

ISSN 0026-8984

Том 57, Номер 4

Июль - Август 2023



МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 4, 2023

ОБЗОРЫ

Молекулярно-клеточные аспекты эндотелиально-мезенхимального перехода при сердечно-сосудистых заболеваниях

*Е. А. Стрельникова, Р. Е. Калинин, И. А. Сучков,
Н. В. Короткова, Н. Д. Мжаванадзе* 563

Структура и сборка комплекса ядерной поры

А. В. Орлова, С. Г. Георгиева, Д. В. Копытова 573

Альтернативные механизмы мутагенеза в mCrG-сайтах при репликации и репарации

Е. С. Шилкин, Д. В. Петрова, Д. О. Жарков, А. В. Макарова 587

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

ДНК-фенотипирование останков из элитных погребений юга России хазарского времени

*Д. О. Фесенко, О. Ю. Арамова, Е. В. Вдовченков, И. Д. Ивановский, О. Е. Фесенко,
С. А. Поляков, Т. Г. Фалеева, М. А. Филиппова, В. С. Флоринская, И. В. Корниенко* 597

Идентификация клинических изолятов группы *Bacillus cereus* и их характеристика методами масс-спектрометрии и электронной микроскопии

*Т. А. Смирнова, Н. Б. Поляков, Д. С. Карпов, А. И. Соловьев, Н. В. Шевлягина,
С. Г. Андреевская, Д. Н. Щербинин, З. С. Плиева, В. А. Козлова,
А. А. Переборова, И. А. Богданов, Д. А. Грумов, М. В. Зубашева,
С. В. Поддубко, А. А. Гречников, М. А. Сухина, В. Г. Жуховицкий* 609

Влияние адипорона на экспрессию генов липидного обмена в первичной культуре макрофагов человека

И. А. Побожьева, К. В. Драчева, С. Н. Пчелина, В. В. Мирошникова 623

Универсальная панель инсерционно-делеционных полиморфизмов *ChipID106* для генетической идентификации личности и биочип на ее основе

*Д. О. Фесенко, И. Д. Ивановский, П. Л. Иванов, Е. Ю. Земскова,
С. А. Поляков, О. Е. Фесенко, М. А. Филиппова, А. С. Заседателев* 632

Метилирование регуляторных регионов генов системы репарации ДНК при атеросклерозе сонных артерий

*Н. П. Бабушкина, А. А. Зарубин, Ю. А. Королёва, Д. Е. Гомбоева,
Е. Ю. Брагина, И. А. Гончарова, М. В. Голубенко, Р. Р. Салахов,
А. А. Слепцов, М. С. Кузнецов, Б. Н. Козлов, Э. Ф. Муслимова,
С. А. Афанасьев, А. Н. Кучер, М. С. Назаренко* 647

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

JMJD3 проявляет онкорепрессорную активность в клетках острого промиелоцитарного лейкоза, стимулируя экспрессию PU.1

М.-Х. Wang, S.-H. Yu, M. Xiao, J. Chen 665

Комбинированная сверхэкспрессия *Foxa3* и *Hnf4a* усиливает пролиферацию и продлевает функциональную сохранность первичных гепатоцитов

J. Y. Fan, G. Dama, Y. L. Liu, W. Y. Guo, J. T. Lin 668

Биогенез микроРНК при клеточном старении, индуцированном хроническим стрессом эндоплазматического ретикула

*Д. М. Зайченко, А. А. Микрюкова, Я. Р. Астафьева,
С. Г. Малахо, А. А. Кубатиев, А. А. Московцев* 671

Сверхэкспрессия <i>MKRN2</i> подавляет рост клеток рака яичников <i>F. Z. Jiang, Q. J. Xia, L. Wu, Y. M. Zhang</i>	687
Инактивация Ras1 в делящихся дрожжах усиливает ответ на окислительный стресс, индуцируемый <i>трет</i> -бутилгидропероксидом (tBHP) <i>N. Masood, S. Anjum, S. Ahmed</i>	689
Математическое моделирование процесса репликации ВИЧ и ответа системы интерферона <i>И. А. Гайнова, А. Е. Соболева, Д. С. Гребенников, Г. А. Бочаров</i>	692
Апатиниб супрессирует опосредованное макрофагами поведение клеток гепатоклеточной карциномы, модулируя передачу сигналов VEGFR2/STAT3/PD-L1 <i>T. Yin, C. B. Fu, D. D. Wu, L. Nie, H. Chen, Y. Wang</i>	706
Анализ случайной интеграции рекомбинантного аденоассоциированного Вируса-6, упакованного в клетки Sf9 насекомых <i>М. Н. Zhang, X. М. Liu, C. Zhang</i>	709
IL-8 связывает пути NF-κB и Wnt/β-катенин при персистентном воспалительном ответе, вызванном хронической инфекцией <i>Helicobacter pylori</i> <i>L. Lin, B. Xie, J. Shi, C. M. Zhou, J. Yi, J. Chen, J. X. He, H. L. Wei</i>	713

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

Взаимодействие ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a с фосфорорганическими аналогами <i>S</i> -аденозилметионина и <i>S</i> -аденозилгомоцистеина <i>В. Л. Филонов, М. А. Хомутов, А. В. Сергеев, А. Л. Хандажинская, С. Н. Кочетков, Е. С. Громова, А. Р. Хомутов</i>	717
---	-----

БИОИНФОРМАТИКА

Пространственная реконструкция TRPC-механорецепторов гребневика <i>Mnemiopsis leidyi</i> A. Agassiz, 1865 <i>А. В. Кузнецов, Д. Н. Втюрина</i>	726
---	-----

Опечатка	736
----------	-----

УДК 577.218

МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ АСПЕКТЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

© 2023 г. Е. А. Стрельникова^а, Р. Е. Калинин^а, И. А. Сучков^а,
Н. В. Короткова^а, Н. Д. Мжаванадзе^а, *

^а Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова Министерства
здравоохранения Российской Федерации, Рязань, 390026 Россия

*e-mail: ekaterina3333@rambler.ru

Поступила в редакцию 23.06.2022 г.

После доработки 30.10.2022 г.

Принята к публикации 30.10.2022 г.

Эндотелиальные клетки, выстилающие внутреннюю стенку кровеносных сосудов, контактируют с кровью и растворенными в ней веществами, подвергаются механическим воздействиям и демонстрируют заметную неоднородность в своей реакции на экзогенные и эндогенные стимулы. Эндотелиальные клетки обладают уникальными свойствами, которые зависят от их расположения, определяются сосудистыми нишами и играют важную роль в регуляции гомеостаза сосудистой системы. Динамическое фенотипическое переключение эндотелиальной гетерогенности может привести к дисфункции эндотелиальных клеток и сыграть существенную роль в патогенезе множества заболеваний. В настоящее время пристальное внимание привлекает эндотелиально-мезенхимальный переход (endothelial-mesenchymal transition, EndMT) – процесс, при котором эндотелиоциты приобретают новые свойства, экспрессируют маркеры мезенхимальных клеток, такие как альфа-актин гладких мышц и виментин, что приводит к изменению их морфологии и появлению способности к миграции. EndMT может индуцироваться различными стимулами или патологическими состояниями, включая воспаление, гипоксию, окислительный стресс. EndMT играет важную роль в патогенезе ряда заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых. В представленном обзоре рассмотрены маркеры, индукторы и ингибиторы EndMT, методы изучения *in vitro* и *in vivo* EndMT, а также роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний.

Ключевые слова: эндотелиоциты, эндотелиально-мезенхимальный переход, эндотелиальная дисфункция, маркеры EndMT, индукторы и ингибиторы EndMT

DOI: 10.31857/S0026898423030138, **EDN:** CHRLDQ

ВВЕДЕНИЕ

Эндотелиальные клетки (ЭК) играют ключевую роль в поддержании гомеостаза сосудов в ответ на различные стимулы. Они могут контролировать сосудистый тонус, проницаемость, коагуляцию и воспаление за счет регуляции многочисленных медиаторов, таких как продуцируемые эндотелием расслабляющий и сокращающий факторы, молекулы клеточной адгезии, цитокины и хемокины [1].

Однако сосудистое повреждение, вызванное различными вмешательствами, такими как ангиопластика, стентирование [2], и заболевания, например, сахарным диабетом и гипертонией, а также иммуноопосредованное повреждение могут привести к эндотелиальной дисфункции с последующим нарушением или потерей нормальных функций ЭК. В условиях хронического воспаления устойчивая активация эндотелиоцитов провоспалительными стимулами, такими

Сокращения: ГМК – гладкомышечные клетки; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени; ЭК – эндотелиальные клетки; BMP – костный морфогенетический белок (Bone Morphogenetic Protein); EMT – эпителиально-мезенхимальный переход (Epithelial-to-Mesenchymal Transition); EndMT – эндотелиально-мезенхимальный переход (Endothelial-Mesenchymal Transition); EPCR – эндотелиальный рецептор белка C (Endothelial Cell Protein C Receptor); FGF – фактор роста фибробластов (Fibroblast Growth Factor); ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1); IL – интерлейкин (Interleukin); NF-κB – транскрипционный ядерный фактор-κB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); PAI-1 – ингибитор активатора плазминогена-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1); PECAM-1 – молекула адгезии эндотелиальных клеток к тромбоцитам (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule); SM22α – гладкомышечный белок 22α (Smooth Muscle 22α); TGF-β – трансформирующий фактор роста β (Transforming Growth Factor-β); TNF-α – фактор некроза опухоли-α (Tumor Necrosis Factor α); VCAM-1 – молекула адгезии сосудистых клеток (Vascular Cell Adhesion Molecule 1); α-SMA – гладкомышечный актин α (α-Smooth Muscle Actin).

как интерлейкин (IL)-6, фактор некроза опухоли- α (TNF- α), IL-1 β и патогены, вызывает изменения нормальной функции ЭК, что приводит к нарушению зависимого от эндотелия иммунного ответа, который является признаком эндотелиальной дисфункции [3]. Эндотелиальная дисфункция вносит вклад в патогенез многих патологических состояний, включая фиброз, атеросклероз, легочную артериальную гипертензию и патологический ангиогенез.

ПОНЯТИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА

Эндотелиально-мезенхимальный переход (endothelial-mesenchymal transition, EndMT) рассматривается как ключевое звено патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний, посредством которого ЭК может претерпевать значительные изменения. EndMT — это процесс фенотипического перехода эндотелиоцитов, при котором снижается экспрессия эндотелиальных маркеров (CD31, фактор Виллебранда, vWF, VE-кадгерин) и увеличивается экспрессия мезенхимальных маркеров (α -SMA, виментин). EndMT сопровождается потерей межклеточных контактов и клеточной полярности, что приводит к приобретению веретенообразной морфологии, мигрирующего и инвазивного фенотипа с усилением продукции компонентов внеклеточного матрикса. В некоторых случаях EndMT приводит к отслоению и миграции происходящих из эндотелиоцитов мезенхимальных клеток в подлежащую ткань [4, 5]. EndMT был впервые описан в эмбриональном развитии в процессе ангиогенеза и образования эндокардиальных подушек сердца, предшественников сердечных клапанов [6]. EndMT играет фундаментальную роль в эмбриогенезе сердца и сосудов в норме, все больше данных указывает на его участие в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний [7].

Концептуально EndMT — это переход клеток от эндотелиального фенотипа к мезенхимально-подобному. Однако не существует согласованных критериев определения EndMT на молекулярном уровне. Это становится препятствием для трактовки результатов исследований, поскольку отсутствует стандартизация и низка сопоставимость данных, полученных на разных модельных системах и в разных лабораториях. Далее мы рассмотрим современные маркеры EndMT.

МАРКЕРЫ EndMT

В число ключевых маркеров EndMT эндотелиального профиля входят:

1) молекула клеточной адгезии-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1, или CD31). Эта молекула участвует в определении барьерной

функции эндотелия путем образования межклеточных контактов, поддерживает множество сосудистых функций, а также вовлечена в трансэндотелиальную миграцию лейкоцитов, ангиогенез и активацию интегринов [8]. PECAM-1 экспрессируется на поверхности тромбоцитов и лейкоцитов, концентрируется в межклеточных соединениях ЭК сосудов [9];

2) фактор Виллебранда (von Willebrand factor, vWF) — гликопротеин крови, участвующий в процессах воспаления и гемостаза, в частности, адгезии тромбоцитов. Основной функцией фактора Виллебранда является адгезия тромбоцитов к местам повреждения сосудов путем связывания со специфическими гликопротеинами мембраны тромбоцитов и с компонентами соединительной ткани, а также взаимодействие с другими белками, в частности с фактором VIII, важным для адгезии тромбоцитов к раневым участкам [10];

3) VE-кадгерин (vascular endothelial cadherin, VE-cadherin) — представитель семейства кадгеринов [11], кальций-зависимый гликопротеин, специфичный для ЭК. VE-кадгерин участвует в образовании адгезионных соединений, которые играют важную роль в изменении сосудистой проницаемости, а также выполняет сигнальную функцию. Передача сигналов через VE-кадгерин влияет на поведение ЭК, воздействуя на активность рецепторов факторов роста и регулируя тем самым ангиогенез. Благодаря своим адгезивным и сигнальным свойствам, VE-кадгерин поддерживает тонкий баланс между пластичностью и целостностью межклеточных соединений, которые необходимы ЭК для поддержания барьерной функции кровеносных сосудов и сохранению при этом способности динамически реагировать на сигналы воспаления и факторов роста [12].

К основным маркерам EndMT мезенхимального профиля относятся:

1) виментин — основной компонент цитоскелета мезенхимальных клеток, играющий значимую роль в поддержании и закреплении положения органелл в цитоплазме, формы клеток, целостности цитоплазмы и стабилизации взаимодействий цитоскелета [13]. Виментин — основной белок промежуточных филаментов, обнаруженных в мезенхимальных клетках. На важную роль виментина в эволюционной физиологии указывает высокая степень гомологии его аминокислотной последовательности у различных видов животных. Однако до недавнего времени функции этого белка оставались неизвестными. В исследовании Colucci-Guyon E. и соавт. показано, что фенотип мышей с дефицитом виментина мало отличается от фенотипа мышей дикого типа [14]. Детальное изучение мышей с дефицитом виментина выявило значительные дефекты, указывающие на участие этого белка в регуляции морфологии глиаль-

ных клеток [15]. Обнаружено также снижение миграционной активности фибробластов у мышей с нокаутом гена виментина [16]. Виментин также играет роль в механотрансдукции напряжения сдвига, что отражается в воздействии на сосудистое сопротивление [17]. Кроме того, недостаток виментина влияет на трансмиграцию и экстравазацию лимфоцитов и целостность эндотелия сосудов. В дальнейшем выявили молекулярные механизмы, лежащие в основе дефектов, связанных с дефицитом виментина. Показано, что виментин участвует в ряде важнейших клеточных процессов, связанных с адгезией, миграцией и клеточной сигнализацией;

2) α -актин гладких мышц (α -smooth muscle actin, α -SMA) — сократительный белок гладкой мускулатуры, который участвует в изменении диаметра просвета сосудов и гомеостазе артериального давления. Актин вовлечен во многие важные клеточные процессы, включая сокращение мышц, подвижность клеток, деление и цитокинез, движение вакуолей и органелл, передачу сигналов, а также создание и поддержание клеточных соединений и формы клеток [18]. У позвоночных идентифицированы три основные группы изоформ актина: альфа, бета и гамма. Альфа-актины, обнаруженные в мышечных тканях, являются основным компонентом сократительного аппарата. Бета- и гамма-актины сосуществуют в большинстве типов клеток как компоненты цитоскелета и как медиаторы внутренней подвижности клеток [19].

В качестве потенциальных маркеров EndMT, которые могут играть важную роль в данном процессе, рассматриваются ингибитор активатора плазминогена типа 1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) и эндотелиальные рецепторы белка C (endothelial cell protein C receptor, EPCR).

PAI-1 в основном вырабатывается эндотелием, но также может секретироваться гладкомышечными клетками (ГМК) и клетками жировой ткани [20]. Основная функция PAI-1 заключается в ингибировании активатора плазминогена урокиназного типа (uPA), фермента, ответственного за расщепление плазминогена с образованием плазмина. Плазмин либо непосредственно опосредует деградацию внеклеточного матрикса, либо в сочетании с матриксными металлопротеиназами. В этом сценарии PAI-1 ингибирует uPA, предотвращая образование плазмина. Дополнительное ингибирование опосредовано связыванием PAI-1 с комплексом рецепторов uPA/uPA, что приводит к деградации последнего [21]. Кроме того, PAI-1 рассматривается в качестве маркера клеточного старения (сенесценции) [22].

EPCR — трансмембранный гликопротеин, который присутствует на поверхности ЭК артерий, вен и капилляров в легких, сердце и коже, а также экспрессируется другими типами клеток, вклю-

чаяя ГМК. EPCR является важным компонентом антикоагулянтной системы белка C. Также показано, что EPCR опосредует передачу цитопротекторных сигналов, индуцированных активированным белком C, ему отводится решающая роль в этом процессе [23].

Таким образом, существуют не только признанные, но и потенциальные маркеры EndMT, включая уже указанные PAI-1 и EPCR, продукция которых характерна как для ЭК, так и для ГМК. Роль этих факторов в процессах EndMT является объектом будущих исследований.

ИНДУКТОРЫ EndMT

В настоящее время известен ряд индукторов и ингибиторов EndMT. Ключевым индуктором считается трансформирующий фактор роста- β (transforming growth factor- β , TGF- β). Важную роль в регуляции EndMT играют TNF- α , IL-1 β , а также высокие концентрации глюкозы. TGF- β относится к наиболее изученным и часто используемым в экспериментальных моделях индукторам EndMT.

TGF- β 1 — прототип большого семейства факторов роста, которое включает активины и костные морфогенетические белки (bone morphogenetic protein, BMP). Установлен механизм передачи сигналов TGF- β , необходимых для регуляции экспрессии генов. У позвоночных 33 гена кодируют связанные с TGF- β полипептиды, которые секретируются в виде гомо- и гетеродимеров. Сигналы TGF- β участвуют в регуляции экспрессии генов следующим образом. Секретируемый димерный лиганд связывается с гетеротетрамерным комплексом киназных рецепторов типа I и II, расположенных на клеточной мембране. После связывания с лигандом индуцируются рецепторы типа II, которые фосфорилируют и тем самым активируют рецепторы типа I, в свою очередь активирующие белки SMAD4 (Mothers against decapentaplegic homolog 4) путем прямого фосфорилирования концевых остатков серина. Два активированных SMAD4 образуют тримерный комплекс с белком-посредником; комплекс транслоцируется в ядро и участвует во взаимодействиях со специфичными к последовательности факторами транскрипции, корепрессорами и коактиваторами регуляторных последовательностей генов. Таким образом осуществляется лиганд-индуцированная активация или репрессия чувствительных генов-мишеней. SMAD4 отвечает за передачу сигналов, обеспечивающих регуляцию роста и дифференцировки клеток [24].

TGF- β имеет три изоформы, TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3, которые могут индуцировать EndMT *in vitro*: TGF- β 2 необходим для индукции EndMT во время развития сердца; при атеросклерозе экс-

прессиируются все изоформы TGF- β с выраженной пространственной и клеточной вариабельностью. Таким образом, EndMT может индуцироваться множеством изоформ TGF- β , поэтому необходимо дальнейшее изучение молекулярных механизмов действия всех трех изоформ [5].

Еще один индуктор EndMT – провоспалительный цитокин TNF- α , который играет важную роль в регуляции различных клеточных взаимодействий. В ЭК ответы TNF- α обусловлены связыванием одного из двух рецепторов TNF типа I или II, что позволяет активировать такие факторы транскрипции, как ядерный фактор каппа (NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Эта активация индуцирует транскрипцию множества генов, таких как гены молекулы адгезии клеток сосудов 1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) и PECAM-1. TNF- α также индуцирует EndMT, активируя множество сигнальных путей в различных типах ЭК [25].

Другой важный индуктор EndMT – провоспалительный цитокин IL-1 β . Впервые изменения фенотипа эндотелиоцитов были обнаружены в обработанных IL-1 β кожных микрососудистых ЭК человека, претерпевающих морфологические изменения и реорганизацию цитоскелета, снижение экспрессии типичных эндотелиальных маркеров, таких как фактор Виллебранда и CD31 [26]. Показано [27], что длительное воздействие IL-1 β на эндотелиоциты микрососудов кожи человека индуцирует экспрессию мезенхимальных маркеров, таких как α -SMA, коллаген типа I и кальпонин, ингибирует экспрессию фактора Виллебранда. Для молекулярного механизма, лежащего в основе индуцированного IL-1 β EndMT, характерна повышенная экспрессия белка SM22 α (smooth muscle protein 22 alpha), кодируемого геном TAGLN (Transgelin) [27]. SM22 α – это белок, который экспрессируется в клетках мезенхимального происхождения, в частности, в миофибробластах и гладкомышечных клетках. TAGLN подвергается эпигенетической регуляции через EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2), в ходе которой TAGLN, интегрируя передачу сигналов IL-1 β и TGF- β 2, способствует трансдифференцировке эндотелиоцитов посредством EndMT [28].

TGF- β 2 и IL-1 β синергически индуцируют EndMT за счет увеличения экспрессии мезенхимальных маркеров при одновременном снижении экспрессии эндотелиальных маркеров в ЭК микрососудов пищевода человека и ЭК пупочной вены человека (HUVEC). Комбинация факторов TNF- α , IL-1 β и TGF- β 1 также индуцирует EndMT в ЭК легочной артерии, при этом в клетках выявлены морфологические изменения и экспрессия эндотелиальных и мезенхимальных маркеров [29].

Показано, что комбинация TGF- β 1, IL-1 β и TNF- α в ЭК микрососудов кишечника человека способна индуцировать EndMT опосредованно – через фактор транскрипции Sp1 (specificity factor 1), ключевой регулятор транскрипции генов, связанных с EndMT [30].

ЭК активно участвуют в регуляции иммунного ответа на различные раздражители, сопровождающиеся воспалением. Однако передача сигналов EndMT, вызванных воспалением, остается недостаточно исследованной. Тем не менее, наблюдения за процессом эпителиально-мезенхимального перехода (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT), связь которого с воспалением относительно хорошо изучена, позволило постепенно установить молекулярные механизмы, лежащие в основе EndMT, вызванного воспалением [3]. В настоящее время известно, что EndMT, индуцированный воспалением, как и EMT, регулируется преимущественно посредством TGF- β , а также других сигнальных путей [31].

EndMT, связанный с иммунным ответом, можно индуцировать провоспалительными цитокинами – TNF- α , IL-1 β и их комбинацией. EndMT, вызванный воспалением, характеризуется потерей нормального фенотипа ЭК и усилением мезенхимальных характеристик, а эндотелиальные/мезенхимальные маркеры контролируются медиаторами EndMT: ZEB1 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1), β -катенин, Akt/NF- κ B, Snail, Slug, Notch1, белками BMP-4 и Sp1, фосфоинозитид-3-киназой PI3K и белком EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) [32, 33] (рис. 1).

Изучение эндотелиальной дисфункции, вызванной такими метаболическими нарушениями, как ожирение, гипергликемия и дислипидемия, выявило связь с индукцией EndMT. Установлено, что высокий уровень глюкозы индуцирует EndMT, активируя пути Smad2/3, Snail, Rho-ассоциированной киназы ROCK1 (rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1), фактора сывороточного ответа SRF (serum response factor) [34] и киназ ERK, регулируемых внеклеточными сигналами (extracellular signal-regulated kinases) в ЭК почечных клубочков при диабетической нефропатии [35, 36]. Это приводило к повышению экспрессии мезенхимальных маркеров, таких как α -SMA, коллаген типа I, фибронектин, виментин, а также к снижению экспрессии эндотелиальных маркеров (CD31 и VE-кадгерина) в ЭК разного типа.

ИНГИБИТОРЫ EndMT

Эндогенные ингибиторы EndMT в отличие от индукторов изучены недостаточно. Фактор роста фибробластов (fibroblast growth factors, FGF) – один из наиболее изученных эндогенных ингибиторов EndMT – подавляет экспрессию TGF- β R1,

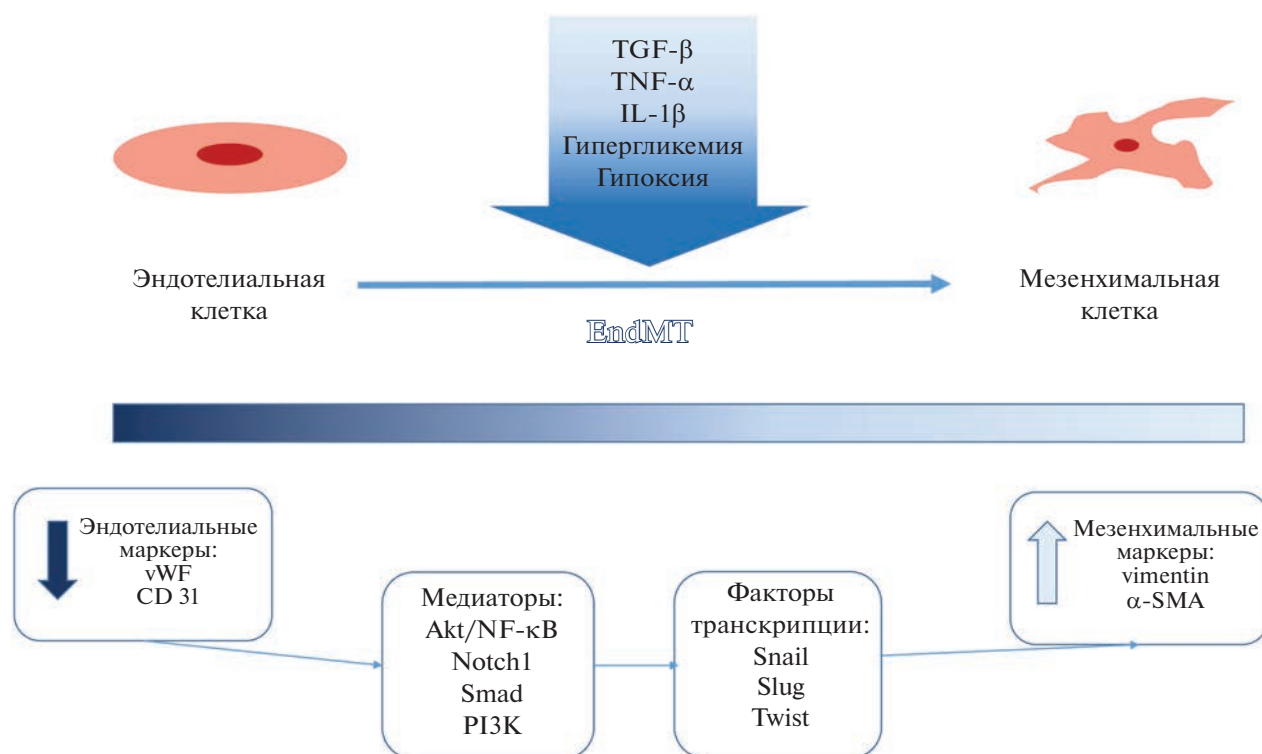


Рис. 1. Схематическое изображение эндотелиально-мезенхимального перехода (EndMT), участвующего в заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Эндотелиальные клетки, стимулируемые трансформирующим фактором роста-β (TGF-β), интерлейкином-1β (IL-1β), фактором некроза опухоли-α (TNF-α), гипергликемией и гипоксией, подвергаются EndMT. EndMT вызывает фенотипические изменения эндотелиоцитов в сторону мезенхимальной клетки, потерю эндотелиальных маркеров и приобретение мезенхимальных маркеров.

ослабляет ответы ЭК на TGF-β и противодействует опосредованной TGF-β1 экспрессии α-SMA [37]. FGF2 является основным фактором, участвующим в поддержании экспрессии маркеров ЭК, он играет важную роль в подавлении экспрессии мезенхимальных маркеров в эндотелиоцитах [38].

Большинство BMP стимулируют EndMT, но BMP7 действует как отрицательный регулятор EndMT. BMP7 блокирует TGFβ-индуцированный EndMT регулируя активность промотора гена VE-кадгерина, однако механизм отрицательной регуляции остается недостаточно изученным [39].

Установлено, что ряд лекарственных препаратов обладает способностью ингибировать EndMT. Так показано, что противодиабетический препарат линаглиптин — ингибитор дипептидилпептидазы-4 (DPP-4), нарушает взаимодействие интегринового рецептора с интегрином β1 и блокирует таким образом TGF-β2-индуцированный EndMT [40]. Иммунодепрессант рапамицин блокирует EndMT, подавляя сигнальный путь киназы mTOR (серин/треониновая протеинкиназа) [41]. Мацинтан, ингибитор рецептора эндотелина-1, нарушает EndMT, индуцированный либо эндотелином-1, либо TGF-β1 [42]. Каллистатин блокирует TGF-β-

индуцированный EndMT, повышая уровень эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) и дифференциально регулируя miR-21 [43]. Спиронолактон, блокатор рецепторов альдостерона, также способен ингибировать TGF-β-индуцированный EndMT, контролируя экспрессию Notch1 [44]. Лозартан, ингибитор рецептора ангиотензина II типа 1, нарушает EndMT, блокируя передачу сигналов TGF-β [45].

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ EndMT В МОДЕЛЯХ *in vitro* И *in vivo*

EndMT изучают с использованием систем культивирования клеток *in vitro*. Обычно для индукции EndMT первичные эндотелиоциты или линии ЭК подвергают воздействию химических или физических стимулов, наиболее часто применяют обработку TGF-β в течение 5–8 дней. Все чаще наблюдается тенденция к использованию TGF-β вместе с таким дополнительным стимулом, как IL-1β или пероксид водорода (H₂O₂). Модели *in vitro* обладают преимуществом, так как предоставляют удобную контролируемую среду для тестирования новых факторов и изучения молекулярных аспектов EndMT. Они также позво-

ляют получать клетки, прошедшие EndMT, которые можно изучать с помощью молекулярных и функциональных методов. Основное ограничение этих моделей состоит в том, что условия культивирования клеток (например, среда, добавки) влияют на степень и фенотип EndMT. Поскольку для EndMT характерно изменение профиля маркеров и морфологии клеток, а также приобретение способности к миграции, логично использовать модели, которые позволяют достоверно оценить эти параметры.

• В число методов, используемых для изучения EndMT, входят:

- иммунофлуоресцентное окрашивание;
- скарификационный тест;
- анализ клеточной миграции;
- анализ проницаемости эндотелия;
- Вестерн-блот-анализ;
- иммунопреципитация;
- ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР).

В рамках изучения EndMT *in vivo* используют иммуноокрашивание гистологических препаратов, технологии модификации ДНК в организмах лабораторных животных и секвенирование РНК.

РОЛЬ EndMT В РАЗВИТИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

EndMT вовлечен в патогенез различных заболеваний, таких как фиброз сердца [46], почек [47] и кожного покрова [48], сосудистый рестеноз [49], легочная артериальная гипертензия [50] и рак [51].

Основная функция эндотелия — формирование барьера между кровью и внесосудистым пространством, который контролирует прохождение молекул и клеток из кровотока через стенку сосуда и обратно. Кроме того, эндотелий реагирует на ряд химических и биомеханических сигналов, секретируя факторы, регулирующие сосудистый тонус, пролиферацию и миграцию ГМК, адгезию иммунных клеток, тромборезистентность и воспаление. Местное увеличение проницаемости периферических сосудов во время воспаления и сопутствующая утечка белков плазмы играют решающую роль в противодействии инфекциям и восстановлении тканей. Микрососудистая гиперпроницаемость связана с развитием и смертностью от острых и хронических заболеваний [52, 53].

Недавно установили вклад EndMT в развитие атеросклероза [5]. ЭК сосудов, подвергающиеся различным воздействиям, претерпевают динамическое фенотипическое переключение в контексте эндотелиальной гетерогенности. Это может привести к дисфункции ЭК и, в свою очередь, к развитию различных заболеваний. Показана важность EndMT при эндотелиальной дисфункции,

которая играет решающую роль в развитии атеросклероза [54].

Большинство факторов риска атеросклероза активируют эндотелий, что приводит к экспрессии хемокинов и цитокинов (например, IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1) и молекул адгезии (VCAM-1, ICAM-1, E-селектин), которые привлекают иммунные клетки и способствуют их экстравазации [55]. Для активации ЭК критично переключение между сигналами оксида азота (NO) и активных форм кислорода (АФК). NO способствует гомеостазу и поддерживает сосудистую стенку в состоянии покоя за счет ингибирования секреции провоспалительных цитокинов, экстравазации иммунных клеток, пролиферации ГМК, тромбоза, тогда как АФК индуцируют передачу сигналов NF-κB, основного регулятора воспаления. В основе механизмов дисфункции ЭК в ответ на патофизиологические стимулы (биохимические и биомеханические) лежит состояние окислительного стресса. При активации эндотелий приобретает провоспалительное состояние и становится более проницаемым, что способствует накоплению лейкоцитов и липидов в интима артерии и приводит к образованию пенных клеток и жировой полосы — отличительных признаков развития атеросклероза [56].

Образование бляшек при атеросклерозе связано с накоплением мезенхимальных клеток (сосудистых ГМК и миофибробластов) в интима артерий. Эти мезенхимальные клетки имеют решающее значение в прогрессировании атеросклероза, поскольку они секретируют провоспалительные молекулы, синтезируют белки внеклеточного матрикса и металлопротеазы, которые способствуют образованию бляшек и регулируют их стабильность. Происхождение неоинтимных мезенхимальных клеток в бляшке, изучаемое в течение десятилетий, все еще не установлено. В патологических условиях ГМК, происходящие из средней оболочки сосуда, и фибробласты из адвентиции мигрируют, пролиферируют и участвуют в утолщении неоинтимы. Кроме того, клетки костного мозга вносят вклад в формирование неоинтимы при патологических условиях. Недавние наблюдения, сделанные на атеросклеротических бляшках человека, свиней и мышей, предполагают эндотелиальное происхождение мезенхимальных клеток неоинтимы, которые экспрессируют как эндотелиальные (например, PECAM-1, Endocan, VE-кадгерин), так и мезенхимальные маркеры (α-SMA и виментин) [5, 57].

Синергизм воспалительной передачи сигналов и TGF-β в индукции EndMT, а также воспалительный стресс усугубляют прогрессирование атеросклероза у мышей [58]. Провоспалительные цитокины (например, IL-1β и TNF-α) активируют фактор транскрипции NF-κB, что приводит к повышенной экспрессии TGF-β1 и TGF-β2, ос-

нового индуктора EndMT. Помимо конвергенции воспаления с передачей сигналов TGF- β , провоспалительные цитокины также могут индуцировать EndMT независимым от TGF- β образом. EndMT, запускаемый воспалением, основан на индукции Snail с помощью NF- κ B, основных регуляторов транскрипции EndMT. Точный путь индуцированного воспалением EndMT еще предстоит выяснить. Дальнейшего изучения требует и его сходство или отличие от канонического EndMT, индуцированного TGF- β [59].

Получены данные, свидетельствующие о важной роли EndMT в патогенезе легочной артериальной гипертензии. К отличительным признакам патогенеза легочной артериальной гипертензии относятся эндотелиальная дисфункция и aberrантное ремоделирование сосудов с окклюзионным α -SMA-положительным накоплением клеток, образующих неоинтиму. При легочной артериальной гипертензии эндотелиоциты локально подвергаются хроническому воспалению, гипоксии, механическому стрессу и потере клеточных контактов. TNF- α , IL-6, TGF- β или IL-8 способствуют экспрессии ZEB/Snail/Twist через передачу сигналов NF- κ B и JAK/STAT. Клетки, подвергающиеся EndMT, также индуцируют местное воспаление через повышенную секрецию цитокинов IL-6, IL-8 и TNF- α . Из-за нарушений кровотока повышенное давление и напряжение сдвига вызывают EndMT, направленный на усиление гладкомышечного компонента измененных сосудов, что ведет к увеличению толщины сосудистой стенки. Напряжение сдвига, возникающее в результате увеличения сосудистого сопротивления, еще больше повреждает клеточные соединения эндотелиоцитов [60].

Миокард приспосабливается к повышенной нагрузке давлением путем изменения своей структуры и функции. Эти изменения сопровождаются серией сложных клеточных и молекулярных перестроек, которые приводят к прогрессированию компенсаторной гипертрофии в сердечную недостаточность [61]. Морфологические изменения включают гипертрофию кардиомиоцитов и повышение синтеза межклеточного вещества, что ведет к нарушению динамического баланса внеклеточного матрикса, влияющего на васкуляризацию, синтез и деградацию коллагена [2–4]. В компенсаторной стадии гипертрофии эти изменения позволяют параллельно увеличивать рост кардиомиоцитов и отложение коллагена. Развитие гипертрофии приводит к апоптозу кардиомиоцитов, избыточному отложению коллагена для замены некротизированных или апоптотических клеток, изменению профиля факторов роста, созданию ангиогенной среды. Это вызывает нарушение микроциркуляторного русла и обусловленную этим гибель кардиомиоцитов и запускает активацию TGF- β . Повышенное со-

держание коллагена в сердце (фиброз) тесно связано с передачей сигналов TGF- β , что делает этот фактор перспективной терапевтической мишенью при сердечной недостаточности [62].

Сердечный фиброз тесно связан с множеством сердечно-сосудистых заболеваний, характеризующихся отложением компонентов внеклеточного матрикса [63]. Процесс фиброза заключается в пролиферации фибробластов с их последующей дифференцировкой в миофибробласты, что приводит к повышенной экспрессии α -SMA и продукции белков внеклеточного матрикса, таких как коллагены I, III, VI и V [64]. EndMT также служит источником фибробластов и ЭК, дающих начало миофибробластам, связанным с фиброзными заболеваниями. Этот переход способствует миграции миофибробластов в интерстициальные ткани, что приводит к фиброзу.

Окислительный и нитрозативный стресс рассматривают в качестве возможных патологических условий, способствующих активации EndMT. Так, в последние годы выявлена важная роль соединений оксида азота во многих физиологических и патологических процессах [65].

TGF- β индуцирует окислительный стресс в ЭК посредством индукции митохондриальной дисфункции, которая приводит к активации транскрипционного фактора NF- κ B. Повышенные уровни эндотелиального окислительного стресса и активность NF- κ B увеличивают экспрессию TGF- β 1 и TGF- β 2, что приводит к усилению EndMT [66]. Более того, окислительный стресс может активировать TGF- β несколькими способами: через окисление ассоциированного с латентностью пептида (LAP) и через опосредованное разрушение LAP матриксной металлопротеиназой. Снижение окислительного стресса экзогенными антиоксидантами снижает уровень эндотелиального окислительного стресса и, следовательно, EndMT [67]. Интересно, что матриксная металлопротеиназа 9, активирующая TGF- β , способствует EndMT при фиброзе почек, что указывает на роль ответа на окислительный стресс в мезенхимальном переходе. Эти данные говорят о том, что воспаление, гипоксия и окислительный стресс в эндотелии способствуют EndMT, индуцируя каноническую передачу сигналов TGF- β .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

EndMT является сложным молекулярно-клеточным процессом, сопровождающимся фенотипическим переходом эндотелиоцитов, который характеризуется потерей эндотелиальных маркеров (CD31 и фактор Виллебранда) и экспрессией мезенхимальных маркеров (α -SMA и виментин). EndMT участвует в эмбриональном развитии, регенерации органов и тканей, формировании им-

мунных и воспалительных ответов в различных физиологических и патологических условиях, а также играет одну из ведущих ролей в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Таким образом, изучение механизмов индукции и ингибирования EndMT под влиянием экзогенных и эндогенных факторов представляет перспективное направление клеточной биологии.

Написание обзора не потребовало специального финансирования.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rodrigues S.F., Granger D.N. (2015) Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers*. **3**(1–2), e978720.
- Калинин Р.Е., Сучков И.А., Крылов А.А., Мжаванадзе Н.Д., Пшенников А.С., Соляник Н.А., Герасимов А.А. (2021) Комплексный подход к лечению неоперабельных пациентов с критической ишемией нижних конечностей и сахарным диабетом: результаты и перспективы. *Наука молодых – Eruditio Juvenium*. **9**(4), 559–572.
- Pérez L., Muñoz-Durango N., Riedel C.A., Echeverría C., Kalergis A.M., Cabello-Verrugio C., Simon F. (2017) Endothelial-to-mesenchymal transition: cytokine-mediated pathways that determine endothelial fibrosis under inflammatory conditions. *Cytokine Growth Factor Rev*. **33**, 41–54.
- Kizu A., Medici D., Kalluri R. (2009). Endothelial–mesenchymal transition as a novel mechanism for generating myofibroblasts during diabetic nephropathy. *Am. J. Pathol.* **175**(4), 1371–1373.
- Souilhol C., Harmsen M.C., Evans P.C., Krenning G. (2018) Endothelial–mesenchymal transition in atherosclerosis. *Cardiovascular Res*. **114**(4), 565–577.
- Kokudo T., Suzuki Y., Yoshimatsu Y., Yamazaki T., Watabe T., Miyazono K. (2008) Snail is required for TGF β -induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J. Cell Sci*. **121**(20), 3317–3324.
- Kovacic J.C., Dimmeler S., Harvey R.P., Finkel T., Aikawa E., Krenning G., Baker A.H. (2019) Endothelial to mesenchymal transition in cardiovascular disease: JACC state-of-the-art review. *J. Am. College Cardiol.* **73**(2), 190–209.
- Zhang Y., Zhang M., Xie W., Wan J., Tao X., Liu M., Zhen Y., Lin F., Wu B., Zhai Z., Wang C. (2020) Gremlin-1 is a key regulator of endothelial-to-mesenchymal transition in human pulmonary artery endothelial cells. *Exp. Cell Res*. **390**(1), 111941.
- Liao D., Sundlov J., Zhu J., Mei H., Hu Y., Newman D.K., Newman P.J. (2022) Atomic level dissection of the platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) homophilic binding interface: implications for endothelial cell barrier function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **42**(2), 193–204.
- Sadler J.E. (1998) Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 395.
- Van Roy F., Berx G. (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**(23), 3756–3788.
- Harris E.S., Nelson W.J. (2010). VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**(5), 651–658.
- Herrmann H., Hesse M., Reichenzeller M., Aebi U., Magin T.M. (2002) Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. *Int. Rev. Cytol.* **223**, 83–175.
- Colucci-Guyon E., Portier M.M., Dunia I., Paulin D., Pournin S., Babinet C. (1994) Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell*. **79**(4), 679–694.
- Colucci-Guyon E., Giménez Y., Ribotta M., Maurice T., Babinet C., Privat A. (1999) Cerebellar defect and impaired motor coordination in mice lacking vimentin. *Glia*. **25**(1), 33–43.
- Eckes B., Colucci-Guyon E., Smola H., Nodder S., Babinet C., Krieg T., Martin P. (2000) Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J. Cell Sci.* **113**(13), 2455–2462.
- Henrion D., Terzi F., Matrougui K., Duriez M., Boulanger C.M., Colucci-Guyon E., Babinet C., Briand P., Friedlander G., Poitevin P., Lévy B.I. (1997) Impaired flow-induced dilation in mesenteric resistance arteries from mice lacking vimentin. *J. Clin. Invest.* **100**(11), 2909–2914.
- Veres-Székely A., Pap D., Sziksz E., Jávorszky E., Rokony R., Lippai R., Tony K., Fekete A., Tulassay T., Szabo A.J., Vannay Á. (2017) Selective measurement of α smooth muscle actin: why β -actin can not be used as a housekeeping gene when tissue fibrosis occurs. *BMC Mol. Biol.* **18**(1), 1–15.
- Doherty G.J., McMahon H.T. (2008) Mediation, modulation, and consequences of membrane-cytoskeleton interactions. *Annu. Rev. Biophys.* **37**(1), 65–95.
- Samad F., Loskutoff D.J. (1996) Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice. *Mol. Med.* **2**(5), 568–582.
- Vaughan D.E. (2005) PAI-1 and atherothrombosis. *J. Thrombosis Haemostasis*. **3**(8), 1879–1883.
- Rana T., Jiang C., Liu G., Miyata T., Antony V., Thanickal V.J., Liu R.M. (2020) PAI-1 regulation of TGF- β 1-induced alveolar type II cell senescence, SASP secretion, and SASP-mediated activation of alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **62**(3), 319–330.
- Fukudome K., Esmon C.T. (1994) Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J. Biol. Chem.* **269**(42), 26486–26491.
- Wharton K., Derynck R. (2009) TGF β family signaling: novel insights in development and disease. *Development*. **136**(22), 3691–3697.
- Farrar E.J., Butcher J.T. (2014) Heterogeneous susceptibility of valve endothelial cells to mesenchymal transformation in response to TNF α . *Ann. Biomed. Eng.* **42**(1), 149–161.
- Romero L.I., Zhang D.N., Herron G.S., Karasek M.A. (1997). Interleukin-1 induces major phenotypic changes in human skin microvascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* **173**(1), 84–92.

27. Maleszewska M., Gjaltema R.A., Krenning G., Harmen M.C. (2015) Enhancer of zeste homolog-2 (EZH2) methyltransferase regulates transgelin/smooth muscle-22 α expression in endothelial cells in response to interleukin-1 β and transforming growth factor- β 2. *Cell. Signal.* **27**(8), 1589–1596.
28. Cho J.G., Lee A., Chang W., Lee M.S., Kim J. (2018) Endothelial to mesenchymal transition represents a key link in the interaction between inflammation and endothelial dysfunction. *Front. Immunol.* **9**, 294.
29. Good R.B., Gilbane A.J., Trinder S.L., Denton C.P., Coghlan G., Abraham D.J., Holmes A.M. (2015) Endothelial to mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Pathol.* **185**(7), 1850–1858.
30. Lee J.G., Ko M.K., Kay E.P. (2012) Endothelial mesenchymal transformation mediated by IL-1 β -induced FGF-2 in corneal endothelial cells. *Exp. Eye Res.* **95**(1), 35–39.
31. Dejana E., Hirschi K.K., Simons M. (2017) The molecular basis of endothelial cell plasticity. *Nat. Commun.* **8**(1), 1–11.
32. Sabbineni H., Verma A., Artham S., Anderson D., Amaka O., Liu F., Narayanan S.P., Somanath P.R. (2019) Pharmacological inhibition of β -catenin prevents EndMT *in vitro* and vascular remodeling *in vivo* resulting from endothelial Akt1 suppression. *Biochem. Pharmacol.* **164**, 205–215.
33. Giordo R., Ahmed Y.M., Allam H., Abusnana S., Papalardo L., Nasrallah G.K., Mangoni A.A., Pintus G. (2021) EndMT regulation by small RNAs in diabetes-associated fibrotic conditions: potential link with oxidative stress. *Front. Cell Develop. Biol.* **9**, 683594.
34. Shang J., Zhang Y., Jiang Y., Li Z., Duan Y., Wang L., Xiao J., Zhao Z. (2017) NOD2 promotes endothelial-to-mesenchymal transition of glomerular endothelial cells via MEK/ERK signaling pathway in diabetic nephropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **484**(2), 435–441.
35. Zhao L., Zhao J., Wang X., Chen Z., Peng K., Lu X., Meng L., Liu G., Guan G., Wang F. (2016) Serum response factor induces endothelial-mesenchymal transition in glomerular endothelial cells to aggravate proteinuria in diabetic nephropathy. *Physiol. Genomics.* **48**(10), 711–718.
36. Ma Z., Zhu L., Liu Y., Wang Z., Yang Y., Chen L., Lu Q. (2017) Lovastatin alleviates endothelial-to-mesenchymal transition in glomeruli via suppression of oxidative stress and TGF- β 1 signaling. *Front. Pharmacol.* **8**, 473.
37. Chen P.Y., Qin L., Barnes C., Charisse K., Yi T., Zhang X., Ali R., Medina P.P., Yu J., Slack F.J., Anderson D.J., Kotelianski V., Wang F., Tellides G., Simons M. (2012) FGF regulates TGF- β signaling and endothelial-to-mesenchymal transition via control of let-7 miRNA expression. *Cell Rep.* **2**(6), 1684–1696.
38. Ichise T., Yoshida N., Ichise H. (2014) FGF2-induced Ras–MAPK signalling maintains lymphatic endothelial cell identity by upregulating endothelial-cell-specific gene expression and suppressing TGF β signalling through Smad2. *J. Cell Sci.* **127**(4), 845–857.
39. Xu X., Friehs I., Zhong Hu T., Melnychenko I., Tampe B., Alnour F., Iasconr M., Kalluri R., Zeisberg M., del Nido P.J., Zeisberg E.M. (2015) Endocardial fibroelastosis is caused by aberrant endothelial to mesenchymal transition. *Circulation Res.* **116**(5), 857–866.
40. Kanasaki K., Shi S., Kanasaki M., He J., Nagai T., Nakamura Y., Ishidaki Y., Kitada M., Srivastava S.P., Koya D. (2014) Linagliptin-mediated DPP-4 inhibition ameliorates kidney fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice by inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition in a therapeutic regimen. *Diabetes.* **63**(6), 2120–2131.
41. Gao H., Zhang J., Liu T., Shi W. (2011) Rapamycin prevents endothelial cell migration by inhibiting the endothelial-to-mesenchymal transition and matrix metalloproteinase-2 and-9: an *in vitro* study. *Mol. Vision.* **17**, 3406.
42. Cipriani P., Di Benedetto P., Ruscitti P., Capece D., Zazzeroni F., Liakouli V., Pantano I., Berardicurti O., Carubbi F., Pecetti G., Turricchia S., Edoardo Alesse, Iglarz M., Giacomelli R. (2015) The endothelial-mesenchymal transition in systemic sclerosis is induced by endothelin-1 and transforming growth factor- β and may be blocked by macitentan, a dual endothelin-1 receptor antagonist. *J. Rheumatol.* **42**(10), 1808–1816.
43. Guo Y., Li P., Bledsoe G., Yang Z.R., Chao L., Chao J. (2015) Kallistatin inhibits TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition by differential regulation of microRNA-21 and eNOS expression. *Exp. Cell Res.* **337**(1), 103–110.
44. Chen X., Cai J., Zhou X., Chen L., Gong Y., Gao Z., Zhang H., Huang W., Zhou H. (2015) Protective effect of spironolactone on endothelial-to-mesenchymal transition in HUVECs via notch pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* **36**(1), 191–200.
45. Wylie-Sears J., Levine R.A., Bischoff J. (2014) Losartan inhibits endothelial-to-mesenchymal transformation in mitral valve endothelial cells by blocking transforming growth factor- β -induced phosphorylation of ERK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**(4), 870–875.
46. Testai L., Brancaleone V., Flori L., Montanaro R., Calderone V. (2021) Modulation of EndMT by hydrogen sulfide in the prevention of cardiovascular fibrosis. *Antioxidants.* **10**(6), 910.
47. Lovisa S., Fletcher-Sananikone E., Sugimoto H., Hensel J., Lahiri S., Hertig A., Taburi G., Lawson E., Dewar R., Revuelta I., Kato N., Wu C.J., Bassett J.R.R.L., Putluni N., Zeisberg M., Zeisberg E.M., Lebleu V., Kalluri R. (2020) Endothelial-to-mesenchymal transition compromises vascular integrity to induce Myc-mediated metabolic reprogramming in kidney fibrosis. *Sci. Signal.* **13**(635), eaaz2597.
48. Manetti M., Romano E., Rosa I., Guiducci S., Bellando-Randone S., De Paulis A., Ibba-Manneschi L., Matucci-Cerinic M. (2017) Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction and dermal fibrosis in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **76**(5), 924–934.
49. Hao Y.M., Yuan H.Q., Ren Z., Qu S.L., Liu L.S., Yin K., Yin K., Fu M., Jiang Z.S. (2019) Endothelial to mesenchymal transition in atherosclerotic vascular remodeling. *Clin. Chim. Acta.* **490**, 34–38.
50. Gorelova A., Berman M., Al Ghouleh I. (2021) Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary arterial hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* **34**(12), 891–914.
51. Gurzu S., Kobori L., Fodor D., Jung I. (2019) Epithelial mesenchymal and endothelial mesenchymal transi-

- tions in hepatocellular carcinoma: a review. *BioMed Res. Int.* **2019**. 2962580.
52. van Nieuw Amerongen G.P., van Hinsbergh V.W. (2002). Targets for pharmacological intervention of endothelial hyperpermeability and barrier function. *Vasc. Pharmacol.* **39**(4–5), 257–272.
 53. Barabutis N., Verin A., Catravas J.D. (2016) Regulation of pulmonary endothelial barrier function by kinases. *Am. J. Physiol. – Lung Cell. Mol. Physiol.* **311**(5), L832–L845.
 54. Davignon J., Ganz P. (2004) Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* **109**(23 Suppl 1), III27–32.
 55. Mudau M., Genis A., Lochner A., Strijdom H. (2012) Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovasc. J. Africa.* **23**(4), 222–231.
 56. Chang J.C., Kou S.J., Lin W.T., Liu C.S. (2010) Regulatory role of mitochondria in oxidative stress and atherosclerosis. *World J. Cardiol.* **2**(6), 150.
 57. Moonen J.R.A., Lee E.S., Schmidt M., Maleszewska M., Koerts J.A., Brouwer L.A., van Kooten T.G., van Luyn M.J.A., Zeebregts C.J., Krenning G., Harmsen M.C. (2015) Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to fibro-proliferative vascular disease and is modulated by fluid shear stress. *Cardiovasc. Res.* **108**(3), 377–386.
 58. Ma K.L., Liu J., Ni J., Zhang Y., Lv L.L., Tang R.N., Ni H.F., Ruan X.Z., Liu B.C. (2013) Inflammatory stress exacerbates the progression of cardiac fibrosis in high-fat-fed apolipoprotein E knockout mice via endothelial-mesenchymal transition. *Int. J. Med. Sci.* **10**(4), 420.
 59. Maleszewska M., Moonen J.R.A., Huijckman N., van de Sluis B., Krenning G., Harmsen M.C. (2013) IL-1 β and TGF β 2 synergistically induce endothelial to mesenchymal transition in an NF- κ B-dependent manner. *Immunobiology.* **218**(4), 443–454.
 60. Ranchoux B., Tanguay V.F., Perros F. (2020) Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. In: *Molecular Mechanism of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension*. Eds Nakanishi T., Baldwin H. S., Fineman J.R., Yamagishi H. Singapur: Springer, 63–70.
 61. Pelouch V., Dixon I., Golfman L., Beamish R.E., Dhalla N.S. (1993) Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol. Cell. Biochem.* **129**(2), 101–120.
 62. van Wamel A.J., Ruwhof C., van der Valk-Kokshoom L.J., Schrier P.I., van der Laarse A. (2002) Stretch-induced paracrine hypertrophic stimuli increase TGF- β 1 expression in cardiomyocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **236**(1), 147–153.
 63. Al Hattab D., Czubryt M.P. (2017) A primer on current progress in cardiac fibrosis. *Canadian J. Physiol. Pharmacol.* **95**(10), 1091–1099.
 64. Ho Y.Y., Lagares D., Tager A.M., Kapoor M. (2014) Fibrosis – a lethal component of systemic sclerosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **10**(7), 390–402.
 65. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Короткова Н.В., Климентова Э.А., Поваров В.О. (2021) Метаболиты оксида азота при развитии осложнений после открытых реконструктивных вмешательств у пациентов с периферическим атеросклерозом. *Наука молодых – Eruditio Juvenium.* **9**(3), 407–414.
 66. Lee E.S., Boldo L.S., Fernandez B.O., Feelisch M., Harmsen M.C. (2017) Suppression of TAK1 pathway by shear stress counteracts the inflammatory endothelial cell phenotype induced by oxidative stress and TGF- β 1. *Sci. Rep.* **7**(1), 1–14.
 67. Jobling M.F., Mott J.D., Finnegan M.T., Jurukovski V., Erickson A.C., Walian P.J., Taylor S.E., Ledbetter S., Lawrence C.M., Rifkin D.B., Barcellos-Hoff M.H. (2006) Isoform-specific activation of latent transforming growth factor β (LTGF- β) by reactive oxygen species. *Radiation Res.* **166**(6), 839–848.

Molecular and Cellular Aspects of Endothelial-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Diseases

E. A. Strelnikova¹, R. E. Kalinin¹, I. A. Suchkov¹, N. V. Korotkova¹, and N. D. Mzhavanadze¹, *

¹Ryazan State Medical University, Ryazan, 390026 Russia

*e-mail: ekaterina3333@rambler.ru

Endothelial cells (ECs), which form the inner surface of the blood vessels, contact with blood, withstand mechanical pressure, and demonstrate heterogeneous reactions to exogenous and endogenous stimuli. ECs have unique properties in accordance with their niche, and play an important role in regulating vascular homeostasis. Endothelial cells may undergo a dynamic phenotypic switch in terms of its heterogeneity, which may lead to endothelial dysfunction and a number of associated pathologies. Endothelial-mesenchymal transition (EndMT) is one of the possible molecular and cellular mechanisms of such kind. EndMT is characterized by phenotypic changes in ECs through which the cells obtain new properties, i.e. start producing mesenchymal markers such as α -SMA and vimentin, change morphology, and become able to migrate. EndMT is a complex biological process, which may be induced by inflammation, hypoxia or oxidative stress, and be involved in pathogenesis of cardiovascular disease. This manuscript presents the key markers, inhibitors, inducers of endothelial-mesenchymal transition, and overall state-of-the-art of EndMT in cardiovascular diseases.

Keywords: endothelial cells, endothelial-mesenchymal transition, endothelial dysfunction, EndMT

СТРУКТУРА И СБОРКА КОМПЛЕКСА ЯДЕРНОЙ ПОРЫ

© 2023 г. А. В. Орлова^а, *, С. Г. Георгиева^а, Д. В. Копытова^а^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: chipushka@gmail.com

Поступила в редакцию 14.11.2022 г.

После доработки 08.12.2022 г.

Принята к публикации 08.12.2022 г.

Обмен молекулами между основными компартментами эукариотической клетки — ядром и цитоплазмой, происходит через комплексы ядерной поры (Nuclear Pore Complex, NPC), пронизывающие двуслойную ядерную мембрану. NPC — сложная многобелковая структура с центральным каналом, имеющая октагональную симметрию и состоящая из нуклеопоринов. Каждый из нуклеопоринов в составе NPC представлен большим количеством копий. В сквозном канале в центре NPC образуется водонепроницаемый барьер, который обеспечивает способность NPC к селективному и быстрому перемещению молекул с одной стороны ядерной оболочки на другую. В основе структурной организации NPC лежит иерархический принцип. Нуклеопорины объединены в комплексы, которые служат мономерами для формирования октамеров основных структурных элементов NPC. В нашем обзоре рассмотрены структура и сборка NPC, механизм которой зависит от стадии клеточного цикла.

Ключевые слова: комплекс ядерной поры, NPC, нуклеопорины, FG- нуклеопорины, Y-комплекс, SLiM-мотив, сборка комплекса ядерной поры, неядерный поровый комплекс

DOI: 10.31857/S0026898423040171, EDN: QLVYOP

ВВЕДЕНИЕ

Для функционирования эукариотической клетки необходим постоянный обмен молекулами между ядром и цитоплазмой. В ядро поступают белки транскрипционного аппарата и факторы сплайсинга, белки, связанные с репликацией и пространственной организацией ДНК, рибосомные белки, а также малые молекулы, необходимые для осуществления репликации, транскрипции, сплайсинга и процессинга РНК. Через ядерные поры в ядро проходят протеасомы, проникают вирусные частицы. В цитоплазму экспортируются синтезированные в процессе транскрипции молекулы РНК: мРНК и некодирующие регуляторные РНК в составе рибонуклеопротеиновых ком-

плексов, а также рРНК в составе рибосомных субъединиц.

Перемещение молекул между ядром и цитоплазмой происходит по каналам комплекса ядерной поры (NPC). Различают два вида транспорта через NPC — активный и пассивный (диффузия). Молекулы размером до 30 кДа преодолевают канал NPC посредством пассивного транспорта, тогда как молекулы большего размера переходят с одной стороны ядерной оболочки на другую путем активного транспорта в комплексе с транспортными рецепторами, которые, в свою очередь, взаимодействуют с нуклеопоринами NPC. Сложная архитектура NPC позволяет проходить через канал NPC (диаметр которого равен примерно 50 нм) как структурам с огромной молекулярной массой, таким как протеасомы, вирусные частицы, субъединицы рибосом, так и очень маленьким молекулам, таким как нуклеотиды. Механизм обмена молекулами между ядром и цитоплазмой интенсивно изучается [1, 2].

Способ сборки NPC зависит от стадии клеточного цикла. На ядерной оболочке растущей клетки происходит сборка NPC *de novo*, а в дочерних клетках, образующихся после деления, NPC формируется из нуклеопоринов материнской клетки. Эти процессы осуществляются посредством разных механизмов. Кроме того, существуют так на-

Сокращения: NPC (Nuclear Pore Complex) — комплекс ядерной поры; FG-повтор (повтор Phe-Gly) — фрагмент нуклеопорина, обогащенный остатками фенилаланина и глицина; SLiM (Short Linear Motif) — короткие (до 10 аминокислот) фрагменты белковой молекулы, играющие ключевую роль в формировании взаимодействий с другими белками; CDK (Cyclin-dependent kinase) — циклинзависимая киназа; PLK (Polo-like kinase) — Полоподобная киназа; PP1 (Protein phosphatase 1) — протеинфосфатаза 1; ELYS (Embryonic Large molecule derived from Yolk Sac) — компонент Y-комплекса; ЭПР — эндоплазматический ретикулум; AL (Anullate Lamellae) — цистерноподобные элементы ЭПР; ALPC (Anullate Lamellae Pore Complex) — неядерный поровый комплекс.

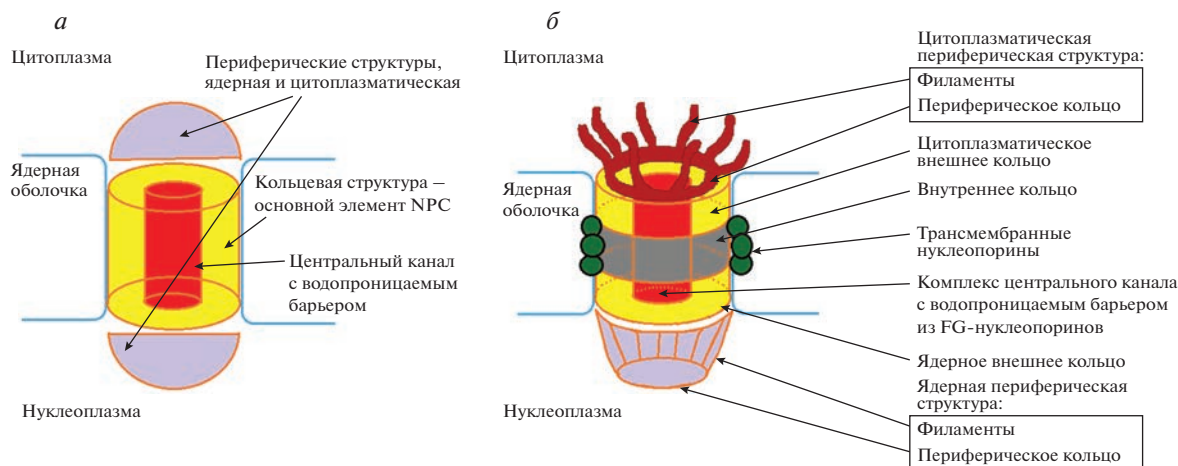


Рис. 1. Основные структурные элементы NPC (а) и схематичное изображение устройства NPC (б).

зываемые неядерные поровые комплексы, о функции и механизмах сборки которых известно совсем немного.

СОСТАВ И РАЗМЕР NPC

NPC — консервативная структура, имеющая сходное строение у всех эукариот, от дрожжей до человека. Белки, входящие в состав NPC, называются нуклеопоринами. Индивидуальные нуклеопорины принято обозначать Nup с указанием его молекулярной массы. Например, Nup107 человека и Nup84 дрожжей это белки с молекулярной массой 107 и 84 кДа. Ряд нуклеопоринов имеет свои собственные названия (TPR, Pom121, ELYS и другие), которые они получили еще до того, как обнаружили, что они входят в состав NPC. В нашем обзоре описана структура NPC человека, поэтому используются названия нуклеопоринов человека, если иное не указано дополнительно.

NPC — самый крупный белковый внутриклеточный комплекс. При молекулярной массе 44–125 МДа (о разбросе в значениях молекулярной массы сказано ниже) диаметр NPC составляет 120 нм [3, 4]. Для сравнения можно сказать, что молекулярная масса рибосомы составляет 4.3 МДа [5]. Столь значительные размеры сделали NPC удобным объектом для исследований, в первую очередь, микроскопических. Впервые NPC увидели в микроскоп в 1950 году [6]. Начиная с этого времени, увеличение разрешающей способности микроскопов приводило к расширению знаний о структуре NPC. В общих чертах устройство NPC представлено на рис. 1а. Установлено, что NPC имеет кольцевую структуру с октагональной симметрией, которая пронизывает двуслойную ядерную мембрану. В центре NPC располагается канал, соединяющий нуклеоплазму с цитоплазмой. В канале находится водонепроницаемый барьер —

структура, обуславливающая селективные пропускные способности NPC. На ядерной и цитоплазматической стороне NPC находятся периферические структуры.

Впервые NPC выделили из печени крысы в 1976 г. [7], когда общая структура NPC уже была достаточно хорошо изучена. Молекулярная масса NPC, определенная в разных работах, варьировала достаточно сильно. Так, размер NPC, выделенного из ооцитов *Xenopus laevis*, составил примерно 125 МДа [8]. Молекулярная масса NPC *Saccharomyces cerevisiae*, рассчитанная с использованием коэффициента седиментации, который составил 310S (для рибосомы 80S), соответствует 56–73 МДа [9]. Сумма молекулярных масс всех выделенных и очищенных нуклеопоринов дрожжей *S. cerevisiae* в составе NPC, т.е. молекулярная масса всего комплекса, равна 44 МДа [9].

В попытке объяснить эту разницу применили метод оценки размеров молекулярных комплексов по микроскопическим размерам отдельных NPC [10]. Этот подход позволял измерять только те NPC, которые не потеряли своей целостности в процессе приготовления препаратов. В результате установлено, что размер NPC составляет 55 МДа, что также заметно превышает биохимически определенную молекулярную массу NPC, равную 44 МДа.

Значительно больший размер NPC у высших эукариот (125 против 55 МДа) изначально объясняли их более сложной структурой, в состав которой входит много нуклеопоринов, которых нет в NPC дрожжей. При этом, судя по электронным фотографиям, размер NPC у высших эукариот больше, чем у дрожжей, примерно на 10–15% [3, 4].

Кроме того, при делении клеток дрожжей не происходит фрагментации ядерной оболочки на везикулы и от нее не отделяются NPC. В клетках высших эукариот ядерная оболочка диссоцииру-

ет на везикулы, NPC отделяются от ядерных мембран и частично разбираются до отдельных нуклеопоринов, а частично до небольших комплексов, состоящих из нескольких нуклеопоринов. Механизм сборки NPC сразу после деления клетки отличается от механизма, посредством которого в интерфазе образуются новые NPC.

Чтобы объяснить большое различие в молекулярной массе NPC у высших и низших эукариот, проведен поиск нуклеопоринов, специфичных для высших эукариот. Однако оказалось, что NPC из печени крысы [11] содержат только шесть нуклеопоринов, гомологи которых не найдены в NPC дрожжей. Молекулярная масса NPC высших эукариот (с учетом открытых нуклеопоринов) составляет 60 МДа. Эта цифра лишь незначительно (на 5 МДа) превышает молекулярную массу NPC *S. cerevisiae*. Сделан вывод, что в зависимости от условий очистки с NPC могут соосаждаться транспортируемые молекулы, что и может быть причиной столь значительного увеличения молекулярной массы.

В связи с этим возникла необходимость более точно охарактеризовать нуклеопорины и определить те их свойства, благодаря которым тот или иной белок попадает в категорию компонентов NPC. Первая попытка подобного рода сделана в работе [12], в которой предложено следующее определение нуклеопоринов — нуклеопорины это белки, постоянно входящие в состав NPC и не имеющие других известных функций. При таком определении в число нуклеопоринов не входят, например, факторы транспорта — белки, опосредующие взаимодействие между транспортируемыми молекулами и каналом NPC, хотя основная их функция — прохождение через ядерную пору, а основное место расположения в клетке — в непосредственной близости от NPC.

Благодаря этому подходу, из состава NPC удалили ряд белков, в том числе компоненты эндоплазматического ретикулума (ЭПР), факторы транспорта, рибосомные белки [12].

Однако не обошлось и без спорных случаев. Во-первых, принимая подобное определение, из числа нуклеопоринов удаляют белки, которые могут выполнять двойную функцию. В частности, из нуклеопоринов исключили белок Sec13p [12], обнаруженный ранее в составе комплекса размером 150 кДа, компоненты которого локализованы на ЭПР. В дальнейшем выяснили, что Sec13p является компонентом Y-комплекса, одного из основных структурных компонентов NPC, и его снова включили в число нуклеопоринов [2].

Еще один пример белка с двойной функцией — белок Grp210 (или Nup210). Этот белок содержит трансмембранный домен, участвующий в закреплении комплекса NPC на внешней и внутрен-

ней ядерных мембранах. При этом Grp210 одновременно является белком ЭПР и участвует в поддержании его гомеостаза [13].

Во-вторых, к моменту введения указанного определения нуклеопоринов ничего не было известно о неядерных поровых комплексах, расположенных на мембранах ЭПР. Эти поровые комплексы состоят из тех же белков, что и NPC, но механизмы их формирования изучены недостаточно. Таким образом, нуклеопорины могут входить не только в состав NPC, расположенных на ядерной оболочке, но и в состав неядерных поровых комплексов.

Нуклеопорины имеют довольно простую пространственную структуру. Многие из них содержат такие домены, как WD40, спиральная катушка (coiled-coil), LRR, кадгерин-подобная структура, β-пропеллер, α-соленоид. Эти структуры встречаются у большого числа функционально различных белков и ответственны за формирование взаимодействий с другими белками.

Примерно треть всех белков, которые относятся к нуклеопоринам, содержит FG-повторы — участки, обогащенные остатками фенилаланина и глицина. FG-повторы формируют водонепроницаемый барьер, через который осуществляется селективный транспорт молекул. Имеются нуклеопорины, состоящие преимущественно из FG-повторов (их называют FG-нуклеопоринами), которые располагаются в центральном канале NPC и основная функция которых состоит в формировании водонепроницаемого барьера. Однако нуклеопорины, локализованные в периферических структурах как с ядерной (Nup153), так и с цитоплазматической стороны (Nup358) NPC, также имеют FG-повторы. Они также участвуют в формировании водонепроницаемого барьера NPC.

Нуклеопорины, формирующие кольцевую структуру внутри ядерных мембран, постоянно находятся в составе NPC. В то же время, ряд нуклеопоринов, формирующих периферические структуры NPC, то присоединяются к NPC на непродолжительное время, то существуют отдельно от него. Такое поведение характерно как для нуклеопоринов периферических структур цитоплазматической стороны (Gle1), так и для нуклеопоринов, входящих в периферические структуры ядерной стороны (Nup153, Nup50). Nup98 расположен в периферических структурах и ядерной, и цитоплазматической стороны, и для него также показан динамичный характер присоединения к NPC [14–16]. Обнаружено, что при ингибировании транскрипции РНК-полимеразами I или II Nup153 и Nup98 “застывают” на ядерной поро. При этом прекращается динамический обмен этих нуклеопоринов между NPC и нуклеоплазмой [17]. Интересно, что Nup153, Nup50, Nup98 содержат FG-повторы, которые участвуют в фор-

мировании водопроницаемого барьера, необходимого для выполнения основной функции NPC, поэтому можно предположить, что они относятся к постоянным компонентам NPC.

Наконец, показано взаимодействие ряда нуклеопоринов многоклеточных эукариот с хроматином, причем как с активно транскрибируемым (Nup133, Nup98, Nup50, Nup62), так и с гетерохроматином (Nup88, Nup93) [18–20].

Таким образом, очевидно, что существующее определение нуклеопоринов нуждается в корректировке. Нуклеопоринами следует называть белки, одной из функций которых является поддержание структуры и транспортной активности NPC, однако они могут участвовать и в других процессах в клетке.

Помимо FG-нуклеопоринов, условно можно выделить структурные нуклеопорины, т.е. те, которые в основном состоят из доменов, отвечающих за взаимодействие с другими белками. В первую очередь из них формируется кольцевая структура, расположенная внутри ядерной оболочки. В некоторых структурных нуклеопоринах также присутствуют немногочисленные FG-повторы. Видимо, их ориентация в NPC такова, что они принимают участие в формировании водопроницаемого барьера.

Известны три нуклеопорина (Gp210, Ndc1 и Pom121), содержащие трансмембранный домен. Их выделяют в группу трансмембранных нуклеопоринов.

ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ NPC

Как уже сказано, NPC – самый крупный белковый комплекс клетки. При массе 60 МДа в состав NPC входят всего 30 разных белков, тогда как рибосома, имеющая молекулярную массу 4.2 МДа, состоит из 80 различных белков. Столь значительное различие обусловлено тем, что каждый из этих 30 нуклеопоринов представлен не менее чем восемью копиями. В формировании одного NPC участвуют около 1000 молекул белка [21].

NPC имеют октагональную симметрию. Основные структурные элементы NPC – это три кольца, взаимное расположение которых показано на рис. 1б, периферические структуры (ядерная и цитоплазматическая), а также комплекс центрального канала.

Внутреннее кольцо – среднее из трех, расположенное в глубине ядерной оболочки, стабилизирует место слияния внешней и внутренней ядерных мембран. Два внешних кольца, ядерное и цитоплазматическое, присоединены к внутреннему с разных сторон (рис. 1б) [22].

К внешним кольцам присоединены периферические структуры, ядерные и цитоплазматические (рис. 1б). Ядерная периферическая структу-

ра напоминает корзину с гибкими стенками и состоит из дистального кольца и филаментов, которые присоединяют это кольцо к внешнему ядерному кольцу (рис. 1б).

Цитоплазматическая периферическая структура состоит из кольца, присоединенного к внешнему цитоплазматическому кольцу, и филаментов, которые направлены в цитоплазму (рис. 1б).

Комплекс центрального канала расположен внутри трех колец. Он состоит из FG-нуклеопоринов, которые формируют водопроницаемый барьер. В формировании барьера принимают участие не только FG-нуклеопорины, но и FG-повторы нуклеопоринов, расположенных в других частях NPC: в периферических структурах и в трех основных кольцах NPC. Один из трансмембранных нуклеопоринов – Pom121, также содержит значительное количество FG-повторов.

NPC закреплен на ядерной мембране при помощи трансмембранных нуклеопоринов. Все структурные элементы NPC представляет собой октамеры, мономеры которых сначала собираются из отдельных нуклеопоринов. Затем из восьми мономеров образуется кольцевая структура каждого из компонентов NPC. Общая для всех основных структурных компонентов NPC схема олигомеризации показана на рис. 2а.

Структурные элементы NPC собираются из таких мономеров, как Y-комплекс, получивший название от своей Y-образной формы, и используемый для постройки ядерного и цитоплазматического внешних колец [24].

В составе этого комплекса выделяют три структурных элемента [25]: “маленький отросток” (состоит из Nup85, Seh1, Nup43), “большой отросток” (образован Nup160 и Nup37) и “стебелек” (Nup96, Sec13, Nup107, Nup133) (рис. 2б). “Отростки” направлены в сторону от ядерной мембраны: в ядерном внешнем кольце в нуклеоплазму, в цитоплазматическом внешнем кольце в цитоплазму. “Стебелек” прикрепляется к ядерной мембране, взаимодействуя с трансмембранными нуклеопоринами, а также участвует во взаимодействии голова к хвосту с другими Y-комплексами (голова – отростки, хвост – дистальная часть стебелька). Это приводит к формированию кольцевой октамерной структуры из восьми Y-комплексов (рис. 2б). В клетках человека каждое внешнее кольцо (и ядерное, и цитоплазматическое) состоит из двух таких октамеров [26]. В клетках дрожжей каждое внешнее кольцо состоит из одного октамера Y-комплексов [27]. На рис. 2б приведены структуры дрожжевых внешних колец.

В состав большого отростка Y-комплексов, составляющих ядерное внешнее кольцо, также входит белок ELYS, который участвует во взаимодействии между NPC и хроматином, запуская при

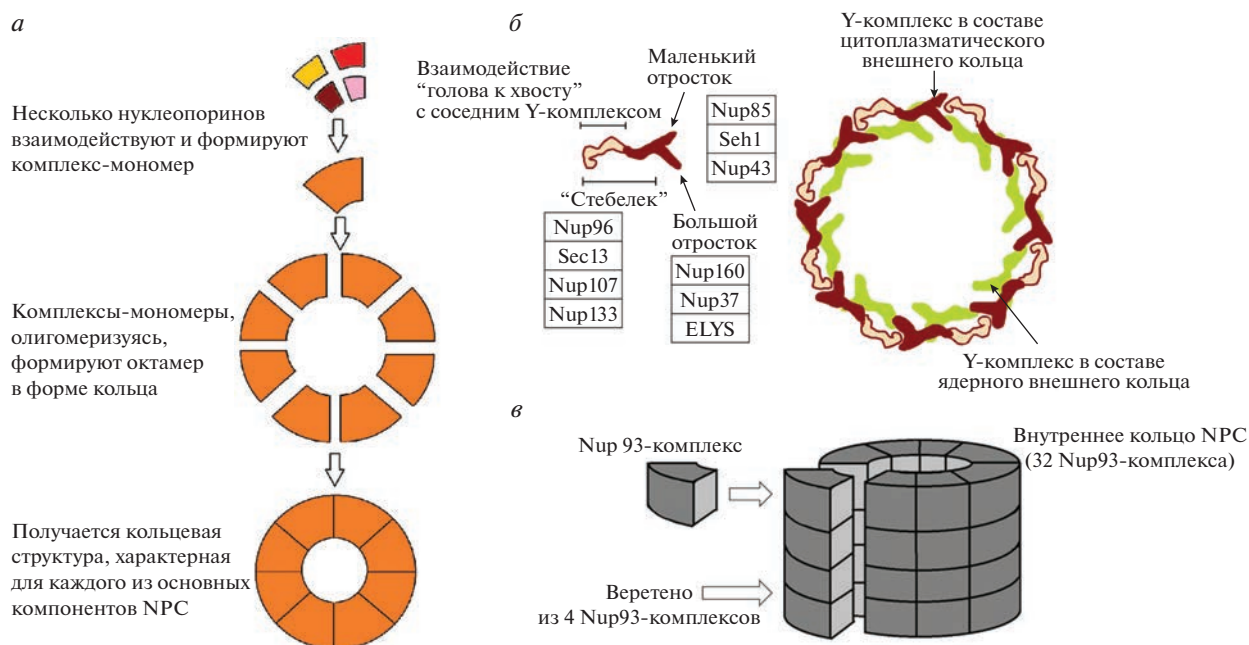


Рис. 2. Схема образования кольцевых структурных компонентов NPC (схема общая, нуклеопорины, составляющие каждое из колец, разные) (а). Схематическая структура Y-комплекса на примере NPC *Homo sapiens* и схема образования внешних колец из Y-комплексов (взаимодействие голова к хвосту) на примере NPC *Saccharomyces cerevisiae* [23] (б). Схема олигомеризации Nup93-комплекса при формировании внутреннего кольца NPC (в).

этом сборку NPC после митоза [28]. Подробнее механизм этого процесса рассмотрен ниже.

Нуклеопорины, составляющие Y-комплекс, называются структурными. Они содержат α -спиральные и β -пропеллерные структуры, необходимые для формирования Y-комплекса и взаимодействия Y-комплексов между собой.

Nup93-комплекс — это мономер, из которого формируется октамер внутреннего кольца и самый консервативный элемент NPC, поскольку его состав одинаков у всех эукариот [29]. Nup93-комплекс состоит из нуклеопоринов Nup35, Nup205, Nup188, Nup93, Nup155 и Nup98. Четыре Nup93-комплекса формируют так называемое веретено (spindle). Веретено, в свою очередь, является мономером, из которого формируется октамер внутреннего кольца (рис. 2в).

Таким образом, внутреннее кольцо состоит из восьми веретен (из 32 копий Nup93-комплекса). Внутреннее кольцо может расширяться, при этом веретена отодвигаются друг от друга [30, 31]. В настоящее время не установлено, каким образом поддерживается такая расширенная конформация, изменяет ли она функции NPC и как это состояние регулируется. Nup35 и Nup133 закрепляют внутреннее кольцо на мембране путем взаимодействия с трансмембранными нуклеопоринами.

Из Nup62-комплексов формируется комплекс центрального канала. Каждый Nup62-комплекс состоит из трех FG-нуклеопоринов: Nup62,

Nup58 и Nup54, основная функция которых — формирование водопроницаемого барьера.

Нуклеопорины, входящие в состав Nup62-комплекса, взаимодействуют между собой при помощи доменов со структурой спиральной катушки.

Каждый Nup62-комплекс присоединен к одному из веретен внутреннего кольца. FG-повторы Nup62, Nup58 и Nup54 сосредоточены в экваториальной части центрального канала NPC.

P-комплекс — это мономер, из восьми копий которого составляет кольцо, которое является компонентом цитоплазматической периферической структуры (рис. 1б). P-комплекс состоит из двух нуклеопоринов — Nup214 и Nup88 — и играет ключевую роль в экспорте мРНК из ядра, а также в транспорте белков между ядром и цитоплазмой [32–35].

Nup214 содержит большое количество FG-повторов, участвующих в формировании водопроницаемого барьера, а также домены, ответственные за взаимодействие с другими белками. В Nup88 мало FG-повторов, в P-комплексе он выполняет структурную функцию.

Цитоплазматические филаменты — второй компонент цитоплазматической периферической структуры, состоят из нуклеопорина Nup358 (один филамент — одна копия Nup358, всего восемь филаментов в каждом NPC). Цитоплазматиче-

ские филаменты присоединены к кольцу из Р-комплексов с цитоплазматической стороны (рис. 1б).

Nup358 — большой белок с молекулярной массой 350 кДа, содержащий много доменов с известными функциями, в том числе Ran-связывающие домены, на которых происходит разборка экспортных комплексов [36], Е3-лигазный домен, FG-повторы, α -спиральные домены, ответственные за взаимодействие с другими белками, домены цинковых пальцев и другие.

Nup358 необходим как для экспорта, так и для импорта молекул в ядро [37]. Он принимает участие в контроле трансляции [38] и в проникновении патогенов в ядро [39]. Кроме того, Nup358 стабилизирует взаимодействие между Y-комплексами ядерного и цитоплазматического внешних колец за счет N-концевых α -спиральных участков.

Ядерная периферическая структура NPC сформирована из Nup153, Nup50 и TPR. Она представляет собой дистальное кольцо из восьми копий белка TPR и восьми отходящих от него в сторону нуклеоплазмы филаментов [40], состоящих из нуклеопоринов Nup50 и Nup153 (рис. 1б).

Nup153 вовлечен в формирование водонепроницаемого барьера своими FG-повторами. TPR принимает участие в создании в районе NPC зон, свободных от хроматина [41].

Все компоненты ядерной периферической структуры задействованы в сборке и разборке экспортных и импортных комплексов, участвующих в транспорте молекул между ядром и цитоплазмой [1, 42].

Трансмембранные нуклеопорины Pom121, Gp210 и Ndc1 не формируют олигомерные структуры, а их собственная структура изучена недостаточно. Известно, что они принимают участие в соединении трех основных структурных колец NPC, а также играют ключевую роль в закреплении NPC на ядерной мембране [43–45]. Pom121 содержит большое количество FG-повторов и участвует в формировании водонепроницаемого ба-

рьера. Распределение нуклеопоринов в структурных компонентах NPC показано в табл. 1.

УЧАСТИЕ SLiM-МОТИВОВ В ФОРМИРОВАНИИ NPC

В структуре нуклеопоринов выявлено и охарактеризовано значительное количество доменов, ответственных за белок-белковые взаимодействия, показано их участие в формировании NPC, найдено также много мотивов, называемых SLiM (Short Linear Motif).

SLiM-мотивы обнаружены в неструктурированных участках аминокислотной последовательности различных белков [46, 47]. Это короткие (до 10 аминокислот) участки, содержащие несколько (обычно три или четыре) аминокислотных остатков, которые остаются неизменными у различных организмов [48, 49] и считаются ключевыми для взаимодействия с другими белками: при их удалении взаимодействие исчезает. Интересно, что все остальные аминокислотные остатки SLiM-мотивов не консервативны в ряду организмов. Неизменными остаются лишь аминокислотные остатки в ключевых позициях и расстояние между ними. SLiM-мотивы считаются горячими точками эволюции [50]. Внесение точечных замен в последовательность SLiM может приводить к заметному изменению свойств этих мотивов. В основном SLiM-мотивы участвуют в слабых и кратковременных взаимодействиях между белками. SLiM-мотивы, имеющие разную последовательность, обнаружены в нуклеопоринах Nup98, Nup35, Nup93 (компоненты внутреннего кольца) и Nup96 (компонент Y-комплекса) [43, 51, 52]. SLiM-мотивы необходимы как для сборки мономеров различных октамерных структур NPC (SLiM Nup98, Nup35), так и для присоединения Nup62-комплексов к спицам внутреннего кольца (SLiM IM-1 на N-конце Nup93) [50]. Таким образом, SLiM-мотивы могут принимать участие во взаимодействиях, которые сохраняются длительное время. SLiM-мотив Nup98 также необходим

Таблица 1. Распределение нуклеопоринов в структурных компонентах NPC

Структурный компонент NPC	Нуклеопорин
Цитоплазматическая периферическая структура	Nup358, Nup214, Nup88
Цитоплазматическое внешнее кольцо	Nup160, Nup133, Nup107, Nup96, Nup85, Nup43, Nup37, Sec13, Seh1
Внутреннее кольцо	Nup205, Nup188, Nup155, Nup98, Nup93, Nup35
Трансмембранные нуклеопорины	Gp210, Ndc1, Pom121
Комплекс центрального канала	Nup62, Nup58, Nup54
Ядерное внешнее кольцо	Nup160, Nup133, Nup107, Nup96, Nup85, Nup43, Nup37, Sec13, Seh1, ELYS
Ядерная периферическая структура	Nup153, Nup50, TPR

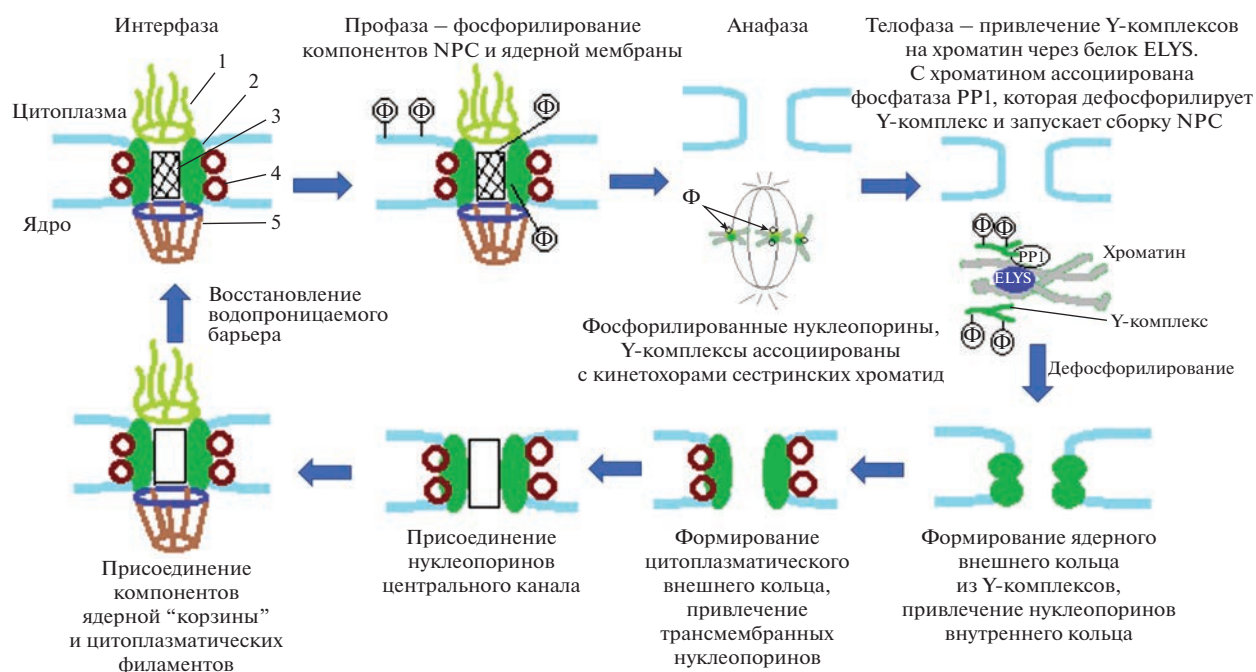


Рис. 3. Схема разборки NPC в профазе и ее сборки на ядерной оболочке дочерней клетки. 1 — цитоплазматическое внешнее кольцо, 2 — внутреннее кольцо, 3 — водопроницаемый барьер, 4 — трансмембранные нуклеопорины, 5 — ядерное внешнее кольцо, Ф — фосфатные остатки.

для формирования водопроницаемого барьера NPC [53].

СБОРКА NPC

В жизни клетки есть два момента, когда происходит образование NPC. Во-первых, при делении клетки. В митозе и мейозе ядерная оболочка в клетках высших эукариот утрачивает свою целостность и разделяется на отдельные везикулы. При этом NPC материнской клетки диссоциируют частично на отдельные нуклеопорины (нуклеопорины периферических структур, внутреннего кольца, трансмембранные нуклеопорины), частично на комплексы-мономеры основных структурных элементов NPC (Y-комплекс). На везикулах, которые образовались из распавшейся ядерной оболочки, остаются только сквозные отверстия в том месте, где находились NPC. Отдельные нуклеопорины и нуклеопориновые субкомплексы разделяются между дочерними клетками. После образования ядерной оболочки в дочерних клетках происходит сборка NPC на уже имеющихся сквозных отверстиях из нуклеопоринов материнской клетки. Этот процесс идет быстро и занимает несколько минут.

Во-вторых, потребность в новых NPC возникает в интерфазе, когда клетка растет, увеличивается в размерах клеточное ядро и площадь поверхности ядерной оболочки. При этом происходит образование новых NPC. Этот процесс идет

медленно, его лимитирующим этапом является формирование сквозных отверстий в ядерной оболочке [54].

Сборка NPC в процессе деления клетки

Диссоциация NPC в профазе митоза инициируется фосфорилированием нуклеопоринов Nup98 и Nup35, киназами PLK-1 и CDK-1 [55]. Сначала фосфорилируется Nup98, что приводит к его отделению от NPC и к нарушению водопроницаемого барьера в канале поры [56]. После этого фосфорилированию подвергается компонент внутреннего кольца Nup35, что нарушает его взаимодействие с трансмембранным нуклеопорином Ndc1 и компонентом внутреннего кольца Nup155. Это приводит к диссоциации всего NPC на отдельные нуклеопорины. Исключение составляют Y-комплексы, которые сохраняют свою целостность [55] (рис. 3).

В процессе деления часть нуклеопоринов связывается с митотическими структурами: Y-комплекс [28, 57–59] и Nup358 [60] локализуются на кинетохоре. Остальные нуклеопорины, высвободившиеся после диссоциации NPC, находятся в цитоплазме в комплексе с импортином β .

После разделения сестринских хроматид в анафазе ядерные оболочки дочерних клеток восстанавливаются и одновременно происходит формирование NPC. Фосфатаза PP1 дефосфорили-

лирует нуклеопорины Y-комплексов, ассоциированные с кинетохором [61].

Повторная сборка NPC после митоза происходит в несколько этапов. Схема этого процесса представлена на рис. 3.

На первом этапе происходит формирование границ ядра: везикулы, образовавшиеся из ядерной оболочки материнской клетки, сливаются, окружая со всех сторон деконденсирующиеся хромосомы новообразованной клетки. Этот процесс занимает несколько минут [62, 63]. Диаметр имеющихся отверстий уменьшается до 40 нм и на них начинают формироваться NPC. Этот процесс инициируется привлечением на хроматин белка ELYS — компонента Y-комплекса [64, 65]. Через ELYS в район формирования NPC привлекается Y-комплекс [54, 64], происходит дефосфорилирование его компонентов за счет активности фосфатазы PP1, также привлекаемой на хроматин белком ELYS [61]. Истощение ELYS приводит к нарушению постмитотической сборки NPC в экспериментах на культуре клеток человека [66] и *Caenorhabditis elegans* [67] — вместо будущей ядерной оболочки NPC начинают собираться на мембранах ЭПР. Таким образом, ELYS определяет, где будет происходить сборка NPC. В настоящее время неясно, необходимо ли присутствие ELYS для изменения диаметра отверстий в формирующейся ядерной оболочке и, если да, то посредством какого механизма это происходит.

В постмитотической сборке NPC принимает участие также ассоциированный с хроматином белок RCC1 (regulator of chromosome condensation 1). Он катализирует замену GDP на GTP в составе GTPазы Ran. При этом создается повышенная концентрация Ran-GTP с внутренней стороны формирующейся ядерной оболочки дочерней клетки. В комплексе с импортином β -нуклеопорины проникают в ядро. Там под действием GTPазы Ran-GTP отдельные нуклеопорины отделяются от импортина β и встраиваются в формирующиеся NPC [68].

После дефосфорилирования нуклеопоринов Y-комплексы встраиваются в формирующийся NPC через взаимодействие с трансмембранными нуклеопоринами Ndc1 и Pom121 [44, 45, 69]. Трансмембранные нуклеопорины привлекаются в район формирования NPC одновременно с дефосфорилированием нуклеопоринов Y-комплексов. В их привлечении принимает участие нуклеопорин внутреннего кольца Nup35, взаимодействующий с ядерной мембраной в районе формирования NPC своим мембраносвязывающим доменом [43, 70]. Связывание Ndc1 и Nup35 необходимо для усиления взаимодействия Nup35 с мембраной [41].

Формирующиеся NPC приобретают октагональную симметрию [71]. На этом этапе они со-

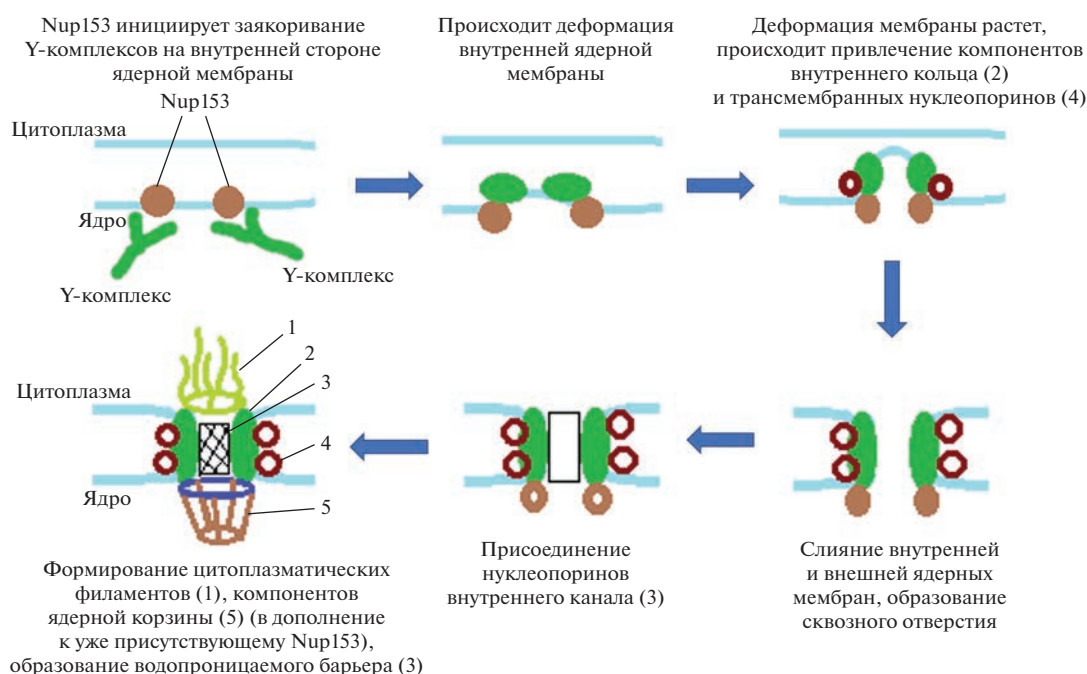
стоят из Y-комплексов внешнего ядерного кольца, трансмембранных нуклеопоринов и ряда нуклеопоринов внутреннего кольца. Диаметр отверстия в частично собранном NPC меньше, чем в полностью сформированном. В процессе сборки внутреннего и цитоплазматического внешнего колец оно расширяется [71].

На следующем этапе сборки к формирующемуся NPC присоединяются недостающие нуклеопорины внутреннего кольца. В привлечении Nup155 и Nup93 принимает участие Nup35. Nup93 привлекается в составе димеров двух типов — с Nup205 или с Nup188, которые также являются компонентами внутреннего кольца. Взаимодействие Nup155 с мембраной необходимо для сборки NPC [72]. Как сборка внутреннего кольца влияет на увеличение диаметра NPC пока не выяснено. Nup93 в составе Nup93-комплекса формирует посадочную платформу внутри центрального канала NPC за счет N-концевого SLiM-мотива. На эту платформу привлекаются компоненты Nup62-комплекса, что приводит транспортный канал в рабочее состояние. Периферические нуклеопорины Nup214, Nup358 и Nup153 присоединяются в конце сборки NPC [69, 73]. Водонепроницаемый барьер возникает в полностью собранном NPC [74]. Этот процесс может быть связан с взаимодействием FG-повторов разных нуклеопоринов между собой, а также с взаимодействием с рецепторами ядерного транспорта или посттрансляционными модификациями белков, входящих в состав канала ядерной поры [75, 76].

Постмитотическая сборка NPC занимает мало времени. За несколько минут тысячи NPC собираются на мембранах ядерных оболочек новообразованных клеток. К отличительным особенностям сборки NPC в дочерних клетках относятся наличие отверстий в ядерной оболочке и предсобранные Y-комплексы, опосредованное дефосфорилированием переключение NPC с разборки на сборку, участие Ran-GTP в отделении нуклеопоринов от импортина β , вследствие которых этот процесс занимает мало времени.

Образование новых NPC в интерфазе

Образовавшиеся в результате деления клетки вступают в интерфазу и начинают расти, при этом увеличивается площадь поверхности ядерной оболочки. Одновременно увеличивается и количество NPC. Встраивание NPC в ядерную оболочку *de novo* идет медленно. У *S. cerevisiae* в линиях, где нарушено формирование NPC, происходит накопление дефектных NPC с внутренней стороны ядерной оболочки. Это наблюдение позволило предположить, что сборка NPC начинается в нуклеоплазме [77–79]. Механизм образования отверстий в ядерной мембране описан в работе на культуре клеток человека [71]. Схематично после-

Рис. 4. Схема сборки NPC *de novo*.

довательность событий формирования NPC *de novo* представлена на рис. 4.

Формирование NPC начинается с того, что Nup153, находящийся в нуклеоплазме, инициирует закоривание Y-комплекса на внутренней мембране ядерной оболочки [80]. Нуклеопорины внутреннего кольца вместе с белками ЭПР [81] изгибают внутреннюю ядерную мембрану в месте присоединения и далее при участии Y-комплекса закрепляют изгиб мембраны, в результате чего начинается формирование препоры. Как и в случае постмитотической сборки, этот предшественник поры имеет октагональную структуру.

Изгиб мембраны увеличивается, а внутренняя ядерная мембрана в процессе деформации сближается с внешней [71]. За счет чего происходит расширение и углубление деформации пока непонятно. Известно, что в расширении диаметра ядерной поры, как и в постмитотической сборке, принимают участие компоненты внутреннего кольца NPC. У *S. cerevisiae* FG-повторы Nup116 (Nup98 у млекопитающих) и Nup188 формируют множественные связи с нуклеопоринами ядерного внешнего кольца и внутреннего кольца, что приводит к присоединению этих нуклеопоринов к формирующемуся NPC. Через 40–50 мин после начала образования NPC происходит слияние внешней и внутренней ядерной мембран и в них образуется отверстие. Механизм этого процесса на данный момент не установлен.

После образования сквозного отверстия к формирующемуся NPC присоединяются цито-

плазматическое внешнее кольцо и цитоплазматические периферические структуры [71].

Если сравнить два механизма формирования NPC, постмитотический и интерфазный, то можно заметить ряд различий. Так ELYS, играющий важную роль в постмитотической сборке, не обязателен для образования NPC *de novo*.

Напротив, активный импорт Nup153 в ядро необходим для привлечения Y-комплексов к месту сборки NPC в интерфазе, но не важен для постмитотической сборки NPC [80]. Nup133, Nup153, Nup155 и Nup35 способны связывать и частично изгибать внутреннюю ядерную мембрану своими амфипатическими спиральями. Удаление этих структурных мотивов Nup153, Nup133 и Nup35 приводит к нарушению интерфазной, но не постмитотической сборки NPC [54, 80, 82].

Неядерные поровые комплексы

В некоторых клетках поровые комплексы обнаруживаются на стопках мембран ЭПР. Эти мембраны называются кольцевидными ламеллами (annulate lamellae, AL). Чтобы отличать такие поровые комплексы от ядерных, их называют неядерные поровые комплексы, или ALPC (Annulate Lamellae Pore Complexes).

ALPC могут образовываться при нарушениях экспрессии отдельных нуклеопоринов, которые наблюдаются в опухолевых клетках разного типа. Также ALPC присутствуют в половых клетках и в

ранних эмбрионах разных организмов, в том числе человека.

Предполагается, что AL служит резервуаром собранных в материнской клетке поровых комплексов, которые используются в раннем эмбриогенезе. Это предположение подтверждается при наблюдении за эмбриогенезом у *Drosophila melanogaster* — AL встраивается в ядерную мембрану вместе с расположенными на ней поровыми комплексами [83]. На электронных фотографиях видно значительное сходство NPC и ALPC. Фракционирование эмбрионов с разделением NPC и ALPC выявило сходное устройство в организации внутреннего кольца, Y-комплексов и расположения трансмембранных нуклеопоринов, однако в ALPC отсутствуют ядерная “корзина”, большая часть цитоплазматических филаментов и нуклеопорины центрального канала [83].

Как формируются ALPC остается пока неясным. Если ALPC образуются *de novo* на цитоплазматических мембранах ЭПР, то непонятно каким образом детерминирована “ядерная” и “цитоплазматическая” стороны порового комплекса, с какой стороны начинается деформация мембраны ЭПР и присоединение нуклеопоринов. При формировании поровых комплексов на ядерной мембране ассоциированные с хроматином белки запускают сборку NPC на внутренней стороне ядерной мембраны (PP1, ELYS). На данный момент не установлены белки, инициирующие образование ALPC. В формировании и диссоциации NPC и ALPC должны участвовать сходные механизмы регуляции — в профазе происходит фосфорилирование и диссоциация как NPC на ядерной мембране, так и ALPC на AL. В анафазе оба вида поровых комплексов появляются снова. Таким образом, разборка и сборка NPC, и ALPC зависят от стадии клеточного цикла [84, 85]. Кроме того, при Ran-GTP-зависимой диссоциации комплекса импорта β и нуклеопоринов происходит сборка NPC, и ALPC [68, 86]. Получены данные, позволяющие предположить, что постмитотическая сборка ALPC происходит по тому же механизму, что и постмитотическая сборка NPC, только собираются они на отверстиях в стопках мембран ЭПР. В пользу этой гипотезы свидетельствует тот факт, что в отсутствие ELYS на мембранах ЭПР начинает собираться больше поровых комплексов, и меньше — на ядерной мембране [64].

На данный момент нет никаких представлений о том, как происходит формирование ALPC в интерфазе. Заякоривание Nup153 на мембране ЭПР может приводить к рекрутированию Y-комплексов и к запуску формирования ALPC [80]. По-видимому, при сборке ALPC возможно создание подобия нуклеоплазматического компартмента за счет локального повышения концентрации Ran-

GTP. Участие Ran-GTP в формировании ALPC показано на экстрактах ооцитов *X. laevis* [68]. Поскольку импорт β присутствует на ALPC [87], неядерное скопление Ran-GTP может принимать участие в диссоциации комплексов импорта β -нуклеопорин для освобождения нуклеопоринов, необходимых для сборки ALPC.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За 70 лет изучения NPC мы получили довольно точные представления о структуре NPC и образующих их белках. Мы понимаем, как нуклеопорины взаимодействуют между собой и какие структурные особенности характерны для них. Много известно о функциях конкретных нуклеопоринов в составе NPC и за счет чего формируется водонепроницаемый барьер внутри поры. При этом стадии формирования NPC изучены недостаточно. Начаты исследования двух различных механизмов формирования NPC — образования *de novo* в интерфазной клетке и постмитотической сборки в новообразованных клетках. Пока нет четкой картины, в какой последовательности происходит сборка NPC, однако выявлены ключевые нуклеопорины (разные для двух механизмов), запускающие формирование NPC.

Представляет интерес и дальнейшее изучение вариантов NPC, присутствующих как в разных тканях, так и внутри одной клетки, а также того, как замена нуклеопоринов на их тканеспецифичные варианты может влиять на транспортные и другие функции NPC.

Еще одна область, которая интенсивно исследуется, это участие нуклеопоринов в различных клеточных процессах, не связанных непосредственно с формированием NPC и с транспортом молекул с одной стороны ядерной оболочки на другую. Так, большое внимание приковано к изучению влияния нуклеопоринов на хромосомную архитектуру и регуляцию экспрессии генов.

Обзор написан за счет гранта Российского научного фонда (проект №22-14-00270).

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. Beck M., Hurt E. (2017) The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **18**(2), 73–89.
2. Hampoelz B., Andres-Pons A., Kastiris P., Beck M. (2019) Structure and assembly of the nuclear pore complex. *Annu. Rev. Biophys.* **48**, 515–536.
3. Allegretti M., Zimmerli C.E., Rantos V., Wilfling F., Ronchi P., Fung H.K.H., Lee C.W., Hagen W.,

- Turoňová B., Karius K., Börmel M., Zhang X., Müller C.W., Schwab Y., Mahamid J., Pfander B., Kosinski J., Beck M. (2020) In-cell architecture of the nuclear pore and snapshots of its turnover. *Nature*. **586**(7831), 796–800.
4. Schuller A.P., Wojtynek M., Mankus D., Tatli M., Kronenberg-Tenga R., Regmi S.G., Dip P.V., Lytton-Jean A.K.R., Brignole E.J., Dasso M., Weis K., Medalia O., Schwartz T.U. (2021) The cellular environment shapes the nuclear pore complex architecture. *Nature*. **598**(7882), 667–671.
 5. Wool I.G., Chan Y.L., Glück A. (1995) Structure and evolution of mammalian ribosomal proteins. *Biochem. Cell. Biol.* **73**(11–12), 933–947.
 6. Callan H.G., Tomlin S.G. (1950) Experimental studies on amphibian oocyte nuclei. I. Investigation of the structure of the nuclear membrane by means of the electron microscope. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **137**(888), 367–378.
 7. Dwyer N., Blobel G. (1976) A modified procedure for the isolation of a pore complex–lamina fraction from rat liver nuclei. *J. Cell. Biol.* **70**(3), 581–591.
 8. Akey C.W., Radermacher M. (1993) Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. *J. Cell. Biol.* **122**(1), 1–19.
 9. Rout M.P., Blobel G. (1993) Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J. Cell. Biol.* **123**(4), 771–783.
 10. Yang Q., Rout M.P., Akey C.W. (1998) Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol. Cell.* **1**(2) 223–234.
 11. Cronshaw J.M., Krutchinsky A.N., Zhang W., Chait B.T., Matunis M.L.J. (2002) Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell. Biol.* **158**(5), 915–927.
 12. Rout M.P., Aitchison J.D., Suprapto A., Hjertaas K., Zhao Y., Chait B.T. (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, transport mechanism. *J. Cell. Biol.* **148**(4), 635–651.
 13. Gomez-Cavazos J.S., Hetzer M.W. (2015) The nucleoporin gp210/Nup210 controls muscle differentiation by regulating nuclear envelope/ER homeostasis. *J. Cell. Biol.* **208**(6), 671–681.
 14. Pritchard C.E.J., Fornerod M., Kasper L.H., van Deursen J.M.A. (2000) RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *J. Cell. Biol.* **145**(2), 237–254.
 15. Griffis E.R., Altan N., Lippincott-Schwartz J., Powers M.A. (2002) Nup98 is a mobile nucleoporin with transcription-dependent dynamics. *Mol. Biol. Cell.* **13**(4), 1292–1297.
 16. Kendirgi F., Barry D.M., Griffis E.R., Powers M.A., Wente S.R. (2003) An essential role for hGle1 nucleocytoplasmic shuttling in mRNA export. *J. Cell. Biol.* **160**(7), 1029–1040.
 17. Griffis E.R., Craige B., Dimaano C., Ullman K.S., Powers M.A. (2004) Distinct functions domains within nucleoporins Nup153 and Nup98 mediate transcription-dependent mobility. *Mol. Biol. Cell.* **15**(4), 1991–2002.
 18. Capelson M., Liang Y., Schulte R., Mair W., Wagner U., Hetzer M.W. (2010) Chromatin-bound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes. *Cell*. **140**(3), 372–383.
 19. Kalverda B., Pickersgill H., Shloma V.V., Fornerod M. (2010) Nucleoporins directly stimulate expression of developmental and cell-cycle genes inside the nucleoplasm. *Cell*. **140**(3), 360–371.
 20. Brown C.R., Kennedy C.J., Delmar V.A., Forbes D.J., Silver P.A. (2008) Global histone acetylation induces functional genomic reorganization at mammalian nuclear pore complexes. *Genes Dev.* **22**(5), 627–639.
 21. Ribbeck K., Görlich D. (2002) The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J.* **21**(11), 2664–2671.
 22. von Appen A., Beck M. (2016) Structure determination of the nuclear pore complex with three-dimensional cryo electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **428**(10), 2001–2010.
 23. Stuwe T., Correia A.R., Lin D.H., Paduch M., Lu V.T., Kossiakoff A.A., Hoelz A. (2015) Architecture of the nuclear pore complex coat. *Science*. **347**(6226), 1148–1152.
 24. Siniosoglou S., Lutzmann M., Santos-Rosa H., Leonard K., Mueller S., Aebi U., Hurt E. (2000) Structure and assembly of the Nup84p complex. *J. Cell. Biol.* **149**(1), 41–54.
 25. von Appen A., Kosinski J., Sparks L., Ori A., DiGiulio A.L., Vollmer B., Mackmull M.T., Banterle N., Parca L., Kastiris P., Buczak K., Mosalaganti S., Hagen W., Andres-Pons A., Lemke E.A., Bork P., Antonin W., Glavy J.S., Bui K.H., Beck M. (2015) *In situ* structural analysis of the human nuclear pore complex. *Nature*. **526**(7571), 140–143.
 26. Bui K.H., von Appen A., DiGiulio A.L., Ori A., Sparks L., Mackmull M.T., Bock T., Hagen W., Andrés-Pons A., Glavy J.S., Beck M. (2013) Integrated structural analysis of the human nuclear pore complex scaffold. *Cell*. **155**(6), 1233–1243.
 27. Rajoo S., Vallotton P., Onischenko E., Weis K. (2018) Stoichiometry and compositional plasticity of the yeast nuclear pore complex revealed by quantitative fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **115**(17), 3969–3977.
 28. Rasala B.A., Orjalo A.V., Shen Z., Briggs S., Forbes D.J. (2006) ELYS is a dual nucleoporin/kinetochore protein required for nuclear pore assembly and proper cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**(47), 17801–17806.
 29. Rout M.P., Field M.C. (2017) The evolution of organellar coat complexes and organization of the eukaryotic cell. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 637–657.
 30. Beck M., Baumeister W. (2016) Cryo-electron tomography: can it reveal the molecular sociology of cells in atomic detail? *Trends Cell. Biol.* **26**(11), 825–837.
 31. Mosalaganti S., Kosinski J., Albert S., Schaffer M., Strenkert D., Salomé P.A., Merchant S.S., Plitzko J.M., Baumeister W., Engel B.D., Beck M. (2018) *In situ* architecture of the algal nuclear pore complex. *Nat. Commun.* **9**(1), 2361.
 32. Adams R.L., Mason A.C., Glass L., Aditi, Wente S.R. (2017) Nup42 and IP 6 coordinate Gle1 stimulation of

- Dbp5/DDX19B for mRNA export in yeast and human cells *Traffic*. **18**(12), 776–790.
33. Fornerod M., van Deursen J., van Baal S., Reynolds A., Davis D., Murti K.G., Franssen J., Grosveld G. (1997) The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J.* **16**(4), 807–816.
 34. Lin D.H., Correia A.R., Cai S.W., Huber F.M., Jette C.A., Hoelz A. (2018) Structural and functional analysis of mRNA export regulation by the nuclear pore complex. *Nat. Commun.* **9**(1), 2319.
 35. Port S.A., Monecke T., Dickmanns A., Spillner C., Hofele R., Urlaub H., Ficner R., Kehlenbach R.H. (2015) Structural and functional characterization of CRM1-Nup214 interactions reveals multiple FG-binding sites involved in nuclear export. *Cell. Rep.* **13**(4), 690–702.
 36. Ritterhoff T., Das H., Hofhaus G., Schröder R.R., Flotho A., Melchior F. (2016) The RanBP2/RanGAP1*SUMO1/Ubc9 SUMO E3 ligase is a disassembly machine for Crm1-dependent nuclear export complexes. *Nat. Commun.* **7**, 11482.
 37. Hutten S., Flotho A., Melchior F., Kehlenbach R.H. (2008) The Nup358-RanGAP complex is required for efficient importin α/β -dependent nuclear import. *Mol. Biol. Cell.* **19**(5), 2300–2310.
 38. Mahadevan K., Zhang H., Akef A., Cui X.A., Guerousov S., Cenik C., Roth F.P., Palazzo A.F. (2013) RanBP2/Nup358 potentiates the translation of a subset of mRNAs encoding secretory proteins. *PLoS Biol.* **11**(4), e1001545.
 39. Dharan A., Talley S., Tripathi A., Mamede J.I., Majetschak M., Hope T.J., Campbell E.M. (2016) KIF5B and Nup358 cooperatively mediate the nuclear import of HIV-1 during infection. *PLoS Pathog.* **12**(6), e1005700.
 40. Krull S., Thyberg J., Björkroth B., Rackwitz H.R., Cordes V.C. (2004) Nucleoporins as components of the nuclear pore complex core structure and Tpr as the architectural element of the nuclear basket. *Mol. Biol. Cell.* **15**(9), 4261–4277.
 41. Krull S., Dörries J., Boysen B., Reidenbach S., Magnus L., Norder H., Thyberg J., Cordes V.C. (2010) Protein Tpr is required for establishing nuclear pore-associated zones of heterochromatin exclusion. *EMBO J.* **29**(10), 1659–1673.
 42. Stewart M. (2007) Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**(3), 195–208.
 43. Eisenhardt N., Redolfi J., Antonin W. (2014) Interaction of Nup53 with Ndc1 and Nup155 is required for nuclear pore complex assembly. *J. Cell. Sci.* **127**(4), 908–921.
 44. Mansfeld J., Güttinger S., Hawryluk-Gara L.A., Panté N., Mall M., Galy V., Haselmann U., Mühlhäusser P., Wozniak R.W., Mattaj I.W., Kutay U., Antonin W. (2006) the conserved transmembrane nucleoporin NDC1 is required for nuclear pore complex assembly in vertebrate cells. *Mol. Cell.* **22**(1), 93–103.
 45. Mitchell J.M., Mansfeld J., Capitanio J., Kutay U., Wozniak R.W. (2010) Pom121 links two essential subcomplexes of the nuclear pore complex core to the membrane. *J. Cell. Biol.* **191**(3), 505–521.
 46. Tompa P. (2012) Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends Biochem. Sci.* **37**(12), 509–516.
 47. Tompa P. (2011) Unstructural biology coming of age. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**(3), 419–425.
 48. van Roey K., Uyar B., Weatheritt R.J., Dinkel H., Seiler M., Budd A., Gibson T.J., Davey N.E. (2014) Short linear motifs: ubiquitous and functionally diverse protein interaction modules directing cell regulation. *Chem. Rev.* **114**(13), 6733–6778.
 49. Davey N.E., Roey K.V., Weatheritt R.J., Toedt G., Uyar B., Altenberg B., Budd A., Diella F., Dinkel H., Gibson T.J. (2012) Attributes of short linear motifs. *Mol. Biosyst.* **8**(1), 268–281.
 50. Davey N.E., Cyert M.S., Moses A.M. (2015) Short linear motifs – *ex nihilo* evolution of protein regulation. *Cell Commun. Signal.* **13**, 43.
 51. Lin D.H., Stuwe T., Schilbach S., Rundlet E.J., Periches T., Mobbs G., Fan Y., Thierbach K., Huber F.M., Collins L.N., Davenport A.M., Jeon Y.E., Hoelz A. (2016) Architecture of the symmetric core of the nuclear pore. *Science*. **352**(6283), aaf1015.
 52. Fischer J., Teimer R., Amlacher S., Kunze R., Hurt E. (2015) Linker Nups connect the nuclear pore complex inner ring with the outer ring and transport channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**(10), 774–781.
 53. Hülsmann B.B., Labokha A.A., Görlich D. (2012) The permeability of reconstituted nuclear pores provides direct evidence for the selective phase model. *Cell*. **150**(4), 738–751.
 54. Doucet C.M., Talamas J.A., Hetzer M.W. (2010) Cell cycle-dependent differences in nuclear pore complex assembly in metazoa. *Cell*. **141**(6), 1030–1041.
 55. Linder M., Köhler M., Boersema P., Weberruss M., Wandke C., Marino J., Ashiono C., Picotti P., Antonin W., Kutay U. (2017) Mitotic disassembly of nuclear pore complexes involves CDK1- and PLK1-mediated phosphorylation of key interconnecting nucleoporins. *Dev. Cell*. **43**(2), 141–156.
 56. Laurell E., Beck K., Krupina K., Theerthagiri G., Bodenmiller B., Horvath P., Aebersold R., Antonin W., Kutay U. (2011) Phosphorylation of Nup98 by multiple kinases is crucial for NPC disassembly during mitotic entry. *Cell*. **144**(4), 539–550.
 57. Belgareh N., Rabut G., Baï S.W., van Overbeek M., Beaudouin J., Daigle N., Zatschina O.V., Pasteau F., Labas V., Fromont-Racine M., Ellenberg J., Doye V. (2001) An evolutionarily conserved NPC subcomplex, which redistributes in part to kinetochores in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **154**(6), 1147–1160.
 58. Katsani K.R., Karess R.E., Dostatni N., Doye V. (2008) *In vivo* dynamics of *Drosophila* nuclear envelope components. *Mol. Biol. Cell.* **19**(9), 3652–3666.
 59. Loiodice I., Alves A., Rabut G., van Overbeek M., Ellenberg J., Sibarita J.B., Doye V. (2004) The entire Nup107–160 complex, including three new members, is targeted as one entity to kinetochores in mitosis. *Mol. Biol. Cell.* **15**(7), 3333–3344.
 60. Joseph J., Liu S.T., Jablonski S.A., Yen T.J., Dasso M. (2004) The RanGAP1–RanBP2 complex is essential for

- microtubule–kinetochore interactions *in vivo*. *Curr. Biol.* **14**(7), 611–617.
61. Hattersley N., Cheerambathur D., Moyle M., Stefanutti M., Richardson A., Lee K.Y., Dumont J., Oegema K., Desai A. (2016) A nucleoporin docks protein phosphatase 1 to direct meiotic chromosome segregation and nuclear assembly. *Dev. Cell.* **38**(5), 463–477.
 62. Anderson D.J., Hetzer M.W. (2007) Nuclear envelope formation by chromatin-mediated reorganization of the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell. Biol.* **9**(10), 1160–1166.
 63. Otsuka S., Steyer A.M., Schorb M., Hériché J.K., Hossain M.J., Sethi S., Kueblbeck M., Schwab Y., Beck M., Ellenberg J. (2018) Postmitotic nuclear pore assembly proceeds by radial dilation of small membrane openings. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25** (1), 21–28.
 64. Franz C., Walczak R., Yavuz S., Santarella R., Gentzel M., Askjaer P., Galy V., Hetzer M., Mattaj I.W., Antonin W. (2007) MEL-28/ELYS is required for the recruitment of nucleoporins to chromatin and postmitotic nuclear pore complex assembly. *EMBO Rep.* **8**(2), 165–172.
 65. Rasala B.A., Ramos C., Harel A., Forbes D.J. (2008) Capture of AT-rich chromatin by ELYS recruits POM121 and NDC1 to initiate nuclear pore assembly. *Mol. Biol. Cell.* **19**(9), 3982–3996.
 66. Capelson M., Hetzer M.W. (2009) The role of nuclear pores in gene regulation, development and disease. *EMBO Rep.* **10**(7), 697–705.
 67. Galy V., Askjaer P., Franz C., López-Iglesias C., Mattaj I.W. (2006) MEL-28, a novel nuclear-envelope and kinetochore protein essential for zygotic nuclear-envelope assembly in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **16**(17), 1748–1756.
 68. Walther T.C., Askjaer P., Gentzel M., Habermann A., Griffiths G., Wilm M., Mattaj I.W., Hetzer M. (2003) RanGTP mediates nuclear pore complex assembly. *Nature.* **424**(6949), 689–694.
 69. Dultz E., Zanin E., Wurzenberger C., Braun M., Rabut G., Sironi L., Ellenberg J. (2008) Systematic kinetic analysis of mitotic dis- and reassembly of the nuclear pore in living cells. *J. Cell. Biol.* **180**(5), 857–865.
 70. Hawryluk-Gara L.A., Shibuya E.K., Wozniak R.W. (2005) Vertebrate Nup53 interacts with the nuclear lamina and is required for the assembly of a Nup93-containing complex. *Mol. Biol. Cell.* **16**(5), 2382–2394.
 71. Otsuka S., Bui K.H., Schorb M., Julius Hossain M., Politi A.Z., Koch B., Eltsov M., Beck M., Ellenberg J. (2016) Nuclear pore assembly proceeds by an inside-out extrusion of the nuclear envelope. *Elife.* **5**(5), e19071.
 72. de Magistris P., Tatarek-Nossol M., Dewor M., Antonin W. (2018) A self-inhibitory interaction within Nup155 and membrane binding are required for nuclear pore complex formation. *J. Cell. Sci.* **131**(1), jcs208538.
 73. Haraguchi T., Koujin T., Hayakawa T., Kaneda T., Tsutsumi C., Imamoto N., Akazawa C., Sukegawa J., Yoneda Y., Hiraoka Y. (2000) Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes. *J. Cell. Sci.* **113**(5), 779–794.
 74. Dultz E., Huet S., Ellenberg J. (2009) Formation of the nuclear envelope permeability barrier studied by sequential photoswitching and flux analysis. *Biophys. J.* **97**(7), 1891–1897.
 75. Kapinos L.E., Huang B., Rencurel C., Lim R.Y.H. (2017) Karyopherins regulate nuclear pore complex barrier and transport function. *J. Cell. Biol.* **216**(11), 3609–3624.
 76. Lowe A.R., Tang J.H., Yassif J., Graf M., Huang W.Y.C., Groves J.T., Weis K., Liphardt J.T. (2015) Importin- β modulates the permeability of the nuclear pore complex in a Ran-dependent manner. *Elife.* **2015**(4), e04052.
 77. Makio T., Stanton L.H., Lin C.C., Goldfarb D.S., Weis K., Wozniak R.W. (2009) The nucleoporins Nup170p and Nup157p are essential for nuclear pore complex assembly. *J. Cell. Biol.* **185**(3), 459–437.
 78. Webster B.M., Colombi P., Jäger J., Lusk C.P. (2014) Surveillance of nuclear pore complex assembly by ESCRT-III/Vps4. *Cell.* **159**(2), 388–401.
 79. Wente S.R., Blobel G. (1993) A temperature-sensitive NUP116 null mutant forms a nuclear envelope seal over the yeast nuclear pore complex thereby blocking nucleocytoplasmic traffic. *J. Cell. Biol.* **123**(2), 275–284.
 80. Vollmer B., Lorenz M., Moreno-Andrés D., Bodenhöfer M., De Magistris P., Astrinidis S.A., Schooley A., Flötenmeyer M., Leptihn S., Antonin W. (2015) Nup153 recruits the Nup107–160 complex to the inner nuclear membrane for interphasic nuclear pore complex assembly. *Dev. Cell.* **33**(6), 717–728.
 81. Dawson T.R., Lazarus M.D., Hetzer M.W., Wente S.R. (2009) ER membrane-bending proteins are necessary for *de novo* nuclear pore formation. *J. Cell. Biol.* **184**(5), 659–675.
 82. Vollmer B., Schooley A., Sachdev R., Eisenhardt N., Schneider A.M., Sieverding C., Madlung J., Gerken U., Macek B., Antonin W. (2012) Dimerization and direct membrane interaction of Nup53 contribute to nuclear pore complex assembly. *EMBO J.* **31**(20), 4072–4084.
 83. Hampoelz B., Mackmull M.T., Machado P., Ronchi P., Bui K.H., Schieber N., Santarella-Mellwig R., Necaikov A., Andrés-Pons A., Philippe J.M., Lecuit T., Schwab Y., Beck M. (2016) Pre-assembled nuclear pores insert into the nuclear envelope during early development. *Cell.* **166**(3), 664–678.
 84. Onischenko E.A., Gubanov N.V., Kiseleva E.V., Hallberg E. (2005) Cdk1 and okadaic acid-sensitive phosphatases control assembly of nuclear pore complexes in *Drosophila* embryos. *Mol. Biol. Cell.* **16**(11), 5152–5162.
 85. Stafstrom J.P., Staehelin L.A. (1984) Dynamics of the nuclear envelope and of nuclear pore complexes during mitosis in the *Drosophila* embryo. *Eur. J. Cell Biol.* **34**(1), 179–189.
 86. D'Angelo M.A., Anderson D.J., Richard E., Hetzer M.W. (2006) Nuclear pores form *de novo* from both sides of the nuclear envelope. *Science.* **312**(5772), 440–443.
 87. Cordes V.C., Rackwitz H.R., Reidenbach S. (1997) Mediators of nuclear protein import target karyophilic proteins to pore complexes of cytoplasmic annulate lamellae. *Exp. Cell Res.* **237**(2), 419–433.

Assembly and Disassembly of Nuclear Pore Complex: a View from Structural Side

A. V. Orlova¹, *, S. G. Georgieva¹, and D. V. Kopytova¹

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

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

Nucleocytoplasmic exchange in the cell occurs through the nuclear pore complexes (NPCs). NPCs are large multiprotein complexes with octagonal symmetry about their axis and imperfect mirror symmetry about a plane parallel with the nuclear envelope (NE). NPC fuses the inner and outer nuclear membranes and opens up a channel between nucleus and cytoplasm. NPC is built of nucleoporins. Each nucleoporin occurs in at least eight copies per NPC. Inside the NPC forms a permeability barrier by which NPC can ensure fast and selectable transport of molecules from one side of nuclear membrane to another. NPC architecture is based on hierarchical principle of organization. Nucleoporins are integrated into complexes that oligomerize into bigger octameric high-order structures. These structures are the main components of NPC. In the first part of this work the main attention is paid to NPC structure and nucleoporins' properties. The second part is dedicated to mechanisms of NPC assembly and disassembly at different stages of cell cycle.

Keywords: NPC, nucleoporins, FG-repeats, Y-complex, SLiM-domain, nuclear pore complex assembly, annulate lamellae pore complexes (APLC)

УДК 577.213:575.224.47

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МУТАГЕНЕЗА В mCpG-САЙТАХ ПРИ РЕПЛИКАЦИИ И РЕПАРАЦИИ

© 2023 г. Е. С. Шилкин^а, Д. В. Петрова^{б, в, *}, Д. О. Жарков^{б, в, *,}, А. В. Макарова^{а, **}

^аИнститут молекулярной генетики, Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

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

^вНовосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

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

**e-mail: amakarova-img@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.12.2022 г.

После доработки 06.02.2023 г.

Принята к публикации 08.02.2023 г.

5-Метил-2'-дезоксцитидин (mC) в составе CpG-сайтов играет ключевую роль в эпигенетической регуляции работы генов, механизмах дифференцировки клеток и канцерогенезе. Несмотря на важность mC для нормального функционирования клетки, CpG-динуклеотиды являются горячими точками мутагенеза. mC дезаминируется с образованием Т, вызывая транзиции С→Т. Однако в последние годы появляются отдельные исследования о влиянии эпигенетических модификаций С на точность и эффективность работы ДНК-полимераз и ферментов эксцизионной репарации. В настоящем обзоре обобщены данные, указывающие на существование независимых от дезаминирования механизмов мутагенеза в CpG-сайтах.

Ключевые слова: 5-метил-2'-дезоксцитидин, CpG-сайты, ДНК-полимеразы, повреждения ДНК, репарация

DOI: 10.31857/S0026898423040195, **EDN:** QLYEPA

ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее распространенных модификаций ДНК в клетках высших эукариот является эпигенетическое метилирование основания С по С5-положению с образованием 5-метил-2'-дезоксцитидина (5-метил-С, mC). Эпигенетическая модификация mC играет ключевую роль в регуляции транскрипции генов, подавлении мобильных элементов, геномном импринтинге, инактивации X-хромосомы и компактизации хроматина [1–3]. Цитозин-ДНК-метилтрансферазы позвоночных специфичны к последовательности CpG, что обеспечивает преимущественное метилирование CpG-динуклеотидов [4]. В геноме человека метилировано >75% CpG-сайтов [3, 5].

Сокращения: ДНКП – ДНК-полимераза; mC – 5-метил-2'-дезоксцитидин, hmC – 5-гидроксиметил-2'-дезоксцитидин, fC – 5-формил-2'-дезоксцитидин, caC – 5-карбоксил-2'-дезоксцитидин, 8-охоG – 8-оксо-2'-дезоксигуанозин, ЦПД – *цис-син*-циклобутановые пиримидиновые димеры, ЭРО – эксцизионная репарация оснований, ЭРН – эксцизионная репарация нуклеотидов, КНО – коррекция неспаренных оснований (мисматчей), TDG – тимин-ДНК-гликозилаза.

Прочность С–С-связи обуславливает высокую химическую стабильность модификации и затрудняет прямое удаление метильной группы. Активное деметилирование в клетках млекопитающих инициируют ТЕТ-диоксигеназы (TET, ten-eleven translocation), последовательно окисляющие mC до 5-гидроксиметил-2'-дезоксцитидина (hmC), 5-формил-2'-дезоксцитидина (fC) и 5-карбоксил-2'-дезоксцитидина (caC) [6–8]. Последние два производных (fC и caC) узнает тимин-ДНК-гликозилаза (TDG), запуская процесс эксцизионной репарации оснований (ЭРО), восстанавливающий исходное неметилированное состояние С [9–11]. Окисленные формы mC менее распространены: у человека метилированы ~4% всех С, тогда как содержание hmC варьирует от ~0.1% (клетки крови и почек) до 1.5% (нейроны головного мозга) [12], а содержание fC и caC оценивается в ~0.0001% от общего числа С [13]. Тем не менее, hmC также принимает участие в эпигенетической регуляции экспрессии генов. Показана роль hmC в дифференцировке стволовых клеток и связь hmC с канцерогенезом [14–16]. Биологическая роль fC и caC менее изучена,

хотя описаны белки, специфично узнающие эти модификации [17, 18].

Несмотря на важность модификаций С для нормального функционирования клетки, СрG-динуклеотиды являются горячими точками мутагенеза. При спонтанном и/или энзиматически индуцированном дезаминировании С образуется dU, а при дезаминировании mC – Т, что приводит к формированию мисматчей dU:G и T:G и последующей фиксации транзиций С→Т [19, 20]. Вследствие меньшей химической стабильности mC дезаминируется чаще, чем С. Кроме того, репарация мисматчей T:G менее эффективна, чем dU:G [19, 20]. Показано также, что метилирование С повышает вероятность повреждения ДНК, увеличивая мутагенный потенциал СрG-динуклеотидов. В частности, соседний или комплементарный mC G чаще окисляется с образованием 8-охоG [21] и образует аддукты с канцерогенными соединениями, такими как бенз[а]пирен, афлатоксин В1 и N-гидрокси-2-аминофлуорен [22, 23]. Под действием ультрафиолетового (УФ) излучения mC формирует ряд промутагенных продуктов [24, 25]. Кроме того, некоторые ДНК-синтезирующие ферменты чувствительны к модификации С в ДНК. Например, метилирование С в 2 раза снижает эффективность включения комплементарного dGMP и в 5 раз повышает частоту включения некомплементарного dAMP обратной транскриптазой вируса птичьего миеобластома. При этом фермент включает следующий нуклеотид после образования некомплементарной пары A:mC в 3 раза эффективнее, чем после пары A:C [26].

В ходе репликации геномной ДНК, репарации повреждений и транслезионного (от translesion – “через повреждение”) синтеза ДНК-полимеразы (ДНКП) сталкиваются с матричным mC и его окисленными производными. В последние годы появились данные о влиянии эпигенетических модификаций С на точность и эффективность работы ДНКП, а также данные, указывающие на существование независимых от дезаминирования механизмов мутагенеза в СрG-сайтах, связанных с работой ДНКП и ферментов репарации. В настоящем обзоре обобщены данные о возможной роли ДНКП и ферментов репарации в мутагенезе в СрG-сайтах.

ВЛИЯНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ ЦИТОЗИНА НА РЕПЛИКАЦИЮ

Ключевыми ферментами, осуществляющими точную репликацию геномной эукариотической ДНК, являются ДНКП В-семейства – Pol ε и Pol δ. Высокая точность этих ферментов обусловлена корректирующей 3'–5'-экзонуклеазной активностью, удаляющей некомплементарные нуклеотиды в ходе синтеза ДНК. Мутации в экзонуклеаз-

ном домене каталитических субъединиц *POLE* (Pol ε) и *POLD1* (Pol δ) вызывают гипермутаторный фенотип, характеризующийся частотой мутаций свыше 1 на 10⁴ [27–29]. Мутационные подписи, оставляемые такими вариантами *POLE*^{exo-mut} (часто это замены P286R и V411L) в клетках злокачественных опухолей, характеризуются транзициями TCG→TTG (>20%), трансверсиями TCT→TAT (>20%) и TTT→TGT (~7%); вариантами *POLD1*^{exo-mut} – TCT→TAT [30–32]. Несмотря на множество работ, в которых гипермутаторные варианты Pol ε и Pol δ изучали в том числе на мышинных и дрожжевых модельных системах (см. подробные обзоры [33, 34]), точные механизмы индуцируемого мутагенеза неясны.

Если бы транзиции СрG→ТрG были следствием исключительно спонтанного дезаминирования mC, то ожидаемые частоты мутаций в СрG-сайтах не увеличивались бы существенно в *POLE*^{exo-mut} опухолях. Однако по данным полногеномного анализа опухолей *POLE*^{exo-mut} клетки существенно обогащены TCG→TTG мутациями, что проявляется в мутационной подписи SBS10b (<https://cancer.sanger.ac.uk/signatures/sbs/sbs10b/> [31, 35]). “Горячие точки” мутагенеза в *POLE*^{exo-mut} опухолях обнаружены в СрG-сайтах высокометилированных областей генов-онкосупрессоров *APC* и *TP53* [32]. Частота мутаций в таких опухолях коррелирует с уровнем метилирования [35, 36]. Таким образом, транзиции СрG→ТрG в *POLE*^{exo-mut} опухолях чаще происходят в сайтах, содержащих mC. Кроме того, мутации в *POLE*^{exo-mut} опухолях неравномерно распределены относительно направления репликации ДНК: наблюдается обогащение на ведущей цепи, синтезируемой Pol ε [35, 37]. Сравнительный биоинформатический анализ областей геномов с разной активностью системы коррекции неспаренных оснований (КНО) также показал, что КНО не влияет на распределение транзиций СрG→ТрG в геномной ДНК [36, 38]. Таким образом, мутационная подпись TCG→TTG в *POLE*^{exo-mut} опухолях, вероятно, обусловлена ошибочным включением dAMP напротив матричного mC вариантами Pol ε с нарушенной экзонуклеазной активностью (рис. 1).

Точность и эффективность синтеза Pol ε дикого типа и варианта Pol ε^{exo-} на ДНК с mC в настоящий момент не исследована. Однако показано, что родственная ДНКП семейства В из *Thermococcus kodakarensis* с инактивированным экзонуклеазным доменом (KOD^{exo-}) включает следующий нуклеотид после образования некомплементарной пары A:mC, эффективнее, чем после A:C. Замена G498M (ДНК-связывающий домен) дополнительно повышает эффективность удлинения мисматча A:mC вариантом KOD^{exo-}. Извест-

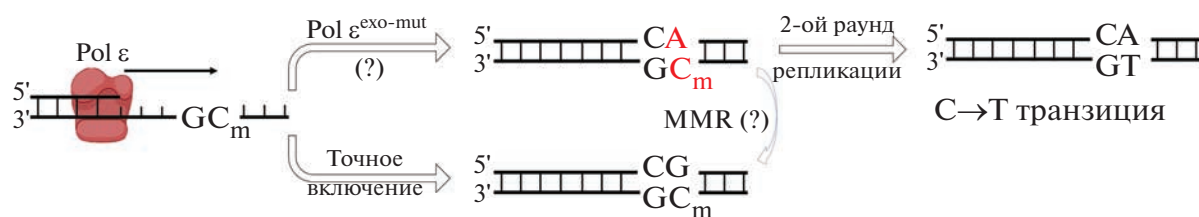


Рис. 1. Возможная схема Pol ε-ассоциированного мутагенеза в CpG-сайтах. Нарушение коррекционной активности у Pol ε^{exo-mut} вариантов повышает частоту ошибочного включения dAMP напротив mC. Если mismatch A:mC избегает репарации, то в следующем раунде репликации фиксируется транзиция CpG→TpG.

но также, что метилирование С снижает эффективность включения комплементарного dGMP ДНКП *T. kodakaraensis* в 1.3–2 раза [39, 40]. При этом одиночная замена G245D в экзонуклеазном домене варианта KOD^{exo} еще больше подавляет включение комплементарного dGMP напротив mC по сравнению с С [41]. Полученные данные подтверждают, что мутации экзонуклеазного домена ДНКП В-семейства могут избирательно снижать точность копирования mC (табл. 1).

Известно, что скорость репликации метилированных участков генома ниже, чем немодифицированных [42]. Это может объясняться как замедлением работы ДНК-хеликазы [42], так и незначительным снижением эффективности синтеза напротив mC вследствие высокой термодинамической стабильности метилированных ДНК-дуплетов [42–44]. Активность Pol δ человека протестирована на ДНК с mC, hmC, fC и caC [45]. В реакциях удлинения праймера Pol δ включала только комплементарный dGMP напротив немодифицированного и модифицированных С с примерно одинаковой эффективностью, но де-

тальные параметры реакции не были определены. Однако Pol δ человека образует более стабильный комплекс Pol δ : (m)C:dGTP в случае матричного mC за счет снижения константы скорости диссоциации тройного комплекса [46]. Показано также, что метилирование С в 1.5–2.5 раза увеличивает задержку ДНКП В-семейства фага phi29 в позициях +2, +3 и +6 от метилированного сайта [47] и незначительно снижает эффективность репликации напротив mC Pol α *Drosophila melanogaster* [26]. При этом включение следующего нуклеотида после G:mC и G:C пар KOD^{exo} происходит с примерно равной эффективностью либо с небольшим предпочтением метилированного С [26, 41]. Можно предположить, что метилирование замедляет транслокацию фермента после включения dGMP или при включении dNMP в позициях +2...+6.

Репликация мтДНК обеспечивается Pol γ семейства А [53]. В настоящий момент остается открытым вопрос о том, имеет ли место эпигенетическая регуляция с участием mC в мтДНК высших эукариот. Однако постепенно накапливаются сви-

Таблица 1. Включение dGMP и dAMP напротив эпигенетически модифицированного С ДНКП разных семейств

Семейство	Включение dGMP	Включение dAMP относительно dGMP	Мутагенез в CpG
В	mC↓ (KOD ^{exo} [39–41], *Pol α <i>D. melanogaster</i> [26]), mC, hmC, fC, caC не влияют (*Pol δ [45])	НД	TCG→TTG (Pol ε [30–32, 36, 37])
Х	mC, hmC, fC не влияют (Pol β [48, 49]), caC↓ (Pol β [48]) mC и hmC не влияют (*Pol λ [49])	mC↑ (Pol β [48])	НД
А	mC↓ зависит от последовательности, fC↓, caC↓ (KF Pol I [45, 50, 51]), hmC не влияет (KF Pol I)	mC↑, fC↑ (KF ^{exo} Pol I [45, 50])	НД
Υ	mC в ЦПД не влияет (*Pol η [52]) mC и hmC не влияют (*Pol κ, *Pol η [49]) mC↓, hmC↓ (Pol ι [49])	mC в ЦПД не влияет (*Pol η [52])	TCG→TTG CCG→TTG (Pol η)
АЕР	mC и hmC не влияют (*PrimPol [49])	НД	НД

* Данные на основе реакции удлинения праймера, кинетические параметры не определяли.

Примечание. ↓ и ↑ – снижение и повышение эффективности включения напротив модифицированного С соответственно; НД – нет данных.

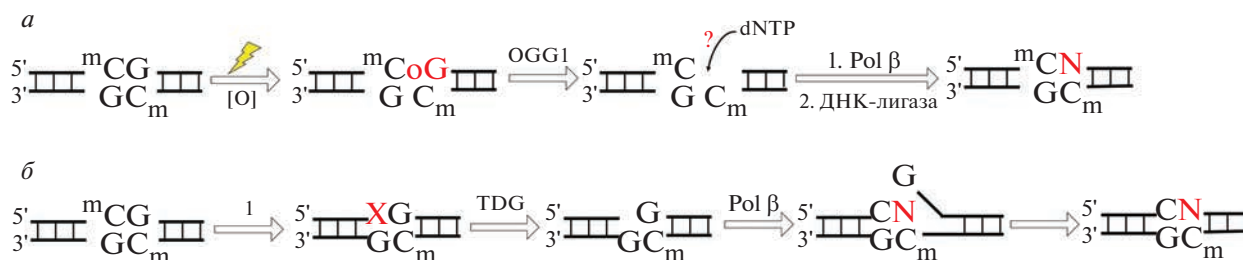


Рис. 2. Возможная схема мутагенеза при ЭРО в CpG-контексте. *a* – При удалении поврежденного основания G в CpG-сайтах mC служит матрицей для синтеза ДНК. Снижение точности синтеза Pol β напротив mC по сравнению с C может приводить к мутации. *б* – Дезаминирование или ТЕТ-опосредованное окисление mC (стадия 1) приводит к формированию T, fC или caC соответственно (обозначено X). При дальнейшей ЭРО по длиннозаплаточному пути Pol β сталкивается с mC в качестве матрицы.

детельства того, что mC и hmC присутствуют в митохондриальном геноме, хотя и на более низком уровне, чем в ядерной ДНК [54–57]. Сегодня из ДНКП А-семейства на биохимическом уровне частично охарактеризован только фрагмент Кленова (KF) Pol I *E. coli*. Показано, что KF включает dGMP напротив fC и caC с меньшей эффективностью [45, 50], но hmC не влияет на эффективность включения dGMP [45, 51]. Эффективность включения dGMP напротив mC зависит от контекста нуклеотидной последовательности, но в большинстве случаев незначительно снижена (~30%) [50]. Важно отметить, что вариант KF^{exo-} с инактивированным 3'–5'-экзонуклеазным доменом включает некомплементарный dAMP напротив mC и fC в 1.5–2 раза чаще, чем напротив немодифицированного C, хотя частота ошибок остается на уровне 10⁻⁴ [50].

ТОЧНОСТЬ СИНТЕЗА ДНК, СОДЕРЖАЩЕЙ mC, ПРИ РЕПАРАЦИИ

Помимо репликации, копирование ДНК при наличии mC в матричной цепи происходит при репаративном синтезе ДНК. Особый интерес представляет репарация при повреждении основания G в метилированных CpG-динуклеотидах, поскольку в этом случае первый же шаг репаративного синтеза происходит с включением dGMP напротив mC. Метилирование C умеренно повышает вероятность окисления G в CpG-контексте с образованием 8-охоG [21], а картирование 8-охоG в геноме с нуклеотидным разрешением показывает значительное обогащение этим повреждением CpG-сайтов [58]. Помимо спонтанного повреждения, модифицированные основания G могут появляться в ДНК при включении метаболитов некоторых противоопухолевых средств, например, 6-тиогуанина, а затем подвергаться репарации [59]. Репарация 8-охоG осуществляется с помощью ЭРО и в CpG-контексте (рис. 2*a*) имеет свои особенности. Метилирова-

ние соседнего или комплементарного с 8-охоG C снижает эффективность работы ДНК-гликозилаз [60, 61], а дезаминирование с образованием T(8-охоG)/CG-динуклеотида ингибирует как репарацию мисматча T/G, так и окисленного производного гуанина [61, 62]. Нарушения в работе ДНК-гликозилаз, участвующих в репарации 8-охоG, повышают частоту трансверсий C→A в контекстах TCG и CCG [30, 63]. Предполагалось, что 3'→5'-экзонуклеазная активность АП-эндонуклеазы APEX1 может приводить к удалению соседнего с поврежденным G остатка mC, что привело бы к увеличению размера заполняемой брешы с возможным изменением специфичности репаративного синтеза [60, 61]. Однако сравнительный анализ удаления 3'-концевых остатков показывает, что mC представляет собой наихудший возможный субстрат для такой активности APEX1 и, по-видимому, этот вариант репарации не реализуется [64].

Кроме того, ЭРО отвечает за репарацию окисленных производных mC (fC и caC) в ходе активного деметилирования и репарации мисматчей hmdU:G, образующихся вследствие дезаминирования hmC [9–11]. Ключевая роль здесь принадлежит ДНК-гликозилазе TDG и адапторному белку XRCC1, который координирует сборку мультисубъединичного комплекса, включающего основные компоненты ЭРО – одну или несколько ДНК-гликозилаз, АП-эндонуклеазу, ДНКП и ДНК-лигазы [65, 66]. Если модификации C оказывают влияние на точность и эффективность работы белков системы ЭРО, то это может вносить вклад в CpG-ассоциированный мутагенез. При активном деметилировании в ходе репаративного синтеза первый нуклеотид включается напротив G в ДНК-матрице, а mC предоставляет матрицу для возможного включения второго нуклеотида, если репарация идет по длиннозаплаточному пути, в котором может участвовать как основная репаративная ДНКП Pol β, так и репликативные Pol δ и Pol ε (рис. 2*б*) [67]. Примечательно, что за-

метная часть репарации при активном деметилировании протекает именно по длиннозаплаточному пути [68–71].

Pol β семейства X является ключевым ферментом синтеза ДНК в ходе ЭРО. Pol λ X-семейства и Pol ι Y-семейства могут, предположительно, в ряде случаев замещать Pol β [72–74]. Анализ стационарной и однооборотной кинетик показал одинаковую эффективность включения dGMP Pol β напротив C, mC, hmC и fC [48]. Частота включения некомплементарного dAMP также не зависела от метильной и гидроксиметильной групп C. Однако активность Pol β (включение dGMP и dAMP) напротив саС была подавлена [48]. Рентгеноструктурный анализ показал, что крупная отрицательно заряженная карбоксильная группа саС вызывает сдвиг сахарофосфатного остова ДНК-матрицы (рис. 3). Этот энергетически невыгодный сдвиг частично компенсируется стабилизацией карбоксильной группы остатком Lys280 белка (рис. 3).

Показано также, что mC и hmC не влияют значительно на эффективность и точность Pol β и Pol λ в реакциях удлинения праймера, однако для детекции незначительных изменений требуются более детальные кинетические исследования [49].

Точность репарации зависит не только от точности работы Pol β , но и от “передачи” продукта включения ДНК-лигазе (LigI или LigIII α) и дальнейшего успешного лигирования. Известно, что при ошибках Pol β ДНК-лигаза не способна эффективно соединять концы разрыва и оставляет AMP на 5'-конце (абортное лигирование) [76–78]. После включения dGMP белком Pol β напротив окисленных производных mC абортное лигирование не наблюдается, хотя ДНК-лигазы менее эффективно “сшивают” такие продукты [79]. Известно, что LigI и LigIII α в присутствии Pol β способны “игнорировать” одонуклеотидную брешь, содержащую матричный C, и напрямую лигируют 3' - и 5'-концы (самолигирование), что теоретически может приводить к формированию одонуклеотидных делеций [78]. Предварительные эксперименты показали, что окисленные производные mC не оказывают влияния на выход продукта самолигирования, хотя требуются дополнительные исследования кинетики этого процесса [79].

ВЛИЯНИЕ mC НА ТОЧНОСТЬ ТРАНСЛЕЗИОННОГО СИНТЕЗА

Транслезионные ДНКП семейства Y – Pol η , Pol ι , Pol κ , эффективно включают нуклеотидные субстраты напротив широкого спектра поврежденных ДНК, но характеризуются низкой точностью копирования неповрежденной ДНК [80]. Эксперименты по удлинению праймера показали, что

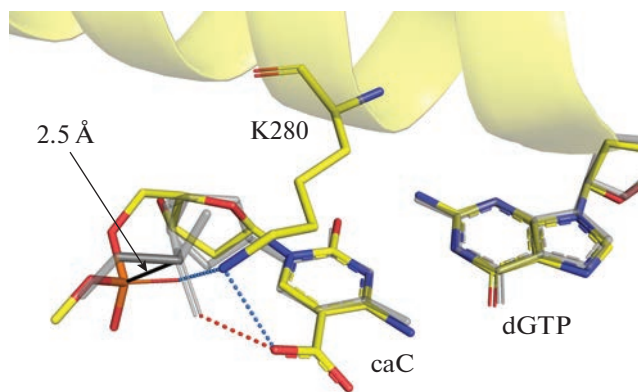


Рис. 3. Структура тройного комплекса Pol β человека с матричным саС и входящим dGTP (PDB ID 6N2S) [48]. Атомы С показаны желтым, О – красным, N – синим, P – оранжевым. Серым цветом показана референсная структура комплекса Pol β : C:dGTP (PDB ID 4UB4) [75]. Синим пунктиром обозначены Н-связи Lys280 с карбоксильной группой саС и атомом О фосфата матрицы, красным – потенциальное столкновение карбоксильной группы саС с фосфатным остовом. Сдвиг остова показан черной линией. Рисунок подготовлен в программе PyMol.

Pol η и Pol κ эффективно “проходят” mC и hmC, и модификации цитозина не влияют на частоту ошибочного включения dAMP. В то же время, у другой ДНКП Y-семейства – Pol ι – снижена эффективность включения dGMP напротив mC, однако точность фермента существенно не изменяется [47].

Поскольку метилирование C повышает вероятность образования некоторых типов повреждений в ДНК, можно предположить, что транслезионные и репаративные ДНКП могут вовлекаться в мутагенез CpG-сайтов.

Цис-син-циклобутановые пиримидиновые димеры (ЦПД) – наиболее распространенное повреждение, индуцированное УФ-излучением. Метилирование повышает коэффициент поглощения C при длине волны 290 нм, что приводит к повышению частоты образования ЦПД в метилированных CpG-сайтах [25, 81]. Потеря ароматичности основания C в составе ЦПД повышает скорость спонтанного дезаминирования поврежденных C, причем эффективность этой реакции сильно зависит от нуклеотидного контекста: (T $\wedge$ C)G дезаминируется в 50 раз быстрее (C $\wedge$ C)G [24, 82]. Более того, 3'-G ускоряет дезаминирование: димеры (T $\wedge$ C)G в 20 раз менее стабильны, чем (T $\wedge$ C)A [24, 82]. Мутационная подпись УФ-индуцированных замен характеризуется одиночными и двойными транзициями: TCG $\rightarrow$ TTG и CCG $\rightarrow$ TTG [83]. Однако метилированные ЦПД в 1.5–4 раза более устойчивы к дезаминированию [82].

Pol η является ключевой ДНКП, ведущей точный и эффективный синтез напротив ЦПД [84].

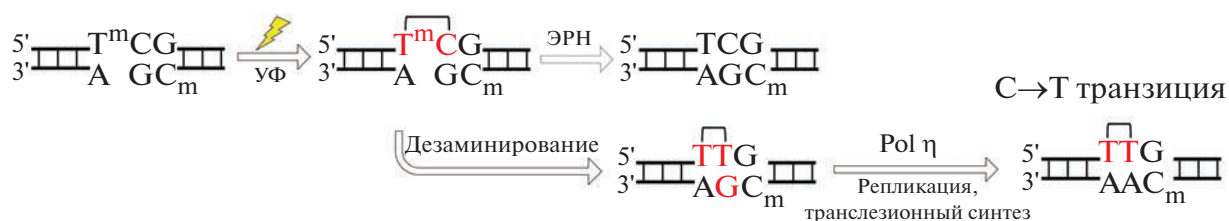


Рис. 4. Схема УФ-индуцированного мутагенеза в mCrG-сайтах, ассоциированного с Pol η. ЭРН – эксцизионная репарация нуклеотидов.

Pol η безошибочно проходит димеры T^mC *in vitro*, и точность фермента не зависит от статуса метилирования C [52]. На мышинной модели *in vivo* показано, что частота мутаций $C \rightarrow T$ в контексте последовательности TCG в клетках кожи при УФ-облучении зависит от Pol η [85]. Предполагается, что повышенная чувствительность $TmCG$ -последовательностей к УФ-излучению ускоряет образование ЦПД и последующее дезаминирование mC. Точное копирование продукта дезаминирования T^mTG Pol η с включением AA закрепляет замену $C \rightarrow T$ (рис. 4). С другой стороны, корреляция между уровнем метилирования и частотой УФ-индуцированных мутаций в опухолях кожи не показана: максимальная частота мутаций наблюдается в регионах со средним уровнем метилирования [36]. Однако метилированные области в активно транскрибируемых генах (телах генов) могут эффективнее репарироваться системой эксцизионной репарации нуклеотидов (ЭРН), что снижает частоту мутаций [36]. Отсутствие корреляции между уровнем мутагенеза и метилированием может быть связано и с невозможностью различить mC и hmC в данных бисульфитного секвенирования, тогда некоторая часть сильно метилированных областей будет содержать hmC, который препятствует образованию ЦПД [86]. Кроме того, в гетерохроматиновых регионах с сильным метилированием УФ-индуцированные мутации могут встречаться реже по причине плотной упаковки нуклеосом, защищающей от воздействия УФ. Чувствительность к УФ в значительной степени зависит от доступности пиримидиновых оснований: повернутые внутрь нуклеосомы основания формируют ЦПД значительно реже [87, 88].

8-охоG – наиболее распространенное повреждение, индуцируемое окислительным стрессом [89]. Метилирование C повышает частоту окисления соседнего G [21]. Влияние эпигенетических модификаций C на транслезионную активность ДНКП семейства Y напротив 8-охоG не изучали. Репаративные ДНКП X-семейства Pol β и Pol λ также обладают транслезионной активностью [71, 78]. Показано, что mC влияет на транслезионную активность Pol β при синтезе напротив соседнего 8-охоG: наличие метилирования увеличивает частоту включения некомплементарных

dTMP и dGMP [90]. Такие ошибочные включения должны приводить к увеличению частоты мутаций $G \rightarrow C$ и $G \rightarrow A$. Действительно, мутации первого типа наблюдали в клетках НЕК293Н при окислительном стрессе, индуцированном хроматом калия [90].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Немногочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что эпигенетические модификации C в ряде случаев могут влиять на эффективность и точность синтеза ДНКП разных семейств и работу ЭРО *in vitro* и в ряде случаев *in vivo*. Однако имеющиеся данные пока не позволяют нарисовать полную картину механизмов мутагенеза, ассоциированного с эпигенетическими модификациями C.

Значимость вклада альтернативных путей мутагенеза в общий уровень мутагенеза по mCrG-сайтам зависит от множества факторов: воздействия ДНК-повреждающих факторов (окислительного стресса, УФ, канцерогенных соединений), эффективности систем репарации, дефектов экзонуклеазной активности репликативных ДНКП. В ряде случаев этот вклад может быть значительным. В частности, частота мутаций CrG $\rightarrow$ TrG в опухолях, не содержащих дефекты в Pol ε, в 5 раз выше средней частоты мутаций в геноме: 7.4×10^{-6} против 1.5×10^{-6} (вклад дезаминирования составляет примерно 6 мутаций на 10^6 п.н.) В $POLE^{exo-mut}$ опухолях частота мутаций CrG $\rightarrow$ TrG достигает $\sim 1.6 \times 10^{-3}$ против базовой $\sim 2.5 \times 10^{-4}$, и вклад Pol ε составляет ~ 1300 мутаций на 10^6 п.н. [35]. Значимость других механизмов еще предстоит оценить. Необходимы не только *in vitro* исследования широкого круга ДНКП и ферментов ЭРО с использованием ДНК-субстратов разной последовательности и ДНК-субстратов, содержащих повреждения ДНК, но также эксперименты *in vivo* и полномасштабный биоинформатический анализ баз данных.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 22-24-20156 (ЕСШ). Анализ мутагенеза в ходе репарации ДНК выполнен при поддерж-

ке Министерства науки и высшего образования РФ (государственное задание № 121031300056-8).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jones P.A. (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 484–492.
2. Szulwach K.E., Jin P. (2014) Integrating DNA methylation dynamics into a framework for understanding epigenetic codes. *BioEssays*. **36**, 107–117.
3. Smith Z.D., Meissner A. (2013) DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 204–220.
4. Lyko F. (2018) The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 81–92.
5. Stevens M., Cheng J.B., Li D., Xie M., Hong C., Maire C.L., Ligon K.L., Hirst M., Marra M.A., Costello J.F., Wang T. (2013) Estimating absolute methylation levels at single-CpG resolution from methylation enrichment and restriction enzyme sequencing methods. *Genome Res.* **23**, 1541–1553.
6. Wu X., Zhang Y. (2017) TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 517–534.
7. Klungland A., Robertson A.B. (2017) Oxidized C5-methyl cytosine bases in DNA: 5-hydroxymethylcytosine; 5-formylcytosine; and 5-carboxycytosine. *Free Radic. Biol. Med.* **107**, 62–68.
8. Branco M.R., Ficz G., Reik W. (2012) Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 7–13.
9. He Y.-F., Li B.-Z., Li Z., Liu P., Wang Y., Tang Q., Ding J., Jia Y., Chen Z., Li L., Sun Y., Li X., Dai Q., Song C.-X., Zhang K., He C., Xu G.-L. (2011) Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*. **333**, 1303–1307.
10. Weber A.R., Krawczyk C., Robertson A.B., Kuśnierczyk A., Vågbo C.B., Schuermann D., Klungland A., Schär P. (2016) Biochemical reconstitution of TET1–TDG–BER-dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism. *Nat. Commun.* **7**, 10806.
11. Kohli R.M., Zhang Y. (2013) TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*. **502**, 472–479.
12. Tomkova M., McClellan M., Kriaucionis S., Schuster-Boeckler B. (2016) 5-hydroxymethylcytosine marks regions with reduced mutation frequency in human DNA. *Elife*. **5**, 1–23.
13. Bachman M., Uribe-Lewis S., Yang X., Burgess H.E., Iurlaro M., Reik W., Murrell A., Balasubramanian S. (2015) 5-Formylcytosine can be a stable DNA modification in mammals. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 555–557.
14. Ito S., Dalessio A.C., Taranova O., Hong K., Sowers L.C., Zhang Y. (2010) Role of tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. **466**, 1129–1133.
15. Dawlaty M.M., Breiling A., Le T., Barrasa M.I., Raddatz G., Gao Q., Powell B.E., Cheng A.W., Faull K.F., Lyko F., Jaenisch R. (2014) Loss of tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells. *Dev. Cell*. **29**, 102–111.
16. Hahn M.A., Qiu R., Wu X., Li A.X., Zhang H., Wang J., Jui J., Jin S.G., Jiang Y., Pfeifer G.P., Lu Q. (2013) Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in mammalian neurogenesis. *Cell Rep.* **3**, 291–300.
17. Spruijt C.G., Gnerlich F., Smits A.H., Pfaffeneder T., Jansen P.W.T.C., Bauer C., Münzel M., Wagner M., Müller M., Khan F., Eberl H.C., Mensinga A., Brinkman A.B., Lephikova K., Müller U., Walter J., Boelens R., van Ingen H., Leonhardt H., Carell T., Vermeulen M. (2013) Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell*. **152**, 1146–1159.
18. Iurlaro M., Ficz G., Oxley D., Raiber E., Bachman M., Booth M.J., Andrews S., Balasubramanian S., Reik W. (2013) A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation. *Genome Biol.* **14**, R119.
19. Pfeifer G.P. (2006) Mutagenesis at methylated CpG sequences. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **301**, 259–281.
20. Waters T.R., Swann P.F. (2000) Thymine-DNA glycosylase and G to A transition mutations at CpG sites. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **462**, 137–147.
21. Kawai K., Wata Y., Hara M., Tojo S., Majima T. (2002) Regulation of one-electron oxidation rate of guanine by base pairing with cytosine derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3586–3590.
22. Hu W., Feng Z., Tang M. (2003) Preferential carcinogen–DNA adduct formation at codons 12 and 14 in the human *K-ras* gene and their possible mechanisms. *Biochemistry*. **42**, 10012–10023.
23. Denissenko M.F., Chen J.X., Tang M.-S., Pfeifer G.P. (1997) Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human *P53* gene (benzo[a]pyrene5-methylcytosine). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 3893–3898.
24. Lee D.H., Pfeifer G.P. (2003) Deamination of 5-methylcytosines within cyclobutane pyrimidine dimers is an important component of UVB mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 10314–10321.
25. Rochette P.J., Lacoste S., Therrien J.P., Bastien N., Brash D.E., Drouin R. (2009) Influence of cytosine methylation on ultraviolet-induced cyclobutane pyrimidine dimer formation in genomic DNA. *Mutat. Res. – Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **665**, 7–13.
26. Shen J.-C., Creighton S., Jones P.A., Goodman M.F. (1992) A comparison of the fidelity of copying 5-methylcytosine and cytosine at a defined DNA template site. *Nucl. Acids Res.* **20**, 5119–5125.
27. Shinbrot E., Henninger E.E., Weinhold N., Covington K.R., Göksenin A.Y., Schultz N., Chao H., Doddapaneni H., Muzny D.M., Gibbs R.A., Sander C., Pursell Z.F., Wheeler D.A. (2014) Exonuclease mutations in DNA

- polymerase epsilon reveal replication strand specific mutation patterns and human origins of replication. *Genome Res.* **24**, 1740–1750.
28. Shlien A., Campbell B.B., de Borja R., Alexandrov L.B., Merico D., Wedge D., Van Loo P., Tarpey P.S., Coup-land P., Behjati S., Pollett A., Lipman T., Heidari A., Deshmukh S., Avitzur N., Meier B., Gerstung M., Hong Y., Merino D.M., Ramakrishna M., Remke M., Arnold R., Panigrahi G.B., Thakkar N.P., Hodel K.P., Henninger E.E., Göksenin A.Y., Bakry D., Charames G.S., Druker H., Lerner-Ellis J., Mistry M., Dvir R., Grant R., Elhasid R., Farah R., Taylor G.P., Nathan P.C., Alexander S., Ben-Shachar S., Ling S.C., Gallinger S., Constantini S., Dirks P., Huang A., Scherer S.W., Grundy R.G., Durno C., Aronson M., Gartner A., Meyn M.S., Taylor M.D., Pursell Z.F., Pearson C.E., Malkin D., Futreal P.A., Stratton M.R., Bouffet E., Hawkins C., Campbell P.J., Tabori U., Biallelic Mismatch Repair Deficiency Consortium (2015) Combined hereditary and somatic mutations of replication error repair genes result in rapid onset of ultra-hypermutated cancers. *Nat. Genet.* **47**, 257–262.
 29. Nebot-Bral L., Brandao D., Verlingue L., Rouleau E., Caron O., Despras E., El-Dakdouki Y., Champiat S., Aoufouchi S., Leary A., Marabelle A., Malka D., Chapt N., Kannouche P.L. (2017) Hypermutated tumours in the era of immunotherapy: the paradigm of personalised medicine. *Eur. J. Cancer.* **84**, 290–303.
 30. Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C., Aparicio S.A.J.R., Behjati S., Biankin A.V., Bignell G.R., Bolli N., Borg A., Borresen-Dale A.-L., Boyault S., Burkhardt B., Butler A.P., Caldas C., Davies H.R., Desmedt C., Eils R., Eyfjörð J.E., Foekens J.A., Greaves M., Hosoda F., Hutter B., Illic T., Imbeaud S., Imielinski M., Jäger N., Jones D.T.W., Jones D., Knappskog S., Kool M., Lakhani S.R., López-Otín C., Martin S., Munshi N.C., Nakamura H., Northcott P.A., Pajic M., Papaemmanuil E., Paradiso A., Pearson J.V., Puente X.S., Raine K., Ramakrishna M., Richardson A.L., Richter J., Rosenstiel P., Schlesner M., Schumacher T.N., Span P.N., Teague J.W., Totoki Y., Tutt A.N.J., Valdés-Mas R., van Buuren M.M., van 't Veer L., Vincent-Salomon A., Waddell N., Yates L.R., Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, ICGC Breast Cancer Consortium, ICGC MML-Seq Consortium, ICGC PedBrain, Zucman-Rossi J., Futreal P.A., McDermott U., Lichter P., Meyerson M., Grimmond S.M., Siebert R., Campo E., Shibata T., Pfister S.M., Campbell P.J., Stratton M.R. (2013) Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* **500**, 415–421.
 31. Alexandrov L.B., Kim J., Haradhvala N.J., Huang M.N., Tian Ng A.W., Wu Y., Boot A., Covington K.R., Gordenin D.A., Bergstrom E.N., Islam S.M.A., Lopez-Bigas N., Klimczak L.J., McPherson J.R., Morganella S., Sabarinathan R., Wheeler D.A., Mustonen V., Getz G., Rozen S.G., Stratton M.R. (2020) The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature.* **578**, 94–101.
 32. Mertz T.M., Baranovskiy A.G., Wang J., Tahirov T.H., Shcherbakova P.V. (2017) Nucleotide selectivity defect and mutator phenotype conferred by a colon cancer-associated DNA polymerase δ mutation in human cells. *Oncogene.* **36**, 4427–4433.
 33. Barbari S.R., Shcherbakova P.V. (2017) Replicative DNA polymerase defects in human cancers: consequences, mechanisms, and implications for therapy. *DNA Repair (Amst.).* **56**, 16–25.
 34. Rayner E., Van Gool I.C., Palles C., Kearsley S.E., Bosse T., Tomlinson I., Church D.N. (2016) A panoply of errors: polymerase proofreading domain mutations in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **16**, 71–81.
 35. Tomkova M., McClellan M., Kriaucionis S., Schuster-Böckler B. (2018) DNA replication and associated repair pathways are involved in the mutagenesis of methylated cytosine. *DNA Repair (Amst.).* **62**, 1–7.
 36. Poulos R.C., Olivier J., Wong J.W.H. (2017) The interaction between cytosine methylation and processes of DNA replication and repair shape the mutational landscape of cancer genomes. *Nucl. Acids Res.* **45**, 7786–7795.
 37. Tomkova M., Tomek J., Kriaucionis S., Schuster-Böckler B. (2018) Mutational signature distribution varies with DNA replication timing and strand asymmetry. *Genome Biol.* **19**, 1–12.
 38. Supek F., Lehner B. (2015) Differential DNA mismatch repair underlies mutation rate variation across the human genome. *Nature.* **521**, 81–84.
 39. Huber C., von Watzdorf J., Marx A. (2016) 5-methylcytosine-sensitive variants of *Thermococcus kodakaraensis* DNA polymerase. *Nucl. Acids Res.* **44**, 9881–9890.
 40. von Watzdorf J., Leitner K., Marx A. (2016) Modified nucleotides for discrimination between cytosine and the epigenetic marker 5-methylcytosine. *Angew. Chemie Int. Ed.* **55**, 3229–3232.
 41. Aschenbrenner J., Drum M., Topal H., Wieland M., Marx A. (2014) Direct sensing of 5-methylcytosine by polymerase chain reaction. *Angew. Chemie Int. Ed.* **53**, 8154–8158.
 42. Rausch C., Zhang P., Casas-Delucchi C.S., Daiß J.L., Engel C., Coster G., Hastert F.D., Weber P., Cardoso M.C. (2021) Cytosine base modifications regulate DNA duplex stability and metabolism. *Nucl. Acids Res.* **49**, 12870–12894.
 43. Lebedev Y., Akopyants N., Azhikina T., Shevchenko Y., Potapov V., Stecenko D., Berg D., Sverdlov E. (1996) Oligonucleotides containing 2-aminoadenine and 5-methylcytosine are more effective as primers for PCR amplification than their nonmodified counterparts. *Genet. Anal. Biomol. Eng.* **13**, 15–21.
 44. Rodríguez López C.M., Lloyd A.J., Leonard K., Wilkinson M.J. (2012) Differential effect of three base modifications on DNA thermostability revealed by high resolution melting. *Anal. Chem.* **84**, 7336–7342.
 45. Shibutani T., Ito S., Toda M., Kanao R., Collins L.B., Shibata M., Urabe M., Koseki H., Masuda Y., Swenberg J.A., Masutani C., Hanaoka F., Iwai S., Kuraoka I. (2015) Guanine-5-carboxylcytosine base pairs mimic mismatches during DNA replication. *Sci. Rep.* **4**, 5220.
 46. Lee J.Y., Park J.W. (2022) Modified cytosines versus cytosine in a DNA polymerase: retrieving thermodynamic and kinetic constants at the single molecule level. *Analyst.* **147**, 341–348.
 47. Flusberg B.A., Webster D.R., Lee J.H., Travers K.J., Olivares E.C., Clark T.A., Korlach J., Turner S.W.

- (2010) Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nat. Methods*. **7**, 461–465.
48. Howard M.J., Foley K.G., Shock D.D., Batra V.K., Wilson S.H. (2019) Molecular basis for the faithful replication of 5-methylcytosine and its oxidized forms by DNA polymerase β . *J. Biol. Chem.* **294**, 7194–7201.
49. Шилкин Е.С., Петрова Д.В., Полтораченко В.А., Болдинова Е.О., Жарков Д.О., Макарова А.В. (2021) Матричные свойства 5-метил-2'-дезокситидина и 5-гидроксиметил-2'-дезокситидина в реакциях с транслезионными и репаративными ДНК-полимеразами человека. *Молекуляр. биология*. **55**, 305–311.
50. Karino N. (2001) Synthesis and properties of oligonucleotides containing 5-formyl-2'-deoxycytidine: *in vitro* DNA polymerase reactions on DNA templates containing 5-formyl-2'-deoxycytidine. *Nucl. Acids Res.* **29**, 2456–2463.
51. Münzel M., Lischke U., Stathis D., Pfaffeneder T., Gnerlich F.A., Deiml C.A., Koch S.C., Karaghiosoff K., Carell T. (2011) Improved synthesis and mutagenicity of oligonucleotides containing 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Chem. – A Eur. J.* **17**, 13782–13788.
52. Song Q., Sherrer S.M., Suo Z., Taylor J.-S. (2012) Preparation of site-specific T=mCG *cis-syn* cyclobutane dimer-containing template and its error-free bypass by yeast and human polymerase η . *J. Biol. Chem.* **287**, 8021–8028.
53. Wanrooij S., Falkenberg M. (2010) The human mitochondrial replication fork in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.* **1797**, 1378–1388.
54. Shock L.S., Thakkar P.V., Peterson E.J., Moran R.G., Taylor S.M. (2011) DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 3630–3635.
55. Matsuda S., Yasukawa T., Sakaguchi Y., Ichiyanagi K., Unoki M., Gotoh K., Fukuda K., Sasaki H., Suzuki T., Kang D. (2018) Accurate estimation of 5-methylcytosine in mammalian mitochondrial DNA. *Sci. Rep.* **8**, 5801.
56. Lopes A.F.C. (2020) Mitochondrial metabolism and DNA methylation: a review of the interaction between two genomes. *Clin. Epigenetics*. **12**, 182.
57. Stocco A., Coppède F. (2021) Mitochondrial DNA methylation and human diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 4594.
58. Fang Y., Zou P. (2020) Genome-wide mapping of oxidative DNA damage via engineering of 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Biochemistry*. **59**, 85–89.
59. Wang H., Wang Y. (2009) 6-Thioguanine perturbs cytosine methylation at the CpG dinucleotide site by DNA methyltransferases *in vitro* and acts as a DNA demethylating agent *in vivo*. *Biochemistry*. **48**, 2290–2299.
60. Kasymov R.D., Grin I.R., Endutkin A.V., Smirnov S.L., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Zharkov D.O. (2013) Excision of 8-oxoguanine from methylated CpG dinucleotides by human 8-oxoguanine DNA glycosylase. *FEBS Lett.* **587**, 3129–3134.
61. Sassa A., Çağlayan M., Dyrkheeva N.S., Beard W.A., Wilson S.H. (2014) Base excision repair of tandem modifications in a methylated CpG dinucleotide. *J. Biol. Chem.* **289**, 13996–14008.
62. Lai Y., Jiang Z., Zhou J., Osemota E., Liu Y. (2016) AP endonuclease 1 prevents the extension of a T/G mismatch by DNA polymerase β to prevent mutations in CpGs during base excision repair. *DNA Repair (Amst.)*. **43**, 89–97.
63. Viel A., Bruselles A., Meccia E., Fornasari M., Quaià M., Canzonieri V., Policicchio E., Urso E.D., Agostini M., Genuardi M., Lucci-Cordisco E., Venesio T., Martayan A., Diodoro M.G., Sanchez-Mete L., Stigliano V., Mazzei F., Grasso F., Giuliani A., Baiocchi M., Maestro R., Giannini G., Tartaglia M., Alexandrov L.B., Bignami M. (2017) A specific mutational signature associated with DNA 8-oxoguanine persistence in MUTYH-defective colorectal cancer. *EBioMedicine*. **20**, 39–49.
64. Ендуткин А.В., Яценко Д.Д., Жарков Д.О. (2022) Влияние метилирования ДНК на 3'→5'-экзонуклеазную активность основной апурин-апири-мидиновой эндонуклеазы человека APEX1. *Биохимия*. **87**, 3–15.
65. Liu X., Xu B., Yang J., He L., Zhang Z., Cheng X., Yu H., Liu X., Jin T., Peng Y., Huang Y., Xia L., Wang Y., Wu J., Wu X., Liu S., Shan L., Yang X., Sun L., Liang J., Zhang Y., Shang Y. (2021) UHRF2 commissions the completion of DNA demethylation through allosteric activation by 5hmC and K33-linked ubiquitination of XRCC1. *Mol. Cell*. **81**, 2960–2974. e7.
66. Steinacher R., Barekati Z., Botev P., Kuśnierczyk A., Slupphaug G., Schär P. (2019) SUMOylation coordinates BERosome assembly in active DNA demethylation during cell differentiation. *EMBO J.* **38**, 1–18.
67. Fortini P., Dogliotti E. (2007) Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst.)*. **6**, 398–409.
68. Barreto G., Schäfer A., Marhold J., Stach D., Swaminathan S.K., Handa V., Döderlein G., Maltry N., Wu W., Lyko F., Niehrs C. (2007) Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature*. **445**, 671–675.
69. Santos F., Peat J., Burgess H., Rada C., Reik W., Dean W. (2013) Active demethylation in mouse zygotes involves cytosine deamination and base excision repair. *Epigenetics Chromatin*. **6**, 39.
70. Grin I., Ishchenko A.A. (2016) An interplay of the base excision repair and mismatch repair pathways in active DNA demethylation. *Nucl. Acids Res.* **44**, 3713–3727.
71. Wang D., Wu W., Callen E., Pavani R., Zolnerowich N., Kodali S., Zong D., Wong N., Noriega S., Nathan W.J., Matos-Rodrigues G., Chari R., Kruhlak M.J., Livak F., Ward M., Caldecott K., Di Stefano B., Nussenzweig A. (2022) Active DNA demethylation promotes cell fate specification and the DNA damage response. *Science*. **378**, 983–989.
72. Petta T.B., Nakajima S., Zlatanou A., Despras E., Couve-Privat S., Ishchenko A., Sarasin A., Yasui A., Kannouche P. (2008) Human DNA polymerase ι protects cells against oxidative stress. *EMBO J.* **27**, 2883–2895.

73. Beard W.A., Wilson S.H. (2019) DNA polymerase beta and other gap-filling enzymes in mammalian base excision repair. *Enzymes*. **45**, 1–26.
74. Markkanen E. (2017) Not breathing is not an option: how to deal with oxidative DNA damage. *DNA Repair (Amst.)*. **59**, 82–105.
75. Freudenthal B.D., Beard W.A., Perera L., Shock D.D., Kim T., Schlick T., Wilson S.H. (2015) Uncovering the polymerase-induced cytotoxicity of an oxidized nucleotide. *Nature*. **517**, 635–639.
76. Çağlayan M., Wilson S.H. (2017) Role of DNA polymerase β oxidized nucleotide insertion in DNA ligation failure. *J. Radiat. Res.* **58**, 603–607.
77. Çağlayan M., Horton J.K., Dai D.-P., Stefanick D.F., Wilson S.H. (2017) Oxidized nucleotide insertion by pol β confounds ligation during base excision repair. *Nat. Commun.* **8**, 14045.
78. Çağlayan M. (2020) The ligation of pol β mismatch insertion products governs the formation of promutagenic base excision DNA repair intermediates. *Nucl. Acids Res.* **48**, 3708–3721.
79. Çağlayan M. (2020) Pol β gap filling, DNA ligation and substrate-product channeling during base excision repair opposite oxidized 5-methylcytosine modifications. *DNA Repair (Amst.)*. **95**, 102945.
80. Vaisman A., Woodgate R. (2017) Translesion DNA polymerases in eukaryotes: what makes them tick? *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **52**, 274–303.
81. Mitchell D.L. (2007) Effects of cytosine methylation on pyrimidine dimer formation in DNA. *Photochem. Photobiol.* **71**, 162.
82. Cannistraro V.J., Taylor J.-S. (2009) Acceleration of 5-methylcytosine deamination in cyclobutane dimers by G and its implications for UV-induced C-to-T mutation hotspots. *J. Mol. Biol.* **392**, 1145–1157.
83. Brash D.E. (2015) UV signature mutations. *Photochem. Photobiol.* **91**, 15–26.
84. Masutani C., Kusumoto R., Iwai S., Hanaoka F. (2000) Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase h. *EMBO J.* **19**, 3100–3109.
85. Ikehata H., Chang Y., Yokoi M., Yamamoto M., Hanaoka F. (2014) Remarkable induction of UV-signature mutations at the 3'-cytosine of dipyrimidine sites except at 5'-TCG-3' in the UVB-exposed skin epidermis of xeroderma pigmentosum variant model mice. *DNA Repair (Amst.)*. **22**, 112–122.
86. Kim S.I., Jin S.G., Pfeifer G.P. (2013) Formation of cyclobutane pyrimidine dimers at dipyrimidines containing 5-hydroxymethylcytosine. *Photochem. Photobiol. Sci.* **12**, 1409–1415.
87. Song Q., Cannistraro V.J., Taylor J.S. (2011) Rotational position of a 5-methylcytosine-containing cyclobutane pyrimidine dimer in a nucleosome greatly affects its deamination rate. *J. Biol. Chem.* **286**, 6329–6335.
88. Cannistraro V.J., Pondugula S., Song Q., Taylor J. (2015) Rapid deamination of cyclobutane pyrimidine dimer photoproducts at TCG sites in a translationally and rotationally positioned nucleosome *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **290**, 26597–26609.
89. van Loon B., Markkanen E., Hübscher U. (2010) Oxygen as a friend and enemy: how to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair (Amst.)*. **9**, 604–616.
90. Jiang Z., Lai Y., Beaver J.M., Tsegay P.S., Zhao M., Horton J.K., Zamora M., Rein H.L., Miralles F., Shaver M., Hutcheson J.D., AgoulNIK I., Wilson S.H., Liu Y. (2020) Oxidative DNA damage modulates DNA methylation pattern in human breast cancer 1 (BRCA1) gene via the crosstalk between DNA polymerase β and a *de novo* DNA methyltransferase. *Cells*. **9**, 225.

Alternative Mechanisms of Mutagenesis at mCpG Sites during Replication and Repair

E. S. Shilkin¹, D. V. Petrova^{2, 3}, D. O. Zharkov^{2, 3, *}, and A. V. Makarova^{1, **}

¹Institute of Molecular Genetics, National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

³Novosibirsk State University, Novosibirsk, 63009 Russia

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

**e-mail: amakarova-img@yandex.ru

5-Methyl-2'-deoxycytidine (mC) at CpG sites plays a key role in the epigenetic gene function regulation, cell differentiation and carcinogenesis. Despite the importance of mC for normal cell function, CpG dinucleotides are known as mutagenesis hotspots. mC is deaminated with the formation of T, causing C→T transitions. However, several recent studies demonstrated the effect of epigenetic modifications of C on the fidelity and efficiency of DNA polymerases and excision repair enzymes. This review summarizes the known data indicating the existence of mutagenesis mechanisms independent of deamination at CpG sites.

Keywords: 5-methyl-2'-deoxycytidine, CpG sites, DNA polymerases, DNA damage, repair

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.29

ДНК-ФЕНОТИПИРОВАНИЕ ОСТАНКОВ ИЗ ЭЛИТНЫХ ПОГРЕБЕНИЙ
ЮГА РОССИИ ХАЗАРСКОГО ВРЕМЕНИ

© 2023 г. Д. О. Фесенко^а, О. Ю. Арамова^{б, с}, Е. В. Вдовченков^с, И. Д. Ивановский^д,
О. Е. Фесенко^е, С. А. Поляков^а, Т. Г. Фалеева^{г, з}, М. А. Филиппова^а,
В. С. Флоринская^с, И. В. Корниенко^{б, с, *}

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

^бФедеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук,
Ростов-на-Дону, 344006 Россия

^сЮжный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванковского,
Ростов-на-Дону, 344090 Россия

^дООО “Центр исследования ДНК”, Химки, 141402 Россия

^еНаучно-исследовательский институт физики Южного федерального университета,
Ростов-на-Дону, 344090 Россия

^гСанкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения
“Бюро судебно-медицинской экспертизы”, Санкт-Петербург, 195067 Россия

^зСеверо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова,
Санкт-Петербург, 191015 Россия

*e-mail: ikornienko@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.10.2022 г.

После доработки 25.12.2022 г.

Принята к публикации 28.12.2022 г.

Анализ древней ДНК позволяет решать научные проблемы, связанные с геногеографическим происхождением и моделями миграции популяций. Хазарский каганат является предметом спора ученых: его сложное историческое становление, отсутствие достаточного количества художественных и письменных источников, а также исчезновение представителей хазарской культуры оставляет открытым вопрос о внешнем облике хазар. Нами проведено ДНК-фенотипирование костных останков из элитных погребений Юга России хазарского времени по признакам цвета глаз, волос, кожи, групп крови по системе АВ0. Установлено, что 8 из 10 погребенных имели при жизни карие глаза, темные волосы, а также преимущественно смуглую кожу. Люди из двух погребений имели серо-голубые глаза, а один человек — светлые волосы. У восьми индивидов установлена наиболее вероятная группа крови по системе АВ0: пятеро имели группу 0 (I), четыре — А (II), один — В (III). Оценка распределения аллелей 10 аутосомных маркеров, обладающих популяционной специфичностью, свидетельствует о высокой гетерогенности этногеографического происхождения исследованных хазар. Полученные результаты свидетельствуют об этнокультурном, генетическом и фенотипическом разнообразии Хазарского каганата.

Ключевые слова: хазары, подкурганные погребения, древняя ДНК, ДНК-фенотипирование, биочип, группы крови, система АВ0, Y-гаплогруппы

DOI: 10.31857/S0026898423040055, **EDN:** QKUCEK

ВВЕДЕНИЕ

Фенотип — внешний облик человека — обычно не привлекает особого внимания на фоне изучения политической, социальной и экономической истории. Однако следует признать, что изучение

фенотипа позволяет значительно детализировать наши знания о людях прошлого. Образ человека, включая цвет волос, глаз и кожи, наряду с одеждой, прической, ювелирными украшениями — является важнейшим признаком идентификации. Деление на свой—чужой, как один из структурообразующих маркеров этничности, во многом исходит из внешнего вида человека. С внешним обликом связаны этнические стереотипы, а внешность является важнейшим маркером родства.

Сокращения: SNP — однонуклеотидный полиморфизм, STR — короткий tandemный повтор, AFR — африканская популяция, EAS — восточно-азиатская популяция, EUR — европейская популяция, SAS — южно-азиатская популяция.

Внешность населения Хазарского каганата, возникшего во второй половине VII века и занимавшего обширные земли в Поволжье, Подонье и на Северо-Восточном Кавказе, влиявшего на территорию всей степной зоны Восточной Европы, вызывает большой интерес и служит объектом дискуссий в научном сообществе [1–3].

В догеномную эпоху для описания внешнего облика хазар мы могли использовать данные физической антропологии, изобразительные и письменные источники. Смешанность антропологических типов у хазар нашла отражение в изобразительном искусстве.

Антропологические данные указывают на преобладание монголоидов в погребениях курганных некрополей Подонья хазарского времени [4]. Краниологические анализы черепов из погребений VII–IX веков, найденных на территории Хазарского каганата (современный Нижний Дон и Нижнее Поволжье), выявили преобладание монголоидных признаков (70%), проявляющих наибольшее сходство с гуннами Забайкалья и тюркоязычными кочевниками Южной Сибири, Алтая и Казахстана. Европеоидные признаки представителей хазарского населения имеют краниологическое сходство с синхронной салтово-маяцкой и сарматской культурами Нижнего Подонья и Нижнего Поволжья [5–8].

Письменные источники отмечают различия во внешнем облике хазар. Ал-Истахри писал: “Хазары не похожи на тюрков, они черноволосы, разделяются на два разряда, один называется кара-хазар, они смуглы так сильно, что их смуглота отдает в чернь, они словно какой-либо разряд из Индии. Другой разряд — белые, красивые и совершенные по внешнему виду”. Персидская редакция ал-Истахри дает несколько иной вариант: “Хазарские люди походят на тюрков, но они не тюрки”. Однако у тюрков деление на черных и белых означало также деление на две социальные категории. Черные хазары были зависимым населением, белые — свободным [3].

Постгеномная эра открывает нам новый источник информации о внешности и других, ранее недоступных, признаках представителей древних эпох: к настоящему времени установлены ассоциации между целым рядом генетических полиморфизмов и фенотипическими проявлениями [9–11]. Благодаря развитию оригинальных отечественных методик генотипирования, мы получили возможность извлекать генетическую информацию из сложных образцов, содержащих крайне малое количество деградированной древней ДНК. Исследуемые нами останки знатных воинов, найденные в подкурганных захоронениях

Нижнего Дона, относятся к кочевой элите Каганата, благодаря характерным особенностям погребального обряда. Эти останки обнаружены в захоронении с чучелом взнузданной верховой лошади, а также со статусными атрибутами: металлическим наборным поясом, серебряным и позолоченным сосудами, ювелирными изделиями и золотыми византийскими монетами [12, 13].

Цель настоящей работы состояла в установлении фенотипических маркеров останков представителей хазарского времени, найденных на территории Юга России, по признакам цвета глаз, волос, кожи, групп крови по системе АВ0.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы. Для молекулярно-генетического анализа отобраны костные останки из подкурганных погребений VII–IX веков, найденных на доменной территории Хазарского каганата (современная Ростовская область) и идентифицированные как элитные воинские захоронения.

Подробное описание девяти объектов исследования, а также места их обнаружения опубликовано ранее [5]. Десятое погребение (№ 166), датируемое второй половиной VIII–началом IX вв. н. э., обнаружено в Мартыновском районе (хутор Новый) Л.С. Ильюковым в 1982 г. [14].

Согласно краниологическим данным, останки №№ 67, 619, 457 принадлежали к монголоидному расовому типу. Скелет № 1986 имел смешанные черты монголоидного и европеоидного типа, а индивиды из погребений №№ 531, 656, 1564 — признаки европеоидного расового типа. Расовую принадлежность скелетов №№ 166, 1251, 1566 установить не удалось из-за отсутствия черепов [4].

Пробоподготовку костных объектов и выделение древней ДНК проводили с использованием оригинальных методик, описанных в работах И.В. Корниенко и соавт. [5, 15, 16], включающих специальную деконтаминационную обработку костного порошка [17, 18]. Экстракцию ДНК из исследуемых образцов проводили в трех независимых параллелях. Далее экстракты ДНК, полученные из одного и того же образца, объединяли и концентрировали с использованием центрифужного концентратора Microcon YM-30 с мембраной Ultracel-30 (“Millipore”, США).

На всех этапах работы с археологическими образцами использовали индивидуальные средства защиты (халаты, одноразовые маски, медицинские шапочки и перчатки).

Оценка концентрации выделенной ДНК. Концентрацию активной ДНК-матрицы определяли

методом ферментативной амплификации ДНК в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием коммерческой тест-системы ХУ-Детект (“Синтол”, Россия) при помощи термоциклера с мультиканальным детектором iQ5 (“Bio-Rad”, США) в четырех повторностях. Использовали следующую программу термоциклирования: предварительная инкубация при 95°C в течение 5 мин, затем 44 цикла, каждый из которых включал денатурацию (95°C, 15 с), отжиг праймеров (61°C, 35 с) и элонгацию цепи (68°C, 10 с). Эффективность ПЦР-РВ, вычисленная по стандартной кривой, составляла 0.92. Данные анализировали при помощи программы iQ5 Optical System Software (версия 2.0). Концентрацию древней ДНК оценивали по каналу FAM (фрагмент гена β -актина размером 82 п.н.) путем сравнения значений пороговых циклов (C_t) опытных образцов с калибровочной кривой.

Генотипирование маркеров, ассоциированных с цветом глаз, волос, кожи, группой крови АВ0, базовой гаплогруппой Y-хромосомы и половой принадлежностью человека. Генотипирование проводили с использованием набора реагентов Phenotype Expert (“Центр исследования ДНК”, Россия). Генотипирование состояло из трех этапов: мультиплексной ПЦР, гибридизации ПЦР-продукта на биочипе и регистрации генотипа. В ходе мультиплексной ПЦР происходила амплификация и флуоресцентное мечение 53 целевых фрагментов генома человека, содержащих 60 генетических маркеров, ассоциированных с цветом глаз, волос, кожи, группой крови АВ0, базовой Y-гаплогруппой и половой принадлежностью человека (маркеры приведены в табл. 1 и подробно описаны в [19]). Средняя длина ампликонов, нарабатываемых набором праймеров Phenotype Expert (“Центр исследования ДНК”), составляет около 79 п.н., что повышает шансы на успешное генотипирование древней деградированной ДНК в сравнении с ближайшим аналогом, использующим методику SNaPshot [9].

ПЦР выполняли по следующей программе: активация полимеразы при 95°C в течение 2 мин, далее 50 циклов симметричной амплификации (94°C, 30 с; 65°C, 40 с; 72°C, 30 с) и 50 циклов асимметричной амплификации (94°C, 20 с; 52°C, 30 с; 72°C, 30 с). Каждый образец анализировали в четырех независимых постановках. В первой постановке брали по 1 мкл образца на реакцию; во второй — по 1, 2 и 3 мкл на ПЦР, в третьей — по 0.1 и 0.2 мкл, в четвертой — 0.4, 0.5, 0.6 и 0.8 мкл соответственно. При проведении ПЦР использовали положительный (мужская ДНК в концентрации 0.5 нг/мкл) и отрицательный (деионизированная вода) контроль.

Гибридизация ПЦР-продуктов на биочипе и анализ картины флуоресценции. Гибридизационную смесь готовили следующим образом: 7.5 мкл формамида, 7.5 мкл промывочного буфера и 15 мкл ПЦР-продукта смешивали в пробирке типа Эппендорф и вносили в гибридизационную камеру биочипа. Биочипы с плотно закрытыми крышками помещали в термостат (12 ч, 37°C). По окончании гибридизации биочипы помещали в 20-кратно разведенный гибридизационно-промывочный буфер на 15 мин, далее переносили в кювету с дистиллированной водой на 1–2 мин, после чего обдували сжатым воздухом. Регистрацию картины флуоресценции биочипа и обработку результатов проводили с использованием анализатора Пикодетект (“БИОЧИП-ИМБ”, Россия) в соответствии с руководством по эксплуатации. Более подробное описание методики генотипирования и обработки результатов приведено в [20–22].

Трансляция генотипа в фенотип. Результаты интерпретировали по признакам группы крови АВ0, базовой гаплогруппы Y-хромосомы и половой принадлежности при помощи программы Phenotype Expert (“Центр исследования ДНК”). Для трансляции полученного генотипа в фенотип по признаку цвет (глаз, волос, кожи) использовали интернет-ресурс <https://hirisplex.erasmusmc.nl>.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение концентрации выделенной ДНК

В результате количественной оценки содержания геномной ДНК в препаратах получены следующие данные (ппгт/мкл): № 67 — 8.3, № 166 — 2.5, № 457 — 5.7, № 531 — 6.5, № 619 — 60.4, № 656 — 177, № 1251 — 6.4, № 1564 — 9.3, № 1566 — 8.9, № 1986 — 97.5. В большинстве объектов мы наблюдали вполне ожидаемую деградацию ДНК-матрицы, обусловленную древностью исследуемых останков.

Генотипирование

В первой постановке (1 мкл ДНК на ПЦР) получены полные генетические профили образцов №№ 67, 166, 656, 1251 и 1986. В остальных пяти образцах имело место выпадение части локусов. Полагая, что это связано с недостаточным количеством ДНК-матрицы, мы увеличили объем анализируемого образца: брали 1, 2 и 3 мкл раствора ДНК на ПЦР. В результате полный профиль получен только для образца № 619, для №№ 457, 531, 1564 и 1566 результаты существенно ухудшились. Мы предположили наличие ингибиторов ПЦР в растворах ДНК, поэтому в двух последующих постановках объем ДНК варьировали

Таблица 1. Результаты генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов 10 скелетов из подкурганных могильников хазарского времени, расположенных на территории Ростовской области

Признак	№	SNP	Ген, гаплогруппа	Алель	Ампликон, п.н.	67	166	457	531	619	656	1251	1564	1566	1986
Пигментация радужной оболочки, волос и кожи	1	rs312262906	MC1R	A/D	76	DD	DD	DD	DD	DD	DD	DD	DD	DD	DD
	2	rs11547464	MC1R	G/A	130**	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
	3	rs885479	MC1R	G/A*	130**	GA	GA	GG	GG	GA	AA	GA	GG	GA	GG
	4	rs1805008	MC1R	C/T	130**	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	5	rs1805005	MC1R	G/T	58	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GT	GG	GG
	6	rs1805006	MC1R	C/A	92***	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	7	rs1805007	MC1R	C/T	130**	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	8	rs1805009	MC1R	G/C	103	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
	9	rs201326893	MC1R	C/A	130**	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	10	rs2228479	MC1R	G/A	92***	GA	GA	GA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
	11	rs1110400	MC1R	T/C	130**	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
	12	rs28777	SLC45A2	A/C	77	AC	AC	AA	AA	AC	AC	AC	AC	AC	AC
	13	rs16891982	SLC45A2	G/C	57	CC	CC	GG	GG	GC	CC	GC	GC	CC	CC
	14	rs12821256	KITLG	T/C*	98	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
	15	rs4959270	LOC105374875	C/A	85	CA	CA	CC	CC	CA	CA	AA	CC	CA	CA
	16	rs12203592	IRF4	C/T	90	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	17	rs1042602	TYR	C/A*	73	CA	CA	AA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA
	18	rs1800407	OCA2	C/T*	79	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC
	19	rs2402130	SLC24A4	A/G	66	AA	AA	AA	AA	GG	AA	AA	AA	AA	AA
	20	rs12913832	HERC2	G/A*	59	AA	GA	AA	GG	GA	GA	GA	GG	AA	GA
	21	rs2378249	PIGU	A/G*	60	AA	AG	AA	AG	AA	AA	AA	AA	AA	AG
	22	rs12896399	LOC105370627	G/T	70	GT	GG	GG	GG	GG	GT	TT	GG	GT	GG
	23	rs1393350	TYR	G/A*	85	GA	GA	GG	GG	GG	GG	GA	GA	GG	GG
	24	rs683	TYRP1	A/C*	97	CC	AC	AC	AA	AC	AC	CC	AC	AC	CC
	25	rs3114908	ANKRD11	C/T	49	CT	CC	CT	CC	TT	CC	CT	CC	CT	CT
	26	rs1800414	OCA2	T/C	53	TT	TT	TT	TT	TT	TC	TT	TT	TC	TT
	27	rs10756819	BNC2	A/G	87	AA	AG	GG	AG	AA	AG	AG	AG	AG	AG
	28	rs2238289	HERC2	A/G*	105	AG	AG	AG	AA	AA	AG	AG	AA	AA	AA
	29	rs17128291	SLC24A4	A/G*	78	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AG
	30	rs6497292	HERC2	A/G*	58	AA	AG	AG	AA	AA	AG	AG	AA	AA	AA
	31	rs1129038	HERC2	T/C*	74	CC	TC	CC	TT	TC	TC	TC	TT	CC	TC

Таблица 1. Продолжение

Признак	№	SNP	Ген, гаплогруппа	Аллель	Ампликон, п.н.	67	166	457	531	619	656	1251	1564	1566	1986
Группа крови	32	rs1667394	HERC2	T/C	65	CC	TC	TC	TT	TT	TC	TC	TT	TT	TT
	33	rs1126809	TYR	G/A	76	GA	GG	GG	GG	GG	GG	AA	GA	GA	GG
	34	rs1470608	OCA2	C/T*	90	GT	GT	GG	GG	GT	GT	GT	GG	TT	GG
	35	rs1426654	SLC24A5	A/G	70	AA	AG	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AG
	36	rs6119471	ASIP	C/G	76	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	37	rs1545397	OCA2	A/T	138	AT	AT	AA	AT	AT	AT	AA	AA	TT	AT
	38	rs6059655	RALY	G/A*	61	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
	39	rs12441727	OCA2	G/A	63	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GA	GG	AA	GG
	40	rs3212355	MC1R	C/T*	63	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	41	rs8051733	DEF8	A/G*	68	AG	AG	AG	GG	AA	AG	AG	AG	AA	AA
Пол	42	rs8176719	ABO (6 ex)	G/D	130	DD	GD	G-	G-	DD	GD	DD	DD	GD	DD
	43	rs8176720	ABO (6 ex)	A/G		AG	AA	A-	AG	AA	AA	AG	GG	AA	GG
	44	rs8176742	ABO (7 ex)	G/A	83	GA	GG	GA	GG	GG	GG	GA	AA	GG	AA
	45	rs8176741	ABO (7 ex)	C/T		CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC
	46	—	AMELX/Y	—	66/70	XY	XX	XY	XY	XY	XY	XY	XY	XY	XY
Гаплогруппы Y-хромосомы	47	rs2032623	B (M60)	D/I	74	D		D	D	D	D	D	D	D	D
	48	rs35284970	C (M130)	C/T	83	C		C	C	C	T	C	T	C	C
	49	rs202084622	D (CTS3946)	G/A	71	G		G	G	G	G	G	G	G	G
	50	rs9786534	E (M5388)	A/T	86	A		A	A	A	A	A	A	A	A
	51	rs2740980	G (P257)	G/A	68	G		A	G	G	G	G	G	G	G
	52	rs576940616	H (M2920)	G/T	84	G		G	G	G	G	G	G	G	G
	53	rs2319818	I (U179)	G/A	117	G		G	G	G	G	G	G	G	G
	54	rs13447352	J (M304)	A/C	73	A		A	A	A	A	A	A	A	A
	55	rs2032607	L (M185)	C/T	85	C		C	C	C	C	C	C	C	C
	56	rs9341278	N (M231)	G/A	86	G		G	G	G	G	G	G	A	G
	57	rs2032678	O (M175)	I/D	83	I		I	I	I	I	I	I	I	I
	58	rs563604826	Q (M1105)	G/A	69	G		G	G	A	G	G	G	G	G
	59	rs17307398	R (P224)	C/T	65	T		T	T	C	C	T	C	C	T
	60	rs9341308	T (M272)	A/G	60	A		A	A	A	A	A	A	A	A

* В оригинальной панели Hgr1Plex-S номенклатура аллелей соответствует противоположной цепи ДНК.

** Эти шесть позиций амплифицируются с общей пары праймеров и находятся внутри одного ПЦР-продукта, длиной 130 п.н.

*** Эти две позиции амплифицируются с общей пары праймеров и находятся внутри одного ПЦР-продукта, длиной 92 п.н. Обозначения: I — инсерция, D — делеция.

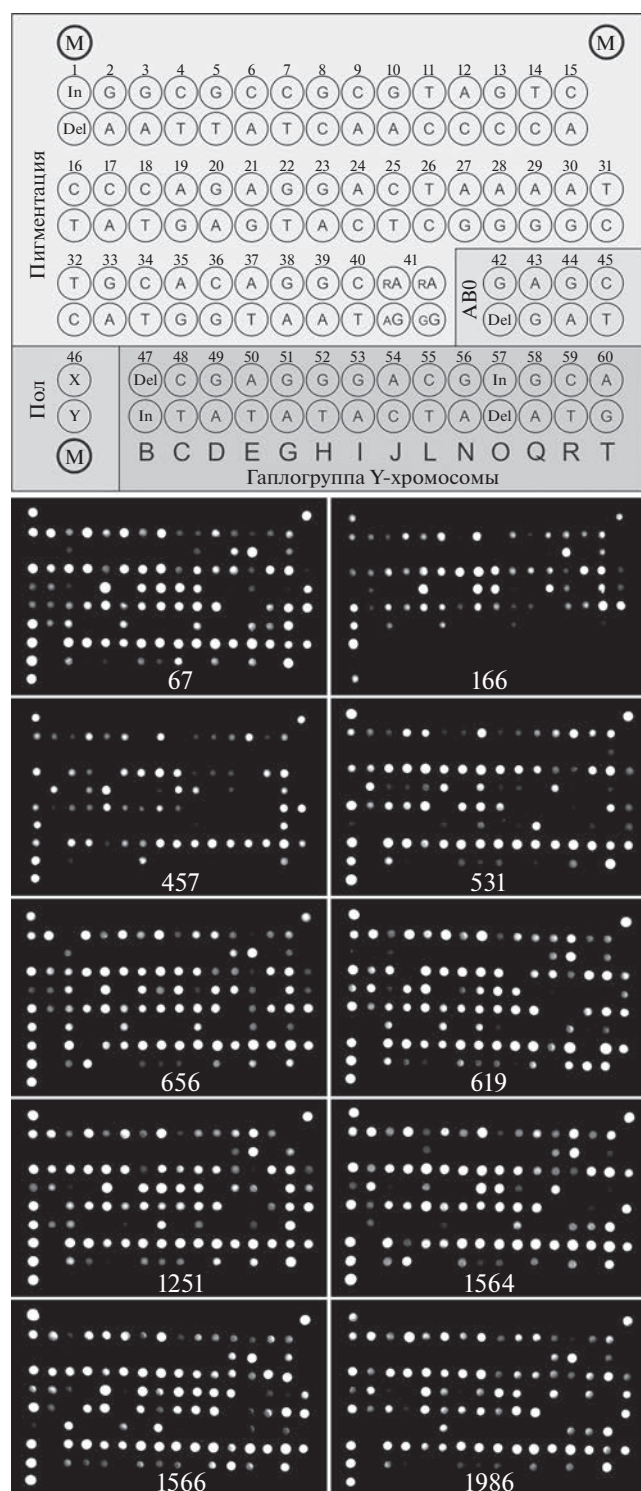


Рис. 1. Схема расположения ДНК-зондов на биологическом микрочипе PhenotypeExpert (вверху). Цифры над каждой парой ячеек соответствуют номеру полиморфизма из табл. 1. Обозначения внутри ячеек соответствуют аллелям для позиционирования матрицы анализатором при автоматическом обсчете сигналов ячеек. В нижней части рисунка приведены результаты генотипирования образцов ДНК из элитных погребений хазарского времени.

в диапазоне 0.1–1 мкл на реакцию. Эта тактика позволила найти оптимум, обеспечивающий получение наиболее полного профиля для каждого из указанных четырех образцов. На рис. 1 приведена схема биочипа Phenotype Expert (“Центр исследования ДНК”) и наилучшие изображения, полученные в экспериментах с оптимальным объемом каждого из 10 образцов.

Полученные результаты подтверждают, что успешность генотипирования таких сложных объектов, как древние костные останки, зависит от концентрации выделенной ДНК, степени ее деградации и присутствия ингибиторов ПЦР в образце. В отсутствие ингибиторов для получения более полного профиля очевидной рекомендацией является увеличение объема образца водного раствора ДНК в ПЦР-смеси. Однако в образцах, содержащих ингибиторы ПЦР, применение этой тактики сдерживается негативным влиянием ингибиторов.

Указанные проблемы делают крайне сложным получение в одном эксперименте полного генетического профиля по всем 60 маркерам. В разных экспериментах мы наблюдали выпадение отдельных локусов и потерю аллелей, однако примененный подход позволил собрать из серии экспериментов полный профиль каждого образца. Сводные результаты генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов 10 скелетов из подкурганных могильников хазарского времени, расположенных на территории Ростовской области, приведены в табл. 1. Получены полные генетические профили всех 10 образцов по исследуемым полиморфизмам, за исключением экзона 6 гена AB0, где произошло выпадение в образце № 457. Однако группу крови удалось установить по частичному генотипу: A (II), аллели A/0^{lv}.

ДНК-фенотипирование и Y-гаплогруппы

Методика ДНК-фенотипирования, использованная нами, позволила дополнить малочисленные и отрывочные сведения о внешнем облике представителей Хазарского каганата конца VII–начала IX веков. Так, фенотипы костных останков по признакам цвета глаз, волос, кожи, группы крови AB0, пола и базовых гаплогрупп Y-хромосомы, полученные при помощи набора реагентов Phenotype Expert (“Центр исследования ДНК”), представлены в табл. 2.

По признаку вероятный цвет глаз установлено, что представители хазарской культуры из погребений №№ 67, 166, 457, 619, 656, 1251, 1566, 1986 имели карий тип градации цвета глаз. Индивиды из погребений №№ 531, 1564 имели серо-голубую градацию цвета глаз.

Таблица 2. Результаты ДНК-фенотипирования костных останков из элитных воинских погребений Хазарского каганата VII—IX вв.

Признак	Скелет, номер									
	67	166	457	531	619	656	1251	1564	1566	1986
Вероятный цвет глаз	Карий	Карий	Карий	Серо-голубой	Карий	Карий	Карий	Серо-голубой	Карий	Карий
Серо-голубой	0.000	0.003	0.000	0.848	0.012	0.021	0.077	0.726	0.000	0.003
Смешанный (болотный, зеленый)	0.003	0.020	0.013	0.088	0.050	0.066	0.091	0.109	0.003	0.020
Карий	0.997	0.977	0.986	0.065	0.938	0.913	0.832	0.165	0.997	0.977
Вероятный цвет волос	Брюнет (черные)	Брюнет (черные)	Шатен/брюнет	Блондин	Шатен/брюнет	Брюнет (черные)	Шатен/брюнет	Шатен	Брюнет (черные)	Шатен/брюнет
Блондин (светлые, желтые)	0.002	0.014	0.104	0.675	0.047	0.013	0.073	0.250	0.003	0.021
Шатен (каштановые, темно-русые)	0.138	0.319	0.559	0.296	0.576	0.276	0.542	0.655	0.220	0.550
Рыжий	0.000	0.000	0.001	0.005	0.000	0.000	0.000	0.004	0.000	0.000
Брюнет (черные)	0.860	0.667	0.336	0.024	0.376	0.711	0.384	0.092	0.777	0.428
Светлые	0.006	0.048	0.220	0.944	0.113	0.078	0.204	0.724	0.010	0.058
Темные	0.994	0.952	0.780	0.056	0.887	0.922	0.796	0.276	0.990	0.942
Вероятный цвет кожи	Смуглая — в темный	Темная	Смуглая	Между светлым и смуглым	Смуглая	Между светлым и смуглым	Смуглая	Смуглая	Смуглая	Темная
Очень бледная	0.017	0.000	0.004	0.018	0.016	0.062	0.118	0.037	0.088	0.000
Светлая	0.047	0.000	0.260	0.582	0.108	0.225	0.177	0.300	0.052	0.000
Смуглая	0.733	0.620	0.698	0.398	0.785	0.713	0.592	0.629	0.828	0.162
Темная	0.200	0.045	0.037	0.001	0.089	0.000	0.094	0.032	0.032	0.833
Черная	0.003	0.335	0.001	0.000	0.002	0.000	0.018	0.001	0.000	0.005
Группа крови	0 (I)	A (II)	A (II)	B (III)	0 (I)	A (II)	0 (I)	0 (I)	A (II)	0 (I)
Генотип	0 ^I /0 ^{Iv}	A/0 ^I	A/0 ^{Iv}	B/0 ²	0 ^I /0 ^I	A/0 ^I	0 ^I /0 ^{Iv}	0 ^{Iv} /0 ^{Iv}	A/0 ^I	0 ^{Iv} /0 ^{Iv}
Пол	М	Ж	М	М	М	М	М	М	М	М
Ганлогруппа Y-хромосомы	R(P224)	—	G (P257)	R(P224)	Q(M1105)	C(M130)	R(P224)	C(M130)	N(M231)	R(P224)

Скелеты под №№ 67, 166, 656, 1566 имели одинаковую градацию цвета волос — брюнет (черные). Скелеты №№ 457, 619, 1251, 1564, 1986 по градации цвета волос определены как темно-каштановые/брюнеты. Установлено, что № 531, вероятно, был блондином.

По признаку вероятный цвет кожи пять представителей хазар, а именно №№ 457, 619, 1251, 1564, 1566, имели смуглый тип кожи. Индивид № 67 имел признаки перехода из смуглого в темный цвет кожи. У №№ 166, 1986 был темный тип градации цвета кожи, а у №№ 531, 656 — между светлым и смуглым.

Наиболее распространенной была группа крови 0 (I). Этот вариант встречался у пяти индивидов №№ 67, 619, 1251, 1564, 1986. Второй по распространенности стала группа А (II). Эту группу имели скелеты №№ 166, 457, 656, 1566. И в образце №531 установлена группа В (III) с достаточно редким генотипом В/О².

Определена принадлежность мужских скелетов к одной из 14 базовых гаплогрупп Y-хромосомы человека: наиболее частой была Y-гаплогруппа R (P224) — №№ 67, 531, 1251, 1986. Дважды выявлена гаплогруппа С (M130) — №№ 656, 1564. Скелет из погребения № 457 имел гаплогруппу G (P257), а №№ 619 и 1566 — Y-гаплогруппы Q (M1105) и N (M231) соответственно.

Полученные нами результаты полностью согласуются с данными предыдущих исследований Y-гаплогрупп этих же костных останков хазар из элитных воинских погребений по STR-локусам, расположенным на Y-хромосоме [5].

Популяционно-специфичные маркеры

Сравнение частот генотипов полиморфизмов панели HirisPlex-S в макропопуляциях (по данным 1000 Genomes Project) позволило выделить 10 SNP, в той или иной степени обладающих популяционной специфичностью. Это позволяет дать дополнительную оценку популяционному разнообразию исследуемых останков. Значения частот аллелей, имеющиеся в нашем распоряжении, относятся к современным популяциям, поэтому некорректно применять их к оценке популяционной принадлежности носителей древней ДНК. Тем не менее, опираясь на эту информацию, можно оценить степень гетерогенности этногеографического происхождения представителей кочевой элиты Хазарского каганата.

Для оценки схожести образца с одной из современных макропопуляций генотипы по 10 упомянутым полиморфизмам сведены в табл. 3 и сопоставлены с данными по африканской (AFR), восточно-

азиатской (EAS), европейской (EUR), южно-азиатской (SAS) популяциям, а также по славянам Центральной России (RU) [19]. В табл. 3 различные генотипы каждого из образцов расположены в одной строке с частотами генотипов в популяциях сравнения (AFR, EAS, EUR, SAS и RU).

Количественные характеристики получали с использованием произведения частот генотипов по всем 10 SNP в каждой популяции; для всех образцов получены значения, позволяющие сравнить их с соответствующими макропопуляциями, а также с современной славянской популяцией (табл. 4). Если генотип в макропопуляции не встречался (по данным исследования 1000 Genomes Project), то за его частоту принимали не 0, а 0.001, чтобы умножением на ноль не утратить информацию по всей совокупности этноспецифичных полиморфизмов.

Полученные результаты следует интерпретировать с осторожностью, учитывая не только временной разрыв (более 1000 лет) между сравниваемыми популяциями, но и ограниченную репрезентативность выборок, обозначенных AFR, EAS, EUR и SAS. Тем не менее, приведенные в табл. 4 результаты с определенностью констатируют выраженную неоднородность геногеографического происхождения исследованных хазар по аутосомным маркерам.

Ниже представлены данные ДНК-фенотипирования образцов и их сравнение с краниологическими описаниями [4] и данными о гаплогруппе, полученными ранее методом предикции, исходя из STR-профиля Y-хромосомы (приведены в скобках в следующем порядке: (YHRD/ NEV-GEN/SNaPshot)) [5].

Образец № 67. Кареглазый брюнет со смуглой (ближе к темной) кожей, гаплогруппа R (R1b/R1b/R1b), череп монголоидного типа.

Образец № 166. Кареглазая брюнетка с темной кожей, череп в скелете отсутствовал.

Образец № 457. Кареглазый мужчина с черными либо темно-каштановыми волосами и смуглой кожей, гаплогруппа G (G2a/G2a2/—), череп предположительно монголоидного типа.

Образец № 531. Мужчина с серо-голубыми глазами, светлыми волосами, кожей светло-смуглого оттенка, гаплогруппа R (R1a/R1a/R1a), европеоидный тип черепа.

Образец № 619. Кареглазый мужчина с черными либо темно-каштановыми волосами и смуглой кожей, гаплогруппа Q (Q/Q/Q), череп монголоидного типа.

Таблица 3. Генотипирование образцов ДНК хазар по полиморфизмам, обладающим популяционной специфичностью в российской и четырех основных макропопуляциях

№	Ген, полиморфизм	Генотип	Частота генотипа в популяции					Результаты генотипирования									
			RU	AFR	EAS	EUR	SAS	67	166	457	531	619	656	1251	1564	1566	1986
12	SLC45A2 rs28777 A>C	AA	0.891	0.047	0.012	0.917	0.051			AA	AC		AA	AC	AC	AC	AC
		AC	0.106	0.297	0.21	0.08	0.344	AC	AC								
		CC	0.003	0.657	0.778	0.004	0.605										
13	SLC45A2 rs16891982 G>C	GG	0.876	0.005	0*	0.885	0.006			GG			GG				
		GC	0.120	0.062	0.012	0.107	0.106	CC	CC				GC	GC	CC	CC	
		CC	0.004	0.933	0.988	0.008	0.888										
20	HERC2 rs12913832 G>A	GG	0.589	0.003	0*	0.451	0.004			GG			GG	GA	GG		GA
		GA	0.357	0.05	0.004	0.37	0.133	AA	GA	AA	GA	GA		AA			
		AA	0.054	0.947	0.996	0.179	0.863										
23	TYR rs1393350 G>A	GG	0.611	0.853	0.994	0.559	0.894			GG			GG	GG	GA		GG
		GA	0.341	0.135	0.006	0.396	0.104	GA	GG	GG			GA	GA			
		AA	0.048	0.012	0*	0.046	0.002										
24	TYRPI rs683 C>A	CC	0.345	0.787	0.978	0.159	0.642	CC			AC	AC		AC	AC		CC
		AC	0.485	0.203	0.022	0.427	0.297										
		AA	0.170	0.011	0*	0.414	0.061			AA	TT	TT	TC	TT	TT	TC	TT
26	OCA2 rs1800414 T>C	TT	0.985	0.998	0.149	1	0.992	TT					TT	TT	TT		TT
		TC	0.015	0.002	0.51	0*	0.008										
		CC	0.000	0*	0.341	0*	0*										
31	HERC2 rs1129038 T>C	TT	0.589	0.003	0	0.447	0.004			TT			TT	TC	TC		TC
		TC	0.357	0.05	0.002	0.376	0.131	CC	TC	CC							
		CC	0.054	0.947	0.998	0.177	0.865										
33	TYR rs1126809 G>A	GG	0.590	0.985	0.998	0.545	0.896			GG			GG	GG	GA		GG
		GA	0.356	0.012	0.002	0.406	0.1	GA	GG	GG				AA	GA		
		AA	0.054	0.003	0*	0.05	0.004										
35	SLC24A5 rs1426654 A>G	AA	0.996	0.008	0*	0.994	0.507	AA		AA			AA	AA	AA		AG
		AG	0.004	0.133	0.024	0.006	0.356		AG	AA							
		GG	0*	0.859	0.976	0*	0.137										
37	OCA2 rs1545397 A>T	AA	0.790	0.971	0.01	0.851	0.783	AT		AA	AT	AT	AA	AA	AA		AT
		AT	0.198	0.027	0.214	0.143	0.198		AT	AT	AT	AT	AA	AA	TT		AT
		TT	0.012	0.002	0.776	0.006	0.018										

*При вычислении произведенный частот, приведенных в табл. 4, вместо 0 использовали значения 0.001.

Таблица 4. Оценка гетерогенности геногеографического происхождения хазар путем сопоставления с современными макропопуляциями, а также со славянской популяцией преимущественно из центральной России

Скелет, №	RU	AFR	EAS	EUR	SAS
67	1.01×10^{-8}	6.83×10^{-8}	7.72×10^{-11}	7.37×10^{-8}	1.52×10^{-4}
166	7.37×10^{-9}	4.23×10^{-7}	2.77×10^{-11}	9.94×10^{-9}	8.85×10^{-5}
457	3.08×10^{-4}	2.79×10^{-7}	3.88×10^{-13}	2.83×10^{-3}	2.14×10^{-5}
531	3.22×10^{-3}	4.21×10^{-15}	3.80×10^{-19}	2.93×10^{-3}	2.38×10^{-11}
619	5.51×10^{-5}	1.69×10^{-9}	1.40×10^{-14}	2.20×10^{-5}	1.51×10^{-5}
656	2.79×10^{-8}	5.10×10^{-11}	3.95×10^{-12}	1.65×10^{-9}	1.02×10^{-6}
1251	7.98×10^{-6}	1.14×10^{-10}	1.76×10^{-19}	3.17×10^{-6}	6.68×10^{-8}
1564	2.01×10^{-4}	4.23×10^{-13}	4.96×10^{-22}	1.00×10^{-4}	7.10×10^{-10}
1566	2.34×10^{-11}	1.65×10^{-11}	1.78×10^{-9}	1.17×10^{-11}	4.42×10^{-7}
1986	5.24×10^{-9}	1.64×10^{-6}	1.23×10^{-9}	3.70×10^{-9}	1.91×10^{-4}

Примечание. Жирным шрифтом выделены наибольшие значения произведения частот, характеризующие максимальную близость к соответствующей современной популяции.

Образец № 656. Кареглазый черноволосый мужчина со светло-смуглой кожей, гаплогруппа C (C3/C2b1a1b1/—), европеоидный тип черепа.

Образец № 1251. Кареглазый мужчина с черными, либо темно-каштановыми волосами и смуглой кожей, гаплогруппа R (R1a/R1a/R1a), череп в скелете отсутствовал.

Образец № 1564. Мужчина с серо-голубыми глазами, черными либо темно-каштановыми волосами и смуглой кожей, гаплогруппа C (C3/C2b1a1b1/—), европеоидный тип черепа.

Образец № 1566. Кареглазый черноволосый мужчина со смуглой кожей, гаплогруппа N (N/N1a1/N), череп в скелете отсутствовал.

Образец № 1986. Кареглазый мужчина с темными либо темно-каштановыми волосами и темной кожей, гаплогруппа R (R1a/R1a/R1a), скелет имеет смешанные черты монголоидного и европеоидного типа.

На данном этапе исследования выделяется скелет № 531, вероятно, с серо-голубыми глазами и светло-смуглой кожей, имеющий Y-гаплогруппу R (P224). Стоит отметить, что другие хазарские воины — представители этой гаплогруппы — имели преимущественно смуглую кожу, темные глаза и волосы, это еще раз подтверждает, что Y-гаплогруппа не определяет фенотип.

Таким образом, данные для восьми фенотипов из 10 не вызывают никакого удивления. Темные волосы и темные глаза в обществе с большой примесью монголоидной расы — это ожидаемая позиция. При анализе обращают на себя внимание погребения № 531 и 1564, в которых погребены люди с серо-голубыми глазами, а № 531 — и со светлыми волосами. Это погребения с подкуржан-

ными ровиками, которые по признакам погребального обряда не выделяются из остальных. Такие результаты заставляют нас с осторожностью отнестись к версиям о прямой корреляции между погребальным обрядом, этничностью погребенного и его расовым происхождением.

Полученные данные являются важным свидетельством этнокультурного и генетического разнообразия представителей Хазарского каганата, которое обуславливает их фенотипическое различие. Но при этом основная часть выборки — 8 из 10 — это люди с темными волосами и глазами, что вполне соотносится с информацией антропологов о монголоидной значительной части номадов этого времени. Настоящая работа дополняет малочисленные исторические письменные и художественные источники, посвященные Хазарскому каганату VII–IX веков.

Пробоподготовка древних костей выполнена в рамках реализации госзадания ЮНЦ РАН (№ гр. проекта 122011900166-9); выделение и количественная оценка препаратов древней ДНК выполнены при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 22-28-02000 “Комплексное историко-культурное и молекулярно-генетическое исследование древнего населения Нижнего Подонья в сарматское время”).

Все процедуры, выполненные в исследовании, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глебов В.П., Иванов А.А. (2007) Кочевническое погребение хазарского времени из курганного могильника Таловый П. В: *Средневековые древности Дона: Материалы и исследования по археологии Дона*. вып. 2. Москва/Иерусалим: Мосты культуры/Гешарим. 154–176.
2. Плетнева С.А. (1976) *Хазары*. Москва: Наука.
3. Батиева Е.Ф. (2007) Антропология погребения хазарского времени из могильника Таловый П. в *Средневековые древности Дона: Материалы и исследования по археологии Дона*. вып. 2. Москва/Иерусалим: Мосты культуры/Гешарим. 177–182.
4. Батиева Е.Ф. (2002) Антропология населения Нижнего Подонья в хазарское время. *Донская археология*. 3–4, 71–101.
5. Корниенко И.В., Фалеева Т.Г., Шурр Т.Г., Арамова О.Ю., Очир-Горяева М.А., Батиева Е.Ф., Вдовченков Е.В., Мошков Н.Е., Куканова В.В., Иванов И.Н., Сидоренко Ю.С., Татаринова Т.В. (2021) Y-гаплогруппы костных останков из курганных погребений хазарского времени на территории Юга России. *Генетика*. 57(4), 464–477.
6. Гинзбург В.В. (1946) Антропологические данные по этногенезу хазар. *Советская этнография*. 2, 81–86.
7. Балабанова М.А. (2006) Особенности антропологического состава погребальных комплексов хазарского времени. В кн.: *Некоторые актуальные проблемы современной антропологии*. Санкт-Петербург: МАЭ РАН, 59–61.
8. Балабанова М.А. (2013) Антропологическая структура населения хазарского времени восточноевропейских степей. В кн.: *Население Юга России с древнейших времен до наших дней (Донские антропологические чтения)*. Ростов-на-Дону, 76–79.
9. Chaitanya L., Breslin K., Zuñiga S., Wirken L., Pośpiech E., Kukla-Bartoszek M., Sijen T., de Knijff P., Liu F., Branicki W., Kayser M., Walsh S. (2018) The HIrisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. *Forensic Sci. Int.: Gen.* 35, 123–135.
10. Walsh S., Chaitanya L., Breslin K., Muralidharan C., Bronikowska A., Pospiech E., Koller J., Kovatsi L., Wollstein A., Branicki W., Liu F., Kayser M. (2017) Global skin colour prediction from DNA. *Hum. Genet.* 136(7), 847–863.
11. Walsh S., Chaitanya L., Clarisse L., Wirken L., Draus-Barini J., Kovatsi L., Maeda H., Ishikawa T., Sijen T., de Knijff P., Branicki W., Liu F., Kayser M. (2014) Developmental validation of the HIrisPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 9, 150–161.
12. Афанасьев Г.Е. (2016) О территории Хазарского каганата и хазарского “домена” в IX веке. В кн.: *Дивногогорский сборник*. Вып. 6. Воронеж. 41–72.
13. Афанасьев Г.Е., Атавин А.Г. (2002) Что же такое хазарский погребальный обряд? (Проблемы материала, археологического анализа и интерпретации). В: *Хазары: тезисы Второго Междунар. colloквиума*. Москва, 11–14.
14. Илюков Л.С. (1983) *Отчет об исследовании курганного могильника у х. Нового Мартыновского района Ростовской области в 1982 году*. Археол. лаб. РГУ. Ф-10, д-1.
15. Корниенко И.В., Харламов С.Г. (2012) Методы исследования ДНК человека: выделение ДНК и ее количественная оценка в аспекте судебно-медицинского исследования вещественных доказательств биологического происхождения. *Учебно-методическое пособие*. Ростов-на-Дону: Изд-во Южного Фед. ун-та, 214 с.
16. Корниенко И.В., Фалеева Т.Г., Махоткин М.А., Андриянов А.И., Арамова О.Ю. (2019) Инновационный метод выделения древней ДНК. *Материалы Международной научной конференции “Азак и мир вокруг него”*. Азов: Изд-во Азовского музея заповедника, 268–271.
17. Арамова О.Ю., Фалеева Т.Г., Махоткин М.А., Андриянов А.И., Корниенко И.В. (2019) Инновационная методика деконтаминации археологического биологического материала. *Материалы VIII научно-практической конференции с международным участием “Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции”*. Ростов-на-Дону, 89–90.
18. Корниенко И.В., Фалеева Т.Г., Арамова О.Ю. (2021) Заявка на патент № 2021129837/04(063279). *Композиция для удаления ДНК и/или РНК-содержащего биологического материала (варианты)*; заявл. 11.10.2021.
19. Фесенко Д.О., Ивановский Д.И., Иванов П.Л., Земскова Е.Ю., Агапитова А.С., Поляков С.А., Фесенко О.Е., Филиппова М.А., Заседателев А.С. (2022) Биочип для генотипирования полиморфизмов, ассоциированных с цветом глаз, волос, кожи, группой крови, половой принадлежностью, основной гаплогруппой Y-хромосомы, и его использование для исследования славянской популяции. *Молекуляр. биология*. 56(5), 860–880.
20. Fesenko D.O., Chudinov A.V., Surzhikov S.A., Zasedatelev A.S. (2016) Biochip-based genotyping assay for detection of polymorphisms in pigmentation genes associated with cutaneous melanoma. *Genet. Test. Mol. Biomarkers*. 20(4), 208–212.
21. Фесенко Д.О., Гусейнов Т.О., Лапа С.А., Кузнецова В.Е., Шершов В.Е., Спицын М.А., Наседкина Т.В., Заседателев А.С., Чудинов А.В. (2018) Исследование субстратных свойств новых флуоресцентно-меченных трифосфатов дезоксицитидина для ферментативного синтеза ДНК полимерами семейств A и B. *Молекуляр. биология*. 52(3), 533–542.
22. Fesenko D.O., Chudinov A.V., Surzhikov S.A., Nasedkina T.V., Zasedatelev A.S. (2014) Biochip for genotyping SNPs defining core Y-chromosome haplogroups in Russian population groups. *BioChip J.* 8(3), 171–178.

DNA-Phenotyping of Remains from Elite Burials in the South of Russia in the Khazar Period

D. O. Fesenko¹, O. Yu. Aramova^{2, 3}, E. V. Vdovchenkov³, I. D. Ivanovsky⁴, O. E. Fesenko⁵,
S. A. Polyakov¹, T. G. Faleeva^{6, 7}, M. A. Filippova¹, V. S. Florinskaya³, and I. V. Kornienko^{2, 3, *}

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

²*Federal Research Center The Southern Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
Rostov-on-Don, 344006 Russia*

³*Southern Federal University, Academy of Biology and Biotechnology named after D.I. Ivanovsky,
Rostov-on-Don, 344090 Russia*

⁴*DNA Research Center, LLC, Hkimki, 141402 Russia*

⁵*Southern Federal University, Research Institute of Physics, Rostov-on-Don, 344090 Russia*

⁶*St. Petersburg State Budgetary Institution of Health Care "Bureau of Forensic Medical Examination",
St. Petersburg, 195067 Russia*

⁷*North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, 191015 Russia*

**e-mail: ikornienko@yandex.ru*

The study of the past through the analysis of ancient DNA allows us to solve scientific problems related to the genogeographic origin and patterns of population migration. The Khazar Khaganate is a subject of controversy among scientists in various fields of science: its complex historical formation, the lack of a sufficient number of artistic and written sources, together with the disappearance of representatives of the Khazar culture, leaves open the question of the appearance of the Khazars. In this work, DNA-phenotyping of bone remains from the elite burials of the South of Russia of the Khazar period was carried out on the basis of the color of eyes, hair, skin, and blood groups according to the AB0 system. It was established that 8 out of 10 buried had brown eyes, dark hair (to varying degrees), and predominantly dark skin during their lifetime. People from two burials had gray-blue eyes, and one person had blond hair. In 8 individuals, the most probable blood type was established according to the AB0 system: 5 people had 0 (I) group, 4 people had A (II) group and one B (III). Assessment of allele distribution of ten autosomal markers with population specificity indicates high heterogeneity of ethnogeographic origin of the studied Khazars. The obtained results are evidence of the ethnocultural, genetic and phenotypic diversity of the Khazar Khaganate.

Keywords: Khazars, burial mounds, ancient DNA, DNA-phenotyping, biochip, AB0 blood group, Y-chromosome haplogroup

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 579.22:57.086.3

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ ГРУППЫ *Bacillus cereus*
И ИХ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДАМИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ
И ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ¹

© 2023 г. Т. А. Смирнова^a, Н. Б. Поляков^{a, b, *}, Д. С. Карпов^c, А. И. Соловьев^a, Н. В. Шевлягина^a,
С. Г. Андреевская^a, Д. Н. Щербинин^a, З. С. Плиева^a, В. А. Козлова^a, А. А. Переборова^a,
И. А. Богданов^{a, d}, Д. А. Грумов^a, М. В. Зубашева^a, С. В. Поддубко^e,
А. А. Гречников^b, М. А. Сухина^f, В. Г. Жуховицкий^{a, g}

^aНациональный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи
Минздрава России, Москва, 123098 Россия

^bИнститут геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского Российской академии наук,
Москва, 119334 Россия

^cЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины,
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^dООО “Нанопромимпорт”, Научный парк Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119234 Россия

^eИнститут медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, 123007 Россия

^fНациональный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н. Рыжих
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123423 Россия

^gРоссийская медицинская академия непрерывного профессионального образования (РМАНПО)
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125993 Россия

*e-mail: polyakovnb@gmail.com

Поступила в редакцию 14.11.2022 г.

После доработки 23.12.2022 г.

Принята к публикации 30.12.2022 г.

Bacillus cereus — спорообразующая грамположительная, преимущественно почвенная бактерия. Споры *Bacillus* обладают чрезвычайно высокой устойчивостью не только к факторам окружающей среды, но и к различным воздействиям, в том числе к санитарной обработке. Загрязнение оборудования больниц и предприятий пищевой промышленности спорами токсинпродуцирующих штаммов *B. cereus* может представлять серьезную угрозу здоровью человека. Нами изучены два клинических изолята, идентифицированные как *B. cereus* и *B. cytotoxicus*. Показано, что содержание ионов кальция в этих изолятах достоверно ниже, чем у эталонных штаммов. По данным электронной микроскопии один из изолятов (SRCC 19/16) имеет увеличенный экзоспориум, а в изоляте SRCC 1208 при споруляции обнаруживаются крупные электронно-плотные включения неясной природы. Можно предположить, что SRCC 1208 содержит биологически активный компонент, обладающий цитотоксическим эффектом и, возможно, играющий определенную роль в патогенезе заболеваний, вызванных данным микроорганизмом. Проведен сравнительный химический, биохимический, физиологический и ультраструктурный анализ спор клинических изолятов и эталонных штаммов *B. cereus*. Полученные нами результаты углубляют представления о свойствах спор, вносящих вклад в повышенную патогенность представителей группы *B. cereus*.

Ключевые слова: *Bacillus cereus*, *Bacillus cytotoxicus*, спора, электронная микроскопия, масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S0026898423040201, **EDN:** QLYLNQ

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898423040201 для авторизованных пользователей.

Сокращения: MALDI-TOF — времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией и ионизацией (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization—Time of Flight); ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия; СЭМ — сканирующая электронная микроскопия; СЭМ-ЭДР — сканирующая электронная микроскопия—энергодисперсионный рентгеновский анализ; MLSA — многолокусный анализ последовательностей (Multilocus Sequence Analysis); AFLP — анализ длин амплифицированных фрагментов (Amplified Fragment Length Polymorphism).

ВВЕДЕНИЕ

Bacillus cereus — это спорообразующая бактерия, часто встречающаяся в окружающей среде. Попадание *B. cereus* в продукты питания и на медицинское оборудование может приводить к развитию пищевых токсикоинфекций и таких серьезных заболеваний, как пневмония и менингит [1], а также сепсис и бактериемия [2].

Споруляция относится к наиболее важным фазам жизненного цикла спорообразующих бактерий. Эта фаза обычно сопровождается морфологическими и биохимическими изменениями бактериальных клеток. Процесс споруляции состоит из 7–8 стадий и заканчивается выходом спор из материнских клеток. Термостабильность спор и их устойчивость к ультрафиолетовому излучению и бактерицидным средствам может быть причиной заражения пищевых продуктов спорами, что ведет к инфицированию людей и животных. Наибольшую опасность представляет попадание спор в желудочно-кишечный тракт. Благодаря своей толерантности к желудочному содержимому и желчи, споры проходят неповрежденными через желудочно-кишечный тракт в тонкую кишку, где они впоследствии прорастают. Согласно опубликованным данным, вегетативные клетки и споры *B. cereus* прикрепляются к эпителию тонкой кишки с последующей ее колонизацией [3].

Вегетативные клетки *B. cereus* продуцируют гемолитические и негемолитические энтеротоксины, а также термостабильный энтеротоксин, ответственный за возникновение эметического синдрома. Анализ лабораторных штаммов *B. cereus* и изолятов, полученных от больных менингитом, позволил выделить два экотипа: вирулентный и авирулентный [4]. Такие экотипы можно обнаружить и у бацилл, выделенных из других источников.

Важная особенность спор микроорганизмов этой группы, в которую помимо *B. cereus* входят *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, — наличие экзоспориума — мембраны, контактирующей с внешней средой, и отделенной от мембраны споры экзоспориальной областью. Экзоспориум *B. cereus* состоит из базального слоя и наружного “ворсистого” слоя [5–7]. Споры *B. cereus* и *B. thuringiensis* имеют тонкие пилиподобные структуры, похожие на пили грамотрицательных бактерий, которые способствуют адгезии, как показано ранее [8]. Экзоспориум и пилиподобные структуры обеспечивают контакт спор с биологическими и искусственными поверхностями. Споры различных штаммов *B. cereus* характеризуются морфологической гетерогенностью. Анализ спор штаммов *B. cereus*, выделенных от человека с симптомами диареи, позволил предположить, что способность спор загрязнять продукты питания и оборудование пищевой промышленности обусловлены особенностями их поверхности [9].

Однако способность бацилл формировать споры имеет и положительные аспекты. Известно, что бациллы, выделенные из желудочно-кишечного тракта, хорошо приспособлены к выживанию в кишечнике, а значит, их можно рассматривать как потенциальные пробиотики и рекомендовать в качестве кандидатов для создания пероральных вакцин [8]. Именно по этой причине бациллы могут использоваться в фармацевтической промышленности. Способность некоторых штаммов влиять на качество пищевых продуктов предполагает возможность их применения в пищевой промышленности.

Количество видов спорообразующих бактерий, выделяемых из природных источников, постоянно растет. Увеличение числа близкородственных видов в группе *B. cereus* усложняет задачу их идентификации и внутригрупповой дискриминации. Предложен ряд методов, обеспечивающих быструю и относительно точную идентификацию штаммов *B. cereus*. Эти методы можно условно разделить на три группы. К первой группе относятся генетические методы, с помощью которых штаммы идентифицируют на основе нуклеотидных последовательностей локуса рДНК (секвенирование 16S рДНК) [10], отдельных генов [11] или набора генов [12]. Во вторую группу входят протеомные методы, где идентификация бактериальных штаммов основана на информации о белках, и включает вестерн-блот-анализ антигенных белков [13] и времяпролетную масс-спектрометрию с матрично-активированной лазерной десорбцией и ионизацией (MALDI-TOF) [14–16]. К третьей группе относятся классические методы идентификации бактерий по морфологии и структуре поверхности вегетативных клеток и спор с использованием электронной микроскопии, энергодисперсионного рентгеновского анализа и атомно-силовой микроскопии [17].

В настоящей работе для идентификации и характеристики двух новых клинических изолятов *B. cereus* использована комбинация генетических, протеомных, биохимических и микроскопических подходов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы. В экспериментах использовали два эталонных штамма: *B. cereus* ATCC 10876 и *B. cereus* NCTC 8035, и два клинических изолята, обозначенных как SRCC 19/16 и SRCC 1208, выделенных из фекалий пациента с язвенным колитом. Клинические изоляты любезно предоставлены Национальным медицинским исследовательским центром колопроктологии им. А.Н. Рыжих Минздрава России. Штаммы культивировали на агаризованной питательной среде NBY при 28°C в течение 12–96 ч.

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Ген	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'	Ожидаемый размер, п.н.	Источник
<i>sspE</i>	GAGAAAGATGAGTAAAAACAACAA CATTTGTGCTTTGAATGCTAG	71	[18]
<i>sph1</i>	GGACAAAGTCAGCGTGCCGAT GAGCCATGATGTAACAGTCCA	771	Данная работа
<i>motB</i>	GGATCGCCTCGTTGGATGAC TGTGTCTGCATATCCTACCG	582	Данная работа
<i>spoIIAB</i>	TTGGTGCAGTGTTAATCGTTG AGTAGCCCCGCTAGTACTCC	489	Данная работа

Идентификация штаммов *B. cereus* путем секвенирования характеристических генов. ДНК из всех штаммов выделяли с помощью набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (“Promega”, США) в соответствии с инструкциями производителя. Фрагменты ДНК, кодирующие 16S РНК, амплифицировали с использованием вырожденных праймеров 27F 5'-AGAGTTTGTATYMTGGCTCAG-3' и 1492R 5'-TACCTTGTTTAYGACTT-3'. ПЦР проводили в смеси следующего состава: 2 мкл 10× буфера, 1 мкл dNTP (2.5 ммоль), 10 пмоль каждого праймера, 1 у.е. Taq-полимеразы (все “Силекс”, Россия), 1 мкл образца ДНК и деионизированной воды до 20 мкл. Условия ПЦР были следующими: денатурация при 94°C в течение 3 мин; затем 40 циклов: — 94°C — 30 с, 55°C — 30 с и 72°C — 90 с; элонгация — 72°C, 10 мин. Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле (буфер TAE, бромистый этидий (0.5 мкг/мл), 5 В/см² в течение 60 мин), экстрагировали из геля с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (“Qiagen”, США) и секвенировали по методу Сэнгера с использованием праймеров 27F и 1492R.

Близкородственные виды внутри группы *B. cereus* трудно дискриминировать только по 16S рДНК, поэтому для уточнения мы провели, во-первых, анализ длин амплифицированных фрагментов (AFLP) гена *sspE* [18, 19], а, во-вторых, многолокусный анализ последовательностей (MLSA) трех генов — *sph1* [20], *motB* [11, 21] и *spoIIAB* [22]. Структуры используемых в работе праймеров приведены в табл. 1.

Амплифицированные фрагменты анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле, очищали и секвенировали по Сэнгеру. Нуклеотидные последовательности секвенированных фрагментов объединяли в искусственные химерные последовательности и использовали в поиске по базе данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) с использованием алгоритма MegaBlast [23] с параметрами, установленными по умолчанию. Далее строили деревья расстояний на основе парного

выравнивания BLAST с использованием метода Fast-Minimum Evolution.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Споры визуализировали с помощью ТЭМ, используя негативное контрастирование препаратов. Суспензию спор распределяли на медной сетке, покрытой слоем формвара (“Serva”, США), затем окрашивали 1%-ным водным раствором уранилацетата. Для приготовления ультратонких срезов материала суспензию бактерий погружали в фиксатор, приготовленный по методу Ито–Карновского [24]. Затем материал фиксировали последовательно в 1%-ном водном растворе OsO₄ и в 1%-ном растворе уранилацетата на 0.2 М малеатном буфере pH 6. Материал последовательно обезвоживали в растворах 50, 70, 96 и 100%-ного этанола. Обезвоженный материал помещали в смесь 100%-ного этанола и смолы LR White, затем в чистую смолу LR White. Далее материал помещали в желатиновые капсулы со смолой и инкубировали в термостате при 56°C.

Ультратонкие срезы получали с помощью ультратома LKB III (“LKB Bromma”, Швеция). Срезы контрастировали 1%-ным уранилацетатом в 70%-ном этаноле и 0.3%-ным цитратом свинца и анализировали на просвечивающих электронных микроскопах JEM-100B (“Jeol”, Япония), LEO 912 AB OMEGA (“Carl Zeiss”, Германия) при ускоряющем напряжении 80 кВ и JEM 2100 (“Jeol”) при ускоряющем напряжении 200 кВ.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Перед исследованием на двухлучевом электронно-ионном сканирующем микроскопе Quanta 200 3D (“FEI Company”, США) клетки и споры *B. cereus* трижды отмывали от культуральной среды стерильной водой и фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине. Образцы отмываемых клеток и/или спор наносили на кремниевые подложки, которые закрепляли на алюминиевых столиках с помощью двусторонней углеродной клейкой ленты и напыляли золотом (толщина слоя золота 5 нм) в установке SPI-MODULE Sputter Coater (“SPI

Supplies”, США). СЭМ проводили в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ.

Сканирующая электронная микроскопия – энергодисперсионный рентгеновский анализ (СЭМ-ЭДР). Для изучения элементного состава спор *B. cereus* образцы промывали в стерильной воде и фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, после чего наносили на медные сетки с 300 ячейками (“SPI Supplies”) и на алюминиевые подложки. ЭДР-анализ проводили на двухлучевом электронно-ионном сканирующем микроскопе Quanta 200 3D, сопряженном с прибором EDAX Genesis XM4 с EDX-детектором (“EDAX”, США), в режиме низкого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ. EDX-анализ проводили в 20 точках в течение 100 с. Данные регистрировали с использованием программного обеспечения EDAX Genesis (версия v.5.21) со следующими параметрами: частота измерений 1500–2000 в секунду, доля времени без измерений 20–40%, размер пятна 5 и рабочее расстояние 15 мм. В полученной спектрограмме удаляли пики меди и алюминия, так как эти элементы детектор улавливал как неспецифический фон с медной решетки и алюминиевых подложек. Дальнейшую обработку данных проводили с использованием Microsoft Office Excel 2007.

Масс-спектрометрия MALDI-TOF. Белки и пептиды экстрагировали, как описано Sauer и соавт. [25], с незначительными модификациями. Отдельные колонии микроорганизмов собирали с поверхности агара пластиковой микробиологической петлей объемом 1 мкл и ресуспендировали в 300 мкл деионизированной воды. К суспензии добавляли 900 мкл 96%-ного этанола, полученную смесь тщательно перемешивали и центрифугировали при 18894 g в течение 2 мин. Супернатант количественно отбирали, осадок подсушивали на воздухе. К высушенному осадку добавляли от 5 до 40 мкл 70%-ной муравьиной кислоты (в зависимости от объема осадка) и равный объем ацетонитрила. Полученную смесь центрифугировали при 18894 g в течение 2 мин. Супернатант, содержащий белковый экстракт, использовали в масс-спектрометрическом анализе.

На 386-луночную стальную мишень (“Bruker Daltonics”, Германия) наносили 1 мкл супернатанта и высушивали при комнатной температуре. На поверхность высушенного экстракта наносили 1 мкл раствора матрицы: насыщенный раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (“Sigma Aldrich”, США), содержащий 50% ацетонитрила и 2.5% трифторуксусной кислоты (“Panreac”, США), и также высушивали при комнатной температуре.

Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе UltrafleXtreme (“Bruker Daltonics”), оснащенный Nd:Yag-лазером (355 нм) в линей-

ном режиме. Детектировали положительно заряженные ионы в диапазоне m/z от 2000 до 20000 при следующих настройках ионного источника: напряжение на IS1 20 кВ, на IS2 19 кВ, на линзах (параметр “Lens”) 4.5 кВ, напряжение питания детектора 2 885 В, коэффициент усиления 12.6.

Спектры снимали в автоматическом режиме с использованием программы Flex Control (v.3.4, build 135). Точки обстрела лазером на мишени выбирали случайным образом. Суммировали 1200 спектров с 200 точек обстрела при частоте лазера 2 кГц.

Библиотеки спектров каждого образца получали при анализе триплекатов восьми технических повторов. Калибровочным стандартом (кат. номер 255 343, “Bruker Daltonics”) и положительным контролем служил белковый экстракт *Escherichia coli* DH5 α с дополнительными белками (PHКаза A [M + H]⁺ 13683.2 Да, миоглобин [M + H]⁺ 16952.3 Да)

Полученные спектры обрабатывали с помощью программного комплекса MALDI biotyper Compass Explorer 4.1 (“Bruker Daltonics”) с использованием стандартного метода препроцессинга данных (Biotyper Preprocessing Standard Method). Обработанные спектры образцов сравнивали с референсной базой характеристических спектральных профилей, включающей 6905 записей. Результаты поиска характеристического профиля выражали как логарифм значений. Значения ниже 1.699 соответствовали ненадежному определению рода; 1.700–1.999 – надежному определению рода и, возможно, вида; 2.000–2.299 – надежному определению рода, с высокой вероятностью вида и, наконец, значения 2.300–3.000 соответствовали надежной идентификации до вида.

Дендрограммы составляли с помощью программного обеспечения MALDI-biotyper Compass Explorer 4.1 (“Bruker Daltonics”); дополнительный анализ масс-спектров проводили с помощью программного обеспечения ClinProTools 3.0 (“Bruker Daltonics”).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты MALDI-TOF-анализа указывают на принадлежность клинических изолятов к группе *B. cereus*.

Первичную идентификацию клинических изолятов проводили с помощью масс-спектрометрического анализа MALDI-TOF (табл. 2). Согласно полученным результатам, исследуемые клинические изоляты можно надежно отнести к роду *Bacillus*. Дендрограмма, построенная на основе масс-спектрометрических данных, также свидетельствует о том, что клинические изоляты ближе к штаммам *B. cereus* (рис. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molec-bio.ru/downloads/2023/4/supp_Smirnova_rus.pdf),

Таблица 2. Результат идентификации клинических изолятов методом MALDI-TOF

Штамм	Наиболее близкий штамм	Надежность идентификации ^а
Клинический изолят SRCC 19/16	<i>B. cereus</i> DSM 31T DSM	1.81
Клинический изолят SRCC 1208	<i>B. cereus</i> 4080 LBK	2.21
<i>B. cereus</i> ATCC 10876	<i>B. cereus</i> 4080 LBK	2.08
<i>B. cereus</i> NCTC 8035	<i>B. cereus</i> 4080 LBK	2.06

^аПриведено значение интегральной количественной оценки надежности идентификации штамма (см. раздел “Экспериментальная часть”).

включая использованные в работе штаммы ATCC10876 и NCTC8035. Однако в эту группу входят также близкородственные виды *B. cereus sensu lato*, такие как *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* и *B. weihenstephanensis*, которые трудно дифференцировать [26]. Хотя в последних работах определены биомаркерные пики для *B. anthracis* [27], *B. cereus* и *B. thuringiensis* [28], в целом, анализ MALDI-TOF имеет слабую разрешающую способность, позволяя надежно идентифицировать только некоторые виды *Bacilli* [29]. Более того, MALDI-TOF-спектры *Bacilli* сильно зависят от условий роста и от присутствия спор в анализируемом образце [29], поэтому для более надежной идентификации наших клинических изолятов мы использовали другие методы.

Анализ последовательностей характеристических генов показывает, что один из клинических изолятов может принадлежать виду B. cytotoxicus

Секвенирование фрагментов 16S рДНК клинических образцов и эталонных штаммов с последующим поиском в базе данных NCBI с помощью BLAST подтвердило принадлежность патогенных штаммов к роду *Bacillus* (табл. 3). Нуклеотидные последовательности 16S рДНК штаммов SRCC 1208, ATCC10876 и NCTC8035 совпадают преимущественно с последовательностями штаммов *B. cereus*. В число близких видов входят также *B. thuringiensis* и *B. anthracis*. Однако изолят SRCC 19/16 проявляет наибольшее сходство с *B. cytotoxicus*, а штамм *B. cereus* находится только на 11-й позиции. Ранее показали, что очень высокое сходство последовательностей 16S рДНК затрудняет дискриминацию таких видов, как *B. cereus*, *B. anthracis* и *B. thuringiensis* [30].

Для более точной идентификации клинических штаммов использовали последовательности тех же генов, как и при определении видовой принадлежности штаммов из группы *B. cereus*, а именно *sspE* [18, 19], *sph1* [20], *motB* [11, 21] и *spoIIAB* [22]. Так, фрагменты гена *sspE* всех четырех штаммов имеют длину 71 п.н., а не 188 п.н. (рис. 1), характерную для штаммов *B. anthracis* [18, 19]. ПЦР-фрагменты генов *motB*, *spoIIAB* и *sph1* секвенировали,

объединяли в искусственные химерные последовательности и использовали в BLAST-поиске. Согласно полученным результатам (табл. 4), наилучшие совпадения получены для штаммов *B. cereus*. Исследуемые клинические изоляты расположены ближе к штаммам *B. cereus* и в соответствующих деревьях расстояний (рис. S2, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molec-bio.ru/downloads/2023/4/supp_Smirnova_rus.pdf).

Физиологические и биохимические тесты указывают на то, что SRCC 19/16 это скорее B. cereus, чем B. cytotoxicus

С использованием физиологических и биохимических тестов, описанных в [31], получены данные, позволяющие отнести изолят SRCC

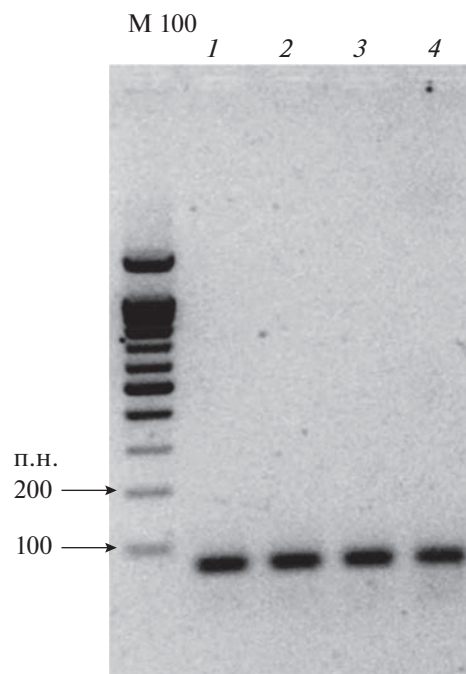


Рис. 1. Электрофореграмма разделения продуктов амплификации участка гена *sspE*, использованного в идентификации штаммов *B. cereus* с помощью AFLP. М100 – маркер молекулярной массы ДНК. 1 – Изолят SRCC 19/16; 2 – изолят SRCC 1208; 3 – *B. cereus* ATCC 10876; и 4 – *B. cereus* NCTC 8035.

Таблица 3. Поиск сходных последовательностей 16S РНК в базе данных NCBI с помощью BLAST

Штамм/Изолят	Штаммы с наиболее сходными фрагментами 16S РНК	Общий балл*	Идентификатор NCBI
SRCC 1208	<i>B. cereus</i> штамм DBM-Z6	1574	MT321509.1
	<i>B. cereus</i> group sp. штамм YP20170200	1574	MT312782.1
	<i>B. cereus</i> штамм EB14	1574	MT256104.1
	<i>B. cereus</i> штамм EB2	1574	MT256102.1
	<i>B. cereus</i> штамм D85	1574	MT256066.1
SRCC 19/16	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_1	20287	CP024120.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_2	20320	CP024116.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_3	20320	CP024113.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_4	20325	CP024111.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_13	18744	CP024109.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_15	20325	CP024107.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_23	20287	CP024104.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_25	20287	CP024101.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_38	20325	CP024098.1
	<i>B. cytotoxicus</i> штамм CH_39	20320	CP024096.1
	<i>B. cereus</i> штамм UCCB 148	1570	MH193385.1
ATCC 10876	<i>B. cereus</i> F837/76	2293	CP003187.1
	<i>B. cereus</i> 03BB108	2193	CP009641.1
	<i>B. thuringiensis</i> штамм Al Hakam	2187	CP000485.1
	<i>B. thuringiensis</i> штамм HD571	2187	CP009600.1
	<i>B. anthracis</i> штамм MCCC 1A02161	2176	CP031642.1
NCTC8035	<i>B. cereus</i> штамм DBM-Z6	1546	MT321509.1
	<i>B. cereus</i> group sp. штамм YP20170200	1546	MT312782.1
	<i>B. cereus</i> штамм EB14	1546	MT256104.1
	<i>B. cereus</i> штамм D85	1546	MT256066.1
	<i>B. thuringiensis</i> штамм 8C5-13	1546	MK603121.1

*Общий балл (total-score) — сумма баллов выравнивания всех найденных сегментов одной и той же последовательности в базе данных, которые соответствуют последовательности, заданной в поиске (вычисляется по всем сегментам).

19/16 к *B. cytotoxicus* или к *B. cereus*. Согласно этим данным (табл. 5), по ряду биохимических свойств SRCC 19/16 более сходен с *B. cereus*, нежели с *B. cytotoxicus*, однако следует отметить, что клетки данного штамма не растут при 10°C, что должно быть характерным для *B. cytotoxicus*.

Различия в химическом составе спор Bacilli, выявленные с помощью сканирующей электронной микроскопии — энергодисперсионного рентгеновского анализа (СЭМ-ЭДР)

Поскольку исследуемые изоляты были выделены из клинических образцов, интерес представляли химические, биохимические, физиологические и структурные особенности их спор, способные вносить вклад в патогенную природу изолятов. В ходе анализа с помощью СЭМ-ЭДР в

спорах эталонных штаммов *B. cereus* ATCC 10876, *B. cereus* NCTC 8035 и в клиническом изоляте SRCC 1208 выявили элементы С, N, O, Na, Mg, Si, P, S, Cl и Ca (табл. 6). Элементы С, N, O, Na, Mg, Si, P, S, Cl, Ca, К обнаружены в клиническом изоляте SRCC 19/16. Отметим сниженное содержание ионов кальция в обоих клинических изолятах. Опубликованы данные о влиянии кальция на термоустойчивость *B. cereus* [32]. Интересно, что калий обнаружен лишь в изоляте SRCC 19/16. Имеются данные о том, что калий может влиять на активность токсинов *B. cereus* [33].

Характеристика спор с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ)

Для описания внешней структуры спор исследуемых штаммов использовали СЭМ (результаты

Таблица 4. Поиск сходных химерных последовательностей *motB-spoIIIB-sph1* в базе данных NCBI с помощью BLAST

Штамм/Изолят	Штаммы с наиболее близкими химерными последовательностями <i>motB-spoIIIB-sph1</i>	Общий балл*	Идентификатор NCBI
SRCC19/16	<i>Bacillus</i> sp. ABP14	1475	CP017016.1
	<i>B. cereus</i> E33L	1459	CP009968.1
	<i>B. cereus</i> штамм JEM-2	1437	CP018935.1
	<i>B. cereus</i> штамм ISSFR-9F	1437	CP018933.1
	<i>B. cereus</i> штамм ISSFR-3F	1437	CP018931.1
SRCC 1208	<i>Bacillus</i> sp. ABP14	1527	CP017016.1
	<i>B. cereus</i> E33L	1516	CP009968.1
	<i>B. cereus</i> штамм JEM-2	1483	CP018935.1
	<i>B. cereus</i> штамм ISSFR-9F	1483	CP018933.1
	<i>B. cereus</i> штамм ISSFR-3F	1483	CP018931.1
ATCC 10876	<i>B. cereus</i> F837/76	2293	CP003187.1
	<i>B. cereus</i> 03BB108	2193	CP009641.1
	<i>B. thuringiensis</i> штамм Al Hakam	2187	CP000485.1
	<i>B. thuringiensis</i> штамм HD571	2187	CP009600.1
	<i>B. anthracis</i> штамм MCCC 1A02161	2176	CP031642.1
NCTC 8035	<i>B. cereus</i> штамм 25	1874	CP020803.1
	<i>B. cereus</i> Q1	1529	CP000227.1
	<i>B. paranthracis</i> штамм CFSAN068816	1523	CP045777.1
	<i>B. cereus</i> штамм CC-1	1523	CP023179.1
	<i>B. cereus</i> NC7401	1523	AP007209.1

*Общий балл (total-score) — сумма баллов выравнивания всех найденных сегментов одной и той же последовательности в базе данных, которые соответствуют последовательности, заданной в поиске (вычисляется по всем сегментам).

Таблица 5. Физиологические и биохимические свойства клинических изолятов

Признак	<i>B. cytotoxicus</i> , согласно [31]	<i>B. cereus</i> , согласно [31]	Штамм		
			ATCC 10876	NCTC 8035	SRCC 19/16
Использование цитрата	– [33%] ^a	+ [34%]	+	+	+
Гидролиз крахмала	–	+ [67%]	+	+	+
Температура роста: минимальная максимальная	20°C	10°C	– (10°C) + (20°C)	– (10°C) + (20°C)	– (10°C) + (20°C)
	50°C	45°C	– (50°C) + (45°C)	– (50°C) + (45°C)	– (50°C) + (45°C)

^aУказан процент положительных штаммов среди всех протестированных согласно [31]; + обнаружен рост; – нет роста.

представлены на рис. 2). Споры эталонного штамма *B. cereus* ATCC 10876 имели овальную форму, каждая спора окружена экзоспориумом. Средняя длина спор вместе с экзоспориумом составила 1.94 ± 0.05 мкм. Споры эталонного штамма *B. cereus* NCTC 8035 также имели овальную форму, были окружены экзоспориумом и были в среднем более короткими, чем у ATCC 10876 (1.75 ± 0.04 мкм). Наименьшая длина спор зафик-

сирована у клинического изолята SRCC 1208 (1.55 ± 0.11 мкм). В отличие от других штаммов споры клинического изолята SRCC 19/16 имели наибольшую длину – 2.17 ± 0.05 мкм, что связано с увеличенным размером экзоспориума. Учитывая большое значение экзоспориума в молекулярных механизмах патогенеза *Bacilli* [6], увеличение его размеров связано, возможно, с патогенным потенциалом спор этого клинического изолята.

Таблица 6. Содержание элементов в спорах эталонных штаммов *B. cereus* и клинических изолятов*

Элемент	<i>B. cereus</i> ATCC 10876	<i>B. cereus</i> NCTC 8035	SRCC 1208	SRCC 19/16
C	59.3 ± 3.3	55.4 ± 2.5	56.0 ± 2.3	49.4 ± 2.1
N	17.3 ± 2.7	18.4 ± 2.6	20.2 ± 1.6	21.0 ± 1.0
O	16.0 ± 0.9	14.8 ± 1.5	17.3 ± 1.1	19.4 ± 1.5
Na	1.5 ± 0.9	2.0 ± 0.9	1.2 ± 0.8	3.1 ± 1.5
Mg	0.7 ± 0.6	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.8 ± 0.8
Si	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.5	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.1
P	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.6 ± 0.2
S	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Cl	0.4 ± 0.1	2.6 ± 1.0	0.5 ± 0.2	2.1 ± 1.2
K	Abs	Abs	Abs	0.6 ± 0.3
Ca	3.1 ± 0.8	4.3 ± 0.5	2.8 ± 0.3	2.4 ± 0.8

*Содержание выражено в весовых процентах (мас. %).

Примечание. Данные представлены в виде среднего ± стандартное отклонение. Abs — нет данных.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЕМ) спор клинических изолятов

Ультраструктурные особенности спор клинических изолятов, ассоциированных с их патогенным потенциалом, изучали с помощью электронной микроскопии. На рис. 3 представлена электронная микрофотография зрелой споры эталонного штамма *B. cereus* ATCC 10876 после негативного окрашивания. Отметим, что споры всех исследованных штаммов имеют сходную структуру. Спора обладает внешней оболочкой — экзоспориумом, который состоит из базальной мембраны и ворсистого слоя. От поверхности спор отходят длинные нитевидные структуры, которые напоминают пили грамотрицательных бактерий.

Путем микроскопирования ультратонких срезов изучали также динамику формирования спор (от 12 до 96 ч) у исследуемых штаммов. Начало споруляции у всех штаммов сопровождалось формированием электронно-прозрачных включений полигидроксibuтирата, которые сохранялись на срезах спорообразующих клеток и на последующих фазах споруляции. Дальнейшие наблюдения подтвердили типичный цикл споруляции *B. cereus*: последовательно отмечалось формирование споровой перегородки, проспоры, экзоспориума, оболочки споры, кортекса споры, ядра и, наконец, зрелой споры. Экзоспориум формируется на внешней мембране споры и, вытягиваясь, образует отсек, занимающий часть родительской клетки, внутри которого продолжается синтез и сборка структур споры. В этом отсеке вновь синтезированные структуры споры защищены от лизиса. Пространство экзоспориума зрелых спор эталонного штамма ATCC 10876 не содержит

включений (рис. 4а). Поверхность спор тонкая, электронно-плотная. Электронно-прозрачный кортекс окружает ядро споры, содержащее наследственный материал (рис. 4а, 4б). На рис. 2б представлен аксиальный срез эталонного штамма NCTC 8035 на стадии созревания споры и формирования экзоспориума. Видно, что экзоспориум занимает небольшую часть цитоплазмы родительской клетки.

У клинического изолята SRCC 1208 наблюдали отличия в формировании экзоспориума. Мембрана экзоспориума, которая начинается от созревающей споры, удлиняется и продвигается к противоположному полюсу материнской клетки. Это ведет к формированию довольно длинного и узкого клиновидного отсека экзоспориума (рис. 5а). Можно отметить также складчатость мембраны экзоспориума, которая исчезает через 96 ч, и значительно больший объем экзоспориума, позволяющий разметить внутри него необычное крупное, округлое или аморфное включение, что структуры, уникальной для спор данного клинического изолята (рис. 5б–5г). С помощью электронной микроскопии с высокой проникающей способностью электронного пучка установлено, что оболочка включения слоистая, а содержимое — зернистое (рис. 5г). В настоящее время не ясно из чего состоит это включение и связано ли оно с патогенезом.

В целом споры клинического изолята SRCC 19/16 похожи на споры эталонных штаммов *B. cereus*. Наблюдали спорующие клетки с многочисленными электронно-прозрачными круглыми включениями полигидроксibuтирата, характерными для этой группы бацилл (рис. 6а).

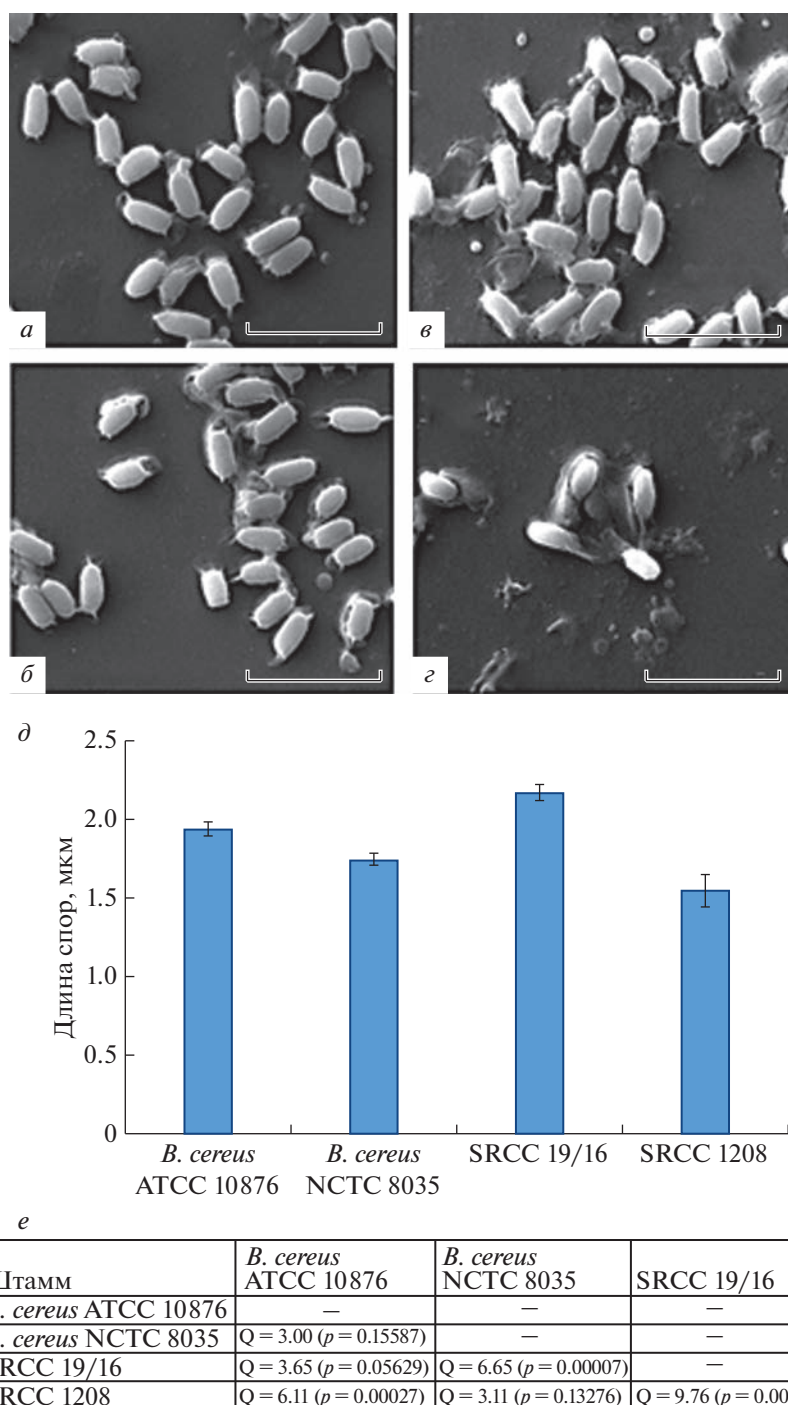


Рис. 2. Изображения спор штаммов *B. cereus*, полученные с помощью СЭМ. а — *B. cereus* ATCC 10876 (эталонный штамм). б — *B. cereus* NCTC 8035 (эталонный штамм). в — SRCC 19/16 (клинический изолят). г — SRCC 1208 (клинический изолят). д — Оценка длины спор исследуемых штаммов. Масштаб — 5 мкм. Длину спор определяли с помощью программы ImageJ. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего, количество измерений варьирует от 6 до 27. е — Оценка статистической значимости различий в длинах спор с помощью теста ANOVA, приведены значения статистики Q и значение p для попарных сравнений с поправкой на множественное сравнение.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе исследованы два клинических изолята, которые относятся к группе близкородственных видов *B. cereus* и идентифи-

цированы нами как *B. cereus* и *B. cytotoxicus* на основании анализа последовательностей характеристических генов в сочетании с биохимическими и физиологическими тестами.

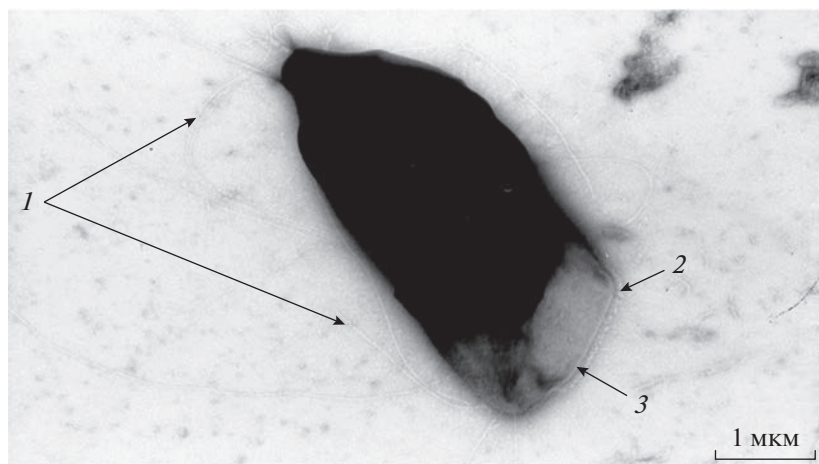


Рис. 3. Электронная микрофотография зрелой споры *B. cereus* ATCC 10876 при негативном окрашивании. Цифрами обозначены: 1 – пилиподобные структуры; 2 – ворсистый слой экзоспориума; 3 – базальный слой экзоспориума.

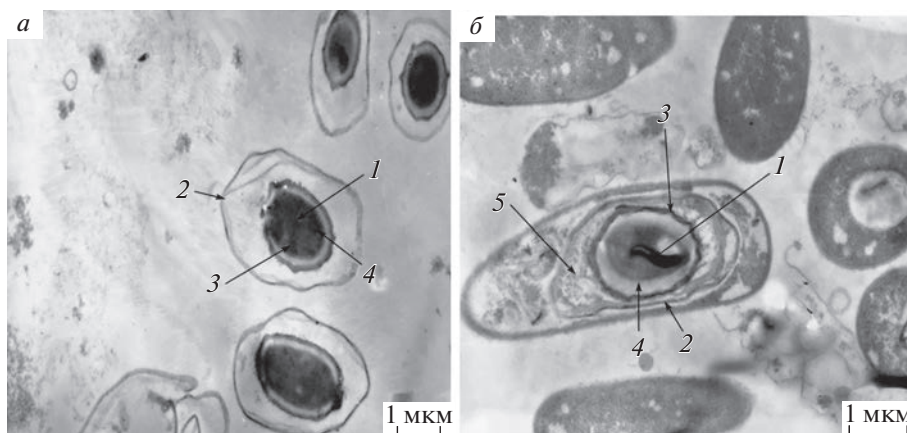


Рис. 4. Электронные микрофотографии ультратонких срезов спор эталонных штаммов: а – *B. cereus* ATCC 10876 и б – *B. cereus* NCTC 8035. Цифрами обозначены: 1 – центральная часть споры; 2 – экзоспориум; 3 – оболочка споры; 4 – кортекс; 5 – внутреннее пространство экзоспориума. Масштабная линейка – 1 мкм.

В ходе дальнейшего изучения клинических изолятов установлено, что содержание ионов кальция в них достоверно ниже, чем у эталонных штаммов. Недавно показано, что при прорастании спор *B. cereus* в среде, обогащенной кальцием, снижается устойчивость клеток к термической обработке [32]. В спорах изолята SRCC 19/16, в отличие от спор других штаммов, обнаружены ионы калия. Опубликованные данные указывают на то, что повышенная активность некоторых токсинов, продуцируемых *B. cereus*, связана с их сродством к ионам калия [33]. Можно предположить, что за счет ионов калия изолят SRCC 19/16 может проявлять повышенную цитотоксичность по сравнению с другими штаммами. Споры этого изолята более удлиненные, поскольку они имеют увеличенный экзоспориум. Экзоспориум играет важную роль в молекулярных патогенетических механизмах *Bacilli* [6], обеспечивая контакт с клетками хозяина. Возможно, увеличение разме-

ров экзоспориума указывает на изменения его структуры, повышающие патогенный потенциал спор клинического изолята. Что касается ультратонкой структуры спор изолята SRCC 19/16, то она не отличается от структуры эталонных штаммов. Интересно отметить, что у изолята SRCC 1208 в ходе споруляции формируется удлиненный и более вместительный экзоспориум, внутри которого затем появляется крупное электронно-плотное включение неясной природы. Эти включения не похожи на известные электронно-плотные кристаллические включения правильной формы, такие как кристаллы Cry-токсинов *B. thuringiensis* [5, 34] и белковые кристаллы других штаммов рода *Bacillus* [35, 36]. Можно предположить, что наблюдаемые включения похожи на параспоровые кристаллы неправильной формы, имеющие белковую природу и обнаруживаемые у некоторых бактерий, например *Paenibacillus popilliae* [37]. В штаммах *B. thuringiensis*, не обладающих инсек-

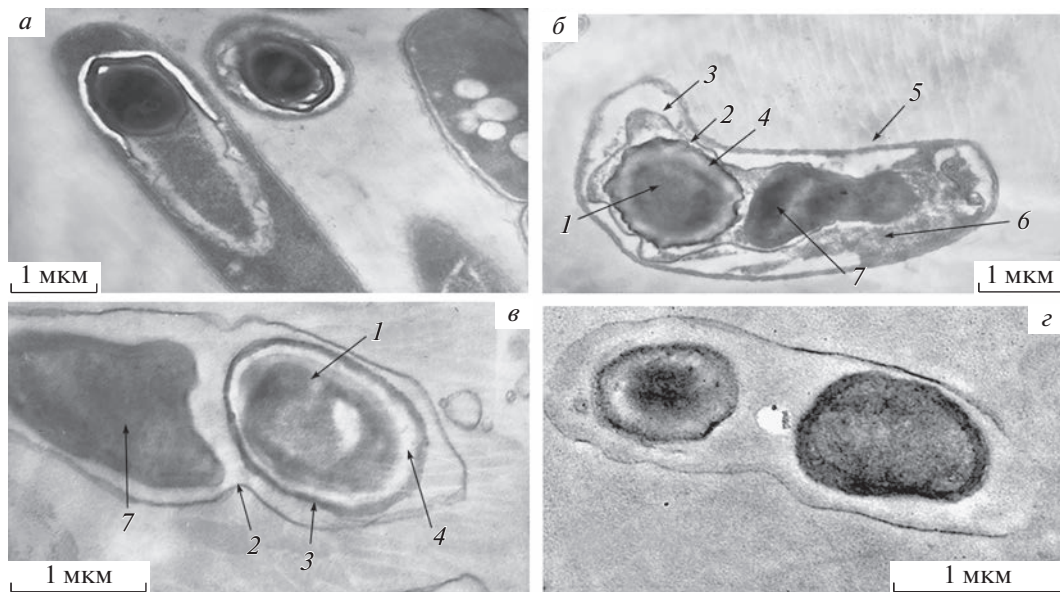


Рис. 5. Электронные микрофотографии ультратонких срезов спор клинического изолята SRCC 1208. *а* – Образование экзоспориума. *б* – Зрелая спора с крупным включением внутри материнской клетки. *в* – Зрелая спора с крупным включением внутри экзоспориума. *г* – Фотография зрелой споры, полученная с помощью высоковольтной электронной микроскопии высокого разрешения с высокой проникающей способностью электронного пучка (200 кВ). Цифрами обозначены: 1 – центральная часть споры; 2 – экзоспориум; 3 – оболочка споры; 4 – кортекс; 5 – клеточная стенка; 6 – цитоплазма родительской клетки; 7 – включение неизвестной природы. Масштабная линейка 1 мкм.

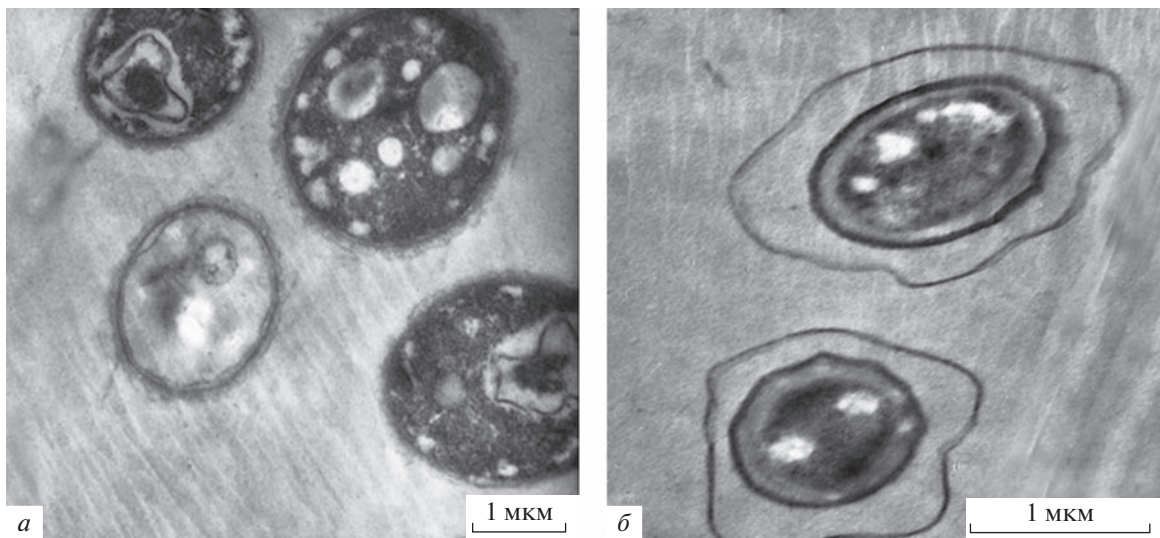


Рис. 6. Электронные микрофотографии ультратонких срезов спор клинического изолята SRCC 19/16. *а* – Спорующие клетки с включениями полигидроксibuтирата. *б* – Зрелая спора. Масштабная линейка 1 мкм.

тицидным действием, обнаружены крупные электронно-плотные кристаллы неправильной формы, имеющие оболочку [38]. Эти кристаллы образованы белком параспорином, который после расщепления протеазами проявляет сильный цитотоксический эффект в отношении клеток человека [38]. Учитывая, что похожие по форме включения обнаружены нами в клиническом изоляте, можно предположить, что они также сформированы белком, обладающим цитотокси-

ческим действием и участвующим в патогенезе. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы установить компоненты этих уникальных включений и их связь с патогенностью клинических изолятов.

Авторы выражают благодарность А.В. Моисенко за техническую поддержку, а также А.В. Рубцову, К.В. Рубцовой и М.С. Золотухину за помощь в подготовке публикации. Авторы выражают также благодарность Центру высокоточного ре-

дактирования генома и генетических технологий для биомедицины ИМБ РАН за предоставленные вычислительные мощности и методики для анализа данных.

Часть работы выполнена на оборудовании ЦКП “Геном” ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/RUS-SIAN_NEW/INSTITUTE/ccu_genome_c.php).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Контракт в системе электронный бюджет № 075-10-2021-113, ID проекта: RF----193021X0001).

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

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Savini V. (2016) In: *The Diverse Faces of Bacillus cereus*. Ed. Savini V. Elsevier Acad. Press, pp. 73–84.
2. Kuroki R., Kawakami K., Qin L., Kaji C., Watanabe K., Kimura Y., Ishiguro C., Tanimura S., Tsuchiya Y., Hamaguchi I., Sakakura M., Sakabe S., Tsuji K., Inoue M., Watanabe H. (2009) Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Intern. Med.* **48**(10), 791–796.
3. Elshaghabee F.M.F., Rokana N., Gulhane R.D., Sharma C., Panwar H. (2017) *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Front. Microbiol.* **8**, 1490.
4. Bundy J.G., Willey T.L., Castell R.S., Ellar D.J., Brindle K.M. (2005) Discrimination of pathogenic clinical isolates and laboratory strains of *Bacillus cereus* by NMR-based metabolomic profiling. *FEMS Microbiol. Lett.* **242**(1), 127–136.
5. Smirnova T.A., Zubasheva M.V., Shevlyagina N.V., Nikolaenko M.A., Azizbekyan R.R. (2013) Electron microscopy of the surfaces of *Bacillus* spores. *Microbiology.* **82**(6), 713–720.
6. Stewart G.C. (2015) The exosporium layer of bacterial spores: a connection to the environment and the infected host. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **79**(4), 437–457.
7. Ball D.A., Taylor R., Todd S.J., Redmond C., Couture-Tosi E., Sylvestre P., Moir A., Bullough P.A. (2008) Structure of the exosporium and sublayers of spores of the *Bacillus cereus* family revealed by electron crystallography. *Mol. Microbiol.* **68**(4), 947–958.
8. Smirnova T.A., Poglazova M.N., Nikolaenko M.A., Azizbekyan R.R. (2000) The adhesion characteristics of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnologia.* **3**, 16–26.
9. Hoa N.T., Baccigalupi L., Huxham A., Smertenko A., Van P.H., Ammendola S., Ricca E., Cutting A.S. (2000) Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(12), 5241–5247.
10. Daffonchio D., Raddadi N., Merabishvili M., Cherif A., Carmagnola L., Brusetti L., Rizzi A., Chanishvili N., Visca P., Sharp R., Borin S. (2006) Strategy for identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains closely related to *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(2), 1295–1301.
11. Chelliah R., Wei S., Park B.J., Kim S.H., Park D.S., Kim S.H., Hwan K.S., Oh D.H. (2017) Novel *motB* as a potential predictive tool for identification of *B. cereus*, *B. thuringiensis* and differentiation from other *Bacillus* species by triplex real-time PCR. *Microb. Pathog.* **111**, 22–27.
12. Olsen J.S., Skogan G., Fykse E.M., Rawlinson E.L., Tomaso H., Granum P.E., Blatny J.M. (2007) Genetic distribution of 295 *Bacillus cereus* group members based on *adk*-screening in combination with MLST (Multilocus Sequence Typing) used for validating a primer targeting a chromosomal locus in *B. anthracis*. *J. Microbiol. Methods.* **71**(3), 265–274.
13. Phillips A.P., Ezzell J.W. (1989) Identification of *Bacillus anthracis* by polyclonal antibodies against extracted vegetative cell antigens. *J. Appl. Bacteriol.* **66**(5), 419–432.
14. Clark A.E., Kaleta E.J., Arora A., Wolk D.M. (2013) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**(3), 547–603.
15. Keys C.J., Dare D.J., Sutton H., Wells G., Lunt M., McKenna T., McDowall M., Shah H.N. (2004) Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect. Genet. Evol.* **4**(3), 221–242.
16. Laue M., Fulda G. (2013) Rapid and reliable detection of bacterial endospores in environmental samples by diagnostic electron microscopy combined with X-ray microanalysis. *J. Microbiol. Methods.* **94**(1), 13–21.
17. Васильченко А.С., Яруллина Д.Р., Никиян А.Н., Тесля А.В. (2012). Морфофункциональные характеристики бактерий *Bacillus cereus* на различных этапах жизненного цикла. *Вестн. Оренбургского гос. университета.* **10**(146), 66–71.
18. Kim K., Seo J., Wheeler K., Park C., Kim D., Park S., Kim W., Chung S.I., Leighton T. (2005) Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **43**(2), 301–310.
19. Abriouel H., Ben Omar N., Lucas Lopez R., Martinez Canamero M., Ortega E., Galvez A. (2007) Differentiation and characterization by molecular techniques of *Bacillus cereus* group isolates from poto poto and degue, two traditional cereal-based fermented foods of Burkina Faso and Republic of Congo. *J. Food Prot.* **70**(5), 1165–1173.
20. Hsieh Y.M., Sheu S.J., Chen Y.L., Tsen H.Y. (1999) Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. *J. Appl. Microbiol.* **87**(4), 481–490.
21. Oliwa-Stasiak K., Molnar C.I., Arshak K., Bartoszcze M., Adley C.C. (2010) Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus cereus* group species. *J. Appl. Microbiol.* **108**(1), 266–273.
22. Ehling-Schulz M., Svensson B., Guinebreteiere M.H., Lindback T., Andersson M., Schulz A., Fricker M., Christiansson A., Granum P.E., Martlbauer E., Nguyen-The C., Salkinoja-Salonen M., Scherer S. (2005) Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to

- a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology (Reading)*. **151**(Pt 1), 183–197.
23. Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T.L., Agarwala R., Schaffer A.A. (2008) Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*. **24**(16), 1757–1764.
 24. Ito S. (1968) Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing tri nitro compounds. *J. Cell Biol.* **39**, 168A–169A.
 25. Sauer S., Freiwald A., Maier T., Kube M., Reinhardt R., Kostorz M., Geider K. (2008) Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One*. **3**(7), e2843.
 26. Liu Y., Lai Q., Goker M., Meier-Kolthoff J.P., Wang M., Sun Y., Wang L., Shao Z. (2015) Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Sci. Rep.* **5**, 14082.
 27. Pauker V.I., Thoma B.R., Grass G., Bleichert P., Hanczaruk M., Zoller L., Zange S. (2018) Improved discrimination of *Bacillus anthracis* from closely related species in the *Bacillus cereus sensu lato* group based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **56**(5), e01900–e01917.
 28. Ha M., Jo H.J., Choi E.K., Kim Y., Kim J., Cho H.J. (2019) Reliable identification of *Bacillus cereus* group species using low mass biomarkers by MALDI-TOF MS. *J. Microbiol. Biotechnol.* **29**(6), 887–896.
 29. Shu L.-J., Yang Y.-L. (2017) *Bacillus* classification based on matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry – effects of culture conditions. *Sci. Repts.* **7**(1), 15546–15546.
 30. Bourque S.N., Valero J.R., Lavoie M.C., Levesque R.C. (1995) Comparative analysis of the 16S to 23S ribosomal intergenic spacer sequences of *Bacillus thuringiensis* strains and subspecies and of closely related species. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(4), 1623–1626.
 31. Guinebreteiere M.H., Auger S., Galleron N., Contzen M., De Sarrau B., De Buyser M.L., Lamberet G., Fagerlund A., Granum P.E., Lereclus D., De Vos P., Nguyen-The C., Sorokin A. (2013) *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**(Pt 1), 31–40.
 32. Sinnela M.T., Pawluk A.M., Jin Y.H., Kim D., Mah J.H. (2021) Effect of calcium and manganese supplementation on heat resistance of spores of *Bacillus* species associated with food poisoning, spoilage, and fermentation. *Front. Microbiol.* **12**, 744953.
 33. Teplova V.V., Mikkola R., Tonshin A.A., Saris N.E., Salkinoja-Salonen M.S. (2006) The higher toxicity of cereulide relative to valinomycin is due to its higher affinity for potassium at physiological plasma concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **210**(1–2), 39–46.
 34. Osman G., Already R., Assaedi A., Organji S., El-Ghareeb D., Abulreesh H., Althubiani A. (2015) Bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* a comprehensive review. *Egyptian J. Biol. Pest Control.* **25**, 271–288.
 35. Yan M., Roehrl M.H., Wang J.Y. (2007) Discovery of crystalline inclusions in *Bacillus licheniformis* that resemble parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Can. J. Microbiol.* **53**(9), 1111–1115.
 36. Charles J.F., Nielson-LeRoux C., Delecluse A. (1996) *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annu. Rev. Entomol.* **41**, 451–472.
 37. Park H.-W., Federici B., Sakano Y. (2006) In: *Inclusion Proteins from other Insecticidal Bacteria*. Eds Shively Jessup M., Steinbüchel A. Berlin: Springer, pp. 321–330.
 38. Mizuki E., Park Y.S., Saitoh H., Yamashita S., Akao T., Higuchi K., Ohba M. (2000) Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **7**(4), 625–634.

Identification of Clinical Isolates of *Bacillus cereus* Group and Their Characterization by Mass Spectrometry and Electron Microscopy

T. A. Smirnova¹, N. B. Polyakov^{1, 2, *}, D. S. Karpov³, A. I. Solovyev¹, N. V. Shevlyagina¹, S. G. Andreevskaya¹, D. N. Shcherbinin¹, Z. S. Plieva¹, V. A. Kozlova¹, A. A. Pereborova¹, I. A. Bogdanov^{1, 4}, D. A. Grumov¹, M. V. Zubasheva¹, S. V. Poddubko⁵, A. A. Grechnikov², M. A. Sukhina⁶, and V. G. Zhukhovitsky^{1, 7}

¹Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia

²Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

³Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

⁴“Nanopromimport” LLC, Moscow State University Science Park, Moscow, 119234 Russia

⁵State Scientific Center of the Russian Federation, Institute of Bio-Medical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123007 Russia

⁶Ryzhikh State Research Center of Coloproctology, Ministry of Health, Moscow, 123423 Russia

⁷Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (RMANPO), Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125993 Russia

*e-mail: polyakovnb@gmail.com

Bacillus cereus is a spore-forming bacterium found in the environment mainly in soil. *Bacillus* spores are known to be extremely resistant not only to environmental factors, but also to various sanitation regimes. This leads to spore contamination of toxin-producing strains in hospital and food equipment and, there-

fore, poses a great threat to human health. Two clinical isolates identified as *B. cereus* and *B. cytotoxicus* were investigated in the present work. It was shown that their calcium ion content was significantly lower than that of the reference strains. According to electron microscopy, one of the isolates SRCC 19/16 has an enlarged exosporium, and isolate SRCC 1208 shows large electron-dense inclusions of unclear nature during sporulation. We can assume that it contains a biologically active component with a cytotoxic effect and possibly plays a role in pathogenesis. Comparative chemical, biochemical, physiological, and ultrastructural analysis of spores of clinical isolates and reference strains of *B. cereus* was performed. The results obtained deepen our understanding of the properties of spores that contribute to the increased pathogenicity of *B. cereus* group species.

Keywords: *Bacillus cereus*, *Bacillus cytotoxicus*, spore, electron microscopy, mass spectrometry

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.218

ВЛИЯНИЕ АДИПОРОНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. И. А. Побожьева^{a, b, *}, К. В. Драчева^{a, b}, С. Н. Пчелина^{a, b, c}, В. В. Мирошникова^{a, b}

^aПетербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Национальный исследовательский центр
“Курчатовский институт”, Гатчина, Ленинградская обл., 188300 Россия

^bПервый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова
Министерства здравоохранения Российской Федерации Санкт-Петербург, 197022 Россия

^cИнститут экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*e-mail: perhaps_to_be@mail.ru

Поступила в редакцию 11.11.2022 г.

После доработки 08.01.2023 г.

Принята к публикации 25.01.2023 г.

Избыточное поглощение богатых холестерином липопротеинов низкой плотности макрофагами сосудистой стенки приводит к трансформации макрофагов в пенистые клетки, накоплению липидов в интиме артерий и, как следствие, к образованию атеросклеротических бляшек и развитию сердечно-сосудистых заболеваний. Адипонектин — секретируемый жировой тканью адипокин, вызывает антиатерогенные и противовоспалительные эффекты, взаимодействуя с рецепторами AdipoR1 и AdipoR2. Одним из механизмов антиатерогенного действия адипонектина может быть участие в регуляции обратного транспорта холестерина и предотвращение образования пенистых клеток. Мы предположили, что низкомолекулярный агонист рецепторов адипонектина — адипорон — может модулировать экспрессию генов обратного транспорта холестерина и воспаления в макрофагах человека, и изучили влияние различных концентраций адипорона (0, 5, 10 и 20 мкМ) на экспрессию генов *ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3* (*LXRα*), *NR1H2* (*LXRβ*), *PPARG*, *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4* в клетках первичной культуры макрофагов человека, а также на макрофаги линии THP-1. Выживаемость клеток оценивали с использованием MTS-теста. Уровень мРНК генов *ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3*, *NR1H2*, *PPARG*, *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4* в первичной культуре макрофагов человека оценивали методом ПЦР в реальном времени. Показано увеличение относительного уровня мРНК генов *PPARG* и *ABCA1* при воздействии адипорона в концентрации 5 и 10 мкМ в течение суток. Отмечен цитотоксический эффект адипорона в высокой концентрации (20 мкМ), выраженный в большей степени в макрофагах линии THP-1. Полученные данные о влиянии адипорона на макрофаги человека и изучение возможных агонистов рецепторов адипонектина представляют значительный интерес, учитывая необходимость поиска новых подходов к профилактике и лечению атеросклероза.

Ключевые слова: адипорон, *ABCA1*, *PPARG*, обратный транспорт холестерина, макрофаги, THP-1

DOI: 10.31857/S0026898423040183, **EDN:** QLXHWK

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) — основная причина смертности во всем мире [1, 2], поэтому поиск молекулярных маркеров развития

Сокращения: ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания; ИБС — ишемическая болезнь сердца; ЛПНП — липопротеины низкой плотности; *LXRα*, *LXRβ* — X-рецепторы печени α и β; *RXR* — ретиноидный X-рецептор; *PPARα*, *PPARγ* — рецепторы α и γ, активируемые пролифераторами пероксисом; *ABCA1*, *ABCG1* — ABC-кассетные транспортеры; ЛПВП — липопротеины высокой плотности; *OTX* — обратный транспорт холестерина; *AdipoR1*, *AdipoR2* — рецепторы адипонектина; *APOA1* — аполипопротеин A1; *ACAT-1* — ацил-КоА-холестерин-ацилтрансфераза-1; *TNF-α* — фактор некроза опухоли α; *IL-6* — интерлейкин-6; *TLR4* — Toll-подобный рецептор 4; *PBS* — фосфатно-солевой буфер; *DMSO* — диметилсульфоксид; *FBS* — эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота.

ССЗ и подходов к их лечению не теряет своей актуальности. Более половины смертей от ССЗ приходится на ишемическую болезнь сердца (ИБС), которая характеризуется нарушением кровоснабжения миокарда вследствие гемодинамически значимого поражения коронарных артерий [3, 4]. Атеросклероз — это многофакторное заболевание, при котором происходит накопление липидов, главным образом эфиров холестерина, в интиме артерий [5]. Отличительным признаком начальных стадий атеросклеротических поражений является образование пенистых клеток, обусловленное неконтролируемым поглощением макрофагами богатых холестерином липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), подверженных различным модификациям, таким как окисление,

ферментативное и неферментативное расщепление, агрегация, десИАлирование [2, 5–11].

Прогрессирование атеросклероза определяется двумя основными процессами — нарушением метаболизма липопротеинов, сопровождающимся накоплением внутриклеточных липидов, и развитием хронического воспаления, важную роль в котором, согласно последним данным, играет митохондриальная дисфункция [12]. Макрофаги захватывают модифицированные ЛПНП посредством рецептор-опосредованного фагоцитоза и пиноцитоза и секретируют широкий спектр факторов, регулирующих воспаление и фиброз [9, 13]. Последующая хронизация воспаления при атеросклерозе может вызываться активацией врожденного иммунитета, обусловленной мутациями митохондриальной ДНК (мтДНК) и нарушениями митофагии [14]. Предполагается, что накопление мутаций мтДНК в макрофагах приводит к снижению ими продукции АТР, синтеза лизосомных липаз, а макрофаги при этом утрачивают способность метаболизировать модифицированные ЛПНП и, накапливая липиды, превращаются в пенистые клетки [15]. Таким образом, атеросклеротическое поражение возникает из-за локального воспаления в стенке артерий, которое становится хроническим и сопровождается неконтролируемым накоплением липидов [14].

Накопление клеточного холестерина приводит к активации нескольких транскрипционных факторов, включая X-рецепторы печени α и β ($LXR\alpha$, $LXR\beta$), ретиноидный X-рецептор (RXR) и рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом PPAR ($PPAR\gamma$, $PPAR\alpha$). Эти транскрипционные факторы регулируют экспрессию ABC-кассетных транспортеров ABCA1 и ABCG1. ABCA1 вместе с APOA1 участвует в биогенезе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), в то время как ABCG1 способствует оттоку холестерина из макрофагов на зрелые частицы ЛПВП. В процессе обратного транспорта холестерина (ОТХ) антиатерогенные ЛПВП принимают участие в транспорте холестерина из периферических тканей в печень для его последующей утилизации в составе желчных кислот [3, 16, 17].

Адипонектин — плейотропный адипокин, секретируемый жировой тканью, оказывает противовоспалительное, антидиабетическое и антиатерогенное действие, взаимодействуя с рецепторами AdipoR1 и AdipoR2, и может рассматриваться как важная терапевтическая мишень. Адипонектин участвует в углеводном и липидном обмене, регулирует чувствительность тканей к инсулину, уменьшает сосудистое воспаление и препятствует проатеросклеротическим процессам, т.е. адгезии моноцитов, трансформации макрофагов в пенистые клетки, миграции и пролиферации гладкомышечных клеток [18–21]. Участвуя в регуляции

липидного спектра крови, адипонектин защищает от развития атеросклероза и неалкогольной жировой болезни печени [22, 23]. Следует отметить, что более медленное прогрессирование атеросклеротических ССЗ у женщин может быть связано с рядом протективных факторов, в том числе, с более высокой концентрацией адипонектина в крови, чем у мужчин [24]. Однако нами не обнаружено различий в концентрации адипонектина в сыворотке крови мужчин и женщин, что может быть связано с ИБС у женщин в исследуемой выборке [25].

Снижение экспрессии гена адипонектина при ожирении, связанном с высоким риском развития ИБС, описано ранее [26–28]. Нами показано снижение концентрации адипонектина в сыворотке крови, а также относительного уровня мРНК и белка адипонектина в подкожной жировой ткани пациентов с ИБС по сравнению с контрольной группой [25].

Предполагается, что одним из механизмов, связанных с предотвращением образования пенистых клеток, может быть участие адипонектина в регуляции ОТХ. Liang и соавт. [29] показали, что адипонектин увеличивает экспрессию гена *ABCA1* как на уровне мРНК, так и на уровне белка, а также способствует оттоку холестерина на APOA1 в макрофагах RAW264,7 путем активации $LXR\alpha$ [29]. Адипонектин может влиять на темпы накопления липидов, снижая экспрессию гена, кодирующего ацил-CoA-холестерин-ацилтрансферазу-1 (*ACAT-1*), которая катализирует образование эфиров холестерина [30]. Помимо этого, противовоспалительное действие адипонектина может быть связано с подавлением секреции цитокинов, таких как $TNF-\alpha$ и $IL-6$ [31–33]. Поэтому актуальным представляется поиск соединений, усиливающих функциональную активность адипонектина. Адипорон, идентифицированный как низкомолекулярный агонист рецепторов адипонектина, улучшает метаболизм глюкозы и липидов, повышает чувствительность к инсулину как в культивируемой клеточной линии миоцитов, так и у мышей [34, 35]. Мы предположили, что адипорон может модулировать экспрессию генов ОТХ и воспаление в макрофагах человека.

Цель данной работы состояла в изучении влияния различных концентраций адипорона на экспрессию генов липидного обмена (*ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3* ($LXR\alpha$), *NR1H2* ($LXR\beta$), *PPARG*, *ACAT1*) и воспаления (*IL6*, *TNFA*, *TLR4*) в макрофагах человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование макрофагов. Первичные культуры макрофагов человека получены из образцов (30 мл) периферической крови трех здо-

ровых доноров. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ПСПбГМУ им. И.П. Павлова. Фракцию мононуклеарных клеток получали методом градиентного центрифугирования при 1600 об/мин в растворе фиколла ($\rho = 1.077$, “Corning”, США) по методике, описанной ранее [36], и дважды отмывали в холодном PBS. Далее мононуклеарные клетки ресуспендировали в культуральной среде (Alpha MEM, “Биолот”, Россия), содержащей 10% аутологичной сыворотки человека, 1% антибиотика (гентамицин), и инкубировали в 24-луночных планшетах в концентрации 2×10^5 клеток на лунку в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C в течение 2 ч, после чего клетки промывали в PBS. Прикрепившиеся к чашкам Петри моноциты культивировали в течение 5 сут с заменой питательной среды на 1-е и 3-и сут.

Полученные клетки инкубировали в течение суток в культуральной среде, содержащей адипорон (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 0 (DMSO), 5, 10 и 20 мкМ. Адипорон поставляется в лиофилизированном виде и растворяется в DMSO, поэтому DMSO использовали в качестве отрицательного контроля. Концентрации адипорона, в том числе предельно допустимые, определяли после проведения теста на выживаемость клеток (MTS-тест). После инкубации клетки отмывали в PBS и использовали для выделения РНК.

В работе также использовали клеточную линию моноцитарного лейкоза человека THP-1 (ЦКП “Коллекция клеточных культур позвоночных” Института цитологии РАН). Клетки культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FBS, 2 мМ L-глутамина и 1% антибиотика (гентамицин) при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. Для дифференцировки в макрофаги клетки рассаживали на 24-луночные планшеты по 5×10^5 на лунку. Дифференцировку моноцитов THP-1 в макрофаги индуцировали форболовым эфиром (“Novus Biologicals”, США) в концентрации 50 нг/мл в течение 24 ч.

MTS-тест. MTS-тест проводили с помощью набора CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (“Promega”, США). К 100 мкл питательной среды добавляли 20 мкл реагента CellTiter 96® AQueous One Solution и инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 1 ч. Жизнеспособность клеток определяли, измеряя оптическую плотность при 490 нм на спектрофотометре xMark (“Bio-Rad”, США).

Определение уровня мРНК исследуемых генов. РНК выделяли с использованием набора GeneJET RNA Purification Kit (“ThermoFisher Scientific”, США). кДНК получена методом обратной транскрипции с использованием набора MMLV RT kit (“Евроген”, Россия). Чистоту препарата РНК оценивали на спектрофотометре SmartSpecPlus (“Bio-Rad”) по соотношению поглощения при

длинах волн 260 и 280 нм (критерий чистоты 2). Отсутствие деградации РНК проверяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле по соотношению интенсивности полос, соответствующих 28S и 18S рРНК (2 : 1 при отсутствии деградации).

Относительный уровень мРНК генов *ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3*, *NR1H2*, *PPARG*, *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4* определяли методом ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентными зондами TaqMan на приборе CFX96 (“Bio-Rad”). Использовали праймеры и зонды, меченные различными флуорофорами (“ДНК-синтез”, Москва). Последовательности праймеров и зондов представлены в табл. 1.

Аmplификацию проводили с использованием Taq AB мастер-микса $\times 2.5$ (“АлкорБио”, Россия) в 20 мкл смеси в следующем температурно-временном режиме: первый цикл – 95°C, 3 мин – предварительная денатурация; плавление – 95°C, 10 с; отжиг – 58°C, 30 с; синтез – 72°C, 10 с, 44 цикла. Достоверность и точность эксперимента обеспечивали, проводя измерения всех образцов как минимум в трех повторах. Относительный уровень мРНК исследуемых генов рассчитывали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ с модификацией для нескольких референсных генов и выражали в относительных единицах [36].

Статистическая обработка. Статистическую обработку выполняли с использованием программ SPSS 23.0 для Windows и R-Studio. Статистический анализ различий между сравниваемыми группами проводили с использованием Н-критерия Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением методом Данна. Критический уровень статистической значимости принимали равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами оценена выживаемость клеток линии THP-1 и первичной культуры макрофагов в присутствии адипорона в концентрации от 0 до 25 мкМ. Для первичной культуры макрофагов выбрана концентрация 20 мкМ как максимальная для клеток данного типа. Воздействие адипорона в тех же концентрациях на клеточную линию THP-1 приводило к более значительному снижению их выживаемости, поэтому дальнейшие эксперименты с этими клетками не проводили (рис. 1).

Определен относительный уровень мРНК генов *ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3*, *NR1H2*, *PPARG*, *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4* в первичной культуре макрофагов человека после воздействия адипорона.

Показано, что воздействие адипорона в концентрации 5 и 10 мкМ на макрофаги человека вы-

Таблица 1. Структура олигонуклеотидных праймеров и зондов

Ген	Прямой (F) и обратный (R) праймеры и TaqMan® зонды
<i>ABCA1</i> (целевой ген)	F: 5'-CTCCTGTGGTGTTTCTGGATG-3' R: 5'-CTTGACAACACTTAGGGCACAA-3' 5' (FAM)-AAGCCCGGCGGTTCTTGTGG -3' (RTQ1)
<i>ABCG1</i> (целевой ген)	F: 5'-CACGTACCTACAGTGGATGT-3' R: 5'-GTCTAAGCCATAGATGGAGA-3' 5' (FAM)-CTATGTCAGGTATGGGTTCGAAG-3' (RTQ1)
<i>APOA1</i> (целевой ген)	F: 5'- CCTTGGGAAAACAGCTAAACC-3' R: 5'-CAGCTTGCTGAAGGTGGAG-3' 5' (FAM)-AGCTCCTTGACAACCTGGGACAGCGT-3' (BHQ1)
<i>ACAT1</i> (целевой ген)	F: 5'-TCAATGGAGGAGCTGTTTCTC-3' R: 5'-AGACCGTATTCTCCTTGCTTCA-3' 5' (FAM)-AATTGGGATGTCTGGAGCCA-3' (RTQ1)
<i>IL6</i> (целевой ген)	F: 5'-ACAACCTGAACCTTCCAAAGA-3' R: 5'-ACCTCAAACCTCCAAAAGACCA-3' 5' (FAM)-CAATGAGGAGACTTGCCTGGTGA-3' (BHQ1)
<i>NR1H3</i> (<i>LXRα</i>) (целевой ген)	F: 5'-TCACCTTCCTCAAGGATTTCA-3' R: 5'-TCGAAGATGGGGTTGATGA-3' 5' (FAM)-TAACCGGGAAGACTTTGCCAAAGCA-3' (RTQ1)
<i>NR1H2</i> (<i>LXRβ</i>) (целевой ген)	F: 5'-CTGTTGCTTGAGAGGGGC-3' R: 5'-CGTGGTAGGAGAGGACATGG-3' 5' (FAM)-CTGGAGAGAGGCTGCTCCGTGA-3' (RTQ1)
<i>TNFA</i> (целевой ген)	F: 5'-CCA-GGG-ACC-TCT-CTC-TAA-TCA-3' R: 5'-CTA-CAA-CAT-GGG-CTA-CAG-GC-3' 5' (FAM)-CTCTGGCCCAGGCAGTCGAATCA-3' (BHQ1)
<i>TLR4</i> (целевой ген)	F: 5'-GAGACCAGAAAGCTGGGAG-3' R: 5'-GTAGAAATTCAGCTCCATGC-3' 5' (FAM)-CCTGCGTGGAGGTGGTTCCTAA-(RTQ1)-3'
<i>PPARG</i> (целевой ген)	F: 5'-GATGTCTCATAATGCCATCACGTT-3' R: 5'-GGATTCAGCTGGTCGATATCACT-3' 5' (FAM)-CCAACAGCTTCTCCTTCTCGGCCTG-3' (RTQ1)
<i>RPLP0</i> (референсный ген)	F: 5'-GATCAGGGACATGTTGCTGG-3' R: 5'-GACTTCACATGGGGCAATGG-3' 5' (ROX)-CAATAAGGTGGCAGCTGCTGC-3' (RTQ2)
<i>ACTB</i> (референсный ген)	F: 5'-CGTGCTGCTGACCGAGG-3' R: 5'-ACAGCCTGGATAGCAACGTAC-3' 5' (HEX)-CCAACCGCGAGAGGATGACCCAGAT-3' (BHQ1)

звало повышение уровня мРНК генов *ABCA1* и *PPARG* ($p < 0.05$ и $p < 0.05$ соответственно) (рис. 2, 3).

Не выявлено изменений в относительном уровне мРНК генов *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3*, *NR1H2*, *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4* при воздействии адипорона.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Адипорон — это низкомолекулярный агонист рецепторов AdipoR1 и AdipoR2 адипонектина. Активация рецепторов приводит к запуску ряда сигнальных каскадов, через которые могут реали-

зоваться антиатерогенные свойства адипонектина [34, 38, 39]. В нашей работе впервые изучено воздействие адипорона на экспрессию генов липидного обмена (*ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3*, *NR1H2*, *PPARG*, *ACAT1*) и воспаления (*IL6*, *TNFA*, *TLR4*) в макрофагах человека. Мы наблюдали увеличение экспрессии генов *PPARG* и *ABCA1* при концентрациях адипорона 5 и 10 мкМ. Ранее было показано, что адипонектин время- и дозозависимым образом усиливает экспрессию гена *ABCA1* в макрофагах мыши, активируя *LXRα*, а также экспрессию генов *ABCA1*, *NR1H3* и *PPARG* в макрофагах человека [29, 40]. Уровень экспрессии ге-

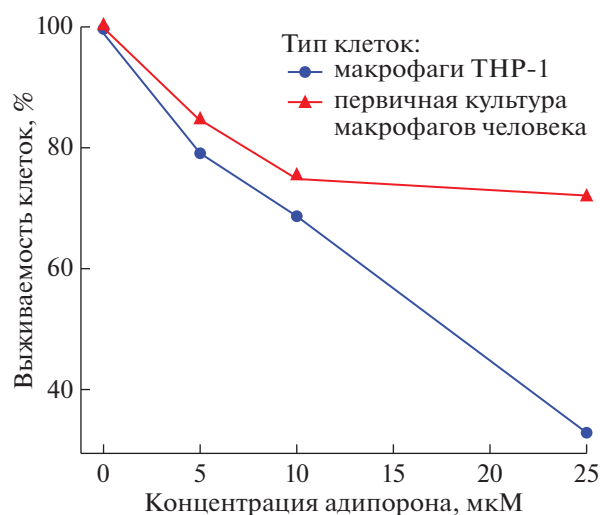


Рис. 1. Выживаемость клеток первичной культуры макрофагов и клеток ТНР-1 после воздействия различных концентраций адипорона.

на *ABCG1* при этом не изменялся, как показано и в нашем исследовании [40].

В исследовании Furukawa и соавт. показано, что воздействие рекомбинантного адипонектина приводит к снижению экспрессии гена *ACAT1* в макрофагах человека, однако наши данные это не подтверждают. Можно предположить, что отсутствие влияния адипорона обусловлено необходимостью дополнительной инкубации в присутствии ЛПНП и может проявляться при экстремальном накоплении липидов [30].

Однако следует отметить, что большой разброс в уровнях мРНК большинства исследуемых генов, наблюдаемый при использовании адипорона в концентрации 20 мкМ, может указывать на

цитотоксический эффект больших концентраций адипорона и затруднять его применение в терапевтических целях. Этим может объясняться и снижение относительного уровня мРНК генов *ABCA1* и *PPARG*, вызванное воздействием 20 мкМ адипорона, по сравнению с 10 мкМ. Показано, что инъекции адипорона в высоких дозах подавляют пролиферацию клеток гиппокампа у мышей [41]. В исследовании Duan и соавт. адипорон в концентрации более 6 мкМ вызывал значительную гибель клеток первичной культуры хондроцитов человека [42].

Адипорон, как и адипонектин, снижает индуцированную полиинозиновой-полицитидиловой кислотой и липополисахаридом продукцию провоспалительных цитокинов, в частности таких, как $TNF\alpha$ и $IL-6$, в макрофагах человека. Однако адипорон не влиял на продукцию цитокинов нестимулированными макрофагами человека [43]. Мы также не наблюдали изменений в экспрессии генов *IL6*, *TNFA*, *TLR4*, что соответствует данным [43].

Нами показано, что воздействие повышенных концентраций адипорона на макрофаги ТНР-1 приводит к снижению их жизнеспособности. Аналогичные данные получены и на линии клеток пигментного эпителия ARPE-19: адипорон снижал пролиферацию и миграцию этих клеток в зависимости от дозы [44]. Вероятно, это связано с тем, что адипорон обладает цитотоксической и противоопухолевой активностью, как показано в ряде работ [45–47]. Предполагается, что снижение жизнеспособности клеток рака поджелудочной железы связано в основном с RIPK1-зависимым некроптозом и в меньшей степени с независимым от каспазы апоптозом и аутофагической гибелью клеток, вызванной митохондриальной дисфункцией [48]. Изучение роли адипонектина

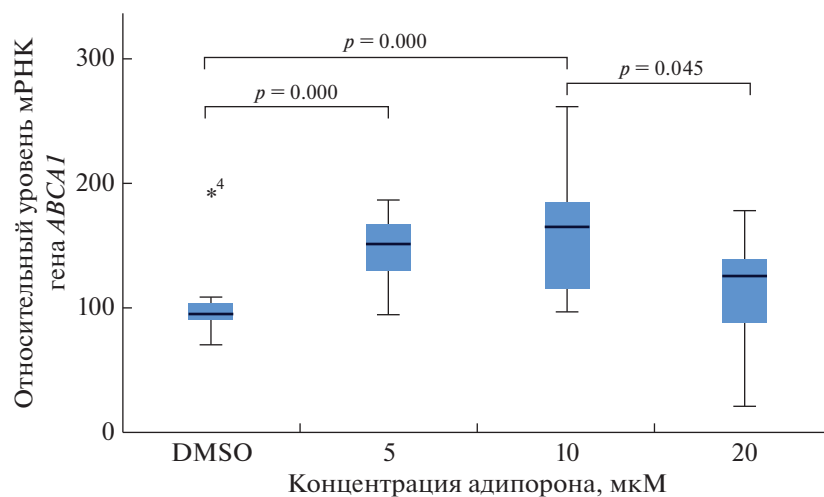


Рис. 2. Относительный уровень мРНК гена *ABCA1* в макрофагах после воздействия адипорона.

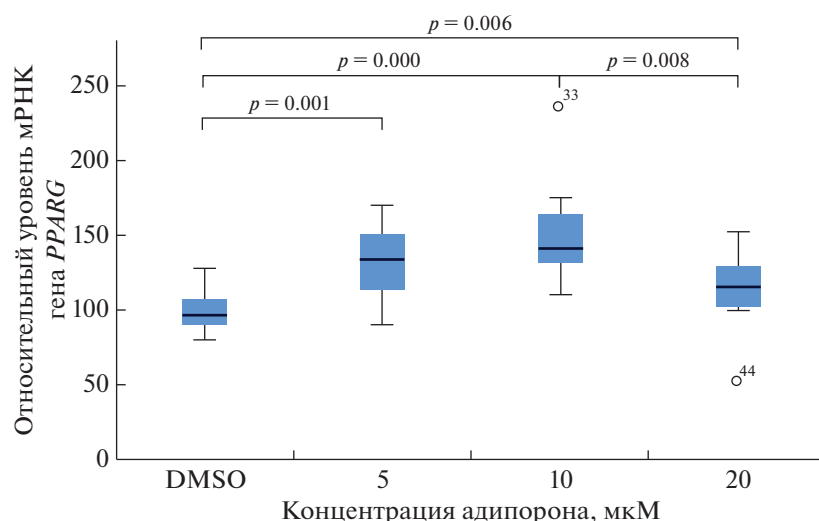


Рис. 3. Относительный уровень мРНК гена *PPARG* в макрофагах после воздействия адипорона.

в развитии опухолей [49, 50] показало, что при раке молочной железы адипонектин как стимулирует рост, так и ингибирует пролиферацию различных типов клеток [51]. Адипонектин индуцирует ингибирование роста и апоптоз клеток рака легкого и снижает скорость пролиферации клеток колоректального рака [52–54], а также доз- и времязависимым образом подавляет пролиферацию и жизнеспособность клеток рака щитовидной железы [55]. Кроме того, обнаружено, что адипонектин ингибирует подвижность клеток рака щитовидной железы и их способность к инвазии [55]. По-видимому, результаты изучения воздействия адипорона и, вероятно, адипонектина, полученные на иммортализованных клеточных линиях, таких как ТНР-1, могут отличаться от результатов, полученных на первичных культурах клеток.

Поиск новых терапевтических подходов к профилактике и лечению атеросклероза остается актуальным, поэтому необходимо дальнейшее изучение механизма действия адипорона, осуществляемого с помощью рецепторов адипонектина.

ВЫВОДЫ

Показано повышение экспрессии генов *PPARG* и *ABCA1* в первичной культуре макрофагов человека в присутствии адипорона в концентрации 5 и 10 мкМ. Влияние адипорона на экспрессию генов липидного обмена и воспаления говорит о возможном участии адипорона в стимуляции ОТХ в первичной культуре макрофагов человека. Отмечен цитотоксический эффект более высоких концентраций адипорона.

Авторы выражают признательность за помощь в работе с клетками линии ТНР-1 и обсуждение

результатов сотрудникам Института экспериментальной медицины С.В. Орлову, Е.Е. Ларионовой, Д.А. Тянянскому.

Эксперименты по изучению экспрессии генов в первичной культуре макрофагов выполнены в рамках государственного задания по теме “Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально-значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения” (регистрационный номер № 121060200125-2); эксперименты по оценке выживаемости клеток ТНР-1 выполнены в рамках государственного задания “Молекулярно-клеточные механизмы активации транспорта липопротеинов через эндотелий на разных стадиях атерогенеза” (шифр № FGWG-2022-0003).

Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ПСПбГМУ им. И.П. Павлова. Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ghantous C.M., Kamareddine L., Farhat R., Zouein F.A., Mondello S., Kobeissy F., Zeidan A. (2020) Advances in cardiovascular biomarker discovery. *Biomedicines*. **8**, 552.
2. Libby P., Buring J.E., Badimon L., Hansson G.K., Deanfield J., Bittencourt M.S., Tokgözoğlu L., Lewis E.F. (2019) Atherosclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primers*. **5**, 56.
3. Крюков Н.Н., Николаевский Е.Н., Поляков В.П. (2010) *Ишемическая болезнь сердца (современные аспекты клиники, диагностики, лечения, профилактики, медицинской реабилитации, экспертизы): Монография*. Самара: ФГОУ ВПО “Самарский государ-

- ственный медицинский университет Росздрава”, 651 с.
4. Severino P., D’Amato A., Pucci M., Infusino F., Adamo F., Birtolo L.I., Netti L., Montefusco G., Chimenti C., Lavallo C., Maestrini V., Mancone M., Chilian W.M., Fedele F. (2020) Ischemic heart disease pathophysiology paradigms overview: from plaque activation to microvascular dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 8118.
 5. Рыжкова А.И., Карагодин В.П., Сухоруков В.Н., Сазонова М.А., Орехов А.Н. (2017) Десилированные липопротеины низкой плотности в крови человека. *Clin. Medicine. Russ. J.* **95**(3), 216–221.
 6. Miller Y.I., Choi S., Fang L., Harkewicz R. (2009) Toll-like receptor-4 and lipoprotein accumulation in macrophages. *Trends Cardiovasc. Med.* **19**, 227–232.
 7. Demina E.P., Smutova V., Pan X., Fougerat A., Guo T., Zou C., Chakraborty R., Snarr B.D., Shiao T.C., Roy R., Orekhov A.N., Miyagi T., Laffargue M., Sheppard D.C., Cairo C.W., Pshezhetsky A.V. (2021) Neuraminidases 1 and 3 trigger atherosclerosis by desialylating low-density lipoproteins and increasing their uptake by macrophages. *J. Am. Heart. Assoc.* **10**, e018756.
 8. Мищенко Е.Л., Мищенко А.М., Иванисенко В.А. (2021) Механочувствительные молекулярные взаимодействия в атерогенных районах артерий: развитие атеросклероза. *Вавил. журн. генетики и селекции.* **25**, 552–561.
 9. Yu X., Fu C., Zhang D., Yin K., Tang C. (2013) Foam cells in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta.* **424**, 245–252.
 10. Chistiakov D.A., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. (2016) Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* **20**, 17–28.
 11. Shemiakova T., Ivanova E., Grechko A.V., Gerasimova E.V., Sobenin I.A., Orekhov A.N. (2020) Mitochondrial dysfunction and DNA damage in the context of pathogenesis of atherosclerosis. *Biomedicine.* **8**, 166.
 12. Shemiakova T., Ivanova E., Wu W.K., Kirichenko T.V., Starodubova A.V., Orekhov A.N. (2021) Atherosclerosis as mitochondriopathy: repositioning the disease to help finding new therapies. *Front. Cardiovasc. Med.* **8**, 660473.
 13. Никифоров Н.Г., Грачев А.Н., Собенин И.А., Орехов А.Н., Кжышкова Ю.Г. (2012) Макрофаги и метаболизм липопротеинов в атеросклеротическом поражении. *Патологическая физиология.* **13**, 900–922. www.medline.ru
 14. Bezsonov E.E., Sobenin I.A., Orekhov A.N. (2021) Immunopathology of atherosclerosis and related diseases: focus on molecular biology. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 4080.
 15. Смирнова Л.А., Хасанова З.Б., Ежов М.В., Полевая Т.Ю., Матчин Ю.Г., Балахонова Ю.Г., Собенин И.А., Постнов А.Ю. (2014) Связь мутаций митохондриального генома с атеросклеротическим поражением коронарных и сонных артерий. *Клиницист.* **1**, 34–41.
 16. Remmeriea A., Scott C.L. (2018) Macrophages and lipid metabolism. *Cell. Immunol.* **330**, 27–42.
 17. Miroshnikova V.V., Panteleeva A.A., Pobozheva I.A., Razgildina N.D., Polyakova E.A., Markov A.V., Belyaeva O.D., Berkovich O.A., Baranova E.I., Nazarenko M.S., Puzirev V.P., Pchelina S.N. (2021) ABCA1 and ABCG1 DNA methylation in epicardial adipose tissue of patients with coronary artery disease. *BMC Cardiovasc. Disord.* **21**, 566.
 18. Liberale L., Bonaventura A., Vecchiè A., Matteo C., Dallegri F., Montecucco F., Carbone F. (2017) The role of adipocytokines in coronary atherosclerosis. *Curr. Atherosclerosis Rep.* **19**, 10.
 19. Villarreal-Molina M.T., Antuna-Puente B. (2012) Adiponectin: anti-inflammatory and cardioprotective effects. *Biochimie.* **94**, 2143–2149.
 20. Choi H.M., Doss H.M., Kim K.S. (2020) Multifaceted physiological roles of adiponectin in inflammation and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1219.
 21. van Stijn C.M.W., Kim J., Lusis A.J., Barish G.D., Tangirala R.K. (2015) Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response. *FASEB J.* **29**, 636–649.
 22. Shabalala S.C., Dlodla P.V., Mabasa L., Kappo A.P., Basson A.K., Pfeiffer C., Johnson R. (2020) The effect of adiponectin in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and the potential role of polyphenols in the modulation of adiponectin signaling. *Biomed. Pharmacother.* **131**, 110785.
 23. Lia H., Yub X.H., Ouc X., Ouyang X.P., Tang C.K. (2021) Hepatic cholesterol transport and its role in non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *Prog. Lipid Res.* **83**, 101109.
 24. Christen T., Trompet S., Noordam R., van Klinken J.B., van Dijk K.W., Lamb H.J., Cobbaert C.M., den Heije M., Jazet I.M., Jukema J.W., Rosendaal F.R., de Mutser R. (2018) Sex differences in body fat distribution are related to sex differences in serum leptin and adiponectin. *Peptides.* **107**, 25–31.
 25. Побожьева И.А., Разгильдина Н.Д., Полякова Е.А., Пантелеева А.А., Беляева О.Д., Нифонтов С.Е., Галкина О.В., Колодина Д.А., Беркович О.А., Баранова Е.И., Пчелина С.Н., Мирошникова В.В. (2020) Экспрессия гена адипонектина в эпикардальной и подкожной жировой ткани при ишемической болезни сердца. *Кардиология.* **60**, 62–69.
 26. Jonas M.I., Kurylowicz A., Bartoszewicz Z., Lisik W., Jonas M., Domienik-Karłowicz J., Puzianowska-Kuznicka M. (2017) Adiponectin/resistin interplay in serum and in adipose tissue of obese and normal-weight individuals. *Diabetol. Metab. Syndr.* **9**, 95.
 27. Sadashiv, Tiwari S., Paul B.N., Kumar S., Chandra A., Dhananjai S., Pal M., Negi S. (2013) Adiponectin mRNA in adipose tissue and its association with metabolic risk factors in postmenopausal obese women. *Hormones.* **12**, 119–127.
 28. Разгильдина Н.Д., Бровин Д.Л., Побожьева И.А., Пантелеева А.А., Мирошникова В.В., Беляева О.Д., Нифонтов С.Е., Галкина О.В., Колодина Д.А., Беркович О.А., Баранова Е.И., Пчелина С.Н., Мирошникова В.В. (2018) Экспрессия гена *ADIPOQ* в подкожной и интраабдоминальной жировой ткани у женщин с различной степенью ожирения. *Цитология.* **60**, 531–535.
 29. Liang B., Wang X., Guo X., Yang Z., Bai R., Liu M., Xiao C., Bian Y. (2015) Adiponectin upregulates ABCA1 expression through liver X receptor alpha signaling pathway in RAW 264.7 macrophages. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 450–457.
 30. Furukawa K., Hori M., Ouchi N., Kihara S., Funahashi T., Matsuzawa Y., Miyazaki A., Nakayama H.,

- Horiuchi S. (2004) Adiponectin down-regulates acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 in cultured human monocyte-derived macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 831–836.
31. Yuan B., Huang L., Yan M., Zhang S., Zhang Y., Jin B., Ma Y., Luo Z. (2018) Adiponectin downregulates TNF- α expression in degenerated intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)*. **43**, E381–E389.
 32. Choi H.M., Doss H.M., Kim K.S. (2020) Multifaceted physiological roles of adiponectin in inflammation and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1219.
 33. Ohashi K., Parker J.L., Ouchi N., Higuchi A., Vita J.A., Gokce N., Pedersen A.A., Kalthoff C., Tullin S., Sams A., Summer R., Walsh K. (2010) Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J. Biol. Chem.* **285**, 6153–6160.
 34. Zhang Y., Zhao J., Li R., Lau W.B., Yuan Y., Liang B., Li R., Gao E., Koch W.J., Ma X., Wang Y. (2015) AdipoRon, the first orally active adiponectin receptor activator, attenuates postischemic myocardial apoptosis through both AMPK-mediated and AMPK-independent signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **309**, E275–E282.
 35. Okada-Iwabu M., Iwabu M., Ueki K., Yamauchi T., Kadowaki T. (2015) Perspective of small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Diabetes Metab. J.* **39**, 363–372.
 36. Натвиг Д.Б., Перлманн П., Визгель Х. (1980) *Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика*. Москва: Медицина, 185–201.
 37. Мирошникова В.В., Пантелеева А.А., Баженова Е.А., Демина Е.П., Усенко Т.С., Николаев М.А., Семенова И.А., Неймарк А.Е., Хе Чж., Беляева О.Д., Беркович О.А., Баранова Е.И., Пчелина С.Н. (2016) Регуляция экспрессии генов транспортеров ABCA1 и ABCG1 в интраабдоминальной жировой ткани. *Биомед. химия*. **62**, 283–289.
 38. Okada-Iwabu M., Yamauchi T., Iwabu M., Honma T., Hamagami K., Matsuda K., Yamaguchi M., Tanabe H., Kimura-Someya T., Shirouzu M., Ogata H., Tokuyama K., Ueki K., Nagano T., Tanaka A., Yokoyama S., Kadowaki T. (2013) A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature*. **503**, 493–499.
 39. Tian L., Luo N., Zhu X., Chung B.H., Garvey W.T., Fu Y. (2012) Adiponectin-adipoR1/2-APPL1 signaling axis suppresses human foam cell formation; differential ability of AdipoR1 and AdipoR2 to regulate inflammatory cytokine responses. *Atherosclerosis*. **221**, 66–75.
 40. Tsubakio-Yamamoto K., Matsuura F., Koseki M., Oku H., Sandoval J.C., Inagaki M., Nakatani K., Nakaoka H., Kawase R., Yuasa-Kawase M., Masuda D., Ohama T., Maeda N., Nakagawa-Toyama Y., Ishigami M., Nishida M., Kihara S., Shimomura I., Yamashita S. (2008) Adiponectin prevents atherosclerosis by increasing cholesterol efflux from macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 390–394.
 41. Lee T.H., Christie B.R., van Praag H., Lin K., Ming-Fai Siu P., Xu A., So K., Yau S. (2021) AdipoRon treatment induces a dose-dependent response in adult hippocampal neurogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 2068.
 42. Duan Z., Tu C., Liu Q., Li S., Li Y., Xie P., Li Z. (2020) Adiponectin receptor agonist AdipoRon attenuates calcification of osteoarthritis chondrocytes by promoting autophagy. *J. Cell. Biochem.* **121**, 3333–3344.
 43. Salvator H., Grassin-Delyle S., Brollo M., Couderc L., Abrial C., Vicioni T., Naline E., Devillier P. (2021) Adiponectin inhibits the production of TNF- α , IL-6 and chemokines by human lung macrophages. *Front. Pharmacol.* **12**, 718929.
 44. Mallardo M., Costagliola C., Nigro E., Daniele A. (2021) AdipoRon negatively regulates proliferation and migration of ARPE-19 human retinal pigment epithelial cells. *Peptides*. **146**, 170676.
 45. Messaggio F., Mendonsa A.M., Castellanos J., Nagathihalli N.S., Gorden L., Merchant N.B., VanSaun M.N. (2017) Adiponectin receptor agonists inhibit leptin induced pSTAT3 and *in vivo* pancreatic tumor growth. *Oncotarget*. **8**, 85378–85391.
 46. Ramzan A.A., Bitler B.G., Hicks D., Barner K., Qamar L., Behbakht K., Powell T., Jansson T., Wilson H. (2019) Adiponectin receptor agonist AdipoRon induces apoptotic cell death and suppresses proliferation in human ovarian cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* **461**, 37–46.
 47. Wang S., Wang C., Wang W., Hao Q., Liu Y. (2020) Adiponectin receptor agonist AdipoRon inhibits the proliferation of myeloma cells via the AMPK/autophagy pathway. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. **28**, 171–176.
 48. Akimoto M., Maruyama R., Kawabata Y., Tajima Y., Takenaga K. (2018) Antidiabetic adiponectin receptor agonist AdipoRon suppresses tumour growth of pancreatic cancer by inducing RIPK1/ERK-dependent necroptosis. *Cell Death Dis.* **9**, 804.
 49. Parida S., Siddharth S., Sharma D. (2019) Adiponectin, obesity, and cancer: clash of the bigwigs in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2519.
 50. Nigro E., Daniele A., Salzillo A., Ragone A., Naviglio S., Sapio L. (2021) AdipoRon and other adiponectin receptor agonists as potential candidates in cancer treatments. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 5569.
 51. Mauro L., Pellegrino M., De Amicis F., Ricchio E., Giordano F., Rizza P., Catalano S., Bonofiglio D., Sis-ci D., Panno M.L., Andò S. (2014) Evidences that estrogen receptor α interferes with adiponectin effects on breast cancer cell growth. *Cell Cycle*. **13**, 553–564.
 52. Illiano M., Nigro E., Sapio L., Caiafa I., Spina A., Scudiero O., Bianco A., Esposito S., Mazzeo F., Pedone P.V., Daniele A., Naviglio S. (2017) Adiponectin down-regulates CREB and inhibits proliferation of A549 lung cancer cells. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **45**, 114–120.
 53. Nigro E., Scudiero O., Sarnataro D., Mazzarella G., Sofia M., Bianco A., Daniele A. (2013) Adiponectin affects lung epithelial A549 cell viability counteracting TNF- α and IL-1 β toxicity through AdipoR1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 1145–1153.
 54. Kim A.Y., Lee Y.S., Kim K.H., Lee J.H., Lee H.K., Jang S., Kim S., Lee G.Y., Lee J., Jung S., Chung H.Y., Jeong S., Kim J.B. (2010) Adiponectin represses colon cancer cell proliferation via AdipoR1- and -R2-mediated AMPK activation. *Mol. Endocrinol.* **24**, 1441–1452.
 55. Nigro E., Orlandella F.M., Polito R., Mariniello R.M., Monaco M.L., Mallardo M., De Stefano A.E., Iervolino P.L.C., Salvatore G., Daniele A. (2021) Adiponectin and leptin exert antagonizing effects on proliferation and motility of papillary thyroid cancer cell lines. *J. Physiol. Biochem.* **77**, 237–248.

The Effect of Adiporon on Lipid Metabolism Genes Expression in Human Macrophages

I. A. Pobozeva^{1, 2, *}, K. V. Dracheva^{1, 2}, S. N. Pchelina^{1, 2, 3}, and V. V. Miroshnikova^{1, 2}

¹Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina, Leningrad Region, 188300 Russia

²Pavlov First St.-Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, 197022 Russia

³Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, 197376 Russia

*e-mail: perhaps_to_be@mail.ru

Atherosclerosis is characterized by excessive uptake of cholesterol-rich low-density lipoproteins by the vascular wall macrophages. It leads to macrophage transformation into foam cells, accumulation of lipids in the intima of the arteries, atherosclerotic plaques development and following progression of cardiovascular diseases. Adiponectin, adipose tissue adipokine, has anti-atherogenic and anti-inflammatory effects that are mediated through binding to its receptors – AdipoR1 and AdipoR2. One of the mechanisms of adiponectin anti-atherogenic activity may be the participation in the regulation of reverse cholesterol transport and prevention of foam cells formation. We assumed that AdipoRon, a small-molecule adiponectin receptor agonist, could modulate the reverse cholesterol transport and inflammation genes expression in human macrophages. The aim of the present study was to investigate the effect of various concentrations of AdipoRon on the lipid metabolism *ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3* (*LXRα*), *NR1H2* (*LXRβ*), *PPARG*, *ACAT1* genes expression and inflammation *IL6*, *TNFA*, *TLR4* genes expression in human macrophages. Primary human macrophages and THP-1 macrophages cell line were treated with various concentrations of AdipoRon. Cell viability was measured using the MTS assay. *ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3*, *NR1H2*, *PPARG*, *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4* mRNA levels in the primary human macrophages was assessed using real-time PCR. The increase of *PPARG* and *ABCA1* mRNA levels was shown in the primary human macrophages after 5 and 10 μM AdipoRon treatment for 24 h. At the same time high concentration (20 μM) of AdipoRon has cytotoxic effect on macrophages, especially, on THP-1 cell line. The effect of AdipoRon on human macrophages and the investigation of potential adiponectin receptor agonists is of interest, due to the search for new approaches to the prevention and treatment of atherosclerosis.

Keywords: AdipoRon, *ABCA1*, *PPARG*, reverse cholesterol transport, macrophages, THP-1

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.29

УНИВЕРСАЛЬНАЯ ПАНЕЛЬ ИНСЕРЦИОННО-ДЕЛЕЦИОННЫХ
ПОЛИМОРФИЗМОВ *ChipID106* ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ
ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИЧНОСТИ И БИОЧИП НА ЕЕ ОСНОВЕ

© 2023 г. Д. О. Фесенко^{а, *}, И. Д. Ивановский^б, П. Л. Иванов^с, Е. Ю. Земскова^с, С. А. Поляков^а,
О. Е. Фесенко^д, М. А. Филиппова^а, А. С. Заседателев^а

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

^бООО “Центр исследования ДНК”, Химки, 141402 Россия

^сРоссийский центр судебно-медицинской экспертизы Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Москва, 125284 Россия

^дНаучно-исследовательский институт физики Южного федерального университета,
Ростов-на-Дону, 344090 Россия

*e-mail: deferos@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.12.2022 г.

После доработки 26.12.2022 г.

Принята к публикации 25.01.2023 г.

Предложен новый подход к генетической идентификации личности, включающий панель из 106 инсерционно-делеционных (InDel) полиморфизмов и метод их генотипирования на биологических микрочипах. Такие фундаментальные свойства InDel-маркеров, как малая длина и низкая частота мутирования, обеспечивают им существенные преимущества в экспертной практике перед широко используемыми тандемными повторами (STR). В настоящей работе проанализировано распределение аллелей всех известных InDel-полиморфизмов в пяти крупнейших мировых популяциях (европейской, восточно-азиатской, южно-азиатской, африканской и американской), отобраны маркеры, отвечающие следующим критериям: частота минорного аллеля более 0.30, физическое расстояние между маркерами более 3 млн. п.н., отсутствие во фланкирующих последовательностях полиморфизмов, тандемных повторов и палиндромов, соотношение AT/GC близкое к 1. Сформирована панель из 106 полиморфизмов со средней частотой минорного аллеля 0.396 во всех пяти популяциях. Разработан метод генотипирования панели, включающий одностадийную мультиплексную ПЦР с последующей гибридизацией на биологическом микрочипе. Средняя длина ампликона составила 72 п.н. На выборке из 201 жителя Москвы и Санкт-Петербурга определены основные характеристики сформированной панели: вероятность случайного совпадения, равная 1.89×10^{-43} , потенциал исключения отцовства (CPE) 0.99999999063. Предлагаемый метод представляет собой альтернативу молекулярно-генетической идентификации личности, основанной на вариациях длин STR-локусов.

Ключевые слова: идентификация личности, биочип, криминалистика, InDel-полиморфизмы

DOI: 10.31857/S0026898423040067, **EDN:** QLARZQ

ВВЕДЕНИЕ

Широкое внедрение методов генетической идентификации личности произвело революцию в расследовании преступлений и стало “золотым стандартом” доказательной базы в суде. В частности, выявление преступников с использованием национальной базы генетических данных (вклю-

чая нераскрытые дела прошлых лет) снижает нагрузку на следственные органы и сокращает долю преступников, находящихся на свободе и продолжающих причинять вред обществу, а реабилитация ошибочно осужденных позволяет вернуть свободу невиновным. Предоставляя веские доказательства вины подозреваемых, современные методы генетической идентификации существенно упрощают принятие верных судебных решений.

Согласно принятой в США судебной практике, идентификация считается доказательной, если генотип подозреваемого по выбранному перечню маркеров уникален в популяции, численность

Сокращения: InDel — инсерционно-делеционный полиморфизм; SNP — однонуклеотидный полиморфизм; STR — короткий тандемный повтор; AFR — африканская популяция; AMR — смешанная американская популяция; EAS — восточно-азиатская популяция; EUR — европейская популяция; SAS — южно-азиатская популяция.

которой на порядок превышает население Земли (10^{11}) [1]. В геноме человека в избытке присутствуют полиморфные элементы, комбинация которых позволяет достоверно отличить одного человека от другого. Количественным показателем идентифицирующей способности единичного полиморфизма является вероятность случайного совпадения (MP, *matching probability*), которая вычисляется как сумма квадратов всех возможных его генотипов. Таким образом, чтобы обеспечить указанные судебные критерии, необходимо использовать набор полиморфизмов, комбинированная вероятность случайного совпадения (CMP, *combined matching probability*, вычисляется как произведение MP всех маркеров, входящих в идентифицирующую систему) при использовании которого не превышает 10^{-11} .

В подавляющем большинстве случаев генетические экспертизы проводят с целью идентификации личности и определения родства (чаще всего отцовства). И, если для доказательства идентичности двух образцов достаточно набора полиморфизмов, имеющего $CMP \approx 10^{-11}$, то для достоверного установления родства требуется на 10–20 порядков более высокий идентифицирующий потенциал. Кроме того, чем выше идентифицирующий потенциал, тем больше вероятность найти в национальной генетической базе родственников разыскиваемого лица, что крайне важно для следствия. В силу этого требования к CMP задаются именно экспертизами по установлению родства.

Более 30 лет доминирующим подходом к генетической идентификации личности было определение длины локусов, содержащих короткие tandemные повторы — STR (*short tandem repeats*), например (AATG)_n, где аллели отличаются числом повторяющихся мотивов (*n*). Одна из наиболее распространенных STR-систем, используемая в национальной генетической базе США CODIS, гарантирует определение по 13 основным локусам уникального генетического профиля в масштабах мировой популяции, имея $CMP \approx 10^{-15}$ [2].

Выбор геномной дактилоскопии в пользу STR-маркеров сложился исторически и обусловлен, в основном, ограниченной методической базой в период формирования этого направления криминалистики. Различия между аллелями STR-локусов обусловлены вариациями длины этих локусов, а определение длины фрагментов ДНК по их электрофоретической подвижности является одним из наиболее ранних и широко распространенных методов изучения ДНК, при помощи которого tandemные повторы и были впервые обнаружены [3]. Таким образом, развитие методов идентификации личности по этому пути до определенного момента видится вполне закономерным. Со временем был выявлен суще-

ственный недостаток STR-маркеров — их большая протяженность. В экспертной практике нередко встречаются образцы деградированной ДНК, которые фрагментированы настолько, что длинные локусы не амплифицируются, приводя либо к полному выпадению информации о данном локусе, либо к потере более длинного аллеля и ложной гомозиготности в гетерозиготных образцах. Острота этой проблемы немного снизилась при смене типа tandemных повторов: локусы с минисателлитами заменили на микросателлиты, что позволило сократить среднюю длину локуса [3].

Другой недостаток обусловлен высокой скоростью мутирования в STR-локусах, что создает риск ошибок при определении родства: в каждой десятой–сотой экспертизе истинного отцовства ребенок будет носителем аллеля, отличающегося от родительского. И эту проблему невозможно решить с помощью каких-либо методических приемов, так как она носит фундаментальный характер, связанный с высокой мутабельностью STR: 10^{-2} – 10^{-3} [5, 6]. Оптимальный выход в этой ситуации нам видится в замене используемых полиморфизмов более стабильными.

В качестве альтернативы STR-маркерам для идентификации личности в 1993 году были предложены однонуклеотидные полиморфизмы — SNP [7] — самый распространенный и самый короткий тип геномного полиморфизма. SNP на порядки более консервативны, чем STR: скорость мутирования 2.5×10^{-8} [8], но в силу биаллельности для получения сопоставимого дискриминирующего потенциала количество SNP должно быть в 2.5–4 раза больше, чем STR [9]. Однако это требовало сложных методических решений: высокочувствительной >50-плексной ПЦР и подходящих методов генотипирования, поэтому развитие этот подход на тот момент не получил. Тем не менее, основатель направления A.J. Jeffreys (Сэр Алек Джеффрис) в заключении к своей обзорной публикации, посвященной 20-летию геномной дактилоскопии, возлагал надежды именно на SNP [4]. Идея использовать биаллельные полиморфизмы была положительно воспринята и, благодаря развитию новых методов генотипирования, в начале 2000-х появилась потенциальная возможность ее практической реализации.

Для создания экспертного инструмента на базе SNP или InDel необходимо решить две задачи: из десятков миллионов полиморфизмов собрать панель с требуемыми характеристиками и разработать метод генотипирования, отвечающий практическим задачам криминалистики. В последние два десятилетия опубликован ряд работ, посвященных как отбору маркеров-кандидатов [10–13], так и апробации методов их генотипирования [14], включая оценку применимости в экспертной практике [15–17].

Интересующий нас класс полиморфизмов представлен SNP и короткими InDel, практически равнозначными с точки зрения размеров, информативности, распространенности в геноме и мутабельности. Однако, принимая во внимание, что наиболее перспективным методом их генотипирования является гибридизационный анализ амплифицированных фрагментов, предпочтительнее использовать короткие InDel, так как в сравнении с SNP дискриминация аллелей InDel надежнее в силу более явных различий в температуре плавления совершенных и несовершенных дуплексов.

С 2009 г. предприняты десятки попыток сформировать InDel-панель для решения экспертных задач в криминалистике. В первых публикациях, посвященных использованию этого типа полиморфизмов в судебно-генетической экспертизе, предложены панели из 38 [18], 33 InDel [19], 49 InDel для глобальной панели [20]; за последние годы китайскими исследователями предложены панели из 12 [21], 32 [22], 35 [23], 47 [24], 60 [17] InDel-полиморфизмов.

Из всех опубликованных подходов к решению данной проблемы только один завершился созданием коммерческого продукта. Он получил название DIPplex® (“Qiagen”, США) и представляет собой набор реагентов для генотипирования панели из 30 InDel-полиморфизмов посредством капиллярного электрофореза [25]. Около сотни публикаций, посвященных апробации DIPplex® на различных популяциях мира, свидетельствуют о востребованности этого направления в криминалистике, в первую очередь, благодаря возможности генотипирования деградированных образцов (средняя длина ампликона в DIPplex® — 114 п.н.). DIPplex® был разработан как расходный материал под имеющееся в большинстве экспертных лабораторий оборудование для STR-типирования. Это должно было облегчить внедрение метода в практику, однако он не получил широкого распространения, и ни одна страна мира не использует его для создания национальной базы генетических данных. По-видимому, это связано с тем, что, несмотря на достаточность идентифицирующего потенциала ($CMR \leq 2.83 \times 10^{-13}$), достоверность установления родства крайне низка: CPE (combined probability of exclusion — вероятность исключения, основной показатель, используемый при определении родства) составляет всего 0.998, иначе говоря, кровное родство первой степени с исследуемым будет допускаться для каждого пятисотого случайного индивида.

Причина, по которой ни одна из разработок не доведена до внедрения на национальном уровне ни в одной стране, на наш взгляд, комплексная. Она состоит в отсутствии как универсальной панели биаллельных полиморфизмов, имеющей до-

статочный идентифицирующий потенциал во всех мировых популяциях, так и метода ее мультиплексного генотипирования, обладающего требуемыми в экспертной практике характеристиками. В настоящей работе нами предпринята попытка решить эту задачу. При формировании панели маркеров мы учли опыт предыдущих работ и требования, предъявляемые современным экспертно-криминалистическим научным сообществом к аналитическим возможностям систем генетической идентификации. В качестве метода генотипирования сформированной панели маркеров мы использовали развитый в ИМБ РАН оригинальный подход, представляющий собой мультиплексную ПЦР с последующим гибридизационным анализом на гидрогелевых биологических микрочипах. Для предварительной оценки аналитических характеристик разработанного инструмента, который мы назвали *ChipID106*, исследована выборка образцов ДНК российской популяции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Отбор InDel-полиморфизмов. Для первичного отбора кандидатов написан макрос для MS Excel, анализирующий файлы gvcf исходными данными *1000 Genomes Project*, размещенными на FTP-сервере геномного браузера Ensemble [http://ftp.ensembl.org/pub/grch37/release-90/variation/gvf/homo_sapiens]. Заданы следующие критерии отбора: полиморфизм должен быть инсерцией или делецией и иметь частоту минорного аллеля ≥ 0.30 во всех пяти популяциях (AFR, AMR, EUR, SAS, EAS). В результате был сформирован пул из 12375 InDel-полиморфизмов. При вторичном отборе исключили InDel, входящие в состав тандемных повторов и полинуклеотидов, что сократило пул до 1395. На третьем этапе для снижения проблем при дизайне специфичных праймеров из списка были удалены кандидаты, содержащие тандемные повторы и полинуклеотиды во фланкирующей области (± 50 п.н. от полиморфизма), либо представляющие собой AT- или GC-богатые регионы. Оставшиеся претенденты были разбиты на кластеры, исходя из их расположения на хромосоме, и на финальном этапе отбор проводили с учетом проверки уникальности фланкирующих последовательностей по BLAST и минимального расстояния до следующего полиморфизма более 3 млн.п.н. Окончательный перечень составил 106 полиморфизмов (табл. 1). Номенклатура полиморфизмов и их координаты указаны согласно сборке GRCh38.p13.

Образцы ДНК. В работе использовали 201 образец ДНК от неродственных совершеннолетних доноров (100 мужчин и 101 женщина), проживающих в Москве, Московской области и Санкт-Петербурге. Концентрацию ДНК измеряли спек-

Таблица 1. Инсерционно-делеционные полиморфизмы, вошедшие в панель *Chip ID106*, частоты аллелей и генетическое разнообразие в российской популяции по результатам настоящего исследования и в пяти основных популяциях по данным *1000 Genome Project*

№	ID полиморфизма	Название в системе <i>ChipID</i>	Положение	Алель	MA*	L**, п.н.	Частоты генотипов и аллелей в российской популяции ($N=201$), F_0				MP	Частота минорного аллеля в основных мировых макропопуляциях, F_0				
							In/In	In/Del	Del/Del	In	Del	EAS	EUR	AMR	SAS	AFR
1	rs10617833	CID.01-042	1:41899280	TCC/-	Del	55	0.443	0.388	0.169	0.637	0.363	0.398	0.374	0.401	0.331	0.476
2	rs11394524	CID.01-120	1:119994503	G/-	Del	66	0.179	0.408	0.413	0.383	0.617	0.414	0.412	0.496	0.318	0.316
3	rs72082809	CID.01-155	1:154776010	GTA/-	Del	65	0.210	0.580	0.210	0.500	0.500	0.336	0.498	0.326	0.404	0.495
4	rs35379245	CID.01-171	1:170771419	AG/-	In	62	0.144	0.448	0.408	0.368	0.632	0.388	0.327	0.376	0.482	0.398
5	rs71107464	CID.01-192	1:191712777	AAT/-	Del	68	0.353	0.483	0.164	0.595	0.405	0.385	0.340	0.421	0.473	0.489
6	rs66765111	CID.01-208	1:207842739	ATTTCAGTTTCTT	Del	65	0.455	0.440	0.105	0.675	0.325	0.412	0.332	0.381	0.320	0.473
7	rs35126101	CID.01-223	1:223222802	CGAG/-	Del	64	0.458	0.433	0.109	0.674	0.326	0.409	0.369	0.319	0.349	0.473
8	rs34450453	CID.01-240	1:239878518	TGG/-	In	84	0.191	0.437	0.372	0.410	0.590	0.366	0.400	0.426	0.454	0.325
9	rs10693974	CID.02-012	2:11733545	ACTC/-	In	61	0.095	0.433	0.473	0.311	0.689	0.420	0.436	0.388	0.484	0.471
10	rs66610049	CID.02-036	2:36026644	CTGT/-	Del	74	0.338	0.473	0.189	0.575	0.425	0.374	0.448	0.373	0.388	0.320
11	rs7616890	CID.02-043	2:42762877	ATA/-	Del	69	0.483	0.388	0.129	0.677	0.323	0.400	0.346	0.374	0.324	0.405
12	rs72339906	CID.02-080	2:80191212	AG/-	Del	58	0.328	0.517	0.154	0.587	0.413	0.399	0.431	0.435	0.454	0.394
13	rs5832955	CID.02-102	2:101846803	G/-	In	71	0.217	0.455	0.328	0.444	0.556	0.362	0.405	0.427	0.440	0.309
14	rs111665673	CID.02-216	2:215632035	AGAG/-	In	76	0.210	0.490	0.300	0.455	0.545	0.374	0.343	0.398	0.427	0.375
15	rs7993635	CID.02-232	2:232275593	C/-	In	76	0.189	0.393	0.418	0.386	0.614	0.365	0.419	0.423	0.347	0.320
16	rs35926392	CID.03-016	3:16145615	GC/-	Del	66	0.338	0.493	0.169	0.585	0.415	0.386	0.362	0.474	0.441	0.372
17	rs139738417	CID.03-031	3:30759018	CATAAGC/-	In	75	0.194	0.507	0.299	0.448	0.552	0.384	0.321	0.354	0.349	0.451
18	rs7495895	CID.03-082	3:82011691	G/-	Del	70	0.368	0.458	0.174	0.597	0.403	0.375	0.456	0.393	0.406	0.343
19	rs35291341	CID.03-100	3:99843746	CT/-	In	64	0.154	0.438	0.408	0.373	0.627	0.382	0.350	0.367	0.432	0.492
20	rs35464243	CID.03-107	3:106930411	CAC/-	In	72	0.109	0.388	0.502	0.303	0.697	0.415	0.477	0.330	0.363	0.359
21	rs10540628	CID.03-124	3:123992597	AC/-	Del	67	0.313	0.488	0.199	0.557	0.443	0.376	0.330	0.424	0.455	0.465
22	rs59170274	CID.04-027	4:26821887	C/-	Del	65	0.338	0.507	0.154	0.592	0.408	0.396	0.371	0.405	0.483	0.350
23	rs34184705	CID.04-045	4:44871992	G/-	Del	59	0.398	0.463	0.139	0.629	0.371	0.392	0.310	0.469	0.334	0.433
24	rs56281469	CID.04-057	4:57360344	CT/-	In	66	0.085	0.338	0.577	0.254	0.746	0.455	0.476	0.312	0.484	0.387
25	rs35932180	CID.04-086	4:85828903	CT/-	In	47	0.129	0.428	0.443	0.343	0.657	0.396	0.366	0.351	0.473	0.470
26	rs72273695	CID.04-113	4:112718708	ATCTGCATTG/-	Del	106	0.537	0.393	0.070	0.734	0.266	0.448	0.421	0.302	0.326	0.306
27	rs70938781	CID.04-138	4:138358907	CCTACCTTG-TAGCT/-	In	62	0.205	0.500	0.295	0.455	0.545	0.379	0.418	0.490	0.448	0.409
28	rs3067059	CID.04-178	4:178345624	ACTTG/-	In	77	0.090	0.512	0.398	0.346	0.654	0.429	0.368	0.331	0.316	0.328
29	rs61235135	CID.05-003	5:3358309	C/-	Del	62	0.423	0.448	0.129	0.647	0.353	0.396	0.379	0.395	0.348	0.382

Таблица 1. Продолжение

№	ID поли-морфизма	Название в системе <i>ChipID</i>	Положение	Аллель	MA*	L**, п.н.	Частоты генотипов и аллелей в российской популяции (<i>N</i> = 201), <i>F</i> ₀					MP	Частота минорного аллеля в основных мировых макропопуляциях, <i>F</i> ₀				
							In/In	In/Del	Del/Del	In	Del		EAS	EUR	AMR	SAS	AFR
30	rs34159280	CID.05-014	5:13705943	CTTCACAAGA–	Del	72	0.448	0.478	0.075	0.687	0.313	0.434	0.393	0.393	0.405	0.452	0.330
31	rs142490175	CID.05-064	5:63882726	GAAAG/–	Del	96	0.403	0.458	0.139	0.632	0.368	0.391	0.336	0.340	0.380	0.404	0.413
32	rs138124389	CID.05-087	5:86744866	TAGACACTG-CAGACTAC/–	In	70	0.179	0.507	0.313	0.433	0.567	0.388	0.465	0.416	0.412	0.449	0.433
33	rs34990478	CID.05-095	5:95002440	CAT/–	Del	65	0.378	0.453	0.169	0.604	0.396	0.377	0.319	0.382	0.370	0.365	0.435
34	rs6149192	CID.05-115	5:114944029	GACCCTAAACA-GAG/–	Del	72	0.234	0.473	0.294	0.470	0.530	0.364	0.478	0.489	0.402	0.454	0.415
35	rs71621395	CID.05-119	5:118963126	AAC/–	Del	85	0.408	0.453	0.139	0.634	0.366	0.391	0.487	0.441	0.379	0.491	0.327
36	rs66881681	CID.05-132	5:131813412	AGG–	Del	77	0.423	0.483	0.095	0.664	0.336	0.421	0.384	0.333	0.353	0.431	0.470
37	rs10701589	CID.05.140	5:140036116	TGAT /–	In	71	0.184	0.522	0.294	0.445	0.555	0.393	0.452	0.431	0.363	0.451	0.384
38	rs3832355	CID.05-150	5:150038428	ACTC/–	Del	65	0.353	0.502	0.144	0.604	0.396	0.398	0.331	0.417	0.494	0.406	0.473
39	rs10560231	CID.05-180	5:179630655	ATG/–	Del	92	0.308	0.463	0.229	0.540	0.460	0.362	0.471	0.412	0.460	0.411	0.396
40	rs35948562	CID.06-007	6:7387821	CA/–	In	73	0.095	0.488	0.418	0.338	0.662	0.421	0.450	0.385	0.463	0.366	0.497
41	rs56071028	CID.06-016	6:15988568	C/–	In	73	0.159	0.483	0.358	0.400	0.600	0.387	0.455	0.404	0.415	0.363	0.426
42	rs10529292	CID.06-031	6:31409184	ACA/–	In	64	0.114	0.403	0.483	0.316	0.684	0.408	0.304	0.330	0.427	0.312	0.470
43	rs68133212	CID.06-072	6:71745181	TCT/–	Del	76	0.463	0.418	0.119	0.672	0.328	0.403	0.384	0.347	0.402	0.408	0.346
44	rs11267328	CID.06-078	6:77750524	ACT-CAGTTCATGA/–	Del	69	0.388	0.488	0.124	0.632	0.368	0.404	0.325	0.447	0.346	0.344	0.465
45	rs3831872	CID.06-088	6:88183335	CAGTTAGAAG-GAACACT/–	In	61	0.159	0.403	0.438	0.361	0.639	0.379	0.306	0.346	0.487	0.390	0.435
46	rs56343259	CID.06-096	6:96279205	GCCC/–	In	56	0.119	0.468	0.413	0.353	0.647	0.403	0.347	0.354	0.366	0.397	0.427
47	rs141141409	CID.06-125	6:124946472	GTT/–	In	64	0.090	0.485	0.425	0.333	0.668	0.424	0.411	0.358	0.318	0.303	0.414
48	rs57057239	CID.06-135	6:135024728	GAAT/–	Del	95	0.358	0.522	0.119	0.619	0.381	0.415	0.442	0.359	0.356	0.447	0.356
49	rs6149835	CID.06-144	6:143819409	TTGAA-CAAAGTCC/-	Del	76	0.468	0.413	0.119	0.674	0.326	0.403	0.482	0.339	0.440	0.359	0.478
50	rs11278298	CID.06-159	6:158930905	TCATTTCAG/–	Del	71	0.448	0.433	0.119	0.664	0.336	0.402	0.364	0.366	0.405	0.491	0.487
51	rs35345873	CID.07-010	7:10352781	G/–	In	85	0.149	0.483	0.368	0.391	0.609	0.391	0.379	0.407	0.334	0.408	0.356
52	rs68111476	CID.07-023	7:23027696	TTTGCCTGATA-ACC/-	Del	66	0.420	0.445	0.135	0.643	0.358	0.393	0.468	0.363	0.329	0.347	0.358
53	rs1610906	CID.07-082	7:81725951	TAT/–	In	72	0.219	0.517	0.264	0.478	0.522	0.385	0.393	0.437	0.450	0.380	0.346
54	rs57943214	CID.07-097	7:96765416	GTATTTG/–	In	82	0.100	0.428	0.473	0.313	0.687	0.416	0.468	0.351	0.412	0.401	0.470
55	rs3216282	CID.07-126	7:126081845	AGAT/–	Del	74	0.482	0.437	0.081	0.701	0.299	0.430	0.379	0.318	0.392	0.369	0.340
56	rs35575707	CID.07-140	7:140101500	AG/–	Del	68	0.418	0.393	0.189	0.614	0.386	0.365	0.495	0.399	0.370	0.406	0.486

Таблица 1. Продолжение

№	ID полиморфизма	Название в системе <i>ChipID</i>	Положение	Аллель	MA*	L**, п.н.	Частоты генотипов и аллелей в российской популяции ($N=201$), F_0					MP	Частота минорного аллеля в основных мировых макропопуляциях, F_0				
							In/In	In/Del	Del/Del	In	Del		EAS	EUR	AMR	SAS	AFR
57	rs71520104	CID.07-153	7:153064801	TTTCTGTGA-CAGTG/-	In	93	0.139	0.431	0.426	0.356	0.644	0.387	0.389	0.425	0.350	0.395	0.424
58	rs35146459	CID.08-002	8:1788862	G/-	Del	55	0.323	0.537	0.139	0.592	0.408	0.413	0.377	0.385	0.383	0.332	0.338
59	rs35604660	CID.08-059	8:59055597	GT/-	In	81	0.194	0.502	0.303	0.445	0.555	0.382	0.342	0.411	0.458	0.355	0.378
60	rs34067160	CID.08-065	8:65072454	AA/-	In	96	0.189	0.438	0.373	0.408	0.592	0.367	0.471	0.427	0.435	0.418	0.392
61	rs35679778	CID.08-104	8:103906808	C/-	In	71	0.144	0.453	0.403	0.371	0.629	0.388	0.432	0.398	0.486	0.473	0.456
62	rs11323264	CID.08-127	8:126654202	G/-	Del	44	0.373	0.448	0.179	0.597	0.403	0.372	0.475	0.414	0.365	0.443	0.341
63	rs6150855	CID.08-141	8:140579696	AGGCTGAGCAG/-	Del	62	0.428	0.443	0.129	0.649	0.351	0.396	0.357	0.356	0.326	0.391	0.414
64	rs56962291	CID.09-072	9:72269223	CTCCT/-	In	81	0.104	0.473	0.423	0.341	0.659	0.413	0.486	0.385	0.432	0.460	0.315
65	rs34499887	CID.09-087	9:86660018	G/-	Del	50	0.234	0.557	0.209	0.512	0.488	0.409	0.493	0.463	0.352	0.465	0.365
66	rs59923204	CID.09-109	9:108837145	C/-	Del	54	0.473	0.368	0.159	0.657	0.343	0.384	0.409	0.347	0.373	0.457	0.362
67	rs55952736	CID.09-117	9:117187806	TAGC/-	In	76	0.095	0.687	0.219	0.438	0.562	0.528	0.329	0.335	0.378	0.301	0.379
68	rs71953876	CID.09-135	9:135380181	CCAC/-	Del	63	0.418	0.458	0.124	0.647	0.353	0.400	0.352	0.305	0.330	0.319	0.469
69	rs10552811	CID.10-071	10:70563084	GC/-	Del	79	0.323	0.473	0.204	0.560	0.440	0.370	0.302	0.467	0.320	0.336	0.405
70	rs5786663	CID.10-085	10:84613642	TA/-	Del	70	0.443	0.403	0.154	0.644	0.356	0.382	0.391	0.394	0.377	0.398	0.320
71	rs140576359	CID.10-118	10:117733203	CCGATATT/-	Del	71	0.313	0.542	0.144	0.585	0.415	0.413	0.409	0.412	0.414	0.373	0.429
72	rs10544160	CID.10-128	10:128080091	TA/-	Del	74	0.343	0.483	0.174	0.585	0.415	0.381	0.349	0.410	0.428	0.351	0.303
73	rs10583916	CID.11-006	11:5870839	TG/-	Del	94	0.404	0.481	0.115	0.644	0.356	0.408	0.460	0.369	0.314	0.372	0.362
74	rs113764748	CID.11-020	11:19528202	TAGC/-	Del	71	0.264	0.542	0.194	0.535	0.465	0.401	0.435	0.452	0.415	0.411	0.327
75	rs74933486	CID.11-083	11:83237025	CA/-	Del	86	0.333	0.517	0.149	0.592	0.408	0.401	0.458	0.458	0.313	0.461	0.437
76	rs35847449	CID.11-094	11:94191207	C/-	In	57	0.100	0.502	0.398	0.351	0.649	0.421	0.403	0.373	0.406	0.412	0.335
77	rs56221618	CID.11-111	11:111065696	AAG/-	Del	61	0.443	0.483	0.075	0.684	0.316	0.435	0.403	0.356	0.346	0.471	0.499
78	rs11394480	CID.11-135	11:134778510	G/-	In	47	0.179	0.403	0.418	0.381	0.619	0.369	0.465	0.349	0.463	0.301	0.408
79	rs10533848	CID.12-013	12:12861586	TC/-	Del	77	0.224	0.512	0.264	0.480	0.520	0.382	0.450	0.445	0.437	0.465	0.312
80	rs10689649	CID.12-090	12:89969919	ACTC/-	In	93	0.104	0.473	0.423	0.341	0.659	0.413	0.362	0.380	0.303	0.433	0.424
81	rs56392226	CID.13-040	13:40028153	AATGC/-	Del	81	0.383	0.498	0.119	0.632	0.368	0.409	0.365	0.412	0.424	0.442	0.359
82	rs59502417	CID.13-087	13:87305513	TGTC/-	Del	90	0.443	0.448	0.109	0.667	0.333	0.409	0.313	0.406	0.431	0.346	0.313
83	rs55812371	CID.14-056	14:56159616	ACATGTTCCA/-	In	69	0.095	0.458	0.448	0.323	0.677	0.419	0.367	0.343	0.310	0.427	0.307
84	rs3085775	CID.14-091	14:91332415	AGTG/-	In	87	0.174	0.498	0.328	0.423	0.577	0.386	0.407	0.437	0.474	0.368	0.329
85	rs67320356	CID.15-067	15:66925590	GAGTTT/-	Del	70	0.423	0.448	0.129	0.647	0.353	0.396	0.349	0.359	0.398	0.477	0.368
86	rs3995812	CID.15-098	15:97502107	TTAC/-	In	61	0.100	0.488	0.413	0.343	0.657	0.418	0.401	0.334	0.401	0.307	0.307

Таблица 1. Окончание

№	ID поли-морфизма	Название в системе <i>ChipID</i>	Положение	Аллель	MA*	L**, п.н.	Частоты генотипов и аллелей в российской популяции (<i>N</i> = 201), <i>F</i> ₀					MP	Частота минорного аллеля в основных мировых макропопуляциях, <i>F</i> ₀				
							In/In	In/Del	Del/Del	In	Del		EAS	EUR	AMR	SAS	AFR
87	rs34436424	CID.16-012	16:11820079	GC/–	Del	80	0.328	0.478	0.194	0.567	0.433	0.374	0.319	0.499	0.304	0.356	0.467
88	rs3841767	CID.16-024	16:24136639	CC/–	Del	68	0.338	0.537	0.124	0.607	0.393	0.419	0.433	0.415	0.455	0.340	0.428
89	rs34816330	CID.16-076	16:76041094	C/–	Del	60	0.289	0.562	0.149	0.570	0.430	0.422	0.330	0.485	0.424	0.433	0.421
90	rs5821134	CID.17-057	17:56529684	ACTC/–	In	78	0.219	0.493	0.289	0.465	0.535	0.374	0.308	0.454	0.318	0.446	0.478
91	rs141730340	CID.17-081	17:80625313	CCTGTGCAGCG/–	Del	95	0.408	0.498	0.095	0.657	0.343	0.423	0.419	0.311	0.304	0.348	0.363
92	rs35452393	CID.18-028	18:27684881	AT/–	In	56	0.343	0.463	0.194	0.575	0.425	0.370	0.472	0.490	0.318	0.458	0.432
93	rs33990768	CID.18-048	18:48155140	G/–	Del	58	0.244	0.517	0.239	0.502	0.498	0.384	0.362	0.481	0.375	0.410	0.441
94	rs112877961	CID.19-029	19:29495432	C/–	Del	59	0.393	0.507	0.100	0.647	0.353	0.422	0.445	0.393	0.411	0.468	0.492
95	rs35894782	CID.20-020	20:20384749	AATAG/–	Del	78	0.428	0.478	0.095	0.667	0.333	0.420	0.366	0.410	0.369	0.348	0.440
96	rs73622051	CID.20-038	20:37610825	TTTA/–	Del	65	0.438	0.453	0.109	0.664	0.336	0.409	0.430	0.347	0.370	0.340	0.347
97	rs34198404	CID.20-056	20:56104372	GTG/–	Del	76	0.338	0.478	0.184	0.577	0.423	0.376	0.446	0.451	0.336	0.362	0.478
98	rs10583984	CID.21-039	21:39042013	AG/–	Del	85	0.368	0.507	0.124	0.622	0.378	0.409	0.415	0.384	0.441	0.318	0.315
99	rs35282131	CID.21-044	21:43822529	ACAT/–	Del	67	0.328	0.498	0.174	0.577	0.423	0.386	0.457	0.370	0.344	0.389	0.466
100	rs60228580	CID.22-033	22:33384984	G/–	In	76	0.169	0.488	0.343	0.413	0.587	0.384	0.358	0.401	0.411	0.424	0.425
101	rs35997669	CID.X-005	X:4674479	C/–	Del	67	Σ	0.356	0.248	0.391	0.483	0.517	0.341	0.328	0.366	0.342	0.390
102	rs7522085	CID.X-029	X:28920529	C/–	Del	75	M	0.510	–	0.490	0.510	0.490	–	–	–	–	–
							Ж	0.208	0.495	0.297	0.455	0.545	–	–	–	–	–
103	rs202172626	CID.X-082	X:82244300	CTTAA/–	Del	109	Σ	0.446	0.252	0.297	0.575	0.425	0.351	0.335	0.336	0.391	0.348
							M	0.590	–	0.410	0.590	0.410	–	–	–	–	–
104	rs34991528	CID.X-094	X:94398625	C/–	In	80	Ж	0.307	0.505	0.188	0.559	0.441	–	–	–	–	–
							Σ	0.584	0.208	0.203	0.692	0.308	0.426	0.377	0.486	0.450	0.317
104	rs34991528	CID.X-094	X:94398625	C/–	In	80	M	0.680	–	0.320	0.680	0.320	–	–	–	–	–
							Ж	0.495	0.416	0.089	0.703	0.297	0.360	0.404	0.419	0.438	0.444
105	rs35020323	CID.X-137	X:136803649	TATT/–	In	64	Σ	0.257	0.262	0.475	0.391	0.609	0.360	0.404	0.419	0.438	0.444
							M	0.400	–	0.600	0.400	0.600	–	–	–	–	–
105	rs35020323	CID.X-137	X:136803649	TATT/–	In	64	Ж	0.119	0.525	0.356	0.381	0.619	–	–	–	–	–
							Σ	0.361	0.257	0.376	0.493	0.507	0.338	0.302	0.415	0.478	0.441
106	rs10689407	CID.X-140	139879947	AT/–	Del	68	M	0.430	–	0.570	0.430	0.570	–	–	–	–	–
							Ж	0.297	0.515	0.188	0.554	0.446	–	–	–	–	–
106	rs10689407	CID.X-140	139879947	AT/–	Del	68	Σ	0.500	0.238	0.252	0.625	0.375	0.370	0.415	0.400	0.370	0.410
							M	0.610	–	0.390	0.610	0.390	–	–	–	–	–
106	rs10689407	CID.X-140	139879947	AT/–	Del	68	Ж	0.400	0.480	0.120	0.640	0.360	–	–	–	–	–

*MA – аллель, минорный во всех популяциях.
**L – длина ампликона; указана для ПЦР-продукта, содержащего аллель Del.

трофотометрически (5–500 нг/мкл), но не приводили к единым значениям.

Мультиплексная праймерная система. На стадии подбора ПЦР-праймеров основная задача состояла в минимизации размера ампликона. В табл. 1 приведены значения длин каждого локуса, среднее значение составило 72 п.н. В ходе экспериментальной оценки работоспособности праймеров и подбора условий ПЦР использовали несколько образцов свежeweделенной ДНК в концентрации 0.5 и 0.05 нг/мкл каждый. После достижения стабильной работы мультиплексной ПЦР проведено генотипирование образцов исследуемой выборки из российской популяции.

Амплификация. ПЦР проводили на амплификаторе SpeedCycler (“AnalytikJena”, Германия) в 25 мкл смеси следующего состава: ПЦР-буфер с полимеразой HotTaqMulti, 4 ед. акт. (“Асфоген”, Россия), 5 mM MgSO₄, 0.2 mM каждого из dNTP (“Сибэнзим”, Россия), смесь праймеров, 200 пмоль универсального праймера Су5-TCATTGGATCT-CATTA, 0.05–500 нг геномной ДНК. Полимеразу активировали (2 мин при 95°C) и проводили на первом этапе 50 циклов амплификации (95°C – 20 с, 65°C – 30 с, 66°C – 30 с, 69°C – 40 с), затем на втором этапе проводили 40 циклов амплификации (95°C – 20 с, 56°C – 30 с, 72°C – 30 с).

Схема биочипа. Биочип изготовлен согласно схеме, приведенной на рис. 1а. Аллель-специфичные олигонуклеотидные зонды нанесены слева направо в порядке расположения в геноме соответствующих им InDel-полиморфизмов (от начала первой хромосомы до конца X-хромосомы). Каждому полиморфизму на биочипе соответствует пара вертикально расположенных ячеек: верхняя ячейка содержит зонд для аллеля с инсерцией, нижняя – с делецией. ПЦР-праймеры и ДНК-зонды произведены компанией “Lumiprobe” (Россия). Гидрогелевые биочипы изготавливали по оригинальной технологии ИМБ РАН в беспылевых помещениях с использованием пинового робота Qarray2 (“Genetix”, Великобритания), согласно ранее описанной методике [26].

Гибридизация. Гибридизационную камеру биочипа заполняли смесью следующего состава: 25% формамида, 5× SSPE, 50 об. % ПЦР-продукта. После инкубации (10 ч, 37°C) и отмывки (10 мин в 1× SSPE при комнатной температуре) биочипы промывали дистиллированной водой, высушивали сжатым воздухом, помещали в портативный анализатор “Пикодетект” (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Москва, Россия), флуоресценцию регистрировали с экспозицией 0.5–2 с в формате SPE. На рис. 1 приведены примеры таких флуоресцентных изображений четырех образцов ДНК (рис. 1б–1д). Изображения анализировали с ис-

пользованием программ ImaGel 2.0 и ImaGelStudio (ИМБ РАН). Результатом автоматической обработки каждого биочипа был текстовый файл с генотипом образца.

Статистический анализ. Частоты аллелей и соответствие равновесию Харди–Вайнберга оценивали при помощи онлайн-программы <https://genecalc.pl/hardy-weinberg-page>. Основные экспертные характеристики сформированной панели (MP, PD, CPD, PE, CPE) вычисляли по общеизвестным формулам в программе PowerStats v12.xls (“Promega Corp.”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стартовой задачей при создании инструмента для генетической идентификации личности, является выбор маркеров, которые обеспечат требуемый дискриминирующий потенциал всей системы. Добавление каждого маркера увеличивает мультиплексность ПЦР, что негативно сказывается на чувствительности и стабильности работы тест-системы. Чтобы минимизировать количество маркеров, обеспечивающих достижение цели, следует задать оптимальные параметры их первичного отбора.

Параметры отбора маркеров

Базовым параметром, определяющим дискриминирующий потенциал биаллельного полиморфизма, является частота минорного аллеля (MAF), идеальное значение MAF составляет 0.5. В связи с отсутствием в геноме нужного количества полиморфизмов, обладающих такими характеристиками, причем во всех мировых макропопуляциях, требуется найти компромиссный диапазон MAF, которому будет соответствовать некий пул, из которого можно будет провести дальнейший отбор по критериям второго порядка. Чем менее строго задано значение MAF, тем больший выбор маркеров возникает у исследователя, но тем меньшим итоговым дискриминирующим потенциалом будет обладать панель. В других аналогичных работах задавалось значение $MAF \geq 0.20$ [20, 27] и менее [28]. Мы попытались провести отбор маркеров, отвечающих более жестким критериям: $MAF \geq 0.30$.

При отборе маркеров-кандидатов мы использовали данные международного исследования *1000 Genomes Project* о частотах аллелей и генотипов в популяциях AFR ($n = 661$), AMR ($n = 347$), EUR ($n = 503$), SAS ($n = 489$) и EAS ($n = 504$). Частота минорного аллеля маркеров (табл. 1) в пяти рассматриваемых популяциях составила 0.301–0.499. Усредненная частота всех минорных аллелей в каждой популяции составила 0.394–0.402. Замысел планируемой работы по выбору InDel-полиморфизмов состоял в том, что при соблюде-

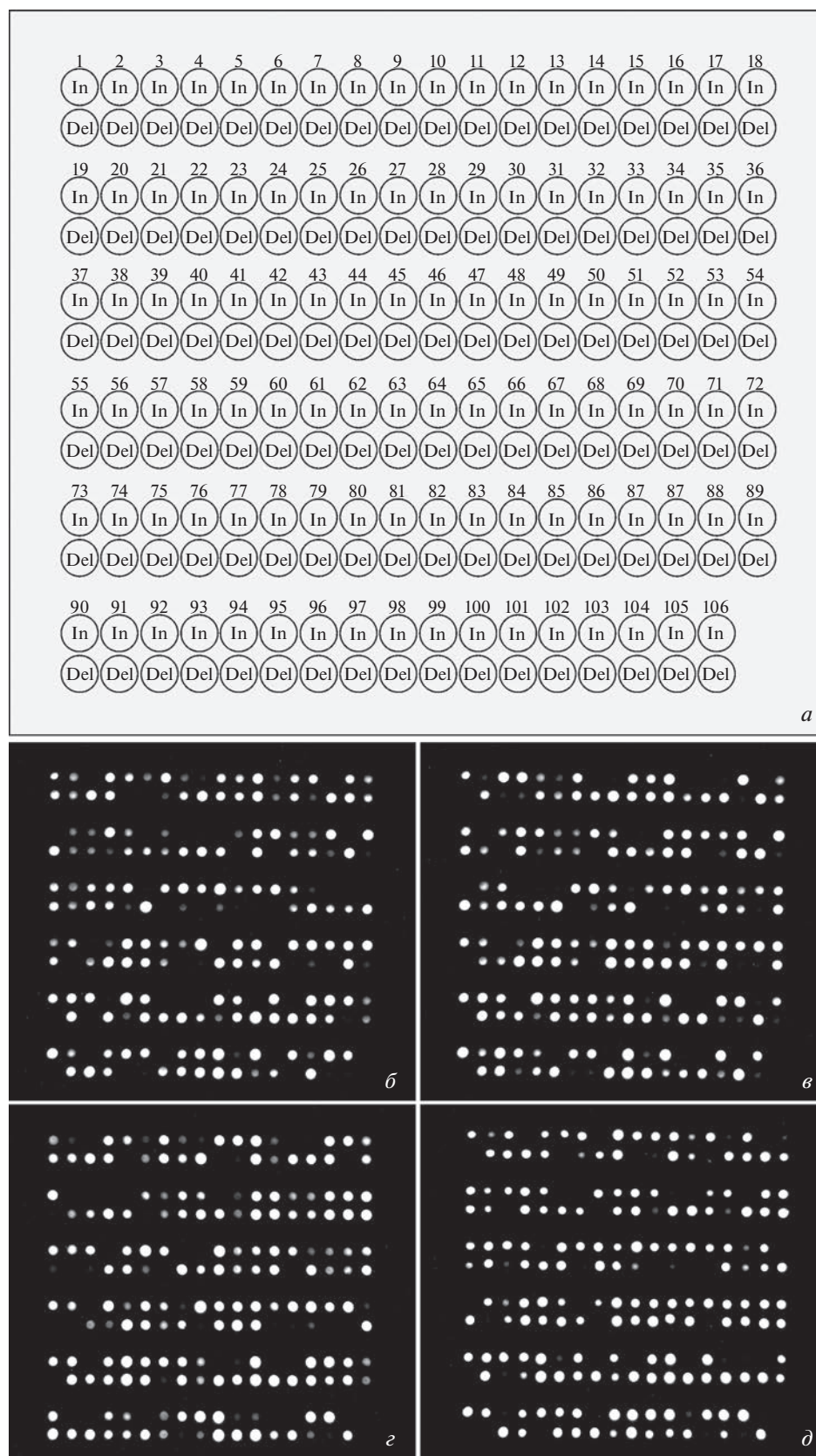


Рис. 1. Схема расположения ДНК-зондов на биологическом микрочипе *ChipID106* (а) и флуоресцентные изображения биочипа, полученные в результате генотипирования четырех неродственных образцов ДНК (б–д). Цифры над каждой парой ячеек соответствуют номеру полиморфизма из табл. 1. Обозначения внутри ячеек соответствуют аллелям полиморфизмов.

нии заданной частоты минорного аллеля во всех пяти макропопуляциях, дискриминирующий потенциал существенно не уменьшится и для более локальных субпопуляций, к которым потенциально может быть применен разрабатываемый метод. Это придаст методу универсальность в глобальном масштабе.

После формирования первичного пула из 12375 InDel, отобранных по критерию $MAF \geq 0.30$, в несколько этапов проведен отсев полиморфизмов, генотипирование которых посредством гибридизационного анализа будет технически затруднительно, либо невозможно. В результате последовательного отбора по указанным критериям создана панель из 106 InDel-полиморфизмов.

Характеристики маркеров

Панель состоит из 106 InDel, 100 из которых расположены на хромосомах 1–22 и шесть – на X-хромосоме. Физическое расстояние между соседними маркерами варьирует от 3 до 113.8 млн.п.н., среднее расстояние 24 млн.п.н., что исключает возможное сцепленное наследование маркеров. Наличие шести маркеров на X-хромосоме дает дополнительные возможности определения родства в некоторых сложных случаях [29].

Размер InDel-полиморфизмов варьирует от 1 до 18 п.н. (среднее значение 4.2, медианное 3). Длина амплифицируемых локусов составила от 44 до 109 п.н., среднее и медианное значения совпадают и составляют 72 п.н. для локусов, содержащих аллель Del, и 76 п.н. для локусов, содержащих аллель In. Минимальная длина фрагмента, который можно получить в ПЦР с последующей гибридизацией, зависит от нуклеотидного состава локуса и в идеальном случае составляет 40–50 п.н. Нам удалось добиться средней длины локуса 72 п.н., что обеспечивает методу фундаментальное преимущество при исследовании деградированной ДНК.

Популяционные данные и дискриминирующие характеристики метода

Несмотря на то, что ряд авторов полагают достаточным опубликовать перечень маркеров, отобранных по определенным критериям *in silico*, мы считаем необходимым их верифицировать, так как результаты современных полногеномных исследований нередко содержат ошибки. Целесообразность включения в панель каждого из выбранных полиморфизмов подтверждена путем экспериментальной оценки их генетического разнообразия в российской популяции.

В исследованных в настоящей работе образцах ($n = 201$), взятых от жителей Москвы, Москов-

ской области и Санкт-Петербурга, усредненная частота минорных аллелей составила 0.385, средняя наблюдаемая гетерозиготность, $H_o = 0.471$ (0.338–0.687). У двух полиморфизмов частота минорного аллеля оказалась незначительно меньше заданного значения: rs56281469 – 0.254 и rs72273695 – 0.266 (табл. 1). Результаты проверки сформированной панели по частотам аллелей в российской популяции свидетельствуют о соответствии выбранных полиморфизмов критериям, заданным при отборе.

Опираясь на полученные данные, мы определили значение MP для каждого полиморфизма (табл. 1), а также оценили основные дискриминирующие характеристики всей панели для российской популяции: совокупная вероятность случайного совпадения, CMP , составила 1.89×10^{-43} , потенциал исключения отцовства $CPE = 0.99999999063$.

Сравнивая полученный показатель вероятности случайного совпадения, $CMP = 1.89 \times 10^{-43}$, с показателем у наиболее известных STR-систем: 13-локусный CODIS – 2.34×10^{-15} ; Identifiler – 5.93×10^{-18} ; PowerPlex16 – 2.43×10^{-18} ; NGM – 1.12×10^{-19} ; New FBI core – 6.28×10^{-30} [2], можно видеть, что предлагаемая панель обладает на 13 порядков более высоким дискриминирующим потенциалом, чем New FBI core – наиболее информативная панель, применяемая на практике. Эта избыточность дискриминирующего потенциала обеспечивает не только преимущество при экспертизах сложных образцов, для которых получены неполные профили, но и более высокую достоверность при определении кровного родства.

Отдельный важный аспект для любой системы генетической идентификации – информация о том, с какой частотой встречаются ее аллели в популяции, к которой относится исследуемая ДНК. Это необходимо для предоставления в суд экспертиз, содержащих обоснованные вероятностные расчеты. К примеру, если обнаруженный аллель встречается с частотой 0.01 в европейской популяции и 0.99 в азиатской, то без информации о популяционной принадлежности ее носителя при расчете будет допущена грубая ошибка. В свете этого, оптимальным решением представляется создание универсальной панели с полиморфизмами, не имеющими значимой популяционной специфичности в распределении аллелей. Этот подход в сочетании с избыточностью дискриминирующего потенциала позволит полностью исключить критическую недостоверность в расчетах вероятности при проведении экспертизы.

*Практические характеристики
метода генотипирования*

Протокол исследования содержит четыре этапа: выделение ДНК, амплификация, гибридизация и регистрация результатов. Выделение ДНК может быть выполнено любым подходящим для биоматериала способом. Метод протестирован в широком диапазоне концентраций и, в отличие от STR-типирования на капиллярном электрофоретическом оборудовании, не требует приведения к допустимым значениям.

Особые усилия были приложены к созданию условий внедрения метода в практику и снижению риска контаминации. Ранее тест-системы, созданные на базе биочип-технологии, обладали рядом недостатков, ограничивающих их широкое применение. В частности, в связи с необходимостью получения одноцепочечного ампликона для гибридизации, использовали двухстадийную “гнездную” ПЦР с переносом ампликонов из симметричной стадии ПЦР в асимметричную, что требовало отдельной лабораторной зоны и создавало серьезный риск контаминации. Благодаря применению ранее опубликованной модификации (LATE)-PCR [30], на стадии амплификации удалось объединить симметричный и асимметричный этап ПЦР.

Кроме того, ограничения в мультиплексности создавали необходимость в постановке нескольких ПЦР с разными пулами праймеров для одного образца. Это не только повышало трудоемкость, но и снижало такой критически важный параметр в криминалистике, как аналитическую чувствительность. Известны публикации, в которых заявляется успешная амплификация сотен локусов, однако это декларируется для высоких концентраций геномной ДНК, которые нечасто встречаются в экспертной практике [31]. Нам удалось подобрать условия амплификации всех 106 локусов в одной мультиплексной ПЦР с сохранением чувствительности, значимой для экспертной работы.

Таким образом, протокол исследования был максимально упрощен, сведен в схему “один образец — одна пробирка — один биочип” и избавлен от промежуточных стадий переноса продукта.

Помимо дискриминирующих возможностей, к важнейшим качествам методов практической криминалистики относятся способность генотипирования деградированных образцов и чувствительность. Залогом успеха при работе с фрагментированной ДНК является минимизация ампликонов при проектировании праймеров. В нашем случае средний размер ампликона доведен до 72 п.н., однако экспериментальная проверка на деградированных образцах в план этой работы не входила.

Что касается чувствительности, то ее типичный нижний предел для современных систем генетической идентификации составляет 50–100 пг ДНК на ПЦР (что соответствует 8–16 геном-эквивалентам). В задачи настоящей работы не входили специальные мероприятия по повышению чувствительности метода, однако, учитывая критическую практическую важность этого параметра, мы провели его предварительную экспериментальную оценку. С этой целью проведено девятикратное генотипирование одного из образцов (50 пг на ПЦР). В среднем наблюдалось выпадение 9 локусов (от 5 до 16), причем не случайных, а вполне определенных, что, вероятнее всего, связано с эффективностью отжига праймеров и может быть исправлено в дальнейшем. Тем не менее, пул из 90–101 сработавших локусов с избытком обеспечивает достаточную дискриминирующую силу не только в идентифицирующих генетических экспертизах, но и для определения отцовства в трио и дуэте.

Графические примеры результатов генотипирования приведены на рис. 1б–1д. При внимательном изучении рисунков могут возникнуть несколько вопросов. Во-первых, некоторые пары ячеек в гетерозиготном состоянии светятся слабее других. Это связано с тем, что не все локусы амплифицируются с одинаковой эффективностью. Однако надежность генотипирования обеспечивается высокой чувствительностью камеры и ее широким динамическим диапазоном (0–65528). Это позволяет одинаково успешно анализировать как слабые, так и сильные пары. Во-вторых, в некоторых парах, очевидно находящихся в гетерозиготном состоянии, можно видеть неравнозначность по яркости верхней (In) и нижней (Del) ячеек. При визуальной интерпретации результатов это могло бы трактоваться неоднозначно, однако обработка выполняется автоматизировано путем оценки дискриминации (дискриминационного отношения сигналов) в каждой паре In-Del. Дискриминация представляет собой частное от деления интенсивности сигналов от ячеек с ДНК-зондами, комплементарными In- и Del-аллелю, соответственно, $D = \frac{I_{in}}{I_{del}}$.

Этот показатель позволяет разделить генотипы биаллельных маркеров на три пула $D_{In/In} \gg 1$, $D_{In/Del} \approx 1$ и $D_{Del/Del} \ll 1$. Для достоверного генотипирования необходимо, чтобы эти пулы не только не пересекались, но и имели достаточно широкий коридор значений между собой.

На рис. 2а–2г приведены примеры такой обработки сигналов. Для удобства восприятия результаты расположены по мере возрастания значения дискриминационного отношения сигналов. Кроме того, при такой подаче легко найти экстремальные значения в каждом пуле, чтобы по ним

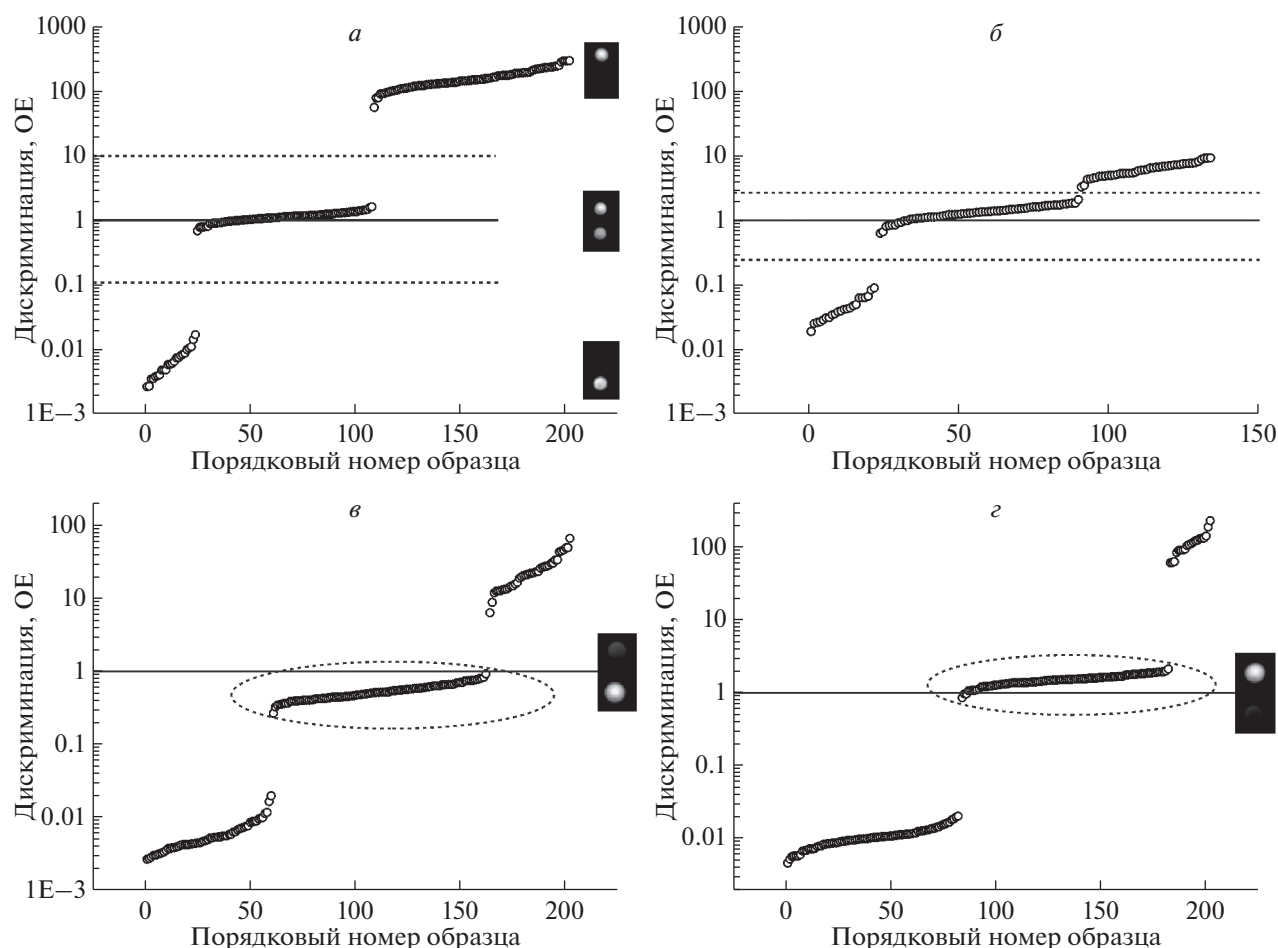


Рис. 2. Примеры распределения дискриминационных значений D , полученных при обработке гибридационных изображений. *а, в, г* — Графики, полученные при генотипировании образцов коллекции и относящиеся к маркерам CID.06-144, CID.03-031 и CID.15-098 соответственно. График, приведенный на части *б*, относится к однонуклеотидному полиморфизму rs4959270, использованы данные [30]. Пунктирные прямые на *а* и *б* — пороговое значение, используемое для автоматизированного генотипирования в программе ImageWare. Пунктирные овалы на *в* и *г* — смещение значений D для гетерозиготных пулов относительно 1. По оси абсцисс отложены порядковые номера образцов при нумерации их по мере возрастания значения дискриминации; OE — относительные единицы.

определить границы коридора и правильно установить пороговые значения, используемые программой ImageWare для автоматической обработки результатов и формирования отчета о генотипе. На рис. 2*а* приведено образцовое распределение сигналов: гетерозиготный пул расположен в области единицы, а полярные пулы In/In и Del/Del отстоят от него более чем на полтора порядка. Это позволяет с существенным запасом установить верхний и нижний порог значений (пунктирные линии на рис. 2*а*).

Чтобы проиллюстрировать преимущества In-Del-полиморфизмов перед SNP и обосновать наш выбор в пользу первых, на рис. 2*б* приведен пример распределения дискриминационных значений для однонуклеотидного полиморфизма rs4959270. Как видно из графика, коридор между пулами существенно уже, что повышает

риск ошибок при генотипировании. Это обусловлено сравнительно большей близостью температур плавления совершенных и несовершенных дуплексов соответствующих ДНК-зондов у SNP, что создает трудности при дизайне ДНК-зондов. Безусловно, если для решения поставленной задачи необходимо генотипировать SNP (как в большинстве практических решений на основе биочип-технологии), то приходится находить оптимальный дизайн олигонуклеотидов. Однако в нашем случае SNP и InDel равнозначны по критически важным для экспертной практики свойствам (перечислены во введении), поэтому мы сделали выбор в пользу InDel.

Графики на рис. 2*в* и 2*г* указывают на возможность визуальных различий в яркости ячеек In и Del при гетерозиготном генотипе, что не влияет на результат. При этом верное генотипирование

обеспечивается смещением пороговых значений в соответствующую сторону при применении автоматизированного подхода. В дальнейшем такие пары ДНК-зондов могут быть скорректированы путем соответствующего изменения длины олигонуклеотида, либо его концентрации в ячейке биочипа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На настоящий момент генетическая идентификация личности целиком базируется на исследовании STR: на этот тип маркеров ориентировано и оборудование, и базы данных, и методика интерпретации результатов. Однако, как упомянуто во введении, стратегически STR проигрывают SNP и InDel по протяженности и мутабельности, и это фундаментальный проигрыш, его нельзя преодолеть техническими средствами. Запрос на метод идентификации, использующий короткие биаллельные маркеры, возник давно, но не был реализован, в первую очередь, в связи с отсутствием подходящего инструмента для генотипирования. В настоящей работе нам удалось продвинуться в создании практического инструмента для решения задач судебно-криминалистической экспертизы на новом уровне. Создана универсальная панель биаллельных маркеров, которая может стать основой для формирования национальной базы генетической информации не только в России, но и в любой стране мира. Выбор метода в пользу отечественной технологии биологических микрочипов низкой плотности в наибольшей степени соответствует поставленным задачам, так как обеспечивает размещение необходимого количества зондов и не требует сложных протоколов пробоподготовки, дорогостоящего оборудования и расходных материалов, что создает предпосылки для его успешного внедрения.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого включенного в исследование участника получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Животовский Л.А. (2001) ДНК в суде. *Химия и жизнь*. № 12, 23–27.
2. Ge J., Eisenberg A., Budowle B. (2012) Developing criteria and data to determine best options for expanding the core CODIS loci. *Investigative Genetics*. 3(1), 1–14.

3. Wyman A.R., White R. (1980) A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77(11), 6754–6758.
4. Tamaki K., Jeffreys A.J. (2005) Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. *Legal Medicine*. 7(4), 244–250.
5. Aşıcıoğlu F., Oguz-Savran F., Ozbek U. (2004). Mutation rate at commonly used forensic STR loci: paternity testing experience. *Disease Markers*. 20(6), 313–315.
6. Hohoff C., Dewa K., Sibbing U., Hoppe K., Forster P., Brinkmann B. (2007) Y-chromosomal microsatellite mutation rates in a population sample from Northwestern Germany. *Int. J. Legal Med.* 121(5), 359–363.
7. Syvänen A.C., Sajantila A., Lukka M. (1993) Identification of individuals by analysis of biallelic DNA markers, using PCR and solid-phase minisequencing. *Am. J. Hum. Genet.* 52(1), 46.
8. Reich D.E., Schaffner S.F., Daly M.J., McVean G., Mullikin J.C., Higgins J.M., Richter D.J., Lander E.S., Altshuler D. (2002) Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. *Nat. Genet.* 32(1), 135–142.
9. Lee H.J., Lee J.W., Jeong S.J., Park M. (2017) How many single nucleotide polymorphisms (SNPs) are needed to replace short tandem repeats (STRs) in forensic applications? *Int. J. Legal Med.* 131(5), 1203–1210.
10. Lee H.Y., Park M.J., Yoo J.E., Chung U., Han G.R., Shin K.J. (2005) Selection of twenty-four highly informative SNP markers for human identification and paternity analysis in Koreans. *Forensic Sci. Int.* 148(2–3), 107–112.
11. Freire-Aradas A., Fondevila M., Kriegel A.K., Phillips C., Gill P., Prieto L., Schneider P.M., Carracedo A., Lareu M.V. (2012) A new SNP assay for identification of highly degraded human DNA. *Forensic Sci. Int.: Genetics*. 6(3), 341–349.
12. Zeng Z., Wang L., Feng Q., Zhang L., Lee L., Wang L., Yue Y., Fang Y., Yang W., Qiu H., Dong Z. (2012) Evaluation of 96 SNPs in 14 populations for worldwide individual identification. *J. Forensic Sci.* 57(4), 1031–1035.
13. Mo S.K., Ren Z.L., Yang Y.R., Liu Y.C., Zhang J.J., Wu H.J., Li Z., Bo X.C., Wang S.Q., Yan J.W., Ni M. (2018) A 472-SNP panel for pairwise kinship testing of second-degree relatives. *Forensic Sci. Int.: Genetics*. 34, 178–185.
14. Krjatskov K., Viltrop T., Palta P., Metspalu E., Tamm E., Suvi S., Sak K., Merilo A., Sork H., Teek R., Nikopenius T., Kivisild T., Metspalu A. (2009) Evaluation of the 124-plex SNP typing microarray for forensic testing. *Forensic science international*. *Genetics*. 4(1), 43–48.
15. Musgrave-Brown E., Ballard D., Balogh K., Bender K., Berger B., Bogus M., Børsting C., Brion M., Fondevila M., Harrison C., Oguzturun C., Parson W., Phillips C., Proff C., Ramos-Luis E., Sanchez J.J., Sánchez Diz P., Sobrino Rey B., Stradmann-Bellinghausen B., Thacker C., Carracedo A., Morling N., Scheithauer R., Schnei-

- der P.M., Syndercombe Court D. (2007) Forensic validation of the SNPforID 52-plex assay. *Forensic Sci. Int. Genet.* **1**(2), 186–190.
16. Fondevila M., Børsting C., Phillips C., de la Puente M., Consortium E.N., Carracedo A., Morling N., Lareu M.V. (2017) Forensic SNP genotyping with SNaPshot: technical considerations for the development and optimization of multiplexed SNP assays. *Forensic Sci. Rev.* **29**(1), 57–76.
 17. Liu J., Du W., Jiang L., Liu C., Chen L., Zheng Y., Hou Y., Liu C., Wang Z. (2022) Development and validation of a forensic multiplex InDel assay: the AGCU InDel 60 kit. *Electrophoresis.* **43**(18–19), 1871–1881.
 18. Pereira R., Phillips C., Alves C., Amorim A., Carracedo A., Gusmão L. (2009) Insertion/deletion polymorphisms: a multiplex assay and forensic applications. *Forensic Sci. Int.: Genet. Suppl. Ser.* **2**(1), 513–515.
 19. Freitas N.S., Resque R.L., Ribeiro-Rodrigues E.M., Guerreiro J.F., Santos N.P., Ribeiro-dos-Santos Â., Santos S. (2010) X-linked insertion/deletion polymorphisms: forensic applications of a 33-markers panel. *Int. J. Legal Med.* **124**(6), 589–593.
 20. LaRue B.L., Lagacé R., Chang C.W., Holt A., Hennessy L., Ge J., King J.L., Chakraborty R., Budowle B. (2014) Characterization of 114 insertion/deletion (INDEL) polymorphisms, and selection for a global INDEL panel for human identification. *Legal Med.* **16**(1), 26–32.
 21. Sun K., Yun L., Zhang C., Shao C., Gao T., Zhao Z., Hou Y., Xie J., Tang Q. (2019) Evaluation of 12 Multi-InDel markers for forensic ancestry prediction in Asian populations. *Forensic Sci. Int. Genet.* **43**, 102155.
 22. Huang Y., Liu C., Xiao C., Chen X. Yi S., Huang D. (2020) Development of a new 32-plex InDels panel for forensic purpose. *Forensic Sci. Int. Genet.* **44**, 102171.
 23. Zhang W., Jin X., Wang Y., Kong T., Cui W., Chen C., Guo Y., Zhu B. (2020) Genetic polymorphisms and forensic efficiencies of a set of novel autosomal InDel markers in a Chinese Mongolian group. *Biomed. Res. Int.* **2020**, 3925189.
 24. Lan Q., Zhao C., Wei C., Xu H., Shen C., Zhu B. (2022) Genetic insights and evaluation of forensic features in Mongolian and Ewenki groups using the InDel variations. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **27**(2), 67.
 25. LaRue B.L., Ge J., King J.L., Budowle B. (2012) A validation study of the Qiagen Investigator DIPplex® kit; an INDEL-based assay for human identification. *Int. J. Legal. Med.* **126**(4), 533–540.
 26. Fesenko D.O., Chudinov A.V., Surzhikov S.A., Zasedatelev A.S. (2014) Biochip for genotyping SNPs defining core Y-chromosome haplogroups in Russian population groups. *BioChip J.* **8**, 171–178.
 27. Li C., Zhang S., Li L., Chen J., Liu Y. (2012) Selection of 29 highly informative InDel markers for human identification and paternity analysis in Chinese Han population by the SNPlex genotyping system. *Mol. Biol. Reports.* **39**(3), 3143–3152.
 28. Huang J., Luo H., Wei W., Hou Y. (2014) A novel method for the analysis of 20 multi-InDel polymorphisms and its forensic application. *Electrophoresis.* **35**(4), 487–493.
 29. Степанов В.А., Вагайцева К.В., Харьков В.Н., Чердниченко А.А., Бочарова А.В. (2016) Панель одонуклеотидных сцепленных с X-хромосомой полиморфных маркеров для ДНК-идентификации (XSNPid) на основе мультиплексного генотипирования с использованием методов многолокусной ПЦР и масс-спектрометрии MALDI-TOF. *Молекуляр. биология.* **50**(3), 445–456.
 30. Фесенко Д.О., Ивановский И.Д., Иванов П.Л., Земскова Е.Ю., Агапитова А.С., Поляков С.А., Фесенко О.Е., Филиппова М.А., Заседателев А.С. (2022) Биочип для генотипирования полиморфизмов ассоциированных с цветом глаз, волос, кожи, группой крови, половой принадлежностью, основной гаплогруппой Y-хромосомы и результаты исследования славянской популяции с его помощью. *Молекуляр. биология.* **56**(5), 860–880.
 31. Krjutskov K., Andreson R., Mägi R., Nikopensius T., Khrunin A., Mihailov E., Tammekivi V., Sork H., Remm M., Metspalu A. (2008) Development of a single tube 640-plex genotyping method for detection of nucleic acid variations on microarrays. *Nucl. Acids Res.* **36**(12), e75.

Universal Panel of Insertion–Deletion Polymorphism for Human Genetic Identification and a Biochip-Based Kit *ChipID106* for This Purpose

D. O. Fesenko^{1, *}, I. D. Ivanovsky², P. L. Ivanov³, E. Yu. Zemskova³, S. A. Polyakov¹, O. E. Fesenko⁴, M. A. Filippova¹, and A. S. Zasedatelev¹

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

²DNA Research Center, LLC, Hkimki, 141402 Russia

³Russian Center of Forensic Medical Expertise, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125284 Russia

⁴Research Institute of Physics, Southern Federal University, Rostov-on-Don, 344090 Russia

*e-mail: deferos@yandex.ru

The paper proposes a panel of 106 insertion–deletion (InDel) polymorphisms and practical testing of the method of their genotyping on biochips. Such fundamental properties of InDel markers as short length and low mutation rate provide them with significant advantages in expert practice over widely used tandem repeats (STRs).

In this work, we analyzed the allele distribution of InDel polymorphisms in the five largest world populations (European, East Asian, South Asian, African and American), and selected markers that meet the following criteria: minor allele frequency of more than 0.30, physical distance between markers more than 3 million bp, the absence of polymorphisms, tandem repeats and palindromes in the flanking sequences, the proximity of the AT/GC ratio to 1. As a result, a panel of 106 polymorphisms was formed with an average frequency of the minor allele for all five populations of 0.396. For panel genotyping, a method was developed that included one-step multiplex PCR followed by hybridization on a biological microarray. The average amplicon length was 72 bp. On a sample of 201 residents of Moscow and St. Petersburg, the main characteristics of the formed panel were determined: the probability of a random match (MP) 1.89×10^{-43} , the paternity exclusion potential (CPE) 0.99999999063. The proposed method is an alternative to molecular genetic identification of a person based on variations in the lengths of STR loci.

Keywords: human identification, microarray, forensics, InDel polymorphisms

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21

МЕТИЛИРОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ РЕГИОНОВ ГЕНОВ СИСТЕМЫ
РЕПАРАЦИИ ДНК ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ СОННЫХ АРТЕРИЙ¹

© 2023 г. Н. П. Бабушкина^{а,*}, А. А. Зарубин^а, Ю. А. Королёва^а, Д. Е. Гомбоева^а, Е. Ю. Брагина^а,
И. А. Гончарова^а, М. В. Голубенко^а, Р. Р. Салахов^а, А. А. Слепцов^а, М. С. Кузнецов^б,
Б. Н. Козлов^б, Э. Ф. Муслимова^б, С. А. Афанасьев^б, А. Н. Кучер^а, М. С. Назаренко^а

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

^бНаучно-исследовательский институт кардиологии,
Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук,
Томск, 634034 Россия

*e-mail: nad.babushkina@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 16.11.2022 г.

После доработки 08.02.2023 г.

Принята к публикации 21.02.2023 г.

Статус метилирования ДНК в геноме человека изменяется в патогенезе распространенных заболеваний и выступает в качестве предиктора ожидаемой продолжительности жизни. В связи с этим представляет интерес исследование уровня метилирования регуляторных регионов генов, отвечающих за общебиологические процессы, потенциально значимые для развития возраст-ассоциированных заболеваний. Среди них гены белков различных систем репарации ДНК, продукты которых характеризуются плейотропными эффектами. В исследовании представлены результаты таргетного анализа метилирования двух регионов генома (промоторного участка гена *MLH1* и энхансерного — вблизи гена *ATM*) в разных тканях пациентов с атеросклерозом сонных артерий. В результате анализа профилей метилирования исследованных генов в различных тканях одних и тех же индивидов выявлено наличие выраженных различий между лейкоцитами и тканями сосудистой стенки. Различия по уровням метилирования в нормальных и пораженных атеросклерозом тканях сонных артерий обнаружены только для двух исследованных CpG-сайтов в гене *ATM* (chr11:108089866 и chr11:108090020, сборка GRCh37/hg19). На основании этих данных можно предполагать участие *ATM* в развитии атеросклероза. “Нагруженность” изученных регионов сайтами связывания транскрипционных факторов (по данным ReMap2022) свидетельствует о том, что тканеспецифичный характер метилирования регуляторных участков генов *MLH1* и *ATM* может быть связан с уровнем их экспрессии в конкретной ткани. Показано, что межиндивидуальные различия в уровнях метилирования CpG-сайтов ассоциированы с достаточно удаленными нуклеотидными заменами.

Ключевые слова: метилирование ДНК, CpG-островки, высокопроизводительное секвенирование, атеросклероз, ген *ATM*, ген *MLH1*

DOI: 10.31857/S002689842304002X, **EDN:** QKQNS

Метилирование ДНК в позиции C5 цитозинового кольца в CpG-динуклеотидах с образованием 5-метилцитозина — один из наиболее изученных механизмов эпигенетической регуляции генома. Функциональное значение метилирования ДНК заключается в транскрипционной инактивации хроматина, обусловленной надмолекулярными изменениями его компактизации. В соматических клетках метилирование ДНК ответственно за поддержание и реализацию таких фундамен-

тальных биологических процессов, как инактивация X-хромосомы, геномный импринтинг, регуляция тканеспецифичной экспрессии генов, репрессия ретротранспозонов [1].

Известно, что некоторые из локусов генома обладают свойством сохранять относительно стабильный уровень метилирования продолжительное время и статус их метилирования коррелирует с изменчивостью ряда клинических признаков, значимых для развития заболеваний различной природы [2–5]. Появляется все больше свидетельств тесной связи эпигенетического возраста ДНК в крови с заболеваниями, проявляющимися

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S002689842304002X для авторизованных пользователей.

в течение жизни человека (сердечно-сосудистыми, неврологическими, онкологическими и др.) [6]. В связи с этим предполагают, что эпигенетический полиморфизм, наряду со структурным, может быть еще одним из значимых факторов риска многофакторных заболеваний [1, 7]. В частности, было высказано предположение, что в роли пускового механизма атеросклероза выступают аберрантные проатерогенные паттерны метилирования ДНК в тканях артерий [8]. Действительно, в ряде исследований показано, что профиль метилирования CpG-сайтов ряда генов пораженной атеросклерозом сосудистой стенки отличается от такового в интактной ткани [4, 9, 10].

Нами выполнен таргетный анализ метилирования двух регионов генома (промоторный участок гена *MLH1* и энхансерный — вблизи гена *ATM*). Оба гена кодируют компоненты систем репарации ДНК и задействованы во многих биологических процессах, в том числе и таких, как ответ на окислительный стресс, иммунный ответ, онкогенез [11]. Роль генов *MLH1* и *ATM* при атеросклерозе изучена недостаточно. Известно, что соматические мутации в гене *ATM* ассоциированы с клональным гемопоэзом с неопределенным потенциалом — фактором риска возрастзависимых заболеваний, включая атеросклероз [12].

Цель исследования заключалась в выявлении особенностей метилирования регуляторных регионов двух генов систем репарации ДНК: *MLH1* и *ATM* — в разных тканях пациентов с атеросклеротическим поражением сонных артерий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Группа исследования. Выборка пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий была сформирована на базе НИИ кардиологии Томского НИМЦ. В выборку было включено 27 пациентов (21 мужчина и 6 женщин, средний возраст — 64.4 ± 7.1 лет), которым по показаниям была проведена операция каротидной эндартерэктомии. У всех пациентов стеноз оперируемой сонной артерии при ультразвуковом исследовании превышал 70% просвета сосуда. Для каждого пациента получены образцы цельной венозной крови, а также образцы тканей сосудов: удаленной атеросклеротической бляшки сонной артерии (на поздних стадиях патологического процесса), прилежащего морфологически неизмененного участка сонной артерии, фрагмента большой подкожной вены (используемой для пластики сонной артерии).

Выделение ДНК из образцов крови и тканей. Материалом для исследования служила ДНК, выделенная как из лейкоцитов цельной венозной крови, собранной в пробирки с консервантом ЭДТА, так и из тканей сосудистой стенки.

Для выделения ДНК из образцов цельной венозной крови использовали метод фенол–хлороформной экстракции [13]. Ткани сосудов (площадью примерно 1 см^2) гомогенизировали в жидком азоте, обрабатывали протеиназой К (“СибЭнзим”, Россия) и проводили экстракцию ДНК фенол–хлороформом. Для дальнейшего анализа ДНК подвергали бисульфитной модификации с использованием набора EZ DNA Methylation Kit (“Zymo Research”, США), согласно протоколу производителя.

Целевые регионы. Выбор целевых регионов для анализа метилирования ДНК исследуемых локусов выполнен согласно следующим критериям: локализация участка ДНК вблизи гена; регуляторная роль данного участка в отношении соответствующего гена; локализация в исследуемом участке генома энхансера или активного промотора, а также вариабельность статуса метилирования ДНК по данным консорциума ENCODE (<https://www.encodeproject.org>). Активные регуляторные регионы генома выбраны согласно определяемым по наличию соответствующих сигналов в данных DNase-seq (участки открытого хроматина) и ChIP-seq на гистоновые модификации: H3K27Ac (активный хроматин), H3K4me1 (энхансеры), H3K4me3 (промоторы) (<http://www.genome.ucsc.edu/>) — в разных клеточных культурах, использованных консорциумом ENCODE [14]. Дополнительно учтена информация по локализации предсказанных энхансерных элементов и точках начала транскрипции генов из базы данных GeneHancer [15].

При выборе целевых регионов также учитывали их расположение относительно CpG-островков. В первую очередь это CpG-берега (в пределах ± 2000 п.н. от CpG-островка) и CpG-шельфы (в пределах ± 4000 п.н. от CpG-островка), которые обогащены функциональными CpG-сайтами и для которых характерны более динамичные уровни метилирования [16, 17]. В силу особенностей первичной структуры анализируемых последовательностей ДНК уровень метилирования был изучен в промоторном регионе гена *MLH1* и в энхансерном — гена *ATM*.

Для гена *MLH1* был выбран фрагмент, содержащий 9 CpG-сайтов (табл. 1), расположенных в пределах 500–1000 п.н. в 5'-направлении от CpG-островка в промоторной области. Исследуемый участок промотора (GN03J036988 по базе данных GeneHancer) приходится на область умеренной гиперчувствительности к ДНКазе I и локализации гистоновых меток H3K27. Кроме того, по данным проекта ENCODE, в этой области выявлено вариабельное метилирование CpG-сайтов в разных клеточных линиях (рис. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.moleculbio.ru/downloads/2023/4/supp_Babushkina_rus.pdf).

Таблица 1. Изученные регионы генов *MLH1* и *ATM* и структура использованных праймеров

Рассматриваемые параметры	<i>MLH1</i>	<i>ATM</i>																																						
Регуляторный элемент	Промотор	Энхансер																																						
Локализация относи- тельно гена	“Выше по течению”	“Выше по течению”																																						
Категория CpG-региона ^a	CpG-берег	CpG-шельф																																						
Геномные координаты ^b	<table><tr><td>start</td><td>chr3:37033249</td></tr><tr><td>CpG_1</td><td>chr3:37033323</td></tr><tr><td>CpG_2</td><td>chr3:37033373^c</td></tr><tr><td>CpG_3</td><td>chr3:37033394</td></tr><tr><td>CpG_4</td><td>chr3:37033489</td></tr><tr><td>CpG_5</td><td>chr3:37033562</td></tr><tr><td>CpG_6</td><td>chr3:37033600</td></tr><tr><td>CpG_7</td><td>chr3:37033625^e</td></tr><tr><td>CpG_8</td><td>chr3:37033632^f</td></tr><tr><td>CpG_9</td><td>chr3:37033662</td></tr><tr><td>end</td><td>chr3:37033762</td></tr></table>	start	chr3:37033249	CpG_1	chr3:37033323	CpG_2	chr3:37033373 ^c	CpG_3	chr3:37033394	CpG_4	chr3:37033489	CpG_5	chr3:37033562	CpG_6	chr3:37033600	CpG_7	chr3:37033625 ^e	CpG_8	chr3:37033632 ^f	CpG_9	chr3:37033662	end	chr3:37033762	<table><tr><td>start</td><td>chr11:108089569</td></tr><tr><td>CpG_1</td><td>chr11:108089803</td></tr><tr><td>CpG_2</td><td>chr11:108089866</td></tr><tr><td>CpG_3</td><td>chr11:108090015</td></tr><tr><td>CpG_4</td><td>chr11:108090020</td></tr><tr><td>CpG_5</td><td>chr11:108090130</td></tr><tr><td>CpG_6</td><td>chr11:108090159^d</td></tr><tr><td>end</td><td>chr11:108090311</td></tr></table>	start	chr11:108089569	CpG_1	chr11:108089803	CpG_2	chr11:108089866	CpG_3	chr11:108090015	CpG_4	chr11:108090020	CpG_5	chr11:108090130	CpG_6	chr11:108090159 ^d	end	chr11:108090311
start	chr3:37033249																																							
CpG_1	chr3:37033323																																							
CpG_2	chr3:37033373 ^c																																							
CpG_3	chr3:37033394																																							
CpG_4	chr3:37033489																																							
CpG_5	chr3:37033562																																							
CpG_6	chr3:37033600																																							
CpG_7	chr3:37033625 ^e																																							
CpG_8	chr3:37033632 ^f																																							
CpG_9	chr3:37033662																																							
end	chr3:37033762																																							
start	chr11:108089569																																							
CpG_1	chr11:108089803																																							
CpG_2	chr11:108089866																																							
CpG_3	chr11:108090015																																							
CpG_4	chr11:108090020																																							
CpG_5	chr11:108090130																																							
CpG_6	chr11:108090159 ^d																																							
end	chr11:108090311																																							
Структура праймеров ^g (5' → 3')	F: AATTTTTTTGAGGGTAGGAAAGTTTGTAG R: CCCCAACTATTAAATATCATTCATTATTC	F: ATAATAGAAAAGATAAAATGGGTAAGGATT R: AACAAACTTCAAAAATTCTAAAAATCCCC																																						
ПЦР-продукт (п.н.)	514	743																																						

^a Категории в соответствии с плотностью расположения CpG-сайтов: CpG-берег (в пределах ± 2000 п.н. от CpG-островка), CpG-шельф (в пределах ± 4000 п.н. от CpG-островка).

^b Координаты приведены согласно сборке генома человека GRCh37/hg19;

^c cg02103401 (ID на метилочипах Illumina);

^d cg09191173;

^e cg24607398,

^f cg10990993;

^g праймеры подобраны с помощью программы MethPrimer (<https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer2/MethPrimer.cgi>; <https://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>); F – прямой праймер, R – обратный праймер (синтезированы “ДНК-Синтез”, Россия).

Предполагаемая регуляторная область гена *ATM* находится на расстоянии 3 т.п.н. в 5'-направлении от точки начала транскрипции гена и приходится на область открытого и активного хроматина (согласно данным проекта ENCODE) и энхансера (GH11J108220), согласно базе данных GeneNancer (рис. S2, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/4/supp_Babushkina_rus.pdf). В этом регионе локализовано 6 CpG-сайтов (табл. 1).

Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в генах *MLH1* и *ATM* проводили методами ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) и ПЦР в режиме реального времени (табл. 2). Целевые фрагменты ДНК амплифицировали с использованием набора БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (“БиоЛабМикс”, Россия) со специфическими парами праймеров (табл. 1).

Дальнейший анализ проведен методом бисульфитного секвенирования ампликонов (Bisulfite Amplicon Sequencing, BSAS) с использованием технологии массового параллельного секвениро-

вания в соответствии с методикой D. Masser с соавт. [18]. Ампликоны, полученные после ПЦР одного и того же образца ДНК, пулировали эквимольно. Очистку пулированных ампликонов для подготовки библиотек проводили с использованием набора для очистки ПЦР-продуктов GeneJET NGS Cleanup Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Концентрацию очищенных ампликонов измеряли на флуориметре Qubit 3.0 (“Thermo Fisher Scientific”). Подготовку и индексацию ДНК-библиотек проводили с использованием наборов Nextera XT DNA Library Prep Kit или Nextera DNA Flex Library Prep Kit (“Illumina”, США), согласно протоколу производителя. Секвенирование полученных ДНК-библиотек выполнено на приборе MiSeq (“Illumina”) с помощью набора MiSeq Reagent Kit v2 (300-cycles) в режиме секвенирования по 150 п.н. с обоих концов фрагментов ДНК-библиотеки.

Анализ данных. Для автоматизации и стандартизации обработки результатов использован алгоритм methylseq, реализованный в Nextflow (<https://doi.org/10.5281/zenodo.2555454>) [19]. По-

Таблица 2. Условия анализа изученных полиморфных вариантов генов *MLH1* и *ATM*

Последовательности праймеров/TaqMan проб ^a (5' → 3')	T_{an} ^b (°C)	Метод детекции, использованные эндонуклеазы ^c
rs1799977, ген <i>MLH1</i>		
F: ATAGTTTGCTGGTGGAGATA R: ATGTGATGGAATGATAAACC	56	ПЦР-ПДРФ, Bcc I (“G” = 243; “A” = 161 + 82)
rs189037, ген <i>ATM</i>		
F: CTGCTTGCGCTTGCTTCTTC R: TGGAGTGAGGAGAGGGAGGA	60	ПЦР-ПДРФ, Mox20 I (“G” = 330, “A” = 220 + 110)
rs1801516, ген <i>ATM</i>		
F: TTTAGCAGTATGTTGAGTTTATGGC R: GGCAACTTTTATCTCCATTCCA FAM-TTTACTCCAAGATACAAATGAATCATGGA-BHQ1 HEX-TTTACTCCAAAATACAAATGAATCATGGA-BHQ1	56	ПЦР в реальном времени

^a Праймеры и пробы подобраны с помощью программы Vector NTI (<http://www.informaxinc.com>; синтеризованы “ДНК-Синтез”); FAM (флуоресцеин) и HEX (гексахлорфлуоресцеин) – флуоресцентные красители, BHQ1 (Black Hole Quenchers 1) – гаситель для ПЦР в реальном времени.

^b Температура отжига праймера.

^c ПДРФ-анализ проводили с использованием указанных эндонуклеаз в соответствии с протоколом фирмы-производителя (“СибЭнзим”, Россия). В скобках указаны длины фрагментов (в п.н.), соответствующих анализируемым аллелям.

лученные прочтения фрагментов ДНК автоматически рассортированы по образцам с удалением нуклеотидной последовательности адаптеров. Прочтения отфильтрованы по качеству (не менее Q20), длине (не менее 20 нуклеотидов) с использованием инструмента Trim Galore (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/), выравнивание проведено на референсную сборку генома человека GRCh38/hg38 с помощью инструмента bwa-meth [20]. Информация о статусе метилирования CpG-сайтов из BAM-файлов экстрагирована с помощью инструмента Bismark [21]. Для контроля качества использованы инструменты FastQC, Qualimap, Preseq, MultiQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) [22–24].

Дальнейшая биоинформатическая обработка профилей метилирования ДНК в исследуемых локусах и статистический анализ данных выполнены в программной среде R с помощью специализированного пакета methylKit [25]. Для манипуляций с данными, вывода графиков и таблиц использованы дополнительные программные пакеты R (ggplot2, reshape, RColorBrewer, Rtsne, xlsx). Из анализа исключали CpG-сайты с менее чем 15-кратным покрытием. Уровень метилирования CpG-сайта определяли как долю прочтений, соответствующих метилированным остаткам цитозина по отношению ко всем прочтениям цитозина в данной позиции генома, и выражали в процентах.

Генотипирование SNP было проведено с использованием программы cgmtools [26], с при-

менением биномиальной модели (минимальное покрытие – 10×, максимальная ошибка – 0.05). Нормализация, фильтрация и объединение vcf-файлов проведены с использованием программы bcftools (<http://samtools.github.io/bcftools/bcftools.html>) с следующей аннотацией в программе annovar [27].

Описание распределения уровня метилирования CpG-сайтов в исследуемых группах представлено в виде среднего значения со стандартным отклонением. Для анализа сходства профилей метилирования ДНК в исследуемых образцах использован алгоритм нелинейного снижения размерности данных tSNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) [28]. Для поиска дифференциально метилированных CpG-позиций применяли линейную регрессию, где зависимой переменной был уровень метилирования, а независимыми – порядковый номер эксперимента, биологический образец, заболевание и тип ткани. Такой подход позволил отделить внутрииндивидуальную дисперсию от групповой и технической. Показатели сцепления: нормированный коэффициент неравновесия по сцеплению D' (коэффициент Левонтина), квадрат коэффициента корреляции между локусами r^2 , показатель максимального правдоподобия LOD – рассчитывали в Haploview 4.2 [29]. Корреляционный анализ проводили с применением критерия Спирмена; зависимость уровня метилирования от генотипов оценивали по критерию Манна–Уитни (в пакете программ Statistica v.6.0). Статистически значимыми считались различия с уровнем значимости $p < 0.05$.

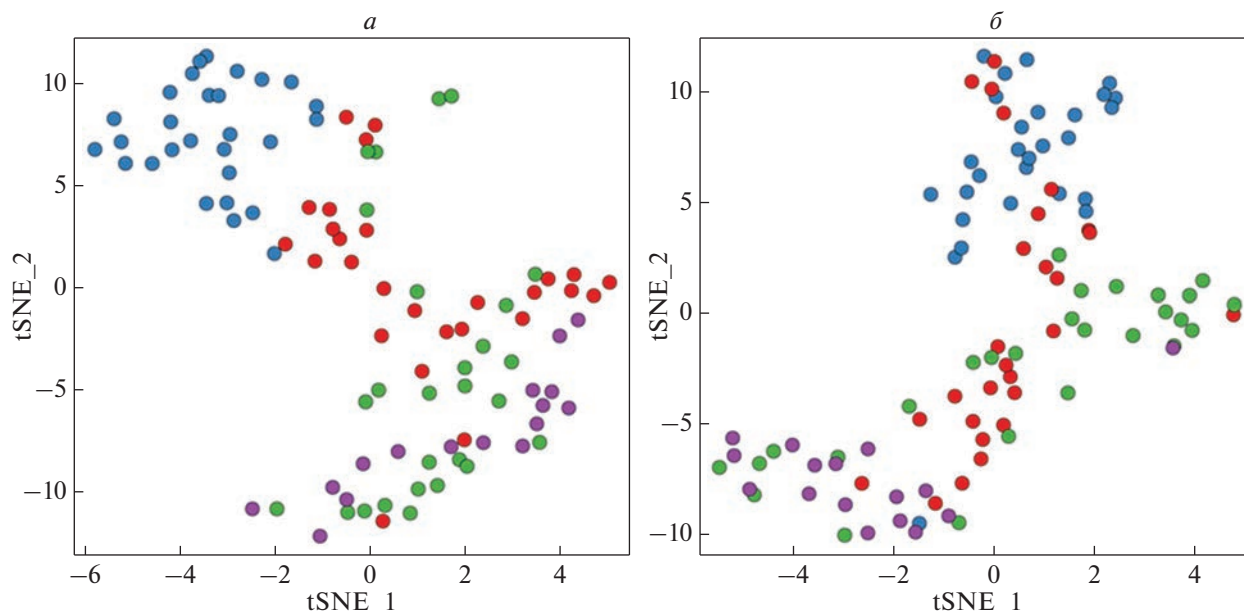


Рис. 1. Взаимное расположение и кластеризация исследуемых образцов (по методу tSNE) в зависимости от профилей метилирования CpG-сайтов в регуляторных областях генов *MLH1* (а) и *ATM* (б). Данные, полученные для лейкоцитов, обозначены синим цветом, для атеросклеротической бляшки — красным, для нормальной ткани артерий — зеленым, для вен — фиолетовым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение метилирования регуляторных регионов генов *MLH1* и *ATM* проведено в пределах мультиплексного эксперимента, включавшего большое число таргетных последовательностей. Всего произведено 3 отдельных запуска секвенатора. Для учета вариабельности данных, полученных в разных запусках, результаты каждого запуска и каждого образца обрабатывали независимо, а при дальнейшем анализе порядковый номер запуска выступал в качестве одной из ковариант регрессионного анализа.

Данные по уровню метилирования ДНК в крови, бляшке и артерии получены для 27 пациентов (у двух из обследованных по одной ткани исключено из дальнейшего анализа в связи с низким уровнем покрытия), а в вене — для 15 пациентов.

По данным tSNE-анализа в целом наблюдается выраженная тканеспецифичность метилирования изученных регуляторных регионов генов *MLH1* и *ATM* — выявлена тенденция кластеризации образцов кровеносных сосудов (артерий и вен) отдельно от лейкоцитов (рис. 1).

Характеристика метилирования промотора гена *MLH1*

Наибольший уровень метилирования CpG-сайтов гена *MLH1* (в среднем >55%, размах вариабельности — от 15 до 87%) наблюдался в лейкоцитах крови (рис. 2).

Индивидуальные значения уровня метилирования ДНК в образцах кровеносных сосудов не превышали 73%, средний уровень составил порядка 30%. Образцы интактных и пораженных атеросклерозом артерий практически не отличались по профилю метилирования ДНК, а средний уровень метилирования CpG-сайтов в них составил 32% (от 4 до 73%) и 33% (от 2 до 63%) соответственно. Наименьший уровень метилирования ДНК зарегистрирован в сосудистой стенке вен: в среднем 23% (от 2 до 61%).

Паттерн метилирования CpG-сайтов в исследуемом участке промотора *MLH1* сходен во всех образцах: CpG_2 (chr3:37033373) и CpG_5 (chr3:37033562) со сниженным относительно других CpG-сайтов уровнем метилирования фланкируют участки с более высоким уровнем (рис. 2). Такой паттерн приблизительно повторяет форму плотности распределения сайтов локализации модифицированного гистона H3K27Ac в разных клеточных линиях (рис. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/4/supp_Babushkina_rus.pdf).

Для всех 9 CpG-сайтов в гене *MLH1* получены статистически значимые межтканевые различия ($p < 0.000000$ для критерия Уилкоксона). Согласно результатам множественной регрессии, уровень метилирования регуляторного региона гена *MLH1* в лейкоцитах отличался от такового в тканях артерий и подкожной вены по всем исследованным CpG-сайтам (во всех случаях $p < 0.01$); при этом между пораженной атеросклерозом и

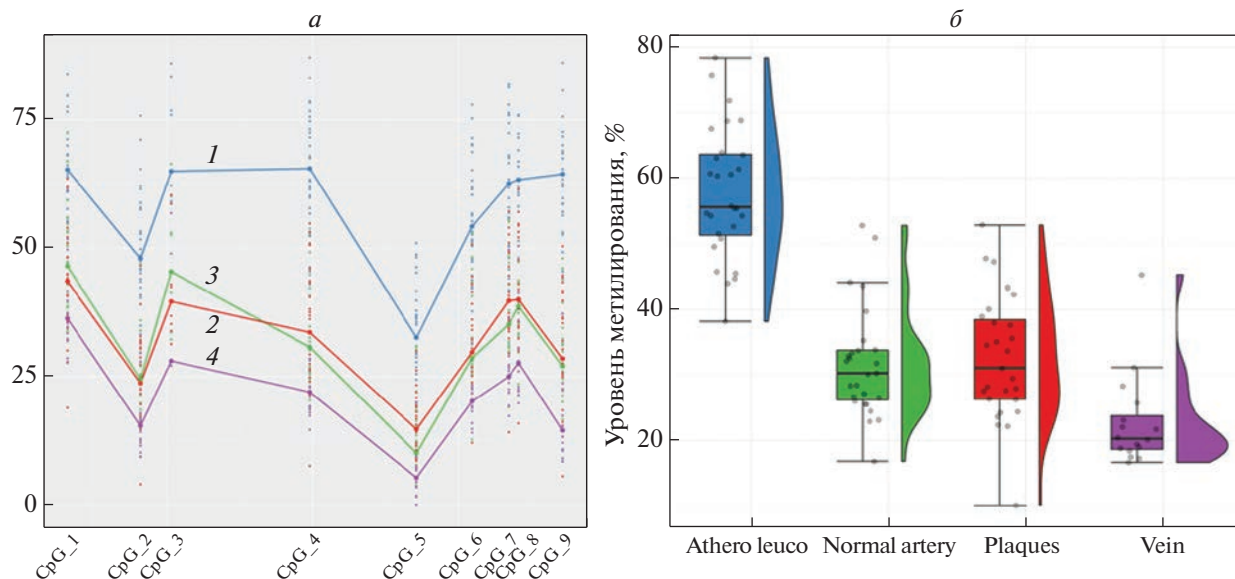


Рис. 2. Профиль метилирования промоторного региона гена *MLH1*. Данные, полученные для лейкоцитов (Athero leuco), обозначены синим цветом (1), для атеросклеротической бляшки (Plaques) – красным (2), для нормальной ткани артерий (Normal artery) – зеленым (3), для вен (Vein) – фиолетовым (4). *a* – Профиль метилирования отдельных CpG-сайтов в промоторе гена *MLH1*. Значения уровня метилирования каждого из исследуемых образцов отмечены небольшими точками, средние значения в каждой из групп исследования обозначены крупными точками и для наглядности соединены линиями между соседними CpG-сайтами (хромосомные позиции см. в табл. 1). *б* – Усредненный уровень метилирования ДНК исследованного регуляторного региона гена *MLH1* в различных тканях.

непораженной тканью артерий различия не выявлены ни по одному из исследованных сайтов (во всех случаях $p > 0.07$). В то же время сосудистая стенка вены по большинству сайтов значимо ($p < 0.05$) отличалась как от непораженной артериальной стенки (за исключением CpG_3, $p = 0.550$), так и от атеросклеротической бляшки – за исключением CpG_1 ($p = 0.160$) и CpG_3 ($p = 0.557$). Скорее всего, отсутствие различий по сайту chr3:37033394 (CpG_3) обусловлено невысоким уровнем прочтений в этой хромосомной позиции, что привело к исключению большого числа образцов из анализа для этого сайта.

Исследуемая область располагается в экзоне 1 гена *EPM2AIP1* и незначительно удалена от CpG-островка (567 п.н.) и одного из трех сайтов начала транскрипции гена *MLH1*. Данный регион полностью входит в состав промотора GH03J036988; внутри анализируемого фрагмента расположен проксимальный энхансероподобный элемент EH38E2192185 (<http://www.genome.ucsc.edu/>; <https://www.genecards.org/>). В эту область попадают также отдельные точки мультирегионов взаимодействий генов *MLH1* и *LRRFIP2* с регуляторными элементами (<http://www.genome.ucsc.edu/>) (рис. 3).

Характеристика метилирования энхансерной области гена *ATM*

Для уровня метилирования ДНК в изученном регуляторном регионе гена *ATM* характерна тка-

неспецифичность за исключением “крайних” CpG-сайтов, по которым уровни метилирования имеют тенденцию выравниваться между исследуемыми группами тканей (рис. 4а). В целом по региону более высокие уровни метилирования CpG-сайтов зарегистрированы для кровеносных сосудов (рис. 4б): выше в венах и примерно на 10% ниже в пораженных атеросклерозом сонных артериях, интактные артерии по уровню метилирования ДНК занимают промежуточное положение. В лейкоцитах отмечены более низкие, по сравнению с образцами кровеносных сосудов, уровни метилирования всех CpG-сайтов, за исключением CpG_1 (chr11:108089803), для которого выявлен повышенный уровень метилирования (>88%) во всех тканях. Уровень метилирования CpG-сайтов в изученном регионе во всех исследованных тканях в целом соответствовал следующей закономерности: CpG_1 > CpG2 > CpG3 < CpG4 < CpG5 > CpG6 (рис. 4).

Суммарная оценка уровня метилирования для всех 6 сайтов в гене *ATM* тем не менее выявила значимые различия между тканями ($p < 0.000000$ для критерия Уилкоксона). Согласно результатам множественной регрессии, по уровню метилирования ДНК ткани сосудистой стенки статистически значимо отличаются от лейкоцитов периферической крови. Так, пораженная артериальная ткань отличается от лейкоцитов ($p < 0.05$) по уровням метилирования пяти CpG-сайтов, кроме CpG_1 ($p = 0.112$). Более выражены отличия по



Рис. 3. Структурно-функциональная характеристика исследованного региона гена *MLH1*. Составлено с использованием ресурсов UCSC (<http://www.genome.ucsc.edu/>) и GeneCard (<https://www.genecards.org/>).

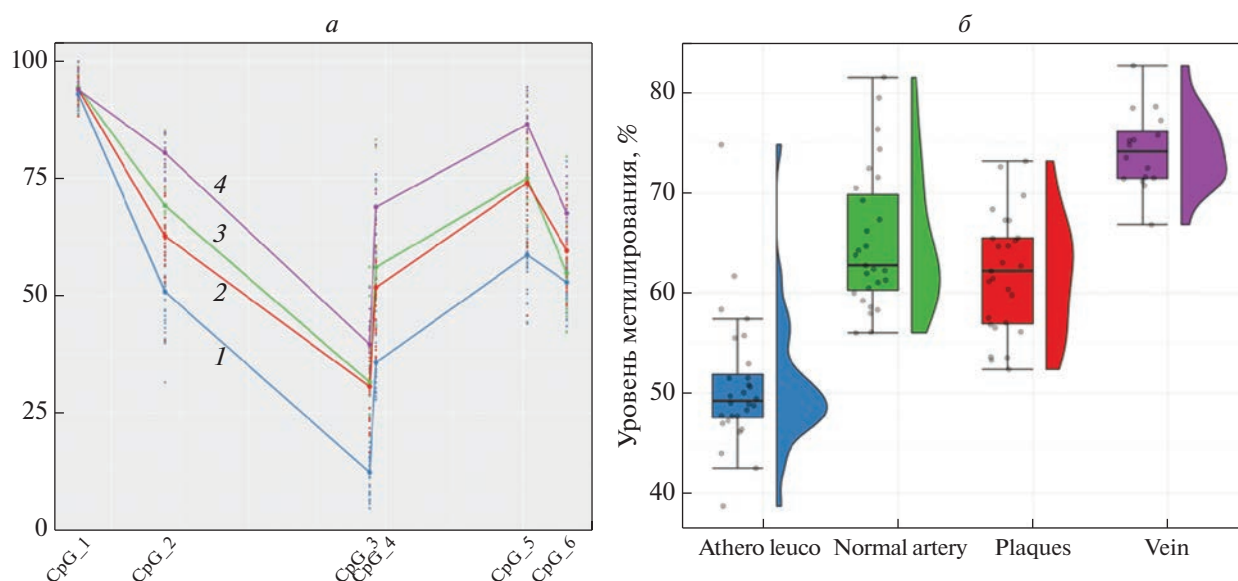


Рис. 4. Профиль метилирования энхансерного региона гена *ATM*. *а* – Паттерн метилирования отдельных CpG-сайтов в энхансере гена *ATM*. *б* – Усредненный уровень метилирования исследованного регуляторного региона гена *ATM* в разных тканях. Обозначения см. в подписи к рис. 2.

уровням метилирования лейкоцитов от тканей венозной стенки ($p < 0.00005$ для всех сайтов, кроме CpG_1, $p = 0.354$). Уровень метилирования интактной артериальной ткани отличается от лейкоцитов по четырем сайтам: ($p < 0.000000005$ для всех сайтов, кроме CpG_1, $p = 0.330$, и CpG_6, $p =$

$= 0.182$). В свою очередь венозная сосудистая стенка также отличается по пяти сайтам (кроме CpG_1) от артериальной – как пораженной атеросклерозом ($p < 0.001$ для всех сайтов), так и интактной ($p < 0.05$ для всех сайтов). Ранее также был выявлен более низкий уровень метилирова-

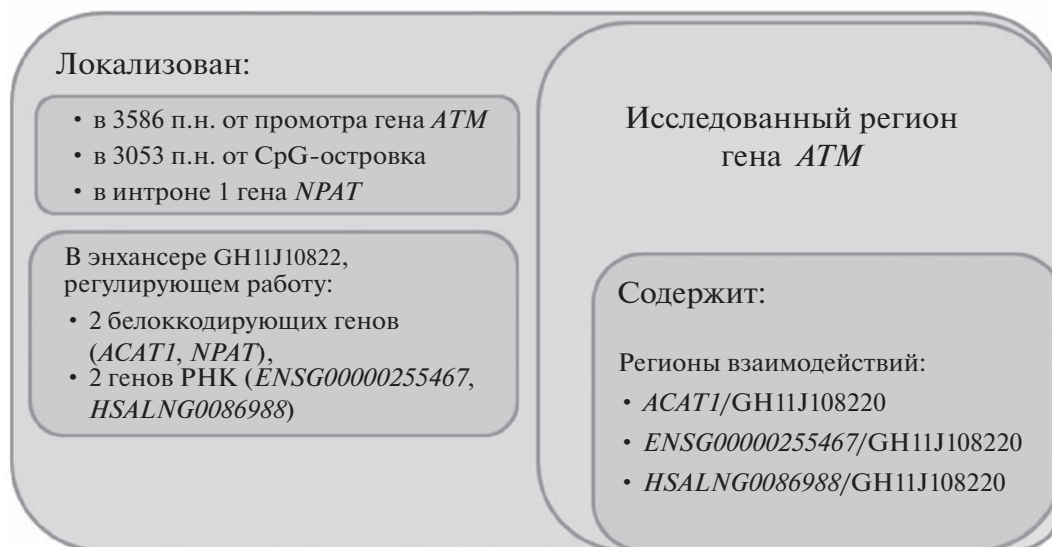


Рис. 5. Структурно-функциональная характеристика исследованного региона гена *ATM*. Составлено с использованием ресурсов UCSC (<http://www.genome.ucsc.edu/>) и GeneCard (<https://www.genecards.org/>).

ния CpG-сайтов в энхансерной последовательности генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* в лейкоцитах крови по сравнению с образцами сосудистой стенки [10]. Различия в уровнях метилирования между непораженной стенкой артерии и атеросклеротической бляшкой зарегистрированы по двум сайтам: CpG_2 (chr11:108089866, $p = 0.0003$) и CpG_4 (chr11:108090020, $p = 0.0026$). По обоим сайтам в пораженной ткани уровень метилирования ниже примерно на 10%. Полученные данные в некоторой степени согласуются с литературными: гипометилирование CpG-сайтов преимущественно именно в “шельфовой” области CpG-островков показано для неопластических тканей [17], а в патогенезе онкологических заболеваний и атеросклероза отмечается общность некоторых биологических процессов (таких как адаптивные иммунные реакции, задействованный в изменении морфологии сигналинг, пролиферация и миграция гладкомышечных клеток сосудов) [30, 31]. На основании полученных результатов можно предполагать усиление экспрессии гена *ATM* и активизацию процессов, регулируемых кодируемой им киназой, в пораженной атеросклерозом стенке артерий.

В целом, паттерн метилирования в регуляторной области гена *ATM* сохранен во всех исследуемых группах и имеет общий характер: высокий уровень метилирования chr11:108089803 (CpG_1) в 5'-регуляторной области, далее следует пониженный уровень метилирования в CpG_3 (chr11:108090015), затем наблюдается повышение уровня метилирования более чем на 20% в CpG_4 (chr11:108090020) (рис. 4). Следует отметить, что такой характер метилирования CpG-сайтов соот-

ветствует локализации повторяющихся элементов: сайты с локально повышенным уровнем их метилирования располагаются в 5'-регионах длинных концевых повторов (рис. S2, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molec-bio.ru/downloads/2023/4/supp_Babushkina_rus.pdf).

Исследуемый регион гена *ATM* локализован в последовательности энхансера GH11J108220 в интроне 1 гена *NPAT* (рис. 5) (<http://www.genome.ucsc.edu/>; <https://www.genecards.org/>). Энхансер GH11J108220 регулирует экспрессию гена *NPAT*, относительно гена *ATM* нет четкой информации. Тем не менее известно, что гены *ATM* и *NPAT* относятся к корегулируемым и коэкспрессирующимся и имеют общий двунаправленный промотор (<https://www.genecards.org/>; <https://gtexportal.org/home/>). Таким образом, можно предположить влияние данного регуляторного элемента на экспрессию обоих генов. Кроме того, продукт гена *NPAT* позитивно регулирует экспрессию *ATM* [32, 33].

Роль метилирования изученных регионов генов MLH1 и ATM в регуляции их экспрессии

По данным проекта ORegAnno (<http://www.oreganno.org/>), изученные нами регуляторные области генов *MLH1* и *ATM* находятся в регионах связывания транскрипционного фактора (ТФ) SMARCA4 (<http://www.genome.ucsc.edu/>) [34]. SMARCA4 обладает геликазной и АТФазной активностью, будучи частью большого АТФ-зависимого комплекса ремоделирования хроматина SNF/SWI, который необходим для активации транскрипции генов, обычно репрессируемых хроматином.

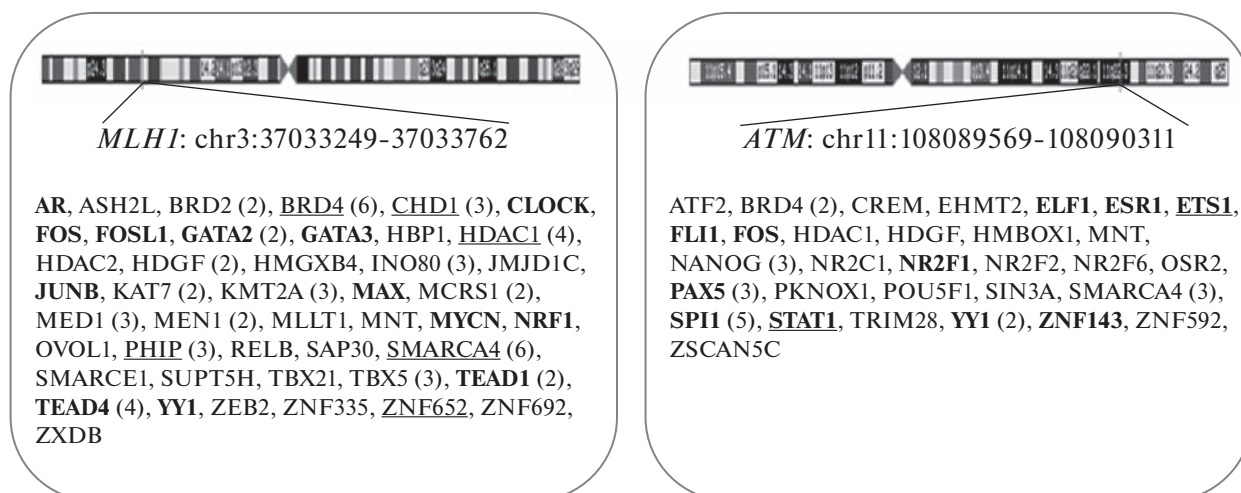


Рис. 6. Факторы транскрипции, для которых зарегистрировано наличие сайтов связывания в исследованных регионах генов *MLH1* и *ATM*. В скобках указано число сайтов связывания данного ТФ в изученном регионе (если оно больше 1); жирным шрифтом выделены ТФ, функционирование которых доказано в клетках крови; подчеркнуты ТФ, сайты связывания которых включают всю анализируемую последовательность целиком.

Полагают, что транскрипция в этом случае регулируется через изменение структуры хроматина (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Согласно ReMapp2022 (<https://remap2022.univamu.fr>) с ДНК в промоторном регионе гена *MLH1* связываются 45 ТФ (рис. 6). Семь сайтов связывания ТФ полностью включают в себя проанализированную нами последовательность: это 2 сайта для BRD4 (изолятор хроматина, который может модулировать сигнальный ответ на повреждение ДНК [35], коактиватор РНК-зависимой полимеразы II [36]), а также по одному сайту для HDAC1 (деацетилаза гистонов, регулятор структурной динамики хроматина; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), SMARCA4 (см. выше), ZNF652 (репрессор транскрипции [37]), CHD1 (белок эухроматина, фактор ремоделирования хроматина [38]), PHIP (модулирует передачу сигналов инсулина; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Таким образом, изученный регион *MLH1* несет существенную регуляторную нагрузку. “Плотность” связывания ТФ возрастает в направлении от CpG_1 к CpG_9 — то есть, чем ближе к CpG-островку, тем больше сайтов связывания различных ТФ.

С регуляторным регионом гена *ATM*, по данным ReMap2022, в разной степени перекрываются 43 сайта связывания ТФ (рис. 6), из них для 6 ТФ выявлено более одного сайта (<https://remap2022.univamu.fr>). Сайты связывания двух ТФ полностью перекрывают анализируемый фрагмент ДНК (STAT1 и ETS1). Активатор транскрипции STAT1 опосредует экспрессию множества генов, важных для жизнеспособности клеток в ответ на различные клеточные стимулы и патогены; играет важную роль в иммунных реакциях на вирусные, грибковые и микобактериальные пато-

гены (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). ТФ ETS1 может функционировать либо как активатор, либо как репрессор транскрипции большого числа генов; участвует в развитии стволовых клеток, их старении и гибели, а также в онкогенезе (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Остальные ТФ связываются с последовательностями, лишь частично перекрывающимися с анализируемым фрагментом, поэтому на их аффинность оказывают влияние не все из исследованных CpG-сайтов. Максимальное число сайтов связывания с ТФ приходится на CpG_3 и CpG_4 (<https://remap2022.univamu.fr>; <http://www.genome.ucsc.edu/>).

Следует заметить, что в ReMapp2022 представлены экспериментальные данные по иммунопреципитации хроматина в различных клеточных линиях; среди них нет клеточных линий сосудистой стенки и клеток цельной крови. Однако все ТФ, связывающиеся с изученными регионами, экспрессируются в широком спектре тканей и в большинстве своем, по-видимому, не относятся к тканеспецифическим. Согласно базе данных NAIK Genome Database (http://summit.med.unideb.hu/summitdb/experiment_preview.php), в мононуклеарных клетках периферической крови зарегистрировано связывание с ДНК для 13 из 45 ТФ, связывающихся с анализируемым регионом гена *MLH1*, и 11 из 31 ТФ, связывающихся с анализируемым регионом гена *ATM* (рис. 6). Таким образом, выявленный нами тканеспецифичный характер метилирования регуляторных регионов генов *MLH1* и *ATM* может влиять на уровень экспрессии этих генов в различных тканях.

Средний уровень метилирования регуляторных регионов изученных генов в лейкоцитах периферической крови, порядка 50%, может отра-

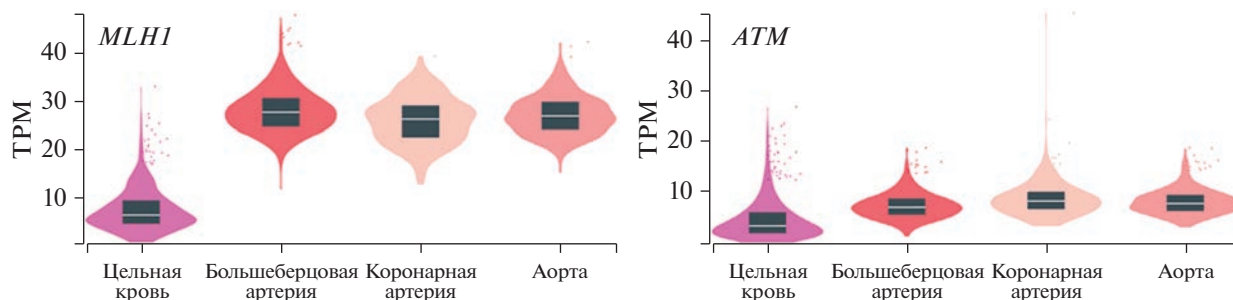


Рис. 7. Экспрессия генов *MLH1* и *ATM* в цельной крови и тканях сосудов (по данным GTEx Portal, <https://gtexportal.org/home/>). Результаты представлены как число транскриптов на миллион (TPM).

жать “активную готовность” к экспрессии (рис. 2, рис. 4). Данный факт вполне объясним при учете функциональных особенностей изученных генов, так как основной биологический процесс, в котором участвуют продукты генов *MLH1* и *ATM* – репарация ДНК, а значит они экспрессируются во всех типах тканей и на всех стадиях онтогенеза. Кроме того, продукты изученных генов участвуют в процессах воспаления, онкосупрессии, а также вовлечены во множество других биологических процессов (особенно это касается *ATM*) [11].

Более интересным результатом представляется гипометилирование промоторного региона гена *MLH1* в тканях сосудистой стенки и в то же время гиперметилирование энхансерного региона гена *ATM*. На основании этих данных можно предположить усиление экспрессии *MLH1* и снижение экспрессии *ATM* в тех же тканях. Полученные по гену *MLH1* результаты в отношении статуса метилирования промоторного региона хорошо согласуются с данными GTExPortal (<https://gtexportal.org/home/>) по экспрессии этого гена (рис. 7): в цельной крови уровень экспрессии *MLH1* невысокий (медианное значение – 6.6 транскриптов на миллион, TPM), а в тканях сосудов (в аорте, большеберцовой и коронарной артериях) он почти одинаков и приблизительно в 4 раза выше. В то же время приведенный в базе данных GTExPortal фактический уровень экспрессии гена *ATM* отличается от ожидаемого (исходя из полученных нами данных по метилированию ДНК): экспрессия *ATM* в тканях сосудов (7–8 TPM) также несколько выше, чем в цельной крови (3.3 TPM). Возможно, это связано с тем, что изученный нами регион гена *ATM* представляет собой энхансер, а не промотор гена, его действие на экспрессию более опосредованное. Однако следует отметить, что в нашем исследовании оценка метилирования ДНК в тканях сосудистой стенки проведена у больных атеросклерозом, поэтому уровень метилирования данного региона может быть связан именно с патологическим процес-

сом, но это предположение требует дальнейшего изучения.

Межиндивидуальная вариабельность метилирования изученных регионов генов MLH1 и ATM

Для изученных регуляторных регионов генов *MLH1* и *ATM* характерна межиндивидуальная вариабельность уровня метилирования ДНК. Причем гипо- или гиперметилирование у отдельных индивидов выявляли в разных тканях (по сравнению с уровнем метилирования ДНК у других индивидов в этой ткани). Известно, что метилом клеток человека претерпевает запрограммированные изменения не только во время онтогенеза, но и под воздействием внешних стимулов, таких как диета, прием лекарственных препаратов, уровень физической активности и различные факторы окружающей среды [4, 39–45]. Оценить влияние всех факторов не представляется возможным, мы рассмотрели некоторые из них. Так, из 27 пациентов только один на момент взятия крови для исследования не принимал лекарственных препаратов из групп гипотензивных, сахароснижающих средств, антикоагулянтов/дезагрегантов, статинов. Большое разнообразие принимаемых препаратов и их сочетаний не позволяет провести корреляционный анализ для оценки влияния отдельных лекарственных средств на уровень метилирования исследованных регионов, но их разнообразие может быть одной из причин высокой межиндивидуальной вариабельности изученного уровня метилирования ДНК.

В некоторых исследованиях (например, см. [46]) отмечали зависимость уровней метилирования отдельных CpG-сайтов от пола и возраста, в том числе и регионов, изученных в проведенном нами исследовании. Согласно данным метилочипов, на которых присутствовали три пробы из анализируемого региона гена *MLH1* и одна проба из региона *ATM*, в клетках цельной крови уровни метилирования cg02103401 и cg24607398 (CpG_2 и CpG_7 *MLH1*) коррелировали с полом,

cg10990993 (CpG_8 *MLH1*) — с полом и возрастом [46], cg09191173 (CpG_6 *ATM*) — с возрастом [46]. Нами зарегистрирована слабая отрицательная корреляция с возрастом ($r = -0.411$) уровня метилирования CpG_3 (chr11:108090015) в регуляторном регионе гена *ATM* в лейкоцитах (но не в тканях сосудистой стенки) пациентов с атеросклерозом. Корреляций уровня метилирования исследованных CpG-сайтов гена *MLH1* с полом и возрастом не выявлено ни в одной из исследованных тканей.

Идентификация SNP, влияющих на уровень метилирования CpG-сайтов (meQTL) в изученных регионах генов MLH1 и ATM

Известно, что помимо средовых воздействий на уровень метилирования оказывают влияние и структурные вариации генома [47–49]. В исследованных регионах локализовано большое число редких (<5%) SNP (108 в регионе *MLH1* и 62 в регионе *ATM*) (<https://gnomad.broadinstitute.org/>).

Анализ “сырых” данных бисульфитного массового параллельного секвенирования, как и стандартный анализ данных высокопроизводительного секвенирования (NGS), позволяет выявлять нуклеотидные замены в анализируемой последовательности. Однако есть некоторые особенности в интерпретации этих данных, поскольку в результате бисульфитной обработки неметилированные остатки цитозина конвертируются в урацил, что приводит после проведения ПЦР к появлению “замен” С/Т. В регионе гена *MLH1* была определена 101 такая замена: 92 в гомозиготном состоянии и 9 в гетерозиготном, — что соответствует числу и локализации цитозинов в данном фрагменте: 92 неметилированных и 9 в составе

анализируемых CpG-сайтов. Анализ замен С/Т можно рассматривать как своеобразный “контроль качества” бисульфитной обработки, так как неполная конверсия приводит к массовому появлению “гетерозигот” вне CpG-сайтов (один образец был нами исключен из анализа на основании таких наблюдений). Кроме того, зарегистрированы две замены А/Г — каждая только в одной ткани одного из образцов, что указывает на высокую вероятность случайного события при ПЦР; их присутствие в образцах требует дальнейшего подтверждения.

Кроме того, между CpG_3 и CpG_4 выявлена замена Т/Г в позиции chr3:37033461 (rs4647200), идентифицированная во всех исследованных тканях у 7 индивидов, один из которых был гомозиготным по этому варианту. Эта замена приводит к появлению нового CpG-сайта, уровень метилирования которого имеет те же межтканевые особенности, что и весь регион (наиболее высокий уровень — в клетках крови, наиболее низкий — в венах). Известно, что порядка 20% распространенных вариантов в геноме человека приводят к появлению либо исчезновению CpG-сайтов, их функциональные последствия изучены плохо. Однако показано, что потеря CpG-сайтов вследствие таких замен приводит к общему снижению уровня метилирования региона [50].

Мы изучили связь rs4647200 с уровнем метилирования CpG-сайтов в регуляторном регионе гена *MLH1*. CpG_3 был исключен из анализа ввиду малого числа образцов, для которых было возможно провести анализ данных по метилированию этого сайта. Статистически значимые различия по уровню метилирования зарегистрированы лишь для отдельных CpG-сайтов (табл. 3), что

Таблица 3. Ассоциации уровней метилирования изученных CpG-сайтов с rs4647200 и rs1799977 гена *MLH1*

Ткань	Уровень значимости ^a							
	CpG_1	CpG_2	CpG_4	CpG_5	CpG_6	CpG_7	CpG_8	CpG_9
rs4647200								
Кровь		0.013	0.031	0.013		0.041	0.010	
Атеросклеротическая бляшка			0.034	0.047		0.041		
Интактная артерия								
Вена	0.013			0.003		0.040		
rs1799977								
Кровь				0.047			0.045	
Атеросклеротическая бляшка								
Интактная артерия	0.013	0.013	0.001	0.005	0.002	0.025		
Вена	0.008							

^a Ассоциации выявлены методом Манна–Уитни, приведены только статистически значимые различия в уровнях метилирования. Для rs4647200 сравнения уровней метилирования проведены между генотипами ТТ и (ТГ + ГГ); для rs1799977 — между АА и (АГ + ГГ).

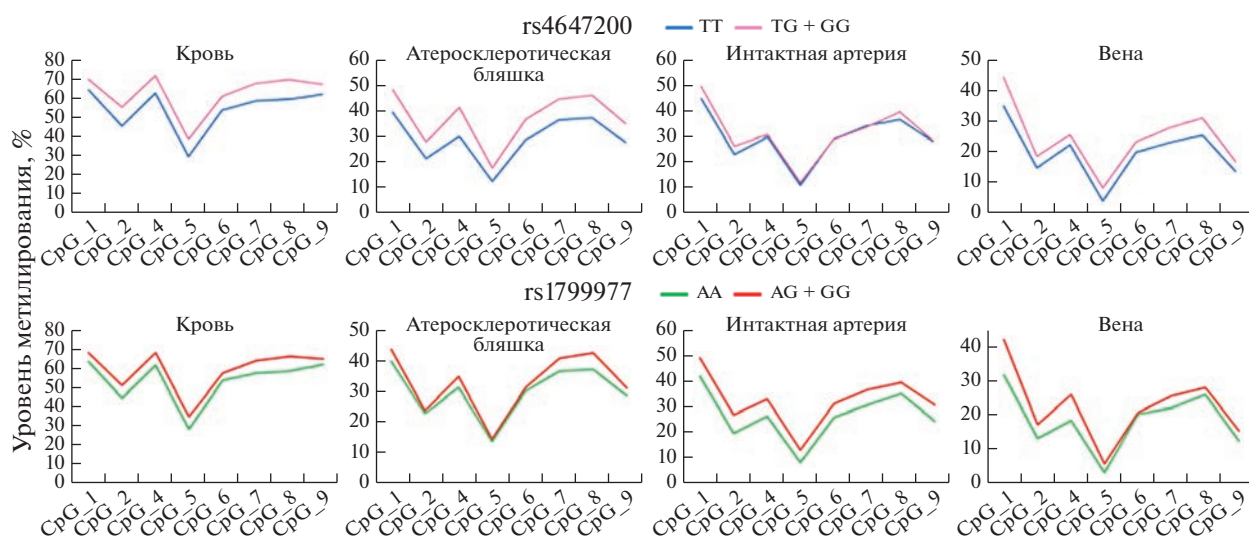


Рис. 8. Средние уровни метилирования CpG-сайтов в исследованных тканях в зависимости от генотипов rs4647200 и rs1799977 гена *MLH1*.

можно объяснить небольшим размером выборки. Однако во всех тканях прослеживается тенденция (наименее выраженная в интактных артериях) по увеличению уровня метилирования у носителей редкого аллеля rs4647200 (генотипы GT и GG) (рис. 8); при этом наиболее высокий уровень метилирования ДНК в подавляющем большинстве случаев зарегистрирован у носителя гомозиготного генотипа GG (1 человек, данные не показаны). Метилирование CpG-сайта, возникающего *de novo*, также контекстзависимо: у гомозиготы оно выше, чем у гетерозигот в 2.5 раза в клетках крови и в 3 раза во всех трех тканях сосудистой стенки. Интересно, что сходные результаты получены и при изучении зависимости уровня метилирования исследованных CpG-сайтов от генотипов по rs1799977 (миссенс-замене в экзоне 8 гена *MLH1*)

Таблица 4. Ассоциации уровней метилирования изученных сайтов с rs1801516 в гене *ATM*

Ткань	Уровень значимости ^а					
	CpG_1	CpG_2	CpG_3	CpG_4	CpG_5	CpG_6
Кровь						
Атеросклеротическая бляшка	0.043					0.009
Интактная артерия		0.024				
Вена						

^а Ассоциации выявлены методом Манна–Уитни, приведены только статистически значимые различия в уровнях метилирования. Сравнения уровней метилирования проведены между генотипами GG и AG.

(рис. 8). Между этими маркерами расстояние порядка 20 т.п.н., тем не менее при разных частотах редких аллелей (14.8 и 31.5% для rs4647200 и rs1799977 соответственно) в исследованной группе они полностью сцеплены: замена в промоторном регионе присутствует только на фоне замены в экзоне 8 гена *MLH1* ($D' = 1.0$, $r^2 = 0.379$, $LOD = 3.23$).

В регионе гена *ATM* зарегистрировано 158 “замен” С/Т, которые соответствуют количеству и локализации цитозинов в данном фрагменте; из них 7 идентифицированы как метилцитозины; уровень метилирования изучен нами в шести из них. Кроме того, в отдельных тканях различных образцов зарегистрировано 15 замен А/Г и по одной – А/Т и Т/А. Это могут быть соматические мутации, но наиболее вероятны случайные технические ошибки. Не выявлено замен, наличие которых подтверждено хотя бы в двух тканях одного образца.

Нами проанализирована возможная связь с уровнем метилирования CpG-сайтов изученного региона двух маркеров в гене *ATM*: rs189037 в промоторной области и rs1801516 в экзоне 37 (миссенс-замена). Эти SNP расположены довольно далеко как от анализируемой последовательности (более 3.5 т.п.н. и 85 т.п.н. для rs189037 и rs1801516 соответственно), так и относительно друг друга. Несмотря на удаленность, в изученной выборке маркеры сцеплены ($D' = 1.0$, $r^2 = 0.123$, $LOD = 1.06$). Замена rs189037 (частота редкого аллеля – 42.6%) не оказывает существенного влияния на уровни метилирования изученных CpG-сайтов в регуляторном регионе (рис. 9); при этом для значительно более удаленного rs1801516 (частота редкого аллеля – 13.5%) в некоторых случаях различия были статистически значимы (табл. 4).

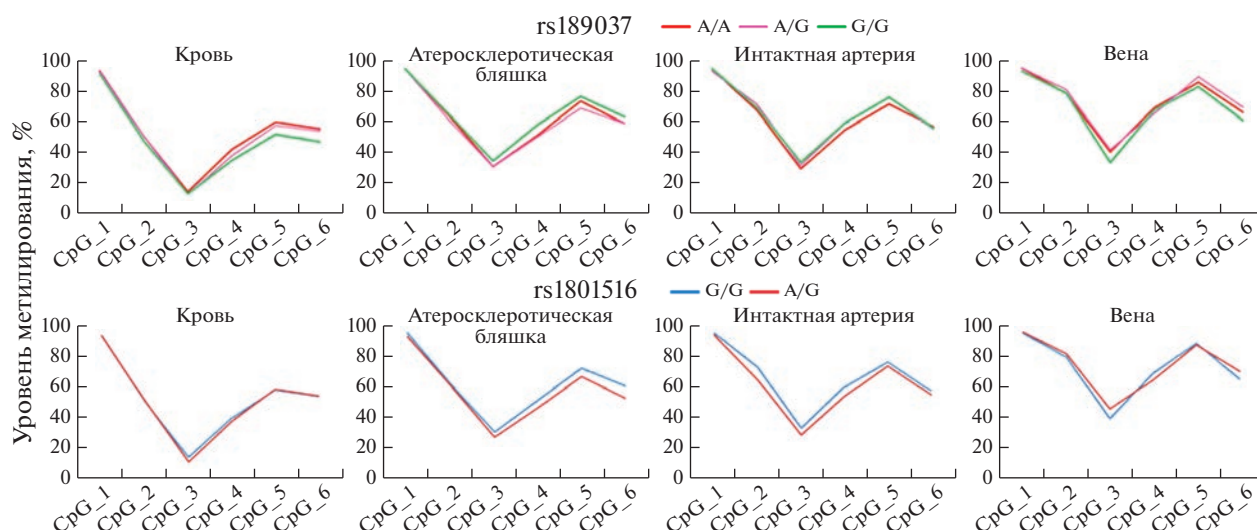


Рис. 9. Средние уровни метилирования CpG-сайтов в исследованных тканях в зависимости от генотипов rs189037 и rs1801516 гена *ATM*.

Изученные нами маркеры ранее не описаны в качестве *цис*- или *транс*-*meQTL*-вариантов для исследованных CpG-сайтов, хотя замена rs189037 в промоторе гена *ATM* (rs189037) относится к *meQTL* для четырех других CpG-сайтов при двух видах рака: cg01991180 при колоректальном раке и аденокарциноме простаты и cg12106634, cg14761454 и cg27453365 при аденокарциноме простаты (http://gong_lab.hzau.edu.cn/Pancan-meQTL/search) [51]. Все эти сайты расположены в одном регионе – в пределах “берега” CpG-островка (<https://genome.ucsc.edu/>). Замена в экзоне 37 гена *ATM*, rs1801516, при раке щитовидной железы является *cis*-*meQTL* для CpG-сайта в интроне 1 гена *ACAT1* (http://gong_lab.hzau.edu.cn/Pancan-meQTL/search), удаленного более чем на 182 т.п.н. от данного SNP (<https://genome.ucsc.edu/>), что косвенно согласуется с полученными нами результатами. Для двух изученных SNP (rs4647200 и rs1799977) в гене *MLH1* в доступной литературе не найдено информации по их роли в качестве *meQTL*, причем остается непонятным: эти маркеры не изучали в данном контексте, или же они не обладают *meQTL*-эффектом. Например, rs4647200 не представлен даже на высокоплотных чипах Infinium Multi-Ethnic Global BeadChip (“Illumina”). Для исследованных нами четырех CpG-сайтов (cg02103401, cg24607398, cg10990993 в гене *MLH1* и cg09191173 в гене *ATM*), представленных на метилчипах, согласно доступным данным, не было выявлено *meQTL*-SNP (http://gong_lab.hzau.edu.cn/Pancan-meQTL/search).

Таким образом, зависимость метилирования ДНК от контекста нуклеотидной последовательности гена более ярко выражена в отношении исследованного региона гена *MLH1*; причем данное

явление показано как относительно SNP, расположенного внутри изученного региона, так и относительно более удаленного маркера. Для гена *ATM* этот эффект выражен существенно слабее. Интересно, что в этом случае значимые различия в уровнях метилирования ДНК выявляли в зависимости от генотипов маркера, существенно более удаленного, но эволюционно более консервативного [52]. Вероятно, это связано с более поздним происхождением замены в промоторном регионе в уже сформировавшемся ранее обширном блоке сцепления. Таким образом, межиндивидуальные различия в уровнях метилирования CpG-сайтов генов *MLH1* и *ATM* связаны с достаточно удаленными структурными вариациями последовательности ДНК. Скорее всего, этот феномен – следствие “блочной” структуры ДНК.

Сопоставление полученных результатов с данными из открытых источников

Четыре из изученных нами CpG-сайтов присутствуют на метилчипах Illumina. Три из них находятся в регуляторном регионе гена *MLH1*: CpG_2 (chr3:37033373, ID на чипе – cg02103401), CpG_7 (chr3:37033625, cg24607398), CpG_8 (chr3:37033632, cg10990993); – и один в гене *ATM* – CpG_6 (chr11:108090159, cg09191173). Это позволило провести сравнение полученных результатов с данными из общедоступного репозитория функциональных геномных данных – Gene Expression Omnibus (GEO, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), который содержит стандартизованные данные секвенирования или данные, полученные на микрочипах (табл. 5). Из обобщенных данных видно, что существует значительная варибель-

Таблица 5. Уровень метилирования CpG-сайтов генов *MLH1* и *ATM* при атеросклерозе

Образцы	Уровень метилирования ^a , %				Источник данных
	<i>MLH1</i> , CpG_2	<i>MLH1</i> , CpG_7	<i>MLH1</i> , CpG_8	<i>ATM</i> , CpG_6	
	chr3:37033373	chr3:37033625	chr3:37033632	chr11:108090159	
	cg02103401	cg24607398	cg10990993	cg09191173	
<i>Сосуды</i>					
Аорта (норма) (<i>n</i> = 15)	11.19 ± 4.32	25.51 ± 3.97	21.55 ± 4.72	75.70 ± 2.35	GSE46401 ^b [53]
Атеросклеротические бляшки аорты (<i>n</i> = 15)	22.60 ± 7.34	40.09 ± 6.37	34.74 ± 5.25	72.89 ± 2.44	
Внутренняя грудная артерия (норма) (<i>n</i> = 4)	21.35 ± 5.97	41.68 ± 9.57	37.24 ± 4.98	73.83 ± 1.89	GSE149759 ^b [54]
Атеросклеротические бляшки сонных артерий (<i>n</i> = 14)	30.85 ± 9.23	52.13 ± 7.56	47.79 ± 8.66	68.99 ± 4.62	
Сонные артерии (норма) (<i>n</i> = 26)	25.65 ± 9.38	35.74 ± 8.92	37.67 ± 5.83	57.21 ± 9.70	Эта работа
Атеросклеротические бляшки сонных артерий (<i>n</i> = 26)	24.31 ± 9.45	39.78 ± 9.15	41.96 ± 11.16	59.39 ± 6.60	Эта работа
Большие подкожные вены (<i>n</i> = 15)	17.50 ± 8.36	26.14 ± 7.72	29.25 ± 8.52	67.73 ± 6.45	Эта работа
<i>Лейкоциты крови</i>					
Здоровые доноры (<i>n</i> = 8)	68.53 ± 5.87	79.35 ± 8.54	76.82 ± 4.58	63.48 ± 5.89	GSE107143 ^b [55]
Атеросклероз коронарных артерий (<i>n</i> = 8)	67.16 ± 5.28	80.95 ± 7.51	75.82 ± 3.78	61.11 ± 8.01	
Атеросклероз коронарных артерий (лейкоциты) (<i>n</i> = 27)	49.21 ± 11.76	61.74 ± 11.78	63.20 ± 8.38	53.96 ± 8.29	Эта работа

^a Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение.^b Идентификационные номера наборов данных из GEO.

ность уровня метилирования изученных сайтов в одних и тех же тканях даже при одной и той же патологии, но по данным разных исследований [53–55]. Это может быть связано с различиями в использованных методах пробоподготовки и анализа. В связи с этим напрямую проводить сравнения результатов различных исследований некорректно. Тем не менее обращают на себя внимание существенные различия в уровнях метилирования изученных CpG-сайтов в тканях стенки различных сосудов (с учетом наших данных): наименьший в аорте, средний в вене и максимальный в сонных артериях. Показано, что уровень метилирования всех изученных CpG-сайтов в атеросклеротической бляшке выше, чем в интактных артериальных тканях [53]. С этими результатами в некоторой степени согласуются полученные нами данные: по трем CpG-сайтам в гене *MLH1* и одному в гене *ATM* тенденция сохраняется, однако различия незначительны (не более 4%). По двум сайтам, для которых нами выявлены стати-

стически значимые различия между пораженным и интактным участками артерий, ситуация противоположна (в пораженной ткани ДНК гипометилирована).

Таким образом, проведенный анализ профилей метилирования промоторной области гена *MLH1* и энхансерного региона гена *ATM* в различных тканях одних и тех же индивидов продемонстрировал наличие выраженных межтканевых различий, не позволяющих, однако, уверенно дифференцировать нормальные и пораженные ткани сосудистой стенки сонных артерий. Тем не менее на основании полученных результатов можно предполагать участие киназы ATM в развитии атеросклероза. Исходя из “нагруженности” изученных регионов сайтами связывания транскрипционных факторов (по данным ReMap2022), тканеспецифичный характер метилирования регуляторных областей генов *MLH1* и *ATM* может быть связан с тканеспецифичным

уровнем их экспрессии. Межиндивидуальные различия в уровнях метилирования CpG-сайтов связаны с достаточно удаленными нуклеотидными заменами.

Авторский коллектив выражает искреннюю благодарность за помощь в подготовке и планировании эксперимента научному сотруднику, к.м.н. Маркову А.В.

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП “Медицинская геномика” Томского НИМЦ и ресурсов биобанка “Биобанк населения Северной Евразии” НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Работа выполнена при финансировании Государственного Министерства науки и высшего образования (№ 122020300041-7).

Проведение работы одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (№ 10 от 15.02.2021 г.).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feinberg A.P. (2008) Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA*. **299**, 1345–1350. <https://doi.org/10.1001/jama.299.11.1345>
2. Paul D.S., Beck S. (2014) Advances in epigenome-wide association studies for common diseases. *Trends Mol. Med.* **20**(10), 541–543. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.07.002>
3. Neidhart M. (2015) *DNA Methylation and Complex Human Disease*. Elsevier Inc. 529 p. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-13028-0>
4. Кучер А.Н., Назаренко М.С., Марков А.В., Королёва Ю.А., Барбараш О.Л. (2017) Вариативность профилей метилирования CpG-сайтов генов микроРНК в лейкоцитах и тканях сосудов при атеросклерозе у человека. *Биохимия*. **82**(6), 923–933.
5. Levy M.A., McConkey H., Kerkhof J., Barat-Houari M., Bargiacchi S., Biamino E., Bralo M.P., Cappuccio G., Ciolfi A., Clarke A., DuPont B.R., Elting M.W., Faivre L., Fee T., Fletcher R.S., Cherik F., Foroutan A., Friez M.J., Gervasini C., Haghsheenas S., Hilton B.A., Jenkins Z., Kaur S., Lewis S., Louie R.J., Maitz S., Milani D., Morgan A.T., Oegema R., Ostergaard E., Pallares N.R., Piccione M., Pizzi S., Plomp A.S., Poulton C., Reilly J., Relator R., Rius R., Robertson S., Rooney K., Rousseau J., Santen G.W.E., Santos-Simarro F., Schijns J., Squeo G.M., St John M., Thauvin-Robinet C., Traficante G., van der Sluijs P.J., Vergano S.A., Vos N., Walden K.K., Azmanov D., Balci T., Banka S., Gecz J., Henneman P., Lee J.A., Mannens M.M.A.M., Roscio T., Siu V., Amor D.J., Baynam G., Bend E.G., Boycott K., Brunetti-Pierri N., Campeau P.M., Christodoulou J., Dymont D., Esber N., Fahrner J.A., Fleming M.D., Genevieve D., Kernohan K.D., McNeill A., Menke L.A., Merla G., Prontera P., Rockman-Greenberg C., Schwartz C., Skinner S.A., Stevenson R.E., Vitobello A., Tartaglia M., Alders M., Tedder M.L., Sadikovic B. (2021) Novel diagnostic DNA methylation epigenotypes expand and refine the epigenetic landscapes of Mendelian disorders. *HGG Adv.* **3**(1), 100075. <https://doi.org/10.1016/j.xhgg.2021.100075>
6. Salameh Y., Bejaoui Y., El Hajj N. (2020) DNA Methylation biomarkers in aging and age-related diseases. *Front. Genet.* **11**, 171. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00171>
7. Yuen R.K., Robinson W.P. (2011) A high capacity of the human placenta for genetic and epigenetic variation: implications for assessing pregnancy outcome. *Placenta*. **32**, S136–S141. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.01.003>
8. Aavik E., Babu M., Yla-Herttuala S. (2019) DNA methylation processes in atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis*. **281**, 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.12.006>
9. Назаренко М.С., Марков А.В., Королева Ю.А., Слепцов А.А., Казанцев А.Н., Барбараш О.Л., Пузырев В.П. (2017) Идентификация дифференциально метилированных генов, потенциально связанных с атеросклерозом у человека. *Российский кардиологический журнал*. **22**(10), 42–48. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2017-10-42-48>
10. Королёва Ю.А., Марков А.В., Гончарова И.А., Слепцов А.А., Бабушкина Н.П., Валиахметов Н.Р., Шарыш Д.В., Зарубин А.А., Кузнецов М.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. (2020) Метилирование дезоксирибонуклеиновой кислоты в области энхансера генов *CDKN2A/2B* и *CDKN2B-AS1* в сосудах и клетках крови у пациентов с атеросклерозом сонных артерий. *Российский кардиологический журнал*. **25**(10), 32–40. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2020-4060>
11. Бабушкина Н.П., Постригань А.Е., Кучер А.Н. (2021) Вовлеченность генов белков BRCA1-ассоциированного комплекса наблюдения за геномом (BASC) в развитие многофакторной патологии. *Молекуляр. биология*. **55**(2), 318–337. <https://doi.org/10.31857/S0026898421020038>
12. Kar S.P., Quiros P.M., Gu M., Jiang T., Mitchell J., Langdon R., Iyer V., Barcena C., Vijayabaskar M.S., Fabre M.A., Carter P., Petrovski S., Burgess S., Vassiliou G.S. (2022) Genome-wide analyses of 200,453 individuals yield new insights into the causes and consequences of clonal hematopoiesis. *Nat. Genet.* **54**(8), 1155–1166. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01121-z>
13. Sambrook J., Russell D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd edition). New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 344 p.
14. Hoffman M.M., Ernst J., Wilder S.P., Kundaje A., Harris R.S., Libbrecht M., Giardine B., Ellenbogen P.M., Bilmes J.A., Birney E., Hardison R.C., Dunham I., Kellis M., Noble W.S. (2013) Integrative annotation of chromatin elements from ENCODE data. *Nucleic Acids Res.* **41**(2), 827–841. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1284>
15. Fishilevich S., Nudel R., Rappaport N., Hadar R., Plaschkes I., Iny Stein T., Rosen N., Kohn A., Twik M., Safran M., Lancet D., Cohen D. (2017) GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes

- in GeneCards. *Database* (Oxford). **2017**, bax028. <https://doi.org/10.1093/database/bax028>
16. Irizarry R.A., Ladd-Acosta C., Wen B., Wu Z., Montano C., Onyango P., Cui H., Gabo K., Rongione M., Webster M., Ji H., Potash J., Sabuncuyan S., Feinberg A.P. (2009) The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat. Genet.* **41**(2), 178–186. <https://doi.org/10.1038/ng.298>
 17. Sandoval J., Heyn H., Moran S., Serra-Musach J., Pujañá M.A., Bibikova M., Esteller M. (2011) Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics*. **6**(6), 692–702. <https://doi.org/10.4161/epi.6.6.16196>
 18. Masser D.R., Stanford D.R., Freeman W.M. (2015) Targeted DNA methylation analysis by next-generation sequencing. *J. Vis. Exp.* **96**, 52488. <https://doi.org/10.3791/52488>
 19. Ewels P.A., Peltzer A., Fillinger S., Patel H., Alneberg J., Wilm A., García M.U., Di Tommaso P., Nahnsen S. (2020) The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. *Nat. Biotechnol.* **38**(3), 276–278. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0439-x>
 20. Pedersen B.S., Eyring K., De S., Yang I.V., Schwartz D.A. (2005) Fast and accurate alignment of long bisulfite-seq reads. *arXiv*. 1401.1129v2. <https://doi.org/10.1101/1129>
 21. Krueger F., Andrews S.R. (2011) Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics*. **27**(11), 1571–1572. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr167>
 22. Okonechnikov K., Conesa A., García-Alcalde F. (2016) Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. **2**(2), 292–294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv566>
 23. Daley T., Smith A.D. (2013) Predicting the molecular complexity of sequencing libraries. *Nat. Methods*. **10**(4), 325–327. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2375>
 24. Ewels P., Magnusson M., Lundin S., Käller M. (2016) MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. **32**(19), 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
 25. Akalin A., Kormaksson M., Li S., Garrett-Bakelman F.E., Figueroa M.E., Melnick A., Mason C.E. (2012) methylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biol.* **13**(10), R87. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-10-r87>
 26. Guo W., Zhu P., Pellegrini M., Zhang M.Q., Wang X., Ni Z. (2018) CGmapTools improves the precision of heterozygous SNV calls and supports allele-specific methylation detection and visualization in bisulfite-sequencing data. *Bioinformatics*. **34**(3), 381–387. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx595>
 27. Wang K., Li M., Hakonarson H. (2010) ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **38**(16), e164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq603>
 28. van der Maaten L.J.P., Hinton G.E. (2008) Visualizing data using t-SNE. *J. Mach. Learn. Res.* **9**, 2579–2605.
 29. Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. **21**(2), 263–265. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth457>
 30. Nettersheim F.S., Picard F.S.R., Hoyer F.F., Winkels H. (2022) Immunotherapeutic strategies in cancer and atherosclerosis—two sides of the same coin. *Front. Cardiovasc. Med.* **8**, 812702. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.812702>
 31. Fasehee H., Fakhraee M., Davoudi S., Vali H., Faghihi S. (2019) Cancer biomarkers in atherosclerotic plaque: evidenced from structural and proteomic analyses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **509**(3), 687–693. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.160>
 32. Byrd P.J., Cooper P.R., Stankovic T., Kullar H.S., Watts G.D., Robinson P.J., Taylor M.R. (1996) A gene transcribed from the bidirectional *ATM* promoter coding for a serine rich protein: amino acid sequence, structure and expression studies. *Hum. Mol. Genet.* **5**(11), 1785–1791. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.11.1785>
 33. Medina R., van der Deen M., Miele-Chamberland A., Xie R.L., van Wijnen A.J., Stein J.L., Stein G.S. (2007) The H1NF-P/p220NPAT cell cycle signaling pathway controls nonhistone target genes. *Cancer Res.* **67**(21), 10334–10342. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1560>
 34. Lesurf R., Cotto K.C., Wang G., Griffith M., Kasaian K., Jones S.J., Montgomery S.B., Griffith O.L.; Open Regulatory Annotation Consortium. (2016) ORegAnno 3.0: a community-driven resource for curated regulatory annotation. *Nucleic Acids Res.* **44**(D1), D126–D132. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1203>
 35. Floyd S.R., Pacold M.E., Huang Q., Clarke S.M., Lam F.C., Cannell I.G., Bryson B.D., Rameseder J., Lee M.J., Blake E.J., Fydrich A., Ho R., Greenberger B.A., Chen G.C., Maffa A., Del Rosario A.M., Root D.E., Carpenter A.E., Hahn W.C., Sabatini D.M., Chen C.C., White F.M., Bradner J.E., Yaffe M.B. (2013) The bromodomain protein Brd4 insulates chromatin from DNA damage signalling. *Nature*. **498**(7453), 246–250. <https://doi.org/10.1038/nature12147>
 36. Muhar M., Ebert A., Neumann T., Umkehrer C., Jude J., Wieshofer C., Rescheneder P., Lipp J.J., Herzog V.A., Reichholf B., Cisneros D.A., Hoffmann T., Schlapansky M.F., Bhat P., von Haeseler A., Köcher T., Obenauf A.C., Popow J., Ameres S.L., Zuber J. (2018) SLAM-seq defines direct gene-regulatory functions of the BRD4-MYC axis. *Science*. **360**(6390), 800–805. <https://doi.org/10.1126/science.aao2793>
 37. Kumar R., Manning J., Spendlove H.E., Kremmidiotis G., McKirdy R., Lee J., Millband D.N., Cheney K.M., Stampfer M.R., Dwivedi P.P., Morris H.A., Callen D.F. (2006) ZNF652, a novel zinc finger protein, interacts with the putative breast tumor suppressor CBFA2T3 to repress transcription. *Mol. Cancer Res.* **4**(9), 655–665. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0249>
 38. Pilarowski G.O., Vernon H.J., Applegate C.D., Boukas L., Cho M.T., Gurnett C.A., Benke P.J., Beaver E., Heeley J.M., Medne L., Krantz I.D., Azage M., Niyazov D., Henderson L.B., Wentzensen I.M., Baskin B., Sacoto M.J.G.,

- Bowman G.D., Bjornsson H.T. (2018) Missense variants in the chromatin remodeler *CHD1* are associated with neurodevelopmental disability. *J. Med. Genet.* **55**(8), 561–566.
<https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104759>
39. Hossain M.B., Vahter M., Concha G., Broberg K. (2012) Environmental arsenic exposure and DNA methylation of the tumor suppressor gene p16 and the DNA repair gene *MLH1*: effect of arsenic metabolism and genotype. *Metallomics*. **4**(11), 1167–1175.
<https://doi.org/10.1039/c2mt20120h>
 40. Ghosh M., Oner D., Poels K., Tabish A.M., Vlaanderen J., Pronk A., Kuijpers E., Lan Q., Vermeulen R., Bekaert B., Hoet P.H., Godderis L. (2017) Changes in DNA methylation induced by multi-walled carbon nanotube exposure in the workplace. *Nanotoxicology*. **11**(9–10), 1195–1210.
<https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1406169>
 41. Sanchez H., Hossain M.B., Lera L., Hirsch S., Albala C., Uauy R., Broberg K., Ronco A.M. (2017) High levels of circulating folate concentrations are associated with DNA methylation of tumor suppressor and repair genes *p16*, *MLH1*, and *MGMT* in elderly Chileans. *Clin. Epigenetics*. **9**, 74.
<https://doi.org/10.1186/s13148-017-0374-y>
 42. Remely M., Ferk F., Sterneder Sioy, Setayesh T., Kepcija T., Roth S., Noorizadeh R., Greunz M., Rebhan I., Wagner K.H., Knasmüller S., Haslberger A. (2017) Vitamin E modifies high-fat diet-induced increase of DNA strand breaks, and changes in expression and DNA methylation of *Dnmt1* and *MLH1* in C57BL/6J male mice. *Nutrients*. **9**(6), 607.
<https://doi.org/10.3390/nu9060607>
 43. Bhattacharjee P., Sanyal T., Bhattacharjee S., Bhattacharjee P. (2018) Epigenetic alteration of mismatch repair genes in the population chronically exposed to arsenic in West Bengal, India. *Environ. Res.* **163**, 289–296.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.002>
 44. Zappe K., Pointner A., Switzeny O.J., Magnet U., Tomeva E., Heller J., Mare G., Wagner K.H., Knasmüller S., Haslberger A.G. (2018) Counteraction of oxidative stress by vitamin E affects epigenetic regulation by increasing global methylation and gene expression of *MLH1* and *DNMT1* dose dependently in Caco-2 cells. *Oxid. Med. Cell Longev.* **3734250**.
<https://doi.org/10.1155/2018/3734250>
 45. Mohammad G., Radhakrishnan R., Kowluru R.A. (2019) Epigenetic modifications compromise mitochondrial DNA quality control in the development of diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **60**(12), 3943–3951.
<https://doi.org/10.1167/iovs.19-27602>
 46. Mulder R.H., Neumann A., Cecil C.A.M., Walton E., Houtepen L.C., Simpkin A.J., Rijlaarsdam J., Heijmans B.T., Gaunt T.R., Felix J.F., Jaddoe V.W., Bakermans-Kranenburg M.J., Tiemeier H., Relton C.L., van IJzendoorn M.H., Suderman M. (2021) Epigenome-wide change and variation in DNA methylation in childhood: trajectories from birth to late adolescence. *Hum. Mol. Genet.* **30**(1), 119–134.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa280>
 47. Feinberg A.P., Irizarry R.A. (2010) Evolution in health and medicine Sackler colloquium: stochastic epigenetic variation as a driving force of development, evolutionary adaptation, and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**(1), 1757–1764.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0906183107>
 48. Grundberg E., Meduri E., Sandling J.K., Hedman A.K., Keildson S., Buil A., Busche S., Yuan W., Nisbet J., Sekowska M., Wilk A., Barrett A., Small K.S., Ge B., Caron M., Shin S.Y.; Multiple Tissue Human Expression Resource Consortium; Lathrop M., Dermitzakis E.T., McCarthy M.I., Spector T.D., Bell J.T., Deloukas P. (2013) Global analysis of DNA methylation variation in adipose tissue from twins reveals links to disease-associated variants in distal regulatory elements. *Am. J. Hum. Genet.* **93**(5), 876–890.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.10.004>
 49. Ahsan M., Ek W.E., Rask-Andersen M., Karlsson T., Lind-Thomsen A., Enroth S., Gyllenstein U., Johansson A. (2017) The relative contribution of DNA methylation and genetic variants on protein biomarkers for human diseases. *PLoS Genet.* **13**(9), 1007005.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007005>
 50. Zhou D., Li Z., Yu D., Wan L., Zhu Y., Lai M., Zhang D. (2015) Polymorphisms involving gain or loss of CpG sites are significantly enriched in trait-associated SNPs. *Oncotarget*. **6**(37), 39995–40004.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.5650>
 51. Gong J., Wan H., Mei S., Ruan H., Zhang Z., Liu C., Guo A.Y., Diao L., Miao X., Han L. (2019) PancanmeQTL: a database to systematically evaluate the effects of genetic variants on methylation in human cancer. *Nucleic Acids Res.* **47**(D1), D1066–D1072.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky814>
 52. Бабушкина Н.П., Кучер А.Н. (2023) Регуляторный потенциал SNP-маркеров в генах, кодирующих белки систем репарации ДНК. *Молекуляр. биология*. **57**(1), 24–46.
 53. Zaina S., Heyn H., Carmona F.J., Varol N., Sayols S., Condom E., Ramirez-Ruz J., Gomez A., Gonçalves I., Moran S., Esteller M. (2014) DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **7**(5), 692–700.
<https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000441>
 54. Li J., Zhang X., Yang M., Yang H., Xu N., Fan X., Liu G., Jiang X., Fan J., Zhang L., Zhang H., Zhou Y., Li R., Gao S., Jin J., Jin Z., Zheng J., Tu Q., Ren J. (2021) DNA methylome profiling reveals epigenetic regulation of lipoprotein-associated phospholipase A2 in human vulnerable atherosclerotic plaque. *Clin. Epigenetics*. **13**(1), 161.
<https://doi.org/10.1186/s13148-021-01152-z>
 55. Istaş G., Declerck K., Pudenz M., Szic K.S.V., Lendinez-Tortajada V., Leon-Latre M., Heyninck K., Haegeman G., Casasnovas J.A., Tellez-Plaza M., Gerhauer C., Heiss C., Rodriguez-Mateos A., Berghe W.V. (2017) Identification of differentially methylated *BRCA1* and *CRISP2* DNA regions as blood surrogate markers for cardiovascular disease. *Sci. Rep.* **7**(1), 5120.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-03434-0>

Methylation of Regulatory Regions of DNA Repair System Genes in Carotid Atherosclerosis

N. P. Babushkina^{1, *}, A. A. Zarubin¹, Iu. A. Koroleva¹, D. E. Gomboeva¹, E. Yu. Bragina¹,
I. A. Goncharova¹, M. V. Golubenko¹, R. R. Salakhov¹, A. A. Sleptsov¹, M. S. Kuznetsov²,
B. N. Kozlov², E. F. Muslimova², S. A. Afanasiev², A. N. Kucher¹, and M. S. Nazarenko¹

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

²Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences,
Tomsk, 634034 Russia

*e-mail: nad.babushkina@medgenetics.ru

The status of DNA methylation in the human genome changes during the pathogenesis of common diseases and acts as a predictor of life expectancy. Therefore, it is of interest to investigate the methylation level of regulatory regions of genes responsible for general biological processes that are potentially significant for the development of age-associated diseases. Among them there are genes encoding proteins of DNA repair system, which are characterized by pleiotropic effects. Here, results of the targeted methylation analysis of two regions of the human genome (the promoter of the *MLH1* gene and the enhancer near the *ATM* gene) in different tissues of patients with carotid atherosclerosis are present. Analysis of the methylation profiles of studied genes in various tissues of the same individuals demonstrated marked differences between leukocytes and tissues of the vascular wall. Differences in methylation levels between normal and atherosclerotic tissues of the carotid arteries were revealed only for two studied CpG sites (chr11:108089866 and chr11:108090020, GRCh37/hg19 assembly) in the *ATM* gene. Based on this, we can assume the involvement of *ATM* in the development of atherosclerosis. “Overload” of the studied regions with transcription factor binding sites (according to ReMapp2022 data) indicate that the tissue-specific nature of methylation of the regulatory regions of the *MLH1* and *ATM* may be associated with expression levels of these genes in a particular tissue. It has been shown that inter-individual differences in the methylation levels of CpG sites are associated with sufficiently distant nucleotide substitutions.

Keywords: DNA methylation, CpG islands, NGS, atherosclerosis, *ATM*, *MLH1*

УДК 575.113.5:575.117.2

JMJD3 ПРОЯВЛЯЕТ ОНКОРЕПРЕССОРНУЮ АКТИВНОСТЬ В КЛЕТКАХ ОСТРОГО ПРОМИЕЛОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА, СТИМУЛИРУЯ ЭКСПРЕССИЮ PU.1¹

© 2023 г. М.-Х. Wang^{a, b}, S.-H. Yu^a, M. Xiao^{c, *}, J. Chen^{a, **}

^aShanghai Institute of Hematology, State Key Laboratory of Medical Genomics, National Research Center for Translational Medicine at Shanghai, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025 China

^bDepartment of Medical Oncology, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou Medical University, Xuzhou, 221009 China

^cShanghai Ji Ai Genetics and IVF Institute, the Obstetrics and Gynecology Hospital of Fudan University, Shanghai, 200011 China

*e-mail: xiaomin3296@163.com

**e-mail: chenjuanrj@163.com

Поступила в редакцию 27.08.2022 г.

После доработки 02.11.2022 г.

Принята к публикации 03.11.2022 г.

Полностью *транс*-ретиноевая кислота, применяемая в терапии острого промиелоцитарного лейкоза, известна как часто используемый для индукции дифференцировки препарат, который восстанавливает экспрессию ключевого фактора транскрипции PU.1, детерминирующего нормальный гемопоэз клеток миелоидной линии. Ранее мы обнаружили, что индуцируемая стрессом гистондеметилаза H3K27 – JMJD3 – прямо активирует экспрессию PU.1, что стимулирует коммитирование миелоидных клеток в ходе нормального гемопоэза. Кроме того, JMJD3 действует как онкорепрессор и играет критически важную регуляторную роль в инициации и прогрессии злокачественного гемопоэза. В настоящей работе продолжено изучение связи между JMJD3 и PU.1 при остром промиелоцитарном лейкозе, при котором JMJD3 проявляет онкосупрессорную активность, стимулируя экспрессию PU.1.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, гистондеметилаза, JMJD3, PU.1, миелоидная дифференцировка

DOI: 10.31857/S0026898423040213, EDN: QMAEUQ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Geissmann F., Manz M.G., Jung S., Sieweke M.H., Merad M., Ley K. (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. **327**(5966), 656–661.
2. Lieschke G.J., Oates A.C., Paw B.H., Thompson M.A., Hall N.E., Ward A.C., Ho R.K., Zon L.I., Layton J.E. (2002) Zebrafish SPI-1 (PU.1) marks a site of myeloid development independent of primitive erythropoiesis: implications for axial patterning. *Dev. Biol.* **246**(2), 274–295.
3. Scott E.W., Simon M.C., Anastasi J., Singh H. (1994) Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*. **265**(5178), 1573–1577.
4. DeKoter R.P., Singh H. (2000) Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*. **288**(5470), 1439–1441.
5. Dahl R., Walsh J.C., Lancki D., Laslo P., Iyer S.R., Singh H., Simon M.C. (2003) Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat. Immunol.* **4**(10), 1029–1036.
6. Fisher R.C., Scott E.W. (1998) Role of PU.1 in hematopoiesis. *Stem Cells*. **16**(1), 25–37.
7. Pham T.H., Benner C., Lichtinger M., Schwarzfischer L., Hu Y., Andreesen R., Chen W., Rehli M. (2012) Dynamic epigenetic enhancer signatures reveal key transcription factors associated with monocytic differentiation states. *Blood*. **119**(24), e161–e71.
8. Herault A., Binnewies M., Leong S., Calero-Nieto F.J., Zhang S.Y., Kang Y.A., Wang X., Pietras E.M., Chu S.H., Barry-Holson K., Armstrong S., Gottgens B., Passegue E. (2017) Myeloid progenitor cluster formation drives emergency and leukaemic myelopoiesis. *Nature*. **544**(7648), 53–58.

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

9. Paz-Priel I., Friedman A. (2011) C/EBPalpha dysregulation in AML and ALL. *Crit. Rev. Oncog.* **16**(1–2), 93–102.
10. Anguita E., Gupta R., Olariu V., Valk P.J., Peterson C., Delwel R., Enver T. (2016) A somatic mutation of GFI1B identified in leukemia alters cell fate via a SPI1 (PU.1) centered genetic regulatory network. *Dev. Biol.* **411**(2), 277–286.
11. Van Thillo Q., De Bie J., Seneviratne J.A., Demeyer S., Omari S., Balachandran A., Zhai V., Tam W.L., Sweron B., Geerdens E., Gielen O., Provost S., Segers H., Boeckx N., Marshall G.M., Cheung B.B., Isobe K., Kato I., Takita J., Amos T.G., Deveson I.W., McCalmont H., Lock R.B., Oxley E.P., Garwood M.M., Dickins R.A., Uytendaele A., Carter D.R., Cools J., de Bock C.E. (2021) Oncogenic cooperation between TCF7-SPI1 and NRAS(G12D) requires beta-catenin activity to drive T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Commun.* **12**(1), 4164.
12. Swigut T., Wysocka J. (2007) H3K27 demethylases, at long last. *Cell.* **131**(1), 29–32.
13. Salminen A., Kaarniranta K., Hiltunen M., Kauppinen A. (2014) Histone demethylase Jumonji D3 (JMJD3/KDM6B) at the nexus of epigenetic regulation of inflammation and the aging process. *J. Mol. Med. (Berl.)*. **92**(10), 1035–1043.
14. Miller S.A., Mohn S.E., Weinmann A.S. (2010) Jmjd3 and UTX play a demethylase-independent role in chromatin remodeling to regulate T-box family member-dependent gene expression. *Mol. Cell.* **40**(4), 594–605.
15. Shi X., Zhang Z., Zhan X., Cao M., Satoh T., Akira S., Shpargel K., Magnuson T., Li Q., Wang R., Wang C., Ge K., Wu J. (2014) An epigenetic switch induced by Shh signalling regulates gene activation during development and medulloblastoma growth. *Nat. Commun.* **5**, 5425.
16. Chen S., Ma J., Wu F., Xiong L.J., Ma H., Xu W., Lv R., Li X., Villen J., Gygi S.P., Liu X.S., Shi Y. (2012) The histone H3 Lys 27 demethylase JMJD3 regulates gene expression by impacting transcriptional elongation. *Genes Dev.* **26**(12), 1364–1375.
17. Yu S.H., Zhu K.Y., Zhang F., Wang J., Yuan H., Chen Y., Jin Y., Dong M., Wang L., Jia X.E., Gao L., Dong Z.W., Ren C.G., Chen L.T., Huang Q.H., Deng M., Zou L.I., Zhou Y., Zhu J., Xu P.F., Liu T.X. (2018) The histone demethylase Jmjd3 regulates zebrafish myeloid development by promoting spil expression. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech* (1861) (2), 106–116.
18. Yu S.H., Zhu K.Y., Chen J., Liu X.Z., Xu P.F., Zhang W., Yan L., Guo H.Z., Zhu J. (2018) JMJD3 facilitates C/EBPbeta-centered transcriptional program to exert oncorepressor activity in AML. *Nat. Commun.* **9**(1), 3369.
19. Kamens J. (2015) The Addgene repository: an international nonprofit plasmid and data resource. *Nucl. Acids Res.* **43**(Database issue), D1152–D1157.
20. Irizarry R.A., Bolstad B.M., Collin F., Cope L.M., Hobbs B., Speed T.P. (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucl. Acids Res.* **31**(4), e15.
21. Gutierrez N.C., Lopez-Perez R., Hernandez J.M., Isidro I., Gonzalez B., Delgado M., Ferminan E., Garcia J.L., Vazquez L., Gonzalez M., San Miguel J.F. (2005) Gene expression profile reveals deregulation of genes with relevant functions in the different subclasses of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. **19**(3), 402–409.
22. Ley T.J., Mardis E.R., Ding L., Fulton B., McLellan M.D., Chen K., Dooling D., Dunford-Shore B.H., McGrath S., Hickenbotham M., Cook L., Abbott R., Larson D.E., Koboldt D.C., Pohl C., Smith S., Hawkins A., Abbott S., Locke D., Hillier L.W., Miner T., Fulton L., Magrini V., Wylie T., Glasscock J., Conyers J., Sander N., Shi X., Osborne J.R., Minx P., Gordon D., Chinwalla A., Zhao Y., Ries R.E., Payton J.E., Westervelt P., Tomasson M.H., Watson M., Baty J., Ivanovich J., Heath S., Shannon W.D., Nagarajan R., Walter M.J., Link D.C., Graubert T.A., DiPersio J.F., Wilson R.K. (2008) DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*. **456**(7218), 66–72.
23. Valk P.J., Verhaak R.G., Beijnen M.A., Erpelinck C.A., Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S., Borer J.M., Beverloo H.B., Moorhouse M.J., van der Spek P.J., Lowenberg B., Delwel R. (2004) Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **350**(16), 1617–1628.
24. Haeflrich T., Kohlmann A., Wiczorek L., Basso G., Kronnig G.T., Bene M.C., De Vos J., Hernandez J.M., Hofmann W.K., Mills K.I., Gilkes A., Chiaretti S., Shurtleff S.A., Kipps T.J., Rassenti L.Z., Yeoh A.E., Papenhausen P.R., Liu W.M., Williams P.M., Foa R. (2010) Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia: report from the International Microarray Innovations in Leukemia study group. *J. Clin. Oncol.* **28**(15), 2529–2537.
25. Burg J.M., Link J.E., Morgan B.S., Heller F.J., Hargrove A.E., McCafferty D.G. (2015) KDM1 class flavin-dependent protein lysine demethylases. *Biopolymers*. **104**(4), 213–246.
26. Wang Z., Qin G., Zhao T.C. (2014) HDAC4: mechanism of regulation and biological functions. *Epigenomics*. **6**(1), 139–150.
27. Xhabija B., Kidder B.L. (2019) KDM5B is a master regulator of the H3K4-methylome in stem cells, development and cancer. *Semin. Cancer Biol.* **57**, 79–85.
28. Tellier M. (2021) Structure, activity, and function of SETMAR protein lysine methyltransferase. *Life (Basel)*. **11**(12), 1342.
29. Kramer O.H. (2009) HDAC2: a critical factor in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* **30**(12), 647–655.
30. Mueller B.U., Pabst T., Fos J., Petkovic V., Fey M.F., Asou N., Buergi U., Tenen D.G. (2006) ATRA resolves the differentiation block in t(15;17) acute myeloid leukemia by restoring PU.1 expression. *Blood*. **107**(8), 3330–3338.
31. Fu W., Zhu G., Xu L., Liu J., Han X., Wang J., Wang X., Hou J., Zhao H., Zhong H. (2022) G-CSF upregulates the expression of aquaporin-9 through CEBPB to enhance the cytotoxic activity of arsenic trioxide to acute myeloid leukemia cells. *Cancer Cell Int.* **22**(1), 195.
32. Duprez E., Wagner K., Koch H., Tenen D.G. (2003) C/EBPbeta: a major PML-RARA-responsive gene in retinoic acid-induced differentiation of APL cells. *EMBO J.* **22**(21), 5806–5816.

JMJD3 Exerts Oncorepressor Activity in Acute Promyelocytic Leukemia by Promoting PU.1 Expression

M.-X. Wang^{1, 2}, S.-H. Yu¹, M. Xiao^{3, *}, and J. Chen^{1, **}

¹*Shanghai Institute of Hematology, State Key Laboratory of Medical Genomics, National Research Center for Translational Medicine at Shanghai, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025 China*

²*Department of Medical Oncology, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou Medical University, Xuzhou, 221009 China*

³*Shanghai Ji Ai Genetics and IVF Institute, the Obstetrics and Gynecology Hospital of Fudan University, Shanghai, 200011 China*

**e-mail: xiaomin3296@163.com*

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

All-trans retinoic acid (ATRA) in acute promyelocytic leukemia (APL) has been the most famous differentiation induction therapy during which the expression of PU.1, a key transcription factor (TF) for myeloid lineage determination in normal hematopoiesis is restored. In our previous studies, we found a stress-inducible H3K27 demethylase, JMJD3, to directly upregulate PU.1 expression to promote myeloid commitment during normal myelopoiesis. In addition, JMJD3 acts as an oncorepressor and plays a critical regulatory role in the initiation and progression of malignant hematopoiesis. In this study, we further resolved the relationship between JMJD3 and PU.1 in APL therein JMJD3 exerts oncorepressor activity via promoting PU.1 expression.

Keywords: acute myeloid leukemia, histone demethylase, JMJD3, PU.1, myeloid differentiation

КОМБИНИРОВАННАЯ СВЕРХЭКСПРЕССИЯ *Foxa3* и *Hnf4a* УСИЛИВАЕТ ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ПРОДЛЕВАЕТ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ СОХРАННОСТЬ ПЕРВИЧНЫХ ГЕПАТОЦИТОВ¹

© 2023 г. J. Y. Fan^{a, b, c, 2}, G. Dama^{a, d, 2}, Y. L. Liu^{a, b}, W. Y. Guo^b, J. T. Lin^{a, b, e, *}

^aStem Cell and Biotherapy Engineering Research Center of Henan,
Henan Joint International Research Laboratory of Stem Cell Medicine, Xinxiang Medical University,
Xinxiang, 453003 China

^bCollege of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Henan, Xinxiang, 453003 China

^cShandong Tianchuan Precision Medical Technology Co. Ltd., Dezhou, 253084 China

^dDepartment of Community Health, Advanced Medical and Dental Institute, University Sains Malaysia,
Kepala Batas, 13200 Malaysia

^eCollege of Biomedical Engineering, Xinxiang Medical University, Henan, Xinxiang, 453003 China

*e-mail: linjilin@126.com

Поступила в редакцию 05.09.2022 г.

После доработки 07.11.2022 г.

Принята к публикации 06.12.2022 г.

В системе культивирования *in vitro* пролиферативная активность первичных гепатоцитов обычно низкая и сопровождается снижением жизнеспособности и потерей специфических для гепатоцитов функций. Ранее показано, что комбинированное введение определенных гепатоцитспецифических факторов транскрипции приводит к конвертированию фибробластов в функциональные гепатоцитоподобные клетки. Однако комбинированное использование факторов транскрипции в первичной культуре гепатоцитов еще недостаточно изучено. Белки FoxA3 (forkhead box protein A3) и Hnf4α (forkhead box protein A3 hepatocyte nuclear factor 4α) представляют собой факторы транскрипции, которыми обогащена печень, и играют жизненно важную роль в дифференцировке и поддержании гепатоцитов. В представленном исследовании в гепатоцитах крысы получили одновременную избыточную экспрессию двух генов: *Foxa3* и *Hnf4a*. Показано, что комбинированное усиление экспрессии двух транскрипционных факторов: FoxA3 и Hnf4α — приводит к повышенной скорости пролиферации и стабилизации специфических функций первичных гепатоцитов в течение длительного периода культивирования.

Ключевые слова: гепатоциты, пролиферация, печень, FoxA3, Hnf4α

DOI: 10.31857/S0026898423040031, **EDN:** QKQQW

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Taub R. (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 836–847.
2. Li A.P. (2007) Human hepatocytes: isolation, cryopreservation and applications in drug development. *Chem. Biol. Interact.* **168**, 16–29.
3. Farinati F., Cardin R., D'Errico A., De Maria N., Naccarato R., Cecchetto A., Grigioni W. (1996) Hepatocyte proliferative activity in chronic liver damage as assessed by the monoclonal antibody MIB1 Ki67 in archival material: the role of etiology, disease activity, iron, and lipid peroxidation. *Hepatology*. **23**, 1468–1475.
4. Michalopoulos G.K., De Frances M.C. (1997) Liver regeneration. *Science*. **276**, 60–66.
5. Block G.D., Locker J., Bowen W.C., Petersen B.E., Katyal S., Strom S.C., Riley T., Howard T.A., Michalopoulos G.K. (1996) Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J. Cell. Biol.* **132**, 1133–1149.
6. Mitaka T. (1998) The current status of primary hepatocyte culture. *Int. J. Exp. Pathol.* **79**, 393–409.
7. Wang J., Xu L., Chen Q., Zhang Y., Hu Y., Yan L. (2015) Bone mesenchymal stem cells overexpressing FGF4 contribute to liver regeneration in an animal

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

² Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

- model of liver cirrhosis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 12774–12782.
8. Berthiaume F., Moghe P.V., Toner M., Yarmush M.L. (1996) Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *FASEB J.* **10**, 1471–1484.
 9. Takashi H., Katsumi M., Toshihiro A. (2007) Hepatocytes maintain their function on basement membrane formed by epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**(1), 151–156.
 10. Cho C.H., Berthiaume F., Tilles A.W., Yarmush M.L. (2008) A new technique for primary hepatocyte expansion *in vitro*. *Biotechnol. Bioeng.* **101**, 345–356.
 11. Tan G.D., Toh G.W., Birgersson E., Robens J., van Noort D., Leo H.L. (2013) A thin-walled polydimethylsiloxane bioreactor for high-density hepatocyte sandwich culture. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 1663–1673.
 12. Paul D., Hohne M., Pinkert C., Piasecki A., Ummelmann E., Brinster R.L. (1988) Immortalized differentiated hepatocyte lines derived from transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes. *Exp. Cell. Res.* **175**, 354–362.
 13. Wege H., Le H.T., Chui M.S., Liu L., Wu J., Giri R., Malhi H., Sappal B.S., Kumaran V., Gupta S., Zern M.A. (2003) Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology*. **124**, 432–444.
 14. Tsuruga Y., Kiyono T., Matsushita M., Takahashi T., Kasai H., Matsumoto S., Todo S. (2008) Establishment of immortalized human hepatocytes by introduction of HPV16 E6/E7 and hTERT as cell sources for liver cell-based therapy. *Cell. Transplant.* **17**, 1083–1094.
 15. Sekiya S., Suzuki A. (2011) Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature*. **475**, 390–393.
 16. Naldini L., Blomer U., Gally P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., Trono D. (1996) *In vivo* gene delivery and stable transduction of non dividing cells by a lentiviral vector. *Science*. **272**, 263–267.
 17. Kingston R.E., Chen C.A., Okayama H. (2003) Calcium phosphate transfection. *Curr. Protoc. Cell. Biol.* **20**, 20–23.
 18. Bowles N.E., Eisensmith R.C., Mohiuddin R., Pyron M., Woo S.L. (1996) A simple and efficient method for the concentration and purification of recombinant retrovirus for increased hepatocyte transduction *in vivo*. *Hum. Gene. Ther.* **7**, 1735–1742.
 19. Lecluyse E.L., Alexandre E. (2010) Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. *Methods Mol. Biol.* **640**, 57–82.
 20. Schmittgen T.D., Livak K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101–1108.
 21. Yamada T., Yoshikawa M., Kanda S., Kato Y., Nakajima Y., Ishizaka S., Tsunoda Y. (2002) *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells*. **20**, 146–154.
 22. Shulman M., Nahmias Y. (2013) Long-term culture and coculture of primary rat and human hepatocytes. In: *Epithelial Cell Culture Protocols*: Second Edition. Eds Randell H.S., Fulcher L.M. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 287–302.
 23. Schrem H., Klempnauer J., Borlak J. (2002) Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: The hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacol. Rev.* **54**, 129–158.
 24. Huang P., He Z., Ji S., Sun H., Xiang D., Liu C., Hu Y., Wang X., Hui L. (2011) Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature*. **475**, 386–389.
 25. Du Y., Wang J., Jia J., Song N., Xiang C., Xu J., Hou Z., Su X., Liu B., Jiang T., Zhao D., Sun Y., Shu J., Guo Q., Yin M., Sun D., Lu S., Shi Y., Deng H. (2014) Human hepatocytes with drug metabolic function induced from fibroblasts by lineage reprogramming. *Cell Stem Cell*. **14**, 394–403.
 26. Huang P., Zhang L., Gao Y., He Z., Yao D., Xu J., Hou Z., Su X., Liu B., Jiang T., Zhao D., Sun Y., Shu J., Guo Q., Yin M., Sun D., Lu S., Shi Y., Deng H. (2014) Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes. *Cell Stem Cell*. **14**, 370–384.
 27. Kim J., Kim K.P., Lim K.T., Lee S.C., Yoon J., Song G., Hwang S.I., Schöler H.R., Cantz T., Han D.W. (2015) Generation of integration-free induced hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts. *Sci. Rep.* **5**, 15706.
 28. Tomizawa M., Shinozaki F., Motoyoshi Y., Sugiyama T., Yamamoto S., Ishige N. (2016) Transcription factors and medium suitable for initiating the differentiation of human induced pluripotent stem cells to the hepatocyte lineage. *J. Cell. Biochem.* **117**, 2001–2009.
 29. Naiki T., Nagaki M., Asano T., Kimata T., Moriwaki H. (2005) Adenovirus-mediated hepatocyte nuclear factor-4 α overexpression maintains liver phenotype in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335**, 496–500.
 30. Cirillo L.A., Lin F.R., Cuesta I., Friedman D., Jarnik M., Zaret K.S. (2002) Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol. Cell*. **9**, 279–289.
 31. Wangenstein K.J., Zhang S., Greenbaum L.E., Kaestner K.H. (2015) A genetic screen reveals Foxa3 and TNFR1 as key regulators of liver repopulation. *Genes Dev.* **29**, 904–909.
 32. Li J., Ning G., Duncan S.A. (2000) Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4 α . *Genes Dev.* **14**, 464–474.
 33. Shen W., Searce L.M., Brestelli J.E., Sund N.J., Kaestner K.H. (2001) Foxa3 (hepatocyte nuclear factor 3 γ) is required for the regulation of hepatic GLUT2 expression and the maintenance of glucose homeostasis during a prolonged fast. *J. Biol. Chem.* **276**, 42812–42817.
 34. Parviz F., Matullo C., Garrison W.D., Savatski L., Adamson J.W., Ning G., Kaestner K.H., Rossi J.M., Zaret K.S., Duncan S.A. (2003) Hepatocyte nuclear factor 4 α controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat. Genet.* **34**, 292–296.
 35. Liu K., Guo M.G., Lou X.L., Li X.Y., Xu Y., Ji W.D., Huang X.D., Yang J.H., Duan J.C. (2015) Hepatocyte nuclear factor 4 α induces a tendency of differentiation and activation of rat hepatic stellate cells. *World J. Gastroenterol.* **21**, 5856–5866.
 36. Klocke R., Gomez-Lechon M.J., Ehrhardt A., Mendoza-Figueroa T., Donato M.T., López-Revilla R., Castell J.V., Paul D. (2002) Establishment and characterization of immortal hepatocytes derived from various transgenic mouse lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**, 864–871.

Combinational Overexpression of *Foxa3* and *Hnf4a* Enhance the Proliferation and Prolong the Functional Maintenance of Primary Hepatocytes

J. Y. Fan^{1, 2, 3}, G. Dama^{1, 4}, Y. L. Liu^{1, 2}, W. Y. Guo², and J. T. Lin^{1, 2, 5, *}

¹*Stem Cell and Biotherapy Engineering Research Center of Henan,
Henan Joint International Research Laboratory of Stem Cell Medicine, Xinxiang Medical University,
East of JinSui Road 601, Xinxiang, 453003 China*

²*College of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Henan, Xinxiang, 453003 China*

³*Shandong Tianchuan Precision Medical Technology Co. Ltd., Dezhou, 253084 China*

⁴*Department of Community Health, Advanced Medical and Dental Institute, Universiti Sains Malaysia,
Kepala Batas, 13200 Malaysia*

⁵*College of Biomedical Engineering, Xinxiang Medical University, Henan, Xinxiang, 453003 China*

**e-mail: linjtlin@126.com*

In an *in vitro* culture system, primary hepatocytes usually display a low proliferation capacity, accompanied with a decrease of viability and a loss of hepatocyte-specific functions. Previous studies have demonstrated that the combination introductions of certain hepatocyte-specific transcription factors are able to convert fibroblasts into functional hepatocyte-like cells. However, such combinational usage of transcription factors in primary hepatocytes culture has not yet sufficiently studied. The forkhead box protein A3 (FoxA3) and hepatocyte nuclear factor 4 α (Hnf4 α) are liver-enriched transcription factors that play vital roles in the differentiation, and maintenance of hepatocytes. Thus, we simultaneously overexpressed the two genes, *Foxa3* and *Hnf4a*, in rat hepatocytes and observed that the combinational augmentation of these two transcription factors have enhanced the proliferation and stabilized the hepatocyte-specific functions of primary hepatocytes over a long-term culture period.

Keywords: hepatocytes, proliferation, liver, FoxA3, Hnf4 α

УДК 577.24

БИОГЕНЕЗ микроРНК ПРИ КЛЕТОЧНОМ СТАРЕНИИ, ИНДУЦИРОВАННОМ ХРОНИЧЕСКИМ СТРЕССОМ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

© 2023 г. Д. М. Зайченко^a, А. А. Микрюкова^a, Я. Р. Астафьева^a, С. Г. Малахов^c,
А. А. Кубатиев^{a, b}, А. А. Московцев^{a, b, *}

^aНаучно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

^bРоссийская медицинская академия непрерывного профессионального образования (РМАНПО)
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125993 Россия

^cГородская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы,
Москва, 125284 Россия

*e-mail: bioinf@mail.ru

Поступила в редакцию 20.11.2022 г.

После доработки 09.12.2022 г.

Принята к публикации 09.12.2022 г.

Малые некодирующие РНК (микроРНК) регулируют экспрессию генов, стабилизируют клеточный фенотип и играют важную роль в дифференцировке, развитии и апоптозе клеток. Канонический путь биогенеза микроРНК включает несколько этапов посттранскрипционного процессинга и транспорта и завершается цитоплазматическим расщеплением пре-микроРНК рибонуклеазой типа III DICER с формированием зрелого дуплекса, который встраивается в комплекс RISC. Биогенез микроРНК и их роль в таком важном процессе, как клеточный стресс, изучены недостаточно. В данной работе с использованием проточной цитофлуориметрии и высокопроизводительного анализа экспрессии генов показано, что хронический стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) — один из видов клеточного стресса, связанного с нарушением сворачивания белков в ЭПР — приводит к формированию фенотипа клеточного старения в фибробластоподобных клетках FRSN. Острый стресс ЭПР способен снижать биогенез микроРНК, тогда как хронический стресс не вызывает существенного падения глобальной экспрессии микроРНК и сопровождается лишь незначительным снижением экспрессии мРНК DICER1. Обнаружено также увеличение гетерогенности клеточной популяции по активности лизосомной бета-галактозидазы при хроническом стрессе ЭПР. Не исключена индуцируемая или исходная неоднородность клеточной популяции и по экспрессии компонентов пути биогенеза микроРНК.

Ключевые слова: стресс эндоплазматического ретикулума, стресс-индуцируемое старение, биогенез микроРНК

DOI: 10.31857/S0026898423040250, **EDN:** QMCHZK

ВВЕДЕНИЕ

Стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР) — один из наиболее изученных видов клеточного стресса [1–4]. ЭПР играет важную роль в синтезе и созревании белков, а действие факторов стресса вызывает дисфункцию системы сворачивания белков в этом компартменте. В результате развивается протеотоксический клеточный стресс с накоплением в просвете ЭПР и цитоплазме токсичных и склонных к агрегации белков с дефективными конформациями. При стрессе ЭПР активируется система сигнальных каскадов, названная системой ответа на белки с ненативными конформациями (Unfolded Protein Response, UPR) [5]. Си-

стема UPR играет двойную роль — запускает адаптивные реакции клетки или программируемую клеточную гибель в случае невозможности восстановления нормального гомеостаза [6].

Клеточный стресс в существенной степени меняет механизмы реализации генетической информации в клетке: модулируются процессы трансляции, транскрипции, а также сплайсинга, транспорта, деградации и стабилизации различных видов РНК, что приводит к значительным изменениям клеточного рибонуклеома [7]. МикроРНК, изящно названные Дэвидом Бартелом скульпторами транскриптома млекопитающих [8], играют важную роль в регуляции экспрессии большин-

ства генов, но их функции в клеточном стрессе и старении изучены недостаточно.

Класс микроРНК объединяет малые некодирующие РНК длиной 20–23 нуклеотида, впервые описанные в 1993 году [9]. МикроРНК регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном и транскрипционном уровнях [8, 10]. Локусы генов микроРНК обнаружены в экзонах (6%) и интронах (44%) кодирующих и некодирующих белки генов, а также в межгенных (50%) областях [11]. Гены микроРНК, в своем большинстве, транскрибируются РНК-полимеразой II, при этом транскрипт подвергается процессингу. Первичный транскрипт (при-микроРНК), достигающий в длину от сотен до нескольких тысяч нуклеотидов, содержит одну или несколько шпилечных структур (60–150 нуклеотидов), являющихся предшественниками (пре-микроРНК) зрелых микроРНК [12]. Эти структуры вырезаются эндорибонуклеазой III Drosha с участием кофактора DGCR8 и ряда других вспомогательных белков, формирующих микропроцессинговый комплекс. Если микроРНК расположена в интроне гена-хозяина и лишена своего собственного промотора, то процессинг ее предшественника, также осуществляемый микропроцессинговым комплексом, участвующим в созревании микроРНК, происходит параллельно со сплайсингом транскрипта гена-хозяина, но до стадии вырезания интронов. Отдельный класс микроРНК – митроны – процессируются без участия микропроцессингового комплекса. После процессинга в ядре предшественники микроРНК транспортируются с участием экспортина-5 (Exp5) в цитоплазму, где специфически расщепляются эндорибонуклеазой типа III DICER [12], что приводит к формированию короткого РНК-дуплекса с 3'-концевыми свесами, одна цепь которого “выбирается” белком семейства Argonaute (AGO1-AGO4) и помещается в макромолекулярный комплекс RISC (RNA-induced silencing complex), а оставшаяся цепь деградирует. Комплекс RISC с загруженной микроРНК (miRISC) связывается со специфической последовательностью мРНК-мишени, преимущественно располагающейся в 3'-нетранслируемой области мРНК и комплементарной (в разной степени) 5'-концевому фрагменту микроРНК, так называемому “seed region”. Данное взаимодействие в большинстве случаев приводит к деградации мРНК [13]. Описаны также случаи активации трансляции, но они редки [14].

Нокауты рибонуклеазы DICER – ключевого компонента биогенеза микроРНК – летальны, они приводят к митотическим катастрофам, нарушениям пролиферации стволовых клеток и дифференцировки [15–17]. микроРНК – один из продуктов ферментативной активности DICER – играют важную роль в дифференцировке, развитии, апоптозе [18]. Несмотря на сравнительно неболь-

шое (по амплитуде) регулирующее воздействие на мРНК-мишени (преимущественно снижение), микроРНК обеспечивают поддержание клеточного фенотипа. Такой контроль клеточного состояния не ограничивается переключениями транскриптома в процессе развития и дифференцировки, но включает формирование ответов на различные физиологические стимулы. Происходящие при клеточном стрессе изменения состояния клеток, обусловленные массивированным репрограммированием транскриптома, представляют собой особый случай, требующий аккуратных оценок роли микроРНК.

Сдвиги в уровнях экспрессии компонентов биогенеза микроРНК имеют большое значение при широком спектре заболеваний, в том числе и возрастзависимых. Так, показано, что уровень DICER1 снижается в клетках пигментного эпителия сетчатки пациентов с географической атрофией при возрастной дегенерации желтого пятна [19]. Нокдаун DICER1, но не семи других ферментов, процессирующих микроРНК, вызывает дегенерацию пигментного эпителия сетчатки у мышей предположительно через накопление Alu-подобных РНК B1 и B2 и РНК Alu в клетках пигментного эпителия сетчатки человека. Антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленные на Alu, предотвращают вызванную нокдауном DICER1 дегенерацию пигментного эпителия, несмотря на сохраняющееся глобальное подавление микроРНК в клетках. Рибонуклеаза DICER1 разрушает Alu-подобные РНК, предотвращая их цитотоксические эффекты и дегенерацию пигментного эпителия сетчатки у мышей.

Глобальное снижение уровня микроРНК считается ключевой чертой опухолевых клеток и важной причиной формирования злокачественного фенотипа [20]. Ранее в опухолевой линии Т-лимфобластов Jurkat обнаружили падение экспрессии всего класса микроРНК при стрессе ЭПР, сопряженное со снижением их биогенеза и соответствующим падением уровня экспрессии DICER1 [7].

Показано также, что увеличение экспрессии miR-103/107 снижает уровень DICER, что приводит к глобальному падению экспрессии микроРНК с приобретением клетками мезенхимальных характеристик и метастазированию [17].

Следствием клеточного стресса может быть не только апоптоз и адаптация, но и клеточное старение [21]. Согласно одному из предположений, клеточное старение – это программа остановки клеточного цикла в ответ на действие различных факторов стресса [22], в результате которой клетки становятся нечувствительными к митогенным стимулам [23]. Клеточное старение является чрезвычайно важным механизмом старения организма и возрастзависимых заболеваний [22]. Пред-

ложенная исходно Л. Хейфликом, концепция клеточного старения (названного впоследствии репликативным, или теломерным), как необратимого ареста клеточного цикла с исчерпанием репликативного потенциала [24], пересматривается в последнее время в сторону большей динамической природы старения [25]. Хотя в репликативно старых фибробластах обнаружены признаки, позволяющие считать их терминально дифференцированными [26], ряд работ указывает на обратимость полноценного фенотипа старения. Другими словами, клетки на стадии, как минимум непосредственно предвещающей старение, или в ранней фазе старения способны вернуться в клеточный цикл [25, 27].

Первоначальное предположение о противоопухолевой направленности клеточного старения также не выглядит столь однозначным. Так, недавно было показано, что индуцированное химиотерапией старение (терапевтически индуцируемое) приводит к повышенной экспрессии сигнатуры стволовости клеток В-клеточной лимфомы [28]. В результате выхода из состояния старения и возвращения в цикл, Wnt-зависимый клоногенный потенциал роста этих клеток был значительно выше, чем у клеток, не претерпевавших старение. По-видимому, в переключение на стволовость также может быть вовлечена микроРНК-опосредованная регуляция.

Клеточное старение и роль некодирующих РНК в этом процессе вызывают значительный интерес, однако многочисленные данные о роли микроРНК весьма противоречивы, а их регуляторный потенциал при стресс-индуцированном старении недостаточно изучен.

В работе [29] обсуждается возможная связь между активацией UPR и клеточным старением, при этом рассматриваются разные варианты причинно-следственной связи: UPR инициирует клеточное старение или клеточное старение приводит к активации UPR. В нашем исследовании предложена модель хронического стресса ЭПР, индуцируемого в течение 4 сут, в ходе которого развивается клеточный фенотип, близкий к наблюдаемому при репликативном старении. Проведено сравнение маркеров старения при остром и хроническом стрессе ЭПР и репликативном старении. С целью обнаружения различий в метаболизме микроРНК нами проанализированы транскриптомные клетки при хроническом и остром стрессе, охарактеризован биогенез микроРНК при старении.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные культуры. В работе использовали первичную культуру фибробластоподобных клеток FRSN из крайней плоти ребенка 3 лет, полу-

ченную из Российской коллекции культур клеток позвоночных (Институт цитологии РАН). Эти клетки имеют фибробластоподобную морфологию, экспрессируют поверхностные антигены, характерные для мезенхимных стволовых клеток (CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC) и не экспрессируют CD34 и HLA-DR. Клетки имеют нормальный кариотип человека (46, XY), количество полиплоидов составляет 13%, модальное число хромосом 46 ($98.5 \pm 1.2\%$).

Клетки культивировали в ростовой среде DMEM с глюкозой (4.5 г/л) с добавлением 10% FBS, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л глутамин при 37°C и 5% CO₂. Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего.

Индукция острого и хронического стресса ЭПР. Хронический стресс ЭПР в клетках FRSN индуцировали дитиотрептолом (ДТТ), восстанавливающим дисульфидные связи в белках. ДТТ использовали в субтоксической концентрации (0.75 мМ), которая была подобрана в предварительных экспериментах. Субтоксической считали концентрацию ДТТ, достаточную для остановки клеточной пролиферации, но не вызывающую гибель существенной части клеток. Индуктор, предварительно растворенный в полном объеме среды, добавляли 1 раз в сут в течение 4 сут. Затем следовала постстрессовая фаза, в которой проводилась полная замена среды ежедневно без добавления индуктора стресса, минимальная длительность этой фазы составляла 1 сут, максимальная — 4 сут. В постстрессовой фазе среду заменяли 1 раз в сутки на полную среду. Также использовали схему однократной индукции стресса ЭПР в течение 6 ч сравнительно высокой концентрацией ДТТ (2.5 мМ).

Выделение суммарной РНК, синтез первой цепи комплементарной ДНК, полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ). Изменения экспрессии мРНК оценивали методом ПЦР-РВ с использованием набора реактивов Maxima SYBRGreen/ROX qPCR Master Mix ("Thermo Fisher Scientific Inc.", США), включающего интеркалирующий краситель SYBRGreen, на амплификаторе CFX96 Real-Time PCR Detection Systems ("Bio-Rad Laboratories, Inc.", США). Суммарную РНК выделяли с использованием набора реагентов RNeasy® Mini Kit ("Qiagen GmbH", Германия) или тризольным методом (с повторной доочисткой хлороформом) с последующей обработкой ДНКазой I и оценкой качества. Лизис клеток проводили непосредственно в культуральной посуде (чашки Петри, 6-луночные планшеты) после удаления ростовой среды. Концентрацию суммарной РНК в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop® ND-1000 ("Thermo Fisher Scientific Inc."). Реакцию синтеза первой цепи кДНК проводили на суммарной РНК, нормированной по

количеству, на флуориметре (Qubit, “Invitrogen”, США), после обработки ДНКазой I с использованием случайных праймеров и обратной транскриптазы M-MuLV (набор RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, “Thermo Fisher Scientific Inc.”) в соответствии с протоколом производителя. Уровни транскриптов нормировали по уровню мРНК GAPDH, нормированные данные использовали для определения относительных изменений экспрессии генов методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Для статистической обработки результатов количественной оценки экспрессии генов использовали критерий Манна–Уитни.

Высокопроизводительный анализ экспрессии микроРНК и мРНК. микроРНК выделяли из клеток с использованием набора *mirVana® miRNA Isolation Kit* (“Ambion”, США). Библиотеки малых РНК получены с использованием *Illumina TruSeq small RNA library preparation kit* (“Illumina”, США). Процедура подготовки состояла из нескольких последовательных этапов: лигирования фракции малых РНК (0.3–0.5 мкг) на 3'- и 5'-концах с синтетическими РНК-адапторами, обратной транскрипции и амплификации (обогащения) с использованием праймеров для секвенирования Illumina с баркодами для мультиплексирования образцов. Перед проведением ПЦР все библиотеки подвергали процедуре нормирования с использованием дополнительной количественной ПЦР в формате SYBR Green с праймерами, идентичными Illumina TruSeq PCR primer, но без концевых модификаций. Амплифицированные библиотеки очищали при помощи электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле. Для валидации библиотек и количественной их оценки проводили дополнительную количественную ПЦР в соответствии с протоколом Illumina qPCR Library quantification protocol (“Illumina”). Нормированные библиотеки малых РНК секвенировали (36 циклов) с использованием генетического анализатора MiSeq Illumina.

Для обработки файлов, полученных в результате секвенирования и прошедших препроцессинг с “обрезанием” индексных последовательностей, использовали локально установленное программное обеспечение MiSeq Reporter v.2.6.3. Прочитанные последовательности малых РНК с обрезанными 3'-адапторами (5'-TGGAATTCTCGGGTGCCAAGG) подвергали фильтрации по качеству ридов (≥ 30 Phred Score): фильтрацию прошли 96.9%. Затем прочитанные последовательности картировали с использованием приложения Bowtie с установленным требованием полного совпадения с версией hg19 сборки генома человека и последовательностями из базы данных микроРНК miRBase.

Суммарную РНК для высокопроизводительного анализа с использованием платформы Affy-

metrix (США) выделяли тризольным методом с дополнительным этапом очистки хлороформом. Пробоподготовку проводили с использованием набора реагентов GeneChip® WT PLUS Reagent Kit (“Ambion”), гибридизацию, мечение и отмывку — с помощью наборов GeneChip® Hybridization Wash and Stain Kit (“Affymetrix”, США), микрочипов Affymetrix 1.0 ST и станции Fluidics Station (“Affymetrix”). Сканирование осуществляли на системе Gene Scan 7G (“Affymetrix”). Коррекцию фона, квантильную нормализацию и суммирование данных микрочипового анализа на уровне генов осуществляли с помощью алгоритма Robust Multi-chip Analysis (RMA) в программе Transcriptome Analysis Console (TAC) версии 4.0.2, там же с помощью алгоритма limma differential expression (элемент Bioconductor) анализировали дифференциальную экспрессию генов. Представленность генных листов в транскриптомных микрочиповых данных оценивали с использованием Gene Set Enrichment Analysis [30] на платформе GenePattern <https://cloud.genepattern.org> [31].

Анализ активности β -галактозидазы, проточная цитометрия. Активность бета-галактозидазы определяли с использованием в качестве субстрата C_{12} FDG (5-додеканоиламинофлуоресцеин ди- β -D-галактопиранозида). В этой реакции образуется флуоресцентный продукт, позволяющий проводить его количественную оценку (микроскопию, проточную цитофлуориметрию). Субстрат добавляли в конечной концентрации 20 мкМ в ростовую среду клеток и инкубировали в течение 2 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. После этого клетки отмывали фосфатно-солевым буфером и анализировали. Сбор данных проточной цитометрии проводили с использованием проточного цитометра FACS Calibur, программного обеспечения CellQuest версии 6.0 (“Becton-Dickinson Biosciences”, США). Цитометрические данные анализировали с использованием программного обеспечения FCS Express (De Novo Software).

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения Statistica, версия 10.0 (“StatSoft Inc.”, США), а также Microsoft Excel. Использовали *t*-критерий, однофакторный дисперсионный анализ и критерий Крускала–Уоллиса. Статистическую обработку результатов количественной оценки экспрессии генов проводили с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Коррекцию множественных сравнений в транскриптомных данных проводили с использованием процедуры Бенджамини–Хохберга (метод контроля ожидаемой доли ложных отклонений), встроенной в Transcriptome Analysis

Console, и реализации алгоритма GSEA [30] платформы GenePattern [31].

В транскриптомном анализе представленности генов GSEA [30] использовали порог отсечения $FDR < 0.25$ (см. ссылку https://software.broadinstitute.org/cancer/software/gsea/wiki/index.php/FAQ#Why_does_GSEA_use_a_false_discovery_rate_.28FDR.29_of_0.25_rather_than_the_more_classic_0.05.3F).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бета-галактозидазная активность клеток FRSN при хроническом стрессе ЭПР

Динамику бета-галактозидазной активности в клетках FRSN анализировали с использованием в качестве субстрата $C_{12}FDG$, который превращается во флуоресцирующий продукт, и проточной цитофлуориметрии. Этот метод позволяет описывать изменения активности бета-галактозидазы на уровне единичных клеток.

Как видно из рис. 1, интенсивность флуоресценции клеток слабо изменялась в течение хронического стресса ЭПР (рис. 1а): отличия от значений в контроле составляли менее 5% после 4-х сут воздействия. Следует заметить, что на третьи сутки воздействия стала заметна бимодальность распределения интенсивностей флуоресценции клеток, что может указывать на рост гетерогенности клеточной популяции, подвергнутой стрессу. На 5-й день стресса после удаления ДТТ из среды отмечен значительный рост флуоресценции клеток.

ПЦР-РВ-анализ экспрессии генов-маркеров стресса ЭПР и DICER1 при хроническом стрессе ЭПР в фибробластах FRSN

Для подтверждения того, что четырехдневное воздействие ДТТ в концентрации 0.75 мМ на фибробласты приводит к развитию ответа на стресс ЭПР, была изучена экспрессия ключевого маркера стресса — шаперона BiP. Отмечено значимое повышение уровня мРНК BiP (рис. 2).

При этом наблюдалось также повышение экспрессии генов стресс-активируемой эндорибонуклеазы ангиогенина (*ANG*) и падение уровня ее ингибитора (*RNHI*) — сходное соотношение уровней экспрессии этих генов отмечено ранее при остром стрессе ЭПР в линии клеток Jurkat [7]. Кроме того, отмечена тенденция к снижению уровня экспрессии гена *DICER1*.

Транскриптомный анализ фибробластов при хроническом стрессе ЭПР

Изменения в процессах метаболизма нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) в фибробластах

FRSN, подвергнутых 4-дневному хроническому стрессу ЭПР, определяли, анализируя их транскриптомные профили (табл. 1).

Из табл. 1. видно, что в клетках, подвергнутых хроническому стрессу, изменена активность большого числа процессов, связанных с синтезом ДНК и регуляцией клеточного цикла. Синтез ДНК при стрессе приводит к репликативному стрессу, ответу на повреждение ДНК и влечет за собой, по-видимому, митотические катастрофы и анеуплоидию — эти процессы вполне характерны и для репликативно старых клеток. Кроме того, в клетках, подвергнутых хроническому стрессу, усилены процессы деградации РНК, сплайсинга и процессинга мРНК. В них обнаружено сравнительно небольшое число процессов РНК-метаболизма, активность которых снизилась — один процесс “Reactome cytosolic tRNA aminoacylation” в пределах $FDR < 25\%$ — порога отсечения, рекомендованного разработчиками метода GSEA. Биогенез микроРНК среди этих процессов не обнаружен.

Изменения во фракции микроРНК при хроническом стрессе ЭПР

Анализ фракции малых РНК также показал, что при 4-дневном стрессе ЭПР в клетках возрастает содержание предшественников микроРНК, а также (в небольшой степени) зрелых форм микроРНК, т.е. не наблюдается глобальное снижение представленности микроРНК (рис. 3).

Выборочное сравнение уровней отдельных транскриптов фибробластов при репликативном старении, остром и хроническом стрессе ЭПР

Выборочное рассмотрение отдельных генов в транскриптомах позволило выявить увеличение экспрессии ключевого маркера — шаперона BiP (*HSPA5*) — при остром стрессе ЭПР в 3.45 раза ($FDR = 1.00E-05$), при хроническом стрессе ЭПР в 1.19 ($FDR = 0.1587$). Также были проанализированы транскрипты репликативно старых клеток FRSN, изменение экспрессии в которых составило 1.11 ($FDR = 0.3138$). Таким образом, уровень мРНК шаперона BiP при остром стрессе ЭПР был заметно выше уровней при хроническом стрессе и старении, которые оказались сходными в этих двух состояниях.

В случае мРНК *DICER1* наблюдали следующее соотношение: снижение -1.74 ($FDR = 0.0005$) при остром стрессе, -1.14 ($FDR = 0.2536$) при хроническом, -1.05 ($FDR = 0.6444$) при репликативном старении. Таким образом, при хроническом стрессе ЭПР и старении имело место незначимое изменение уровня *DICER1* и его снижение при остром стрессе ЭПР.

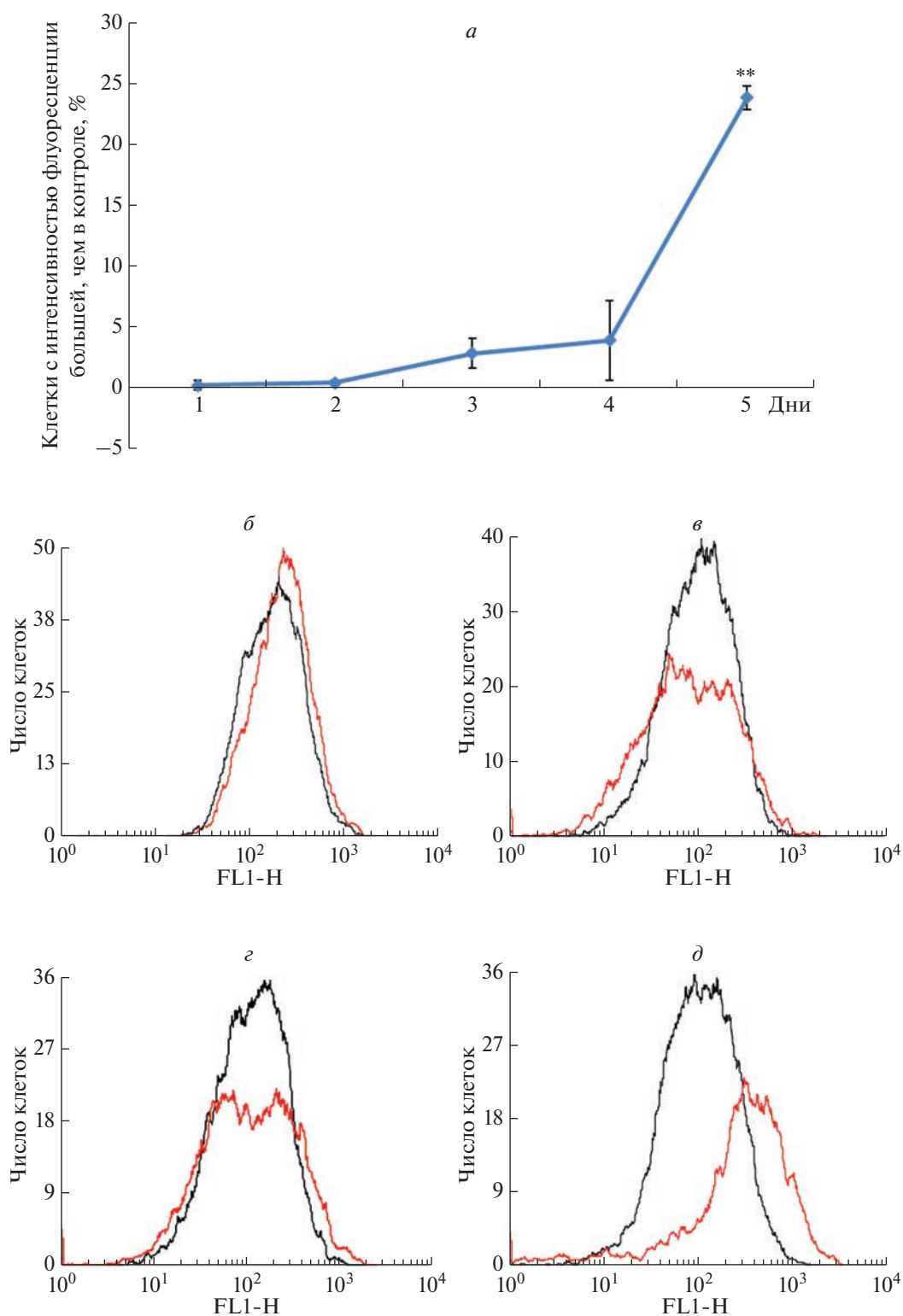


Рис. 1. Динамика изменений бета-галактозидазной активности в клетках FRSN при индуцированном ДТТ субтоксическом многократном стрессе ЭПР (0.75 мМ ДТТ, 4 дня стресс, 5-й день без индуктора). *а* – Содержание подвергнутых стрессу клеток (%), интенсивность флуоресценции которых выше, чем в контроле; *б–д* – гистограммы по каналу FL1. Дни стресса: *б* – 1, *в* – 3, *з* – 4, *д* – 5-й день. ** $p < 0.01$, $n = 3$.

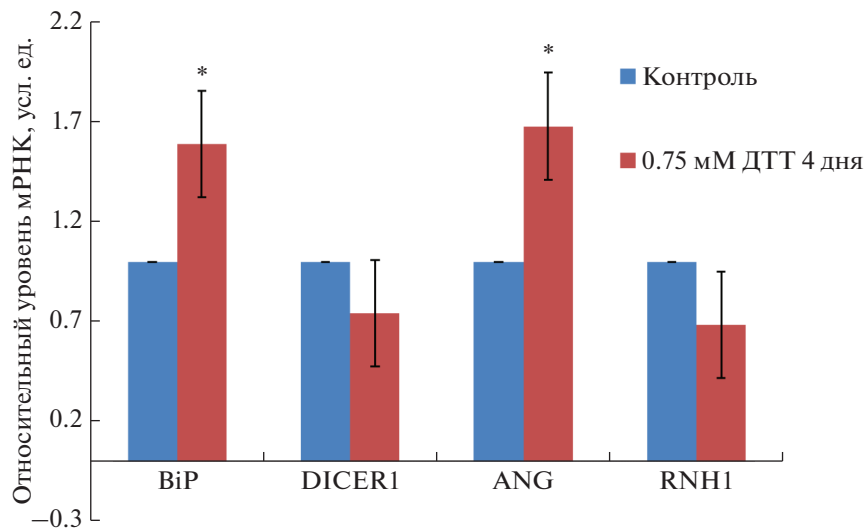


Рис. 2. Уровни мРНК BiP (HSPA5), DICER1, ANG и ингибитора ANG (RNH1) в клетках FRSN при ДТТ-индуцированном субтоксическом стрессе ЭПР (0.75 mM ДТТ, 4 дня), * $p < 0.05$, $n = 3$.

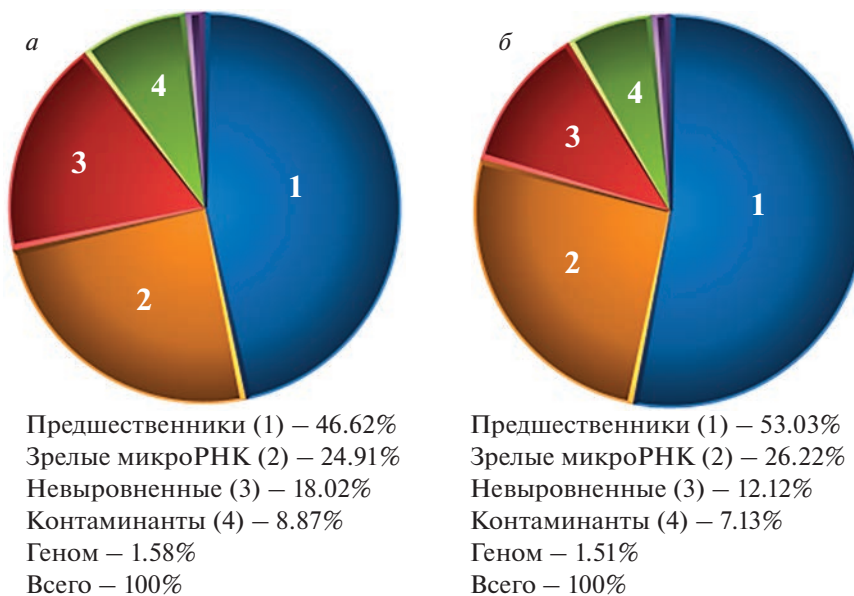


Рис. 3. МикроРНК при многократном стрессе ЭПР. Примеры распределения прочтений: а – контроль; б – 4-дневный стресс ЭПР.

Выборочный анализ генов ингибиторов циклинзависимых киназ выявил следующие соотношения кратности изменения их экспрессии:

CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21): 1.79 (FDR = 0.0002) – острый стресс, 1.43 (FDR = 0.0057) – хронический, 1.86 (FDR = 9.63E–05) – репликативное старение.

CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, p16): 1.21 (FDR = 0.0778) – острый стресс, 1.13 (FDR = 0.3028) – хронический, 1.53 (FDR = 0.0022) – репликативное старение.

Кратность изменения экспрессии гена маркера пролиферации *MKI67* (antigen identified by monoclonal antibody Ki-67): –1.84 (FDR = 0.0007) – острый стресс, –4.19 (FDR = 2.74E–05) – хронический, –14.65 (FDR = 2.28E–07) – репликативное старение;

DNMT1 – маркер клеточного старения ДНК-метилтрансферазы DNMT1 (DNA (cytosine-5-) – methyltransferase 1): 1.25 (FDR = 0.0190) – острый стресс, –1.18 (FDR = 0.1010) – хронический, –1.89 (FDR = 5.96E–05) – репликативное старение.

Таблица 1. Процессы ДНК- и РНК-метаболизма, активность которых изменилась при 4-дневном стрессе ЭПР*

Процесс	Число генов	ES	NES	NOM <i>p</i> -val.	FDR <i>q</i> -val.
Reactome M G1 transition	70	−0.57119	−2.0412	0	0.015571239
Reactome activation of the pre replicative complex	23	−0.70386	−2.01857	0	0.015304196
Reactome processing of capped intron containing pre mRNA	118	−0.50592	−1.98361	0	0.015815465
KEGG cytosolic DNA sensing pathway	44	−0.59669	−1.95188	0.002347418	0.018572371
Reactome assembly of the pre replicative complex	56	−0.55779	−1.92291	0	0.02145724
Reactome vif mediated degradation of APOBEC3G	47	−0.5544	−1.85614	0	0.033851728
Reactome mRNA splicing	91	−0.49049	−1.83755	0	0.03826567
Reactome mRNA processing	135	−0.45359	−1.82997	0	0.040611435
Reactome transport of mature transcript to cytoplasm	42	−0.56155	−1.80992	0.002304148	0.0455481
Reactome mRNA 3 end processing	25	−0.59268	−1.76488	0.004830918	0.053662024
Reactome p53 dependent G1 DNA damage response	51	−0.50441	−1.73786	0	0.064953834
Reactome activation of ATR in response to replication stress	25	−0.5934	−1.72793	0.023017902	0.06917527
Reactome metabolism of non coding RNA	42	−0.52777	−1.71281	0.002487562	0.07342382
Reactome activation of chaperone genes by XBP1S	41	−0.52384	−1.68704	0.014634146	0.08357151
Reactome synthesis of DNA	81	−0.45024	−1.66991	0	0.09007551
Reactome destabilization of mRNA by AUF1/hnRNP D0	48	−0.49912	−1.66699	0.004975124	0.090713635
Reactome transport of mature mRNA derived from an intronless transcript	31	−0.54141	−1.64859	0.01438849	0.09772833
Reactome transport of ribonucleoproteins into the host nucleus	25	−0.53486	−1.57752	0.037406486	0.12973335
KEGG RNA degradation	52	−0.45107	−1.54381	0.011848342	0.14593673
Reactome G1/S transition	95	−0.4025	−1.5027	0.015831135	0.16722047
Reactome mRNA splicing minor pathway	36	−0.46363	−1.48038	0.043589745	0.17420946
KEGG DNA replication	34	−0.46562	−1.44514	0.078947365	0.19072776
Reactome SMAD2 SMAD3 SMAD4 heterotrimer regulates transcription	25	−0.49914	−1.44286	0.06590909	0.18828596
Reactome DNA strand elongation	28	−0.47466	−1.43111	0.08	0.19533893
KEGG mismatch repair	20	−0.50254	−1.39918	0.09859155	0.21652995
Reactome RNA pol II pre transcription events	52	−0.40576	−1.38314	0.07537688	0.22260873
Reactome cytosolic tRNA aminoacylation	22	0.623262	1.702985	0.008532	0.147578

*FDR < 25%.

Примечание. ES — Enrichment Score, NES — Normalized Enrichment Score, NOM *p*-val. — Nominal *P* Value, FDR *q*-val. — False Discovery Rate. Отрицательные значения NES — повышение активности генов, входящих в генный лист процесса, положительные — снижение.

Стресс ЭПР сопровождается временным блоком трансляции, что влечет за собой сборку стрессорных гранул [3, 32]. Изменения экспрессии генов некоторых предполагаемых участников сборки стрессорных гранул составили:

G3BP1 (GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1): -1.3 (FDR = 0.0189) – острый стресс, -1.1 (FDR = 0.4045) – хронический, -1.16 (FDR = 0.1381) – репликативное старение.

G3BP2 (GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2): -1.53 (FDR = 0.0022) – острый стресс, 1.01 (FDR = 0.9417) – хронический, 1.01 (FDR = 0.9126) – репликативное старение.

TIA1 (cytotoxic granule-associated RNA binding protein): 1.53 (FDR = 0.0012) – острый стресс, 1.26 (FDR = 0.0472) – хронический, -1.09 (FDR = 0.3723) – репликативное старение.

Видны разнонаправленные небольшие изменения экспрессии потенциальных элементов стрессорных гранул; для характеристики гранул при хроническом стрессе ЭПР требуется проведение дополнительных исследований.

Результаты транскриптомного анализа согласуются с приведенными результатами определения экспрессии методом ПЦР.

Сопоставление транскриптомных профилей фибробластов при остром и хроническом стрессах ЭПР

С целью выявления отличий в процессах метаболизма мРНК и микроРНК сравнили транскриптомные профили фибробластов, подвергнутых 4-дневному хроническому стрессу ЭПР и острому стрессу ЭПР (табл. 2).

Показана активность ряда процессов метаболизма ДНК и РНК при остром стрессе. Подобную активацию наблюдали ранее в клетках, подвергнутых хроническому стрессу ЭПР. Значительное число этих процессов связано с поддержанием целостности генома и репарацией ДНК. Обнаружено повышение активности элементов системного контроля клеточного цикла и поддержания теломера, а также процессов синтеза ДНК и репликативного стресса. Усилены процессы деградации РНК, включая механизмы ее дестабилизации: BRF1-опосредованные и зависимые от деаденилирования. Выявлено отличие острого стресса от хронического: острый стресс сопровождался снижением экспрессии генов, вовлеченных в биогенез микроРНК.

Согласно полученным данным, при остром стрессе ЭПР наблюдается снижение биогенеза микроРНК, практически не выраженное при хроническом стрессе ЭПР и старении. Снижение уровня мРНК DICER1 при остром стрессе ЭПР было более существенным, чем при хроническом и репликативном старении. Таким образом, на-

копление стрессового воздействия при многократном применении его индуктора в субтоксической концентрации приводит к развитию старения и не сопровождается заметным снижением биогенеза микроРНК.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе проведенного исследования установлено, что хронический стресс ЭПР, индуцируемый в течение 4 суток, вызывает рост бета-галактозидазной активности в клетках FRSN. Уровень бета-галактозидазной активности, ассоциированной со старением (SA- β -Gal), широко используется в качестве одного из ключевых маркеров старения клеток. Показано [33], что активность бета-галактозидазы увеличивается при старении фибробластов кожи человека вплоть до конца их жизни. В нашем исследовании в качестве субстрата бета-галактозидазы использовали C_{12} FDG. В ходе этой реакции образуется флуоресцентный продукт, что позволяет подсчитать с помощью проточной цитометрии число клеток с измененной активностью бета-галактозидазы. На вторые сутки стресса обнаруживается бимодальность распределения клеточной популяции по активности бета-галактозидазы, что свидетельствует о росте гетерогенности популяции при стрессе и возможном появлении субпопуляций с повышенной и пониженной активностями этого фермента.

Транскриптомный анализ фибробластов, подвергнутых острому и хроническому стрессу ЭПР, а также репликативно старых, выявил ряд совпадений по маркерам клеточного старения. Stein и соавт. [33] показали рост уровня белка ингибитора циклинзависимых киназ p21 на ранних стадиях старения фибробластов кожи человека, однако на поздних стадиях этот уровень значительно снижается. Уровень другого ингибитора – p16 – при этом стабильно возрастал и поддерживался на высоком уровне не менее 2 месяцев. Предполагается, что на ранних этапах клеточное старение имеет более динамический характер, чем и объясняется вариабельность уровней p16 и p21 в клеточных культурах в раннем периоде старения [33].

В нашем исследовании повышенный уровень мРНК p21 (CDKN1A) наблюдали при всех условиях – при остром и хроническом стрессе ЭПР, и репликативном старении. Отмечено небольшое увеличение уровня мРНК p16 (CDKN2A) при остром стрессе ЭПР и наиболее существенное его повышение при репликативном старении. Снижение уровня MKI67 – маркера клеточной пролиферации – было наиболее заметным при хроническом стрессе ЭПР и репликативном старении. Уровень еще одного маркера клеточного старения – ДНК-метилтрансферазы DNMT1 [34], снижался при хроническом стрессе ЭПР и репликативном старении, и повышался при остром

Таблица 2. Процессы ДНК- и РНК-метаболизма, активность которых изменилась при остром стрессе ЭПР относительно хронического*

Процесс	Число генов	ES	NES	NOM <i>p</i> -val.	FDR <i>q</i> -val.
Reactome meiotic recombination	65	0.8735447	3.0217183	0.0	0.0
Reactome meiosis	90	0.82234603	2.96751	0.0	0.0
Reactome RNA pol I promoter opening	45	0.9244056	2.9474995	0.0	0.0
Reactome RNA pol I transcription	66	0.8583928	2.9423776	0.0	0.0
Reactome deposition of new CENPA containing nucleosomes at the centromere	48	0.9169156	2.942151	0.0	0.0
Reactome chromosome maintenance	100	0.7930599	2.90852	0.0	0.0
Reactome RNA pol I RNA pol III and mitochondrial transcription	95	0.78643805	2.8621817	0.0	0.0
Reactome meiotic synapsis	59	0.8478427	2.8409016	0.0	0.0
Reactome telomere maintenance	65	0.82788223	2.8384316	0.0	0.0
Reactome packaging of telomere ends	39	0.89991754	2.7889936	0.0	0.0
Reactome mitotic prometaphase	78	0.71624535	2.5278203	0.0	0.0
Reactome generic transcription pathway	314	0.61757505	2.5247838	0.0	0.0
Reactome DNA replication	170	0.63824695	2.4992688	0.0	0.0
Reactome mitotic M G1 phases	151	0.6272604	2.4370246	0.0	0.0
Reactome cell cycle mitotic	278	0.5840766	2.3945434	0.0	0.0
Reactome DNA repair	91	0.5916363	2.1514232	0.0	7.006776E–5
Reactome G2–M checkpoints	29	0.7238688	2.125362	0.0	1.0110341E–4
Reactome DNA strand elongation	28	0.73273474	2.11058	0.0	2.2830068E–4
KEGG DNA replication	34	0.6707805	2.0365164	0.0	6.039853E–4
Reactome activation of ATR in response to replication stress	25	0.71596396	2.0221338	0.0	7.4789627E–4
Reactome activation of the pre replicative complex	23	0.7113308	2.0045867	0.0	9.3203026E–4
Reactome E2F mediated regulation of DNA replication	23	0.69756645	1.9457265	0.0	0.0020754456
Reactome tRNA aminoacylation	38	0.6286507	1.9356256	0.001506024	0.0023312168
Reactome cytosolic tRNA aminoacylation	22	0.68875885	1.9215747	0.0	0.0028764098
KEGG mismatch repair	20	0.6977293	1.9181719	0.0016501651	0.002935597
Reactome extension of telomeres	26	0.66418475	1.8678123	0.0015772871	0.006243486
Biocarta ATM pathway	19	0.6773608	1.8271466	0.005033557	0.0105374735
Reactome synthesis of DNA	81	0.50922495	1.8051174	0.0	0.0134009
Reactome mitotic G2 G2–M phases	68	0.52067155	1.8027968	0.0	0.013513143
KEGG RNA degradation	52	0.5344431	1.7615125	0.0044444446	0.019558316
Reactome homologous recombination repair of replication independent double strand breaks	15	0.69050735	1.7571673	0.0033057851	0.020094687
Reactome cell cycle checkpoints	96	0.47384042	1.7323368	0.0	0.026984116

Таблица 2. Окончание

Процесс	Число генов	ES	NES	NOM <i>p</i> -val.	FDR <i>q</i> -val.
Reactome G0 and early G1	20	0.626771	1.7156974	0.008064516	0.031962775
Reactome mitotic G1 G1/S phases	118	0.45982128	1.7137032	0.0	0.031992786
Biocarta G2 pathway	20	0.63347596	1.7037532	0.00792393	0.035362072
Reactome RNA pol I transcription initiation	20	0.62224483	1.692696	0.008431703	0.038403533
KEGG p53 signaling pathway	65	0.4859263	1.6910647	0.006954103	0.03845253
Reactome unfolded protein response	71	0.49807125	1.6886604	0.0028328612	0.038820274
Reactome S phase	97	0.4626438	1.6864203	0.0013003901	0.039107393
Reactome nucleotide excision repair	42	0.52816725	1.6751274	0.009036144	0.043052983
Reactome perk regulated gene expression	25	0.5864574	1.6702857	0.0062305294	0.043940376
Reactome double strand break repair	21	0.60828984	1.657773	0.006472492	0.04618458
Reactome deadenylation dependent mRNA decay	41	0.50045973	1.6009737	0.01490313	0.07402219
Reactome activation of genes by ATF4	22	0.5698372	1.5749847	0.02601626	0.08751855
Reactome transport of ribonucleoproteins into the host nucleus	25	0.5460245	1.5581003	0.021909233	0.09215212
Reactome RNA pol I transcription termination	18	0.5971615	1.5489627	0.040584415	0.094890304
Reactome M/G1 transition	70	0.44184095	1.5154264	0.015006822	0.11944161
Biocarta stress pathway	24	0.53664243	1.5047216	0.04347826	0.125504
Reactome mitochondrial tRNA aminoacylation	19	0.5240794	1.4389845	0.06539075	0.18136242
Reactome destabilization of mRNA by BRF1	15	0.566649	1.4311684	0.07509158	0.18765597
Reactome RNA pol III transcription initiation from type 3 promoter	23	0.5010268	1.4196658	0.08279221	0.1929102
Reactome intrinsic pathway for apoptosis	28	0.4842015	1.4041576	0.07119741	0.20652774
KEGG base excision repair	31	0.4659267	1.3808284	0.08229814	0.23449185
Reactome destabilization of mRNA by tristetraprolin TTP	15	0.54531926	1.378124	0.11355932	0.23645765
Reactome metabolism of non coding RNA	42	0.43581405	1.3656077	0.06994048	0.24292718
Reactome destabilization of mRNA by KSRP	15	0.54964983	1.3626724	0.11584327	0.24208733
Biocarta bad pathway	24	−0.50187	−1.57884	0.020566	0.10174
Reactome microRNA miRNA biogenesis	20	−0.51226	−1.52795	0.032	0.123316
Reactome regulatory RNA pathways	22	−0.46209	−1.40196	0.072776	0.188577

*FDR < 25%.

 Примечание. ES – Enrichment Score, NES – Normalized Enrichment Score, NOM *p*-val. – Nominal *P* value, FDR *q*-val. – False Discovery Rate. Положительные значения NES – повышение активности генов, входящих в генный лист процесса, отрицательные – снижение.

стрессе. Анализ экспрессионных маркеров, а также рост активности бета-галактозидазы свидетельствуют о приобретении фенотипа стресс-индуцированного старения фибробластами, подвергнутыми 4-суточному воздействию субтоксических концентраций ДТТ, причем этот фенотип сходен с фенотипом репликативного старения.

Хронический стресс ЭПР индуцировали ДТТ в концентрации, которая не вызывала значительной гибели контрольных клеток, но замедляла их пролиферацию. Вообще, воздействие высоких доз соединений, вызывающих стресс, например токсинов, приводит к развитию апоптоза. Предполагается, что при меньшей интенсивности стрессового воздействия доминирующим механизмом будет старение [35].

Следует отметить невысокий уровень p16 (CDKN2A) при хроническом стрессе ЭПР по сравнению с репликативным старением. В то же время, при хроническом стрессе наблюдается бимодальность распределения клеток по активности бета-галактозидазы, что позволяет предположить разделение исходно гомогенной популяции как минимум на две с более и менее выраженными признаками стресс-индуцированного старения. Это может быть одним из объяснений сравнительно низкого среднего уровня экспрессии p16 (CDKN2A) во всей популяции. Путь p16^{Ink4a}/RB обычно активируется при репликативном старении, а также при старении, индуцированном активными формами кислорода и активацией онкогенов, но не при старении, вызванном повреждением ДНК. Считается, что этот путь необходим именно для поддержания в клетках состояния старения [36].

ДТТ — сильный восстанавливающий агент, который блокирует образование дисульфидных связей в ЭПР [37], быстро (в течение нескольких минут) вызывает развитие стресса ЭПР в клеточных культурах [38]. В клетках эукариот в условиях окисленной среды в ЭПР происходит образование большинства дисульфидных связей [39], что важно для конформационного созревания белков в секреторном пути. Известно, что окислительно-восстановительный баланс цитозоля сильно сдвинут в сторону восстановления (соотношение восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона составляет ~100 : 1), что препятствует образованию дисульфидных связей, в ЭПР же соотношение GSH : GSSG составляет примерно 3 : 1 [40]. Несмотря на то, что ДТТ может действовать на белки с дисульфидными связями в разных локализациях, например, на внеклеточные домены, ДТТ сильно влияет на белки *en masse* и их сворачивание в ЭПР, запуская сигнальные ветви UPR, как показано здесь и ранее [7].

В обзоре Pluquet и соавт. [29] высказано предположение, что механизмом, индуцированного

стрессом ЭПР старения, может быть окислительный стресс, вызванный нарушением окислительного фолдинга, опосредуемого оксидоредуктазой ERO1 и протеиндисульфидизомеразой (PDI). Показано, что ДТТ в концентрации свыше 1.25 mM вызывает снижение уровня активных форм кислорода в клетках Jurkat, индуцируя в них восстановительный стресс, однако более низкие концентрации ДТТ увеличивают уровень активных форм кислорода [41]. Предполагалось, что в результате окисления в присутствии металлов (преимущественно меди) ДТТ индуцирует образование пероксида водорода и вызывает окислительный стресс [42]. Окислительный фолдинг, как известно, вносит существенный, но не основной вклад в генерацию пероксида водорода в клетках [43, 44]. Кроме того, в просвете ЭПР пероксиредоксин 4 (фермент, обладающий антиоксидантной активностью, которым богаты секретирующие клетки) восстанавливает пероксид водорода с образованием дисульфидных связей [44–46]. Однако мы не наблюдали значимого роста уровня пероксиредоксинов, включая пероксиредоксин 4, во всех использованных условиях, отмечено только небольшое увеличение экспрессии гена оксидоредуктазы *ERO1B*. Вместе с тем, Pluquet и соавт. указывают на возможную роль ветви UPR, опосредуемую сенсором ЭПР, белком ATF6α, в старении фибробластов [47].

Ряд авторов считают, что снижение экспрессии DICER, наблюдаемое при действии таких стрессоров, как активные формы кислорода, форболовый эфир, активация онкогена *RAS* [48], снижает клеточную устойчивость к стрессу [49]. Проверено предположение, согласно которому причиной снижения уровня белка DICER может быть апоптоз, вызванный действием стрессоров, однако это предположение не нашло подтверждения [48]. Увеличение экспрессии DICER, наоборот, способствует устойчивости к стрессу, как минимум, у беспозвоночных [49].

Интересной представляется связь уровней экспрессии DICER и генов иммунного ответа. Интерфероны типа I и двухцепочечная РНК (Poly IC) снижают экспрессию DICER на уровне белка, в то время как интерферон-гамма повышает ее [48]. Анализ экспрессии DICER в нескольких клеточных линиях с варьирующими паттернами экспрессии иммунных генов выявил высокий уровень экспрессии белка DICER в клетках трофобласта JAR и JEG-3, в которых подавлена активность генов МНС класса II и костимулирующих генов [48]. В клетках рака шейки матки, в которых иммунные гены конститутивно репрессированы, но индуцируются интерфероном-гамма, выявлен умеренный уровень DICER. В клетках же Raji и Daudi, в которых, как и в нормальных В-клетках, на высоком уровне конститутивно экспрессируются гены МНС класса II

и другие иммунные гены, белок DICER не определялся [48]. При этом уровни мРНК DICER не всегда полностью коррелируют с уровнем белка DICER. МикроРНК проявляют в том числе и антивирусную направленность, и нокдаун DICER увеличивает чувствительность мышей к вирусным инфекциям [50]. Учитывая это, подавление DICER ключевыми противовирусными молекулами — интерферонами-альфа — трудно объяснить с позиции оптимальной защиты клетки [48]. Необходимо также учитывать, что мишенью вирусных ответов может быть DICER [51].

В клеточном ответе на стресс можно выделить как минимум две фазы — раннюю и позднюю. Ранняя неспецифическая фаза характеризуется блоком кепзависимой трансляции и началом активной экспрессии генов стрессового ответа, таких как шапероны. В поздней фазе (специфической адаптации) происходит ослабление экспрессии шаперонов, и клетка “пытается” возвратиться к нормальному функционированию при условии снижения воздействия стресса или адаптации к нему. По нашему мнению, роль DICER на этих двух этапах может быть разной. На первом этапе снижение экспрессии DICER будет способствовать более эффективной и высокоамплитудной экспрессии генов стрессового ответа и стохастическому фенотипу клеток, что направлено на выживание. На втором же этапе, вероятно, DICER необходим для восстановления дифференцированного фенотипа. Так как подавление DICER часто влечет за собой падение экспрессии микроРНК, предположили, что это приводит к дерепрессии генов, способствующих клеточному выживанию — это может иметь место при действии интерферонов-альфа [48]. Не удивительно, что опухолевые клетки характеризуются снижением уровня DICER — они как бы “застевают” в первой фазе ответа на стресс, что подтверждается частым повышением экспрессии в них генов стрессового ответа, например, шаперонов. Участие микроРНК в специфической фазе стрессового ответа подтверждают недавние работы. Так, например, в постстрессовой стадии после теплового шока показано возвращение к нормальному уровню шаперона hsp-70 посредством связывания микроРНК miR-85 со специфическими сайтами в 3'-нетранслируемой области его мРНК [52].

Наше предположение о роли DICER может помочь объяснить данные, наблюдаемые при клеточном старении. При старении клеток, индуцированном стрессом ЭПР, не происходит существенного снижения биогенеза микроРНК, наблюдается лишь небольшое падение уровня DICER, что сочетается с умеренным ростом экспрессии генов стрессового ответа, например, BiP. Несмотря на накопительный эффект хронического стресса, биогенез микроРНК при этом почти не изменяется, однако речь идет о среднем

по клеточной популяции уровне. Сообщалось о глобальном снижении экспрессии микроРНК и падении уровня DICER в жировой ткани мышей при старении, причем снижение калорийности корма предотвращало этот эффект [53]. Однако в этой работе при определении уровня белка DICER методом вестерн-блоттинга не использовали нормирование при сравнении с уровнем контрольного белка бета-тубулина, что затрудняет интерпретацию данных. Кроме того, уровни экспрессии в ПЦР-анализе нормировали по гену *36B4*, кодирующему кислый рибосомный фосфобелок RPLP0. Хотя *36B4* может использоваться для оценки относительного уровня экспрессии генов при анализе процессов в жировой ткани, не сопровождаемых массивными изменениями транскриптома, при старении наблюдается масштабная дисрегуляция экспрессии рибосомных генов: показано повышение биогенеза рибосом с сопутствующим укрупнением ядрышка [54]. Это может повлечь за собой систематическое изменение уровня референсного рибосомного белка и погрешность в оценке экспрессии генов.

Таким образом, в проведенном нами исследовании показано, что хронический стресс ЭПР (4 сут), индуцированный ДТТ (0.75 мМ) в фибробластах FRSN, приводит к формированию фенотипа клеточного старения, сходного с фенотипом репликативного старения. Сопоставление хронического и острого стресса ЭПР выявило их важное отличие — при хроническом стрессе не происходит снижения биогенеза микроРНК.

Авторы выражают благодарность коллективу нашего института.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (№ 22-25-00820, <https://rscf.ru/project/22-25-00820/>).

Статья не содержит результатов исследований, полученных на животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kozutsumi Y., Segal M., Normington K., Gething M.J., Sambrook J. (1988) The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*. **332**, 462–464. <https://doi.org/10.1038/332462A0>
2. Schröder M., Kaufman R.J. (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 739–789. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134>
3. Меситов М.В., Московцев А.А., Кубатеев А.А. (2013) Молекулярная логика сигнальных путей при стрессе эндоплазматического ретикулума: система UPR (Unfolded Protein Response). *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*.

- 57(4), 97–108.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24640782/>
4. Acosta-Alvear D., Karagöz G.E., Fröhlich F., Li H., Walther T.C., Walter P. (2018) The unfolded protein response and endoplasmic reticulum protein targeting machineries converge on the stress sensor IRE1. *Elife*. **7**, e43036.
<https://doi.org/10.7554/eLife.43036>
 5. Korennykh A., Walter P. (2012) Structural basis of the unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* **28**, 251–277.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155826>
 6. Московцев А.А., Клементьева Т.С., Зайченко Д.М., Колесов Д.В., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. (2018) Проадаптивная и проапоптотическая активности стресс-активируемой рибонуклеазы IRE1: разделение на временной шкале клеточного стресса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. **62**, 21–27.
<https://doi.org/10.25557/0031-2991.2018.04.21-27>
 7. Mesitov M.V., Soldatov R.A., Zaichenko D.M., Malakho S.G., Klementyeva T.S., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A., Mironov A.A., Moskovtsev A.A. (2017) Differential processing of small RNAs during endoplasmic reticulum stress. *Sci. Rep.* **7**, 46080.
<https://doi.org/10.1038/srep46080>
 8. Bartel D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. **136**, 215–233.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
 9. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. **75**, 843–854.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
 10. Kim D.H., Sætrom P., Snøve O., Rossi J.J. (2008) MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 16230–16235.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0808830105>
 11. Kozomara A., Griffiths-Jones S. (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucl. Acids Res.* **42**, 68–73.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1181>
 12. Kim V.N., Han J., Siomi M.C. (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 126–139.
<https://doi.org/10.1038/nrm2632>
 13. Bartel D.P. (2018) Metazoan microRNAs. *Cell*. **173**, 20–51.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
 14. Fabian M.R., Sonenberg N., Filipowicz W. (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 351–379.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-060308-103103>
 15. Wienholds E., Koudijs M.J., van Eeden F.J., Cuppen E., Plasterk R.H. (2003) The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development. *Nat. Genet.* **35**, 217–218.
<https://doi.org/10.1038/NG1251>
 16. Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A., Murchison E.P., Alcorn H., Li M.Z., Mills A.A., Elledge S.J., Anderson K.V., Hannon G.J. (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* **35**, 215–217.
<https://doi.org/10.1038/NG1253>
 17. Martello G., Rosato A., Ferrari F., Manfrin A., Cordenonsi M., Dupont S., Enzo E., Guzzardo V., Rondina M., Spruce T., Parenti A.R., Daidone M.G., Biciato S., Piccolo S. (2010) A microRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell*. **141**, 1195–1207.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.05.017>
 18. Pampalakis G., Diamandis E.P., Katsaros D., Sotiropoulou G. (2010) Down-regulation of dicer expression in ovarian cancer tissues. *Clin. Biochemistry*. **43**, 324–327.
<https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2009.09.014>
 19. Kaneko H., Dridi S., Tarallo V., Gelfand B.D., Fowler B.J., Cho W.G., Kleinman M.E., Ponicsan S.L., Hauswirth W.W., Chiodo V.A., Karikó K., Yoo J.W., Lee D.K., Hadziahmetovic M., Song Y., Misra S., Chaudhuri G., Buas F.W., Braun R.E., Hinton D.R., Zhang Q., Grossniklaus H.E., Provis J.M., Madigan M.C., Milam A.H., Justice N.L., Albuquerque R.J.C., Blandford A.D., Bogdanovich S., Hirano Y., Witta J., Fuchs E., Littman D.R., Ambati B.K., Rudin C.M., Chong M.M., Provost P., Kugel J.F., Goodrich J.A., Dunaief J.L., Baffi J.Z., Ambati J. (2011) DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature*. **471**, 325–332.
<https://doi.org/10.1038/NATURE09830>
 20. Kumar M.S., Lu J., Mercer K.L., Golub T.R., Jacks T. (2007) Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat. Genet.* **39**, 673–677.
<https://doi.org/10.1038/ng2003>
 21. Toussaint O., Medrano E.E., von Zglinicki T. (2000) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp. Gerontology*. **35**, 927–945.
[https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00180-7](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00180-7)
 22. Childs B.G., Durik M., Baker D.J., Van Deursen J.M. (2015) Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat. Medicine*. **21**(12), 1424–1435.
<https://doi.org/10.1038/nm.4000>
 23. Narita M., Nunez S., Heard E., Narita M., Lin A.W., Hearn S.A., Spector D.L., Hannon G. J., Lowe S.W. (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*. **113**, 703–716.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00401-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00401-X)
 24. Hayflick L. (1965) The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **37**, 614–636.
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
 25. Lee S., Schmitt C.A. (2019) The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat. Cell. Biol.* **21**, 94–101.
<https://doi.org/10.1038/s41556-018-0249-2>
 26. Seshadri T., Campisi J. (1990) Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science*. **247**, 205–209.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2104680>

27. Beauséjour C.M., Krtolica A., Galimi F., Narita M., Lowe S.W., Yaswen P., Campisi J. (2003) Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* **22**, 4212–4222. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG417>
28. Milanovic M., Fan D.N.Y., Belenki D., Däbritz J.H.M., Zhao Z., Yu Y., Dörr J.R., Dimitrova L., Lenze D., Monteiro Barbosa I.A., Mendoza-Parra M.A., Kanashova T., Metzner M., Pardon K., Reimann M., Trumpp A., Dörken B., Zuber J., Gronemeyer H., Hummel M., Dittmar G., Lee S., Schmitt C.A. (2018) Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*. **553**, 96–100. <https://doi.org/10.1038/nature25167>
29. Pluquet O., Pourtier A., Abbadie C. (2015) The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **308**, 415–425. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00334.2014>
30. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S., Mesirov J.P. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
31. Reich M., Liefeld T., Gould J., Lerner J., Tamayo P., Mesirov J.P. (2006) GenePattern 2.0. *Nat. Genet.* **38**, 500–501. <https://doi.org/10.1038/ng0506-500>
32. Кухарский М.С., Эверетт М.У., Лыткина О.А., Распопова М.А., Ковражкина Е.А., Овчинников Р.К., Антохин А.И., Московцев А.А. (2022) Нарушение белкового гомеостаза в клетке как основа патогенеза нейродегенеративных заболеваний. *Молекуляр. биология.* **56**(6), 1044–1056.
33. Stein G.H., Drullinger L.F., Soulard A., Dulić V. (1999) Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2109–2117. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.3.2109>
34. Wang A.S., Dreesen O. (2018) Biomarkers of cellular senescence and skin aging. *Front. Genet.* **9**, 247. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00247>
35. Childs B.G., Baker D.J., Kirkland J.L., Campisi J., Van Deursen J.M. (2014) Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* **15**, 1139–1153. <https://doi.org/10.15252/embr.201439245>
36. González-Gualda E., Baker A.G., Fruk L., Muñoz-Espín D. (2021) A guide to assessing cellular senescence *in vitro* and *in vivo*. *FEBS J.* **288**, 56–80. <https://doi.org/10.1111/FEBS.15570>
37. Braakman I., Helenius J., Helenius A. (1992) Manipulating disulfide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **11**, 1717–1722. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1992.TB05223.X>
38. Osowski C.M., Urano F. (2011) Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol.* **490**, 71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385114-7.00004-0>
39. Tu B.P., Weissman J.S. (2004) Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J. Cell. Biol.* **164**, 341–346. <https://doi.org/10.1083/JCB.200311055>
40. Hwang C., Sinskey A.J., Lodish H.F. (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science*. **257**, 1496–1502. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1523409>
41. Меситов М.В., Игнашкова Т.И., Мещерский М.Е., Акопов А.С., Соколовская А.А., Московцев А.А., Кубатиев А.А. (2012) Индукция стресса эндоплазматического ретикулума в условиях окислительно-восстановительного дисбаланса в клетках Т-лимфоцитарной лейкемии человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, **56**(3), 87–93. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23072118/>
42. Held K.D., Sylvester F.C., Hopcia K.L., Biaglow J.E. (1996) Role of Fenton chemistry in thiol-induced toxicity and apoptosis. *Radiation Res.* **145**, 542–553. <https://doi.org/10.2307/3579272>
43. Masciarelli S., Sitia R. (2008) Building and operating an antibody factory: redox control during B to plasma cell terminal differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*. **1783**(4), 578–588. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2008.01.003>
44. Anelli T., Bergamelli L., Margittai E., Rimessi A., Fagioli C., Malgaroli A., Pinton P., Ripamonti M., Rizzuto R., Sitia R. (2012) Ero1 α regulates Ca²⁺ fluxes at the endoplasmic reticulum–mitochondria interface (MAM). *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 1077–1087. <https://doi.org/10.1089/ARS.2011.4004>
45. Tavender T.J., Bulleid N.J. (2010) Peroxiredoxin IV protects cells from oxidative stress by removing H₂O₂ produced during disulphide formation. *J. Cell Sci.* **123**, 2672–2679. <https://doi.org/10.1242/JCS.067843>
46. Zito E., Melo E.P., Yang Y., Wahlander Å., Neubert T.A., Ron D. (2010) Oxidative protein folding by an endoplasmic reticulum-localized peroxiredoxin. *Mol. Cell.* **40**, 787. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.11.010>
47. Cormenier J., Martin N., Deslé J., Salazar-Cardozo C., Pourtier A., Abbadie C., Pluquet O. (2018) The ATF6 α arm of the unfolded protein response mediates replicative senescence in human fibroblasts through a COX2/prostaglandin E2 intracrine pathway. *Mech. Ageing Dev.* **170**, 82–91. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2017.08.003>
48. Wiesen J.L., Tomasi T.B. (2009) Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. *Mol. Immunol.* **46**, 1222. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2008.11.012>
49. Emde A., Hornstein E. (2014) miRNAs at the interface of cellular stress and disease. *EMBO J.* **33**, 1428–1437. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.201488142>

50. Otsuka M., Jing Q., Georgel P., New L., Chen J., Mols J., Kang Y.J., Jiang Z., Du X., Cook R., Das S.C., Pattnaik A.K., Beutler B., Han J. (2007) Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity*. **27**, 123–134.
<https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2007.05.014>
51. Müller S., Imler J.L. (2007) Dicing with viruses: microRNAs as antiviral factors. *Immunity*. **27**, 1–3.
<https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2007.07.003>
52. Pagliuso D.C., Bodas D.M., Pasquinelli A.E. (2021) Recovery from heat shock requires the microRNA pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* **17**, e1009734.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1009734>
53. Mori M.A., Raghavan P., Thomou T., Boucher J., Robida-Stubbs S., MacOtela Y., Russell S.J., Kirkland J.L., Blackwell T.K., Kahn C.R. (2012) Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell Metabolism*. **16**, 336–347.
<https://doi.org/10.1016/J.CMET.2012.07.017>
54. Turi Z., Lacey M., Mistrik M., Moudry P. (2019) Impaired ribosome biogenesis: mechanisms and relevance to cancer and aging. *Aging (Albany NY)*. **11**, 2512.
<https://doi.org/10.18632/AGING.101922>

microRNA Biogenesis during Cellular Senescence Induced by Chronic Stress of the Endoplasmic Reticulum

D. M. Zaichenko¹, A. A. Mikryukova¹, I. R. Astafeva¹, S. G. Malakho³,
A. A. Kubatiev^{1,2}, and A. A. Moskovtsev^{1,2,*}

¹*Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia*

²*Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (RMANPO), Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125993 Russia*

³*Botkin City Clinical Hospital of the Moscow City Health Department, Moscow, 125284 Russia*

*e-mail: bioinf@mail.ru

MicroRNAs are small non-coding regulatory RNAs about 22 nt long, post-transcriptional and transcriptional regulators of gene expression that stabilize the cellular phenotype and play an important role in differentiation, development, and apoptosis. MicroRNA biogenesis includes several precisely controlled post-transcriptional stages of processing and transport, including cytoplasmic cleavage of pre-miRNA by type III ribonuclease DICER with the formation of a mature duplex included in the RISC complex. The role of miRNA and its biogenesis are not well understood in such an important process as cellular stress. Cellular stress is a non-specific cellular response to non-physiological stimuli that can switch a cell to death or cellular senescence. The global decrease in microRNA levels is a key feature of cancer cells and an important reason for the formation of a malignant phenotype. In this work, using flow cytometry and high-throughput analysis of gene expression, we showed that chronic endoplasmic reticulum (ER) stress, one of the types of cellular stress associated with impaired protein folding in the ER, leads to the formation of a cellular aging phenotype in fibroblast-like FRSN cells. Despite the fact that acute ER stress can reduce miRNA biogenesis, chronic stress does not lead to a significant drop in global miRNA expression and is accompanied by only a slight decrease in DICER1 mRNA expression. Under chronic ER stress, we found an increase in cell population heterogeneity in terms of lysosomal beta-galactosidase activity, which does not exclude induced or initial cell heterogeneity and in terms of expression of microRNA biogenesis pathway components.

Keywords: ER stress, stress-induced aging, miRNA biogenesis

СВЕРХЭКСПРЕССИЯ *MKRN2* ПОДАВЛЯЕТ РОСТ КЛЕТОК РАКА ЯИЧНИКОВ¹

© 2023 г. F. Z. Jiang^{a, 2}, Q. J. Xia^{b, 2}, L. Wu^c, Y. M. Zhang^{a, *}

^aDepartment of Obstetrics and Gynecology, Dushu Lake Hospital affiliated to Soochow University, Soochow University, Suzhou, 215005 China

^bObstetrics and Gynecology Department, Nantong Haimen District People's Hospital, Nantong, 226151 China

^cSuzhou Industrial Park Centers for Disease Control and Prevention, Suzhou, 215005 China

*e-mail: zhangyueming@suda.edu.cn

Поступила в редакцию 21.10.2022 г.

После доработки 05.12.2022 г.

Принята к публикации 17.12.2022 г.

Рак яичников характеризуется низкой пятилетней выживаемостью и высоким уровнем смертности. Изучено влияние E3-лигазы *MKRN2* (Makorin ring finger protein 2), роль которой при раке яичников не установлена, на рост клеток рака яичников. Экспрессию *MKRN2* в ткани рака яичников анализировали иммуногистохимически. Сверхэкспрессию *MKRN2* в двух клеточных линиях рака яичников (SKOV3 и CAO3) индуцировали с помощью лентивирусной трансфекции, а уровни экспрессии верифицировали методом вестер-блоттинга. Пролиферацию и рост клеток оценивали методом ССК-8 и формирования колоний, миграцию клеток оценивали с использованием transwell-метода, а апоптоз — с помощью проточной цитометрии. Ксенографтные опухоли получали в мышах, которым вводили клетки SKOV3, уровни *MKRN2* и апоптоза в опухолевых клетках определяли иммуногистохимически и методом TUNEL. Уровни *MKRN2* в ткани опухоли яичников были снижены по сравнению с нормальной тканью. Сверхэкспрессия *MKRN2* в клетках SKOV3 и CAO3, трансфицированных лентивирусным вектором, снижала ассоциированное с опухолью поведение клеток и индуцировала апоптоз *in vitro*. Сверхэкспрессия *MKRN2* в ксенографтных опухолях приводила к подавлению роста опухоли и повышала апоптоз *in vivo*. Эти данные предполагают участие *MKRN2* в канцерогенезе рака яичников и возможность использования *MKRN2* в терапии опухолей.

Ключевые слова: пролиферация клеток, миграция клеток, клеточная инвазия, *MKRN2*, рак яичников

DOI: 10.31857/S0026898423040109, **EDN:** QLPEZQ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tew W.P., Lacchetti C., Ellis A., Maxian K., Banerjee S., Bookman M., Jones M.B., Lee J.M., Lheureux S., Liu J.F., Moore K.N., Muller C., Rodriguez P., Walsh C., Westin S.N., Kohn E.C. (2020) PARP inhibitors in the management of ovarian cancer: ASCO guideline. *J. Clin. Oncol.* **38**(30), 3468–3493.
2. Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. (2021) Cancer statistics, 2021. *CA Cancer J. Clin.* **71**(1), 7–33.
3. Lin C.N., Tsai Y.C., Hsu C.C., Liang Y.L., Wu Y.Y., Kang C.Y., Lin C.H., Hsu P.H., Lee G.B., Hsu K.F. (2021) An aptamer interacting with heat shock protein 70 shows therapeutic effects and prognostic ability in serous ovarian cancer. *Mol. Therapy Nucl. Acids.* **23**, 757–768.
4. Lheureux S., Gourley C., Vergote I., Oza A.M. (2019) Epithelial ovarian cancer. *Lancet.* **393**(10177), 1240–1253.
5. Wolf E.J., Miles A., Lee E.S., Nabeel-Shah S., Greenblatt J.F., Palazzo A.F., Tropepe V., Emili A. (2020) *MKRN2* physically interacts with GLE1 to regulate mRNA export and zebrafish retinal development. *Cell Rep.* **31**(8), 107693.
6. Böhne A., Darras A., D'Cotta H., Baroiller J.F., Galiana-Arnoux D., Volff J.N. (2010) The vertebrate makorin ubiquitin ligase gene family has been shaped by large-scale duplication and retroposition from an ancestral gonad-specific, maternal-effect gene. *BMC Genomics.* **11**, 721.
7. Zhang Q., Meng Y., Zhang L., Chen J., Zhu D. (2009) RNF13: a novel RING-type ubiquitin ligase over-expressed in pancreatic cancer. *Cell Res.* **19**(3), 348–357.

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

² Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

8. Ulrich H.D. (2002) Natural substrates of the proteasome and their recognition by the ubiquitin system. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **268**, 137–174.
9. Shin C., Ito Y., Ichikawa S., Tokunaga M., Sakata-Sogawa K., Tanaka T. (2017) MKRN2 is a novel ubiquitin E3 ligase for the p65 subunit of NF- κ B and negatively regulates inflammatory responses. *Sci. Rep.* **7**, 46097.
10. Jiang J., Xu Y., Ren H., Wudu M., Wang Q., Song X., Su H., Jiang X., Jiang L., Qiu X. (2018) MKRN2 inhibits migration and invasion of non-small-cell lung cancer by negatively regulating the PI3K/Akt pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**(1), 189.
11. Zhang Y., Cui N., Zheng G. (2020) Ubiquitination of P53 by E3 ligase MKRN2 promotes melanoma cell proliferation. *Oncol. Lett.* **19**(3), 1975–1984.
12. Jia C., Tang H., Yang Y., Yuan S., Han T., Fang M., Huang S., Hu R., Li C., Geng W. (2020) Ubiquitination of IGF2BP3 by E3 ligase MKRN2 regulates the proliferation and migration of human neuroblastoma SHSY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **529**(1), 43–50.
13. Abreu A.P., Macedo D.B., Brito V.N., Kaiser U.B., Latronico A.C. (2015) A new pathway in the control of the initiation of puberty: the MKRN3 gene. *J. Mol. Endocrinol.* **54**(3), R131–139.
14. Qian Y.C., Xie Y.X., Wang C.S., Shi Z.M., Jiang C.F., Tang Y.Y., Qian X., Wang L., Jiang B.H. (2020) Mkrn2 deficiency induces teratozoospermia and male infertility through p53/PERP-mediated apoptosis in testis. *Asian J. Androl.* **22**(4), 414–421.
15. Wadekar H.B., Sahi V.P., Morita E.H., Abe S. (2013) MKRN expression pattern during embryonic and post-embryonic organogenesis in rice (*Oryza sativa* L. var. Nipponbare). *Planta.* **237**(4), 1083–1095.
16. Hildebrandt A., Brüggemann M., Rücklé C., Boerner S., Heidelberger J.B., Busch A., Hänel H., Voigt A., Möckel M.M., Ebersberger S., Scholz A., Dold A., Schmid T., Ebersberger I., Roignant J.Y., Zarnack K., König J., Beli P. (2019) The RNA-binding ubiquitin ligase MKRN1 functions in ribosome-associated quality control of poly(A) translation. *Genome Biol.* **20**(1), 216.
17. Herrera R.A., Kiontke K., Fitch D.H. (2016) Makorin ortholog LEP-2 regulates LIN-28 stability to promote the juvenile-to-adult transition in *Caenorhabditis elegans*. *Development.* **143**(5), 799–809.
18. Liu M., Zhong J., Zeng Z., Huang K., Ye Z., Deng S., Chen H., Xu F., Li Q., Zhao G. (2019) Hypoxia-induced feedback of HIF-1 α and lncRNA-CF129 contributes to pancreatic cancer progression through stabilization of p53 protein. *Theranostics.* **9**(16), 4795–4810.
19. Xu Y., Sun J.Y., Jin Y.F., Yu H. (2018) PCAT6 participates in the development of gastric cancer through endogenous competition with microRNA-30. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **22**(16), 5206–5213.
20. Lee K.Y., Chan K.Y., Tsang K.S., Chen Y.C., Kung H.F., Ng P.C., Li C.K., Leung K.T., Li K. (2014) Ubiquitous expression of MAKORIN-2 in normal and malignant hematopoietic cells and its growth promoting activity. *PLoS One.* **9**(3), e92706.

Overexpression of *MKRN2* Inhibits the Growth of Ovarian Cancer Cells

F. Z. Jiang¹, Q. J. Xia², L. Wu³, and Y. M. Zhang^{1, *}

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Dushu Lake Hospital affiliated to Soochow University, Soochow University, Suzhou, China

²Obstetrics and Gynecology Department, Nantong Haimen District People's Hospital, Nantong, China

³Suzhou Industrial Park Centers for Disease Control and Prevention, Suzhou, China

*e-mail: zhangyueming@suda.edu.cn

Ovarian cancer has a high mortality with low five-year survival rates. The role of the E3 ligase Makorin ring finger protein 2 (*MKRN2*) in ovarian cancer is unknown. This study investigated the impact of *MKRN2* on the growth of ovarian cancer. *MKRN2* expression in ovarian cancer tissue was analyzed by immunohistochemistry. Overexpression of *MKRN2* was induced in two ovarian cancer cell lines (SKOV3 and CAOV3) by lentivirus transfection, and expression levels were verified by western blotting. Proliferation and growth were determined by CCK-8 and colony formation assays, while migration was examined using transwell assays and apoptosis by flow cytometry. Xenograft tumors of transfected SKOV3 cells were established in mice, and immunohistochemistry and TUNEL assays measured *MKRN2* levels and apoptosis in tumor cells. Reduced levels of *MKRN2* in cancerous tissue relative to non-cancerous ovarian tissues. Lentiviral-based *MKRN2* overexpression in SKOV3 and CAOV3 cells reduced tumor-associated behavior while inducing apoptosis *in vitro*. In xenograft tumors, *MKRN2* overexpression inhibited ovarian cancer growth and increased apoptosis *in vivo*. These findings imply the *MKRN2* involvement in ovarian carcinogenesis and suggest its potential for treating the disease.

Keywords: cell proliferation, cell migration, cell invasion, *MKRN2*, ovarian cancer

УДК 577.21

ИНАКТИВАЦИЯ Ras1 В ДЕЛЯЩИХСЯ ДРОЖЖАХ УСИЛИВАЕТ ОТВЕТ НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС, ИНДУЦИРУЕМЫЙ *тrem*-БУТИЛГИДРОПЕРОКСИДОМ (tBHP)¹

© 2023 г. N. Masood^a, S. Anjum^b, S. Ahmed^b, *

^aBiochemistry and Structural Biology Division, CSIR- Central Drug Research Institute, Sector 10, Jankipuram Extension, Sitapur Road, Lucknow, 226031 India

^bAcademy of Scientific and Innovative Research (AcSIR), Ghaziabad, 201002 India

*e-mail: shakil_ahmed@cdri.res.in

Поступила в редакцию 22.07.2022 г.

После доработки 29.11.2022 г.

Принята к публикации 24.12.2022 г.

Малые GTPазы Ras функционируют как молекулярные переключатели, регулирующие клеточный гомеостаз. Ras-зависимые сигнальные пути регулируют такие важные процессы, как прохождение клеточного цикла, апоптоз, миграция и старение клеток. Нарушение сигнального пути Ras связано с несколькими патологическими состояниями. Установлено, что белки Ras могут участвовать в регуляции окислительно-восстановительных сигнальных путей, включая влияние на уровень активных форм кислорода, создающих условия для канцерогенеза. Предполагается, что активные формы кислорода и разобщение митохондриальных функций являются главными факторами, воздействующими на физиологические процессы в клетках и вовлеченными в разные патологии. В настоящей работе изучена роль Ras1, *тrem*-бутилгидропероксида (tBHP) и антимицина А в ответе клеток *Schizosaccharomyces pombe* на окислительный стресс. Обнаружено снижение выживаемости, более высокий уровень активных форм кислорода и нарушение функций митохондрий в клетках *ras1Δ* и в клетках дикого типа, обработанных tBHP, а также ингибитором дыхательной цепи антимицином А. Более того, эти эффекты сильнее выражены в обработанных антимицином или tBHP клетках *ras1Δ*. Показано также, что Ras1 регулирует экспрессию и активность таких антиоксидантных ферментов, как глутатионпероксидаза (GSH-Px), глутатион-S-трансфераза (GST) и каталаза. Эти результаты свидетельствуют о потенциальной роли Ras1 *S. pombe* в смягчении ответа на окислительный стресс.

Ключевые слова: *Schizosaccharomyces pombe*, Ras1, активные формы кислорода, ROS, *тrem*-бутилгидропероксид tBHP, окислительный стресс

DOI: 10.31857/S0026898423040158, EDN: QLULLQ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sbodio J.I., Snyder S.H., Paul B.D. (2019) Redox mechanism in neurodegeneration: from disease outcome to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **30**, 1450–1499.
2. Simanshu D.K., Nissley D.V., McCormick F. (2017) RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell.* **170**(1), 17–33.
3. Vojtek A.B., Der C.J. (1998) Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 19925–19928.
4. Klandorf H., Dyke Van K. (2012) Oxidative and nitrosative stresses: their role in health and disease in man and birds. In: *Oxidative Stress – Molecular Mechanisms and Biological Effects*. Eds Lushchak V., Semchyshyn H.M. IntechOpen, 47–60. <https://doi.org/10.5772/33879>
5. Carew J.S., Zhou Y., Huang P. (2006) Oxidative stress, cell proliferation, and apoptosis. In: *Oxidative Stress, Disease and Cancer*. Ed. Singh K.K. London: Imperial College Press, 309–331. https://doi.org/10.1142/9781860948046_0009
6. Marozkina N.V., Gaston B. (2012) S-Nitrosylation signaling regulates cellular protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1820**, 722–729.
7. Malumbres M., Barbacid M. (2003) RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer.* **3**, 459–465.
8. Garcia P., Tajadura V., Garcia I., Sanchez Y. (2006) Role of Rho GTPases and Rho GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast.* **23**, 1031–1043.

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

9. Young E., Zheng Z.Y., Wilkins A.D., Jeong H.T., Li M., Lichtarge O., Chang E.C. (2014) Regulation of Ras localization and cell transformation by evolutionarily conserved palmitoyltransferases. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 374–385.
10. Kim H.J., Jung H.Y., Lim C.J. (2008) The pap1+ gene of fission yeast is transcriptionally regulated by nitrosative and nutritional stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **280**, 176–181.
11. Bond M., Croft W., Tyson R., Bretschneider T., Davey J., Ladds G. (2013) Quantitative analysis of human ras localization and function in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. **30**, 145–156.
12. Weston C., Bond M., Croft W., Ladds G. (2013) The coordination of cell growth during fission yeast mating requires Ras1-GTP hydrolysis. *PLoS One*. **8**(10), e77487
13. Sánchez N.S., Königsberg M. (2006) Using yeast to easily determine mitochondrial functionality with 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **34**(3), 209–212.
14. Warholm M., Guthenberg C., von Bahr C., Mannervik B. (1985) Glutathione transferases from human liver. *Methods Enzymol.* **113**, 499–504.
15. Wendel A. (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **77**, 325–333.
16. Roggenkamp R., Sahm H., Wagner F. (1974) Microbial assimilation of methanol induction and function of catalase in *Candida boidinii*. *FEBS Lett.* **41**(2), 283–286.
17. Vlamis-Gardikas A., Åslund F., Spyrou G., Bergman T., Holmgren A. (1997) Cloning, overexpression, and characterization of glutaredoxin 2, an atypical glutaredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **272**(17), 11236–11243.
18. Sonkar A., Yadav S., Ahmed S. (2016) Cleavage and polyadenylation factor, Rna14 is an essential protein required for the maintenance of genomic integrity in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim. Biophys. Acta* **1863** (2), 189–197.
19. Amoroso S., D'Alessio A., Sirabella R., Di Renzo G., Annunziato L. (2002) Ca(2+) independent caspase-3 but not Ca2+-dependent caspase-2 activation induced by oxidative stress leads to SH-SY5Y human neuroblastoma cell apoptosis. *J. Neurosci. Res.* **68**, 454–462.
20. Kanupriya A., Prasad D., Sai Ram M., Sawhney R.C., Ilavazhagan G., Banerjee P.K. (2007) Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced cytotoxicity in U-937 macrophages by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Toxicol. In Vitro*. **21**(5), 846–854.
21. Lv H., Zhen C., Liu J., Yang P., Hu L., Shang P. (2019) Unraveling the potential role of glutathione in multiple forms of cell death in cancer therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, 3150145.
22. Auten R.L., Davis J.M. (2009) Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatr. Res.* **66**(2), 121–127.
23. Guo C., Sun L., Chen X., Zhang D. (2013) Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural. Regen. Res.* **8**(21), 2003.
24. Bhatti J.S., Bhatti G.K., Reddy P.H. (2017) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — a step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis Dis.* **1863**(5), 1066–1077.
25. Veal E.A., Toone W.M., Jones N., Morgan B.A. (2002) Distinct roles for glutathione S-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **277**, 35523–35531.
26. Aniya Y., Daido A. (1994) Activation of microsomal glutathione S-transferase in tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress of isolated rat liver. *Jpn. J. Pharmacol.* **66**(1), 123–130.
27. Takebe G., Yarimizu J., Saito Y., Hayashi T., Nakamura H., Yodoi J., Nagasawa S., Takahashi K. (2002) A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J. Biol. Chem.* **277**(43), 41254–41258.
28. Inoue Y., Matsuda T., Sugiyama K.I., Izawa S., Kimura A. (1999) Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **274**(38), 27002–27009.
29. Sandström B.E., Marklund S.L. (1990) Effects of variation in glutathione peroxidase activity on DNA damage and cell survival in human cells exposed to hydrogen peroxide and *t*-butyl hydroperoxide. *Biochem. J.* **271**(1), 17–23.
30. Jamieson D.J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **14**(16), 1511–1527.
31. Zhang J., Wang X., Vikash V., Ye Q., Wu D., Liu Y., Dong W. (2016) ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 4350965. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
32. Cox A. D., Der C. J. (2003) The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene*. **22**, 8999–9006.
33. Shaulian E., Karin M. (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*. **20**, 2390–2400.
34. Weinberg F., Hamanaka R., Wheaton W.W., Weinberg S., Joseph J., Lopez M., Kalyanaraman B., Mutlu G.M., Budinger G.S., Chandel N.S. (2010) Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**(19), 8788–8793.
35. Toone W.M., Kuge S., Samuels M., Morgan B.A., Toda T., Jones N. (1998) Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes Dev.* **12**(10), 1453–1463.
36. Lim J.K., Delaidelli A., Minaker S.W., Zhang H.F., Colovic M., Yang H., Negri G.L., von Karstedt S., Lockwood W.W., Schaffer P., Leprivier G. (2019) Cystine/glutamate antiporter xCT (SLC7A11) facilitates oncogenic RAS transformation by preserving intracellular redox balance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **116**, 9433–9442.
37. Padanad M.S., Konstantinidou G., Venkateswaran N., Melegari M., Rindhe S., Mitsche M., Yang C., Batten K., Huffman K.E., Liu J., Tang X. (2016) Fatty acid oxidation mediated by Acyl-CoA synthetase long chain 3 is required for mutant KRAS lung tumorigenesis. *Cell Rep.* **16**, 1614–1628.
38. Carracedo A., Cantley L.C., Pandolfi P.P. (2013) Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat. Rev. Cancer*. **13**, 227–232.

Inactivation of Ras1 in Fission Yeast Aggravates the Oxidative Stress Response Induced by Tert Butyl Hydroperoxide (tBHP)

N. Masood¹, S. Anjum², and S. Ahmed^{2, *}

¹Biochemistry and Structural Biology Division, CSIR- Central Drug Research Institute, Sector 10, Jankipuram Extension, Sitapur Road, Lucknow, 226031 India

²Academy of Scientific and Innovative Research (AcSIR), Ghaziabad, 201002 India

*e-mail: shakil_ahmed@cdri.res.in

Ras proteins are small GTPases and function as molecular switches to regulate cellular homeostasis. Ras-dependent signalling pathways regulate several essential processes such as cell cycle progression, growth, migration, apoptosis, and senescence. The dysregulation of Ras signaling pathway has been linked to several pathological outcomes. A potential role of RAS in regulating the redox signalling pathway has been established that includes the manipulation of ROS levels to provide a redox milieu that might be conducive to carcinogenesis. Reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial impairment have been proposed as major factors affecting the physiology of cells and implicated in several pathologies. The present study was conducted to evaluate the role of Ras1, tert Butyl hydroperoxide (tBHP), and antimycin A in oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe* cells. We observed decreased cell survival, higher levels of ROS, and mitochondrial dysfunctionality in *ras1Δ* cells and tBHP as well as respiratory inhibitor, antimycin A treated wild type cells. Furthermore, these defects were more profound in *ras1Δ* cells treated with tBHP or antimycin A. Additionally, Ras1 also has been shown to regulate the expression and activity of several antioxidant enzymes like glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione-S-transferase (GST), and catalase. Together, these results suggest the potential role of *S. pombe* Ras1 in mitigating oxidative stress response.

Keywords: *Schizosaccharomyces pombe*, Ras1, ROS, tBHP, oxidative stress

УДК 51.76

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА РЕПЛИКАЦИИ ВИЧ И ОТВЕТА СИСТЕМЫ ИНТЕРФЕРОНА¹© 2023 г. И. А. Гайнова^{a, *}, А. Е. Соболева^b, Д. С. Гребенников^{c, d}, Г. А. Бочаров^{c, d}^aИнститут математики им. С.Л. Соболева Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия^bМосковский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Московская область, Долгопрудный, 141701 Россия^cИнститут вычислительной математики им. Г.И. Марчука Российской академии наук, Москва, 119333 Россия^dПервый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения России, Москва, 119991 Россия

*e-mail: gajnova@math.nsc.ru

Поступила в редакцию 09.08.2022 г.

После доработки 29.11.2022 г.

Принята к публикации 24.12.2022 г.

Разработка физиологически содержательных математических моделей, описывающих многоуровневую регуляцию в сложной сети иммунных ответов, в частности системы интерферонрегулируемых процессов репликации вирусов, является фундаментальной научной задачей в рамках межинтеграционного системного подхода к исследованиям в иммунологии. В работе представлена детальная математическая модель высокого разрешения, описывающая репликацию вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), ответ системы интерферона (ИФН) I типа на проникновение вируса в клетку и подавление действия ИФН-индуцируемых белков вспомогательными белками ВИЧ. В результате проведенного исследования впервые разработана модель, учитывающая взаимодействие всех трех процессов. Математическая модель представляет собой систему из 37 нелинейных обыкновенных дифференциальных уравнений, включающую 78 параметров. Особенность модели заключается в том, что в ней описаны не только процессы, вовлеченные в интерфероновый ответ клетки на заражение вирусом, но также используемые вирусом механизмы, препятствующие действию системы ИФН.

Ключевые слова: математическая модель, вирус иммунодефицита человека, репликация, вспомогательные белки, интерферон типа I, интерфероновый ответ, индуцируемые интерфероном белки

DOI: 10.31857/S0026898423040080, EDN: QLNHZQ

ВВЕДЕНИЕ

Защита от инфекций — основная функция иммунной системы организма человека и животных, контролируемая реакциями врожденного и адаптивного иммунитета [1]. Ключевой фактор реакций врожденного иммунитета, реализующий механизмы защиты организма от вирусных инфекций, — система интерферона (ИФН) I типа [2, 3]. Образующиеся в инфицированных клетках молекулы ИФН переводят клетку в противовирусное состояние, которое может либо предотвратить

инфекцию *de novo*, либо ингибировать более поздние стадии репликации вируса, такие как сборка и выход новых вирионов из клетки [4–6].

В организме человека ИФН I типа составляют семейство родственных цитокинов, включая 13 подтипов ИФН- α и два подтипа ИФН- β , которые секретируются в ответ на стимуляцию рецепторов распознавания чужеродных клеточных компонентов. Это Toll-подобные рецепторы (TLR), RIG1-подобные рецепторы (RLR) и NOD-подобные рецепторы (NLR) [7].

Следует заметить, что структура ингибирующей сети ИФН- α , а также параметры, регулирующие ее активность, плохо изучены, в то время как понимание динамики иммунного ответа системы ИФН имеет важное значение при разработке эффективных лекарственных средств для лечения инфекционных и других заболеваний. Так, динамические модели позволяют точно определить, какие молекулярные компоненты сети ингибировать

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898423040080 для авторизованных пользователей.

Сокращения: ВИЧ — вирус иммунодефицита человека; ИФН — интерферон(ы); кДНК — комплементарная ДНК; dsRNA (doubly spliced RNA) — двукратно сплайсированная РНК; gRNA (genomic RNA) — полноразмерная РНК; ISGs (interferon-stimulated genes) — интерферонстимулируемые гены; ssRNA (singly spliced RNA) — однократно сплайсированная РНК.

ния ИФН- α наиболее перспективны в качестве терапевтических мишеней [5].

В нашей работе впервые построена, прокалибрована и исследована высокоразмерная модель, описывающая на временном интервале 0–35 ч взаимодействие процессов трех классов: 1) репликацию вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) в