	Большое депрессивное расстройство. Болезнь Паркинсона. Эпилепсия. Шизофрения. Биполярное расстройство
<i>CAMK2N2</i>	Шизофрения. Боковой амиотрофический склероз
<i>PPP3R1</i>	Болезнь Альцгеймера. Деменция. Болезнь Паркинсона. Большое депрессивное расстройство. Спинально-мозжечковая атаксия
<i>SLC24A2</i>	Эпилепсия. Аутизм. Болезнь Альцгеймера. Расстройство аутистического спектра. Шизофрения
<i>SLC24A4</i>	Болезнь Альцгеймера. Биполярное расстройство. Деменция
<i>GRIN2A</i>	Эпилепсия. Шизофрения. Биполярное расстройство. Болезнь Хантингтона. Болезнь Альцгеймера. Аутизм. Обсессивно-компульсивное расстройство. Психоз. Ментальная депрессия. Болезнь Паркинсона. Большое аффективное расстройство
<i>GRIN2C</i>	Болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, депрессия, шизофрения. Аутизм, умственная отсталость

Мы соотнесли 26 ДЭГ, ассоциированных с кальциевой сигнализацией у мышей (табл. 1), с аналогичными генами человека, используя генетические базы данных <https://www.malacards.org/> и <https://www.genecards.org/> и опубликованные данные [54]: 24 гена, дифференциально экспрессируемые в гиппокампе мышей, связаны с нейродегенеративными и психическими заболеваниями человека (табл. 3). Сходство генов, ассоциированных с кальциевыми процессами у мышей и у человека, позволяет прогнозировать возможность обнаружения общих механизмов формирования различных психонейропатологий, а также риск развития этих патологий, с использованием установленных генетических маркеров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что гены *Calm2*, *Camk1g*, *Camk2d* и *Camk2n2*, дифференциально экспрессируемые в гиппокампе депрессивных мышей, связаны с ДЭГ потенциалзависимых кальциевых каналов и могут рассматриваться в качестве ключевых в регуляции работы этих каналов. Существенную роль может играть ген *Grin2a*, кодирующий субъединицу ионотропного глутаматного рецептора. В целом, полученные данные свидетельствуют об изменении экспрессии генов, связанных с кальциевой сигнализацией, и позволяют предположить развитие кальциопатии, в том числе кальциевой каналопатии, в гиппокампе мышей, находящихся в депрессивноподобном состоянии, формируемом под влиянием негативного опыта поражений при воздействии хронического социального стресса.

Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП “Научно-технологическое развитие Российской Федерации” (2019–2030), тема 0134-2019-0002, и ИЦиГ СО РАН в рамках БП № FWNR-2022-0019.

Работа с мышами проведена в соответствии с международными правилами и стандартами работы с животными (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes). Протокол эксперимента № 9 одобрен Комиссией по биоэтике ИЦиГ СО РАН (Март, 24, 2010, N 613).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li Z., Ruan M., Chen J., Fang Y. (2021) Major depressive disorder: advances in neuroscience research and translational applications. *Neurosci. Bull.* **37**, 863–880.
2. Lohoff F.W. (2010) Overview of the genetics of major depressive disorder. *Curr. Psychiatry Rep.* **12**, 539–546.
3. Sall S.S., Thompson W., Santos A., Dwyer D.S. (2021) Analysis of major depression risk genes reveals evolu-

- tionary conservation, shared phenotypes, and extensive genetic interactions. *Front. Psychiatry.* **12**, 698029.
4. Mariani N., Cattane N., Pariante C., Cattaneo A. (2021) Gene expression studies in depression development and treatment: an overview of the underlying molecular mechanisms and biological processes to identify biomarkers. *Translat. Psychiatry.* **11**, 354.
5. Stacey D., Cohen-Woods S., Toben C., Arolt V., Danilowski U., Baune B.T. (2013) Evidence of increased risk for major depressive disorder in individuals homozygous for the high-expressing 5-HTTLPR/rs25531 (LA) allele of the serotonin transporter promoter. *Psychiatr. Genet.* **23**, 222–223.
6. Fan T., Hu Y., Xin J., Zhao M., Wang J. (2020) Analyzing the genes and pathways related to major depressive disorder via a systems biology approach. *Brain Behav.* **10**, e01502.
7. Nobis A., Zalewski D., Waszkiewicz N. (2020) Peripheral markers of depression. *J. Clin. Med.* **9**, 3793.
8. Duman R.S., Voleti B. (2012) Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends Neurosci.* **35**, 47–56.
9. Donev R., Alawam K. (2015) Alterations in gene expression in depression: prospects for personalize patient treatment. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **101**, 97–124.
10. Norkeviciene A., Gocentiene R., Sestokaite A., Sabaliauskaite R., Dabkeviciene D., Jarmalaite S., Bulotiene G.A. (2022) Systematic review of candidate genes for major depression. *Medicina (Kaunas).* **58**, 285.
11. Berridge M.J. (2014) Calcium signaling and psychiatric disease: bipolar disorder and schizophrenia. *Cell Tissue Res.* **357**, 477–492.
12. Fairless R., Williams S.K., Diem R. (2014) Dysfunction of neuronal calcium signaling in neuroinflammation and neurodegeneration. *Cell Tissue Res.* **357**, 455–462.
13. Czeredys M. (2020) Dysregulation of neuronal calcium signaling via store-operated channels in Huntington's disease. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 611735.
14. Da Silva P.R., Gonzaga do N.T.K.S., Maia R.E., da Silva B.A. (2022) Ionic channels as potential targets for the treatment of autism spectrum disorder: a review. *Curr. Neuropharmacol.* **20**, 1834–1849.
15. Xu J., Minobe E., Kameyama M. (2022) Ca²⁺ dyshomeostasis links risk factors to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Front. Cell. Neurosci.* **16**, 867385.
16. Schmunk G., Gargus J.J. (2013) Channelopathy pathogenesis in autism spectrum disorders. *Front. Genet.* **4**, 222.
17. Cortés-Mendoza J., de León-Guerrero S.D., Pedraza-Alva G., Pérez-Martínez L. (2013) Shaping synaptic plasticity: the role of activity mediated epigenetic regulation on gene transcription. *Int. J. Dev. Neurosci.* **6**, 359–369.
18. Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 11–21.
19. Van Eldik L.J., Watterson D.M. (1998) Calmodulin and calcium signal transduction: an introduction. In:

- Calmodulin and Signal Transduction*. Eds Van Eldik L.J., Watterson D.M. Elsevier: Academic Press, 1–15.
20. Brandt P.C., Vanaman T.C. (1998) Calmodulin and ion flux regulation. In: *Calmodulin and Signal Transduction*. Eds Van Eldik L.J., Watterson D.M. Elsevier: Academic Press, 397–471.
 21. Zhang M., Abrams C., Wang L., Gizzi A., He L., Lin R., Chen Y., Loll P.J., Pascal J.M., Zhang J.-F. (2012) Structural basis for calmodulin as a dynamic calcium sensor. *Structure*. **20**, 911–923.
 22. Salińska E., Łazarewicz J.W. (2012) Role of calcium in physiology and pathology of neurons. *Postepy Biochem.* **58**, 403–417.
 23. Brini M., Cali T., Ottolini D., Carafoli E. (2014) Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 2787–2814.
 24. Napolioni V., Persico A.M., Porcelli V., Palmieri L. (2011) The mitochondrial aspartate/glutamate carrier AGC1 and calcium homeostasis: physiological links and abnormalities in autism. *Mol. Neurobiol.* **44**, 83–92.
 25. Schmunk G., Gargus J.J. (2013). Channelopathy pathogenesis in autism spectrum disorders. *Front. Genet.* **4**, 222.
 26. Savitz J.B., Drevets W.C. (2009) Imaging phenotypes of major depressive disorder: genetic correlates. *Neuroscience*. **164**, 300–330.
 27. Grace A.A. (2016). Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nat. Rev. Neurosci.* **17**, 524–532.
 28. Krugers H.J., Lucassen P.J., Karst H., Joëls M. (2010) Chronic stress effects on hippocampal structure and synaptic function: relevance for depression and normalization by anti-glucocorticoid treatment. *Front. Synaptic Neurosci.* **2**, 24.
 29. Lagace D.C., Donovan M.H., DeCarolis N.A., Farnbauch L.A., Malhotra S., Berton O., Nestler E.J., Krishnan V., Eisch A.J. (2010) Adult hippocampal neurogenesis is functionally important for stress-induced social avoidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 4436–4441.
 30. Golden S.A., Covington H.E., Berton O., Russo S.J. (2011) A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice. *Nat. Protoc.* **6**, 1183–1191.
 31. Kudryavtseva N.N. (2021) Development of mixed anxiety/depression-like state as a consequences of chronic anxiety: review of experimental data. In: *Curr. Topics Behav. Neurosci.* Berlin, Heidelberg: Springer, **54**, 125–152.
 32. Kudryavtseva N.N., Bakshtanovskaya I.V., Koryakina L.A. (1991) Social model of depression in mice of C57BL/6J strain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **38**, 315–320.
 33. Karst H., Joëls M. (2007). Brief RU 38486 treatment normalizes the effects of chronic stress on calcium currents in rat hippocampal CA1 neurons. *Neuropsychopharmacology*. **32**, 1830–1839.
 34. Smagin D.A., Bondar N.P., Kovalenko I.N., Kudryavtseva N.N., Michurina T.V., Enikolopov G., Park J.-H., Peunova N., Glass Z., Sayed K. (2015) Altered hippocampal neurogenesis and amygdalar neuronal activity in adult mice with repeated experience of aggression. *Front. Neurosci.* **9**, 443.
 35. DeLong G.R. (1992) Autism, amnesia, hippocampus and learning. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **16**, 63–70.
 36. Irle E., Ruhleder M., Lange C., Seidler-Brandler U., Salzer S., Dechent P., Weniger G., Leibing E., Leichsenring F. (2010) Reduced amygdalar and hippocampal size in adults with generalized social phobia. *J. Psychiatry Neurosci.* **35**, 126–131.
 37. Moon A.L., Haan N., Lawrence S., Wilkinson L.S., Thomas K.L., Hall J. (2018) CACNA1C: Association with psychiatric disorders, behavior and neurogenesis. *Schizophrenia Bull.* **44**, 958–965.
 38. Xu W., Yao X., Zhao F., Zhao H., Cheng Z., Yang W., Cui R., Xu S., Li B. (2020) Changes in hippocampal plasticity in depression and therapeutic approaches influencing these changes. *Neural Plasticity*. Article ID **8861903**. 16.
 39. Schwarz K., Moessnang C., Schweiger J.I., Harneit A., Schneider M., Chen J., Cao H., Schwarz E., Witt S.H., Rietschel M., Nöthen M., Degenhardt F., Wackerhagen C., Erk S., Romanczuk-Seiferth N., Walter H., Tost H., Meyer-Lindenberg A. (2022) Ventral striatal-hippocampus coupling during reward processing as a stratification biomarker for psychotic disorders. *Biol. Psychiatry*. **91**, 216–225.
 40. Smagin D.A., Galyamina A.G., Kovalenko I.L., Babenko V.N., Kudryavtseva N.N. (2019) Aberrant expression of collagen gene family in the brain regions of male mice with behavioral psychopathologies induced by chronic agonistic interactions. *BioMed. Res. Inter-nat.* 7276389.
 41. Коваленко И.Л., Галямина А.Г., Смагин Д.А., Кудрявцева Н.Н. (2020) Коэкспрессия глутаматергических генов и генов аутистического спектра в гиппокампе у самцов мышей с нарушением социального поведения. *Вавиловский журн. генетики и селекции*. **24**, 191–199.
 42. Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. (2003) Calcium: calcium signaling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 517–529.
 43. Clapham D.E. (2007) Calcium signaling. *Cell*. **131**, 1047–1058.
 44. Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б. Дж., Фукс П.А. (2003) От нейрона к мозгу а. — М.: Едиториал УРСС, 672 с.
 45. Долгачева Л.П., Тулеуханов С.Т., Зинченко В.П. (2020) Участие Ca^{2+} -проницаемых АМРА-рецепторов в синаптической пластичности. *Биол. мембраны: Журн. мембранной и клеточной биологии*. **37**, 175–187.
 46. Мельников К.Н. (2006) Разнообразие и свойства кальциевых каналов возбудимых мембран. *Психофармакология и биологическая наркология*. **6**, 1139–1155.
 47. Stratton M.M., Chao L.H., Schulman H., Kuriyan J. (2013) Structural studies on the regulation of Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase II. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 292–301.
 48. Sałaciak K., Koszałka A., Zmudzka E., Pytka K. (2021) The calcium/calmodulin-dependent kinases II and IV as therapeutic targets in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–32.
 49. Ben-Johny M., Yue D.T. (2014) Calmodulin regulation (calmodulation) of voltage-gated calcium channels. *J. Gen. Physiol.* **143**, 679–692.

50. Lucia D., Burgess D., Cullen C.L., Dorey E.S., Rawashdeh O., Moritz K.M. (2019) Periconceptional maternal alcohol consumption leads to behavioural changes in adult and aged offspring and alters the expression of hippocampal genes associated with learning and memory and regulators of the epigenome. *Behav. Brain Res.* **362**, 249–257.
51. Dedic N., Pohlmann M.L., Richter J.S., Mehta D., Czamara D., Metzger M.W., Dine J., Bedenk B.T., Hartmann J., Wagner K.V., Jurik A., Almli L.M., Lori A., Moosmang S., Hofmann F., Wotjak C.T., Rammes G., Eder M., Chen A., Ressler K.J., Wurst W., Schmidt M.V., Binder E.B., Deussing J.M. (2018) Cross-disorder risk gene *CACNA1C* differentially modulates susceptibility to psychiatric disorders during development and adulthood. *Mol. Psychiatry*. **23**, 533–543.
52. O'Roak B.J., Vives L., Girirajan S., Karakoc E., Krumm N., Coe B.P., Levy R., Ko A., Lee C., Smith J.D., Turner E.H., Stanaway I.B., Vernot B., Malig M., Baker C., Reilly B., Akey J.M., Borenstein E., Rieder M.J., Nickerson D.A., Bernier R., Shendure J., Eichler E.E. (2012) Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of *de novo* mutations. *Nature*. **485**, 246–250.
53. Li B., Tadross M.R., Tsien R.W. (2016) Sequential ionic and conformational signaling by calcium channels drives neuronal gene expression. *Science*. **351**, 863–867.
54. Kessi M., Chen B., Peng J., Yan F., Yang L., Yin F. (2021) Calcium channelopathies and intellectual disability: a systematic review. *Orphanet. J. Rare. Dis.* **16**, 219.
55. Andrade A., Brennecke A., Mallat S., Brown J., Rivadeneira J., Czepl N., Londrigan L. (2019) Genetic associations between voltage-gated calcium channels and psychiatric disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3537.
56. Kudryavtseva N.N., Kovalenko I.L., Smagin D.A., Galyamina A.G., Babenko V.N. (2017) Abnormality of social behavior and dysfunction of autism related gene expression developing under chronic social defeat stress in male mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **27**, S678.

Changes in the Expression of Genes, Associated with Calcium Processes, in the Hippocampus of Mice under the Influence of Chronic Social Defeat Stress

M. B. Pavlova¹, *, D. A. Smagin², N. N. Kudryavtseva², and N. A. Dyuzhikova¹, **

¹*Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg, 199034 Russia*

²*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: pavlova@infran.ru

**e-mail: dyuzhikova@infran.ru

Using data from a complete transcriptome analysis, changes in the expression of genes encoding proteins involved in calcium regulation processes in the hippocampus of male mice with symptoms of depression caused by chronic social defeat stress were investigated. The expression of *Cacna1g*, *Cacnb3*, *Camk1g*, *Camk2d*, *Camk2n2*, *Caly*, *Caln1*, *S100a16*, *Slc24a4* genes in the hippocampus of depressed mice was increased in relation to control, while the *Cacna2d1*, *Cacng5*, *Grin2a*, *Calm2* gene expression was reduced. The greatest number of significant correlations between the expression of the gene *Calm2*, which has the highest transcriptional activity, and other differentially expressed genes was revealed. It is assumed that calcium signaling in the hippocampus of mice is disrupted under the influence of chronic social defeat stress. The involvement of the *Calm2* gene and the *Camk1g*, *Camk2d* and *Camk2n2* genes in this process is discussed.

Keywords: Chronic social defeat stress, mouse, depression-like state, differentially expressed genes, calcium signaling, hippocampus

ЭВОЛЮЦИОННАЯ, ПОПУЛЯЦИОННАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНОМИКА, ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 57.042

Р-ЭЛЕМЕНТ НЕ ОКАЗЫВАЕТ ЗАМЕТНОГО ВЛИЯНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ *Drosophila simulans*¹

© 2023 г. Л. П. Захаренко^а*, Д. В. Петровский^а, Р. А. Быков^а

^аИнститут цитологии и генетики, Сибирское отделение Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: zakharp@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 06.07.2022 г.

После доработки 16.09.2022 г.

Принята к публикации 16.09.2022 г.

Известны случаи горизонтального переноса мобильных генетических элементов между видами семейства Drosophilidae. В середине прошлого века описан случай горизонтального переноса Р-элемента из генома *Drosophila willistoni* в геном *D. melanogaster*. Новая инвазия Р-элемента в геном *D. simulans* из генома *D. melanogaster* произошла около 10 лет назад. В настоящее время Р-элемент распространился по всем популяциям *D. melanogaster* и 30% популяций *D. simulans* Европы, Африки и Америки. В этой статье мы исследовали присутствие Р-элемента в линиях *D. simulans*, выделенных в разные годы в трех азиатских популяциях (Ташкент, Нальчик и остров Сахалин), а также физиологические характеристики (цитотип, длительность жизни, плодовитость и локомоторную активность) линий *D. simulans* с Р-элементом и без него, чтобы оценить значимость появления нового мобильного элемента в геноме этого вида. Р-элемент обнаружили в линиях, выделенных из природы после 2012 года. Число копий Р-элемента на геном (2–3 десятка согласно данным флуоресцентной гибридизации *in situ*) было больше, чем в американских популяциях, и сопоставимо с африканскими популяциями. Обнаружены признаки внутривидового гибридного дисгенеза для некоторых пар линий. Однако в целом присутствие Р-элемента не оказывало заметного влияния на физиологические характеристики особей. Либо адаптация к новому мобильному элементу прошла очень быстро, либо скорость перемещения Р-элемента настолько незначительна, что его появление в геноме осталось незамеченным.

Ключевые слова: *Drosophila simulans*, Р-элемент, горизонтальный перенос, гибридный дисгенез

DOI: 10.31857/S0026898423020258, **EDN:** EECYAE

The P-element Has Not Significant Effect on the *Drosophila simulans* Viability

L. P. Zakharenko¹*, D. V. Petrovskii¹, and R. A. Bykov¹

¹Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: zakharp@bionet.nsc.ru

Cases of horizontal transfer of transposable elements (TEs) between species are known for the Drosophilidae family. In the middle of the last century, the case of horizontal transfer of the P-element from the *Drosophila willistoni* to the *D. melanogaster* was described. A novel P-element invasion into the *D. simulans* genome from *D. melanogaster* occurred approximately 10 years ago. Currently, the P-element has spread across all *D. melanogaster* population and 30% of *D. simulans* populations in Europe, Africa and America. In this paper, we investigated the presence of the P-element in *D. simulans* lines caught in different years in three Asian populations (Tashkent, Nalchik and Sakhalin Island). We also examined the physiological characteristics (cytotype, lifespan, fecundity and locomotor activity) of *D. simulans* lines with and without the P-element to determine the significance of this new mobile element in the genome. The P-element was found in lines isolated from nature after 2012. The number of P-element copies per genome (two-to-three dozen according to fluorescence *in situ* hybridization data) was greater than in the American and comparable to the African populations. There were signs of intraspecific hybrid dysgenesis for some pairs of lines. However, in general the presence of the P-element did not adversely affect the physiological characteristics. Either adaptation to the new TE occurs very quickly, or the rate of movement of the P-element is so insignificant that its appearance in the genome remains unnoticed.

Keywords: *Drosophila simulans*, P-element, horizontal transfer, hybrid dysgenesis

¹ Статья представлена авторами на английском языке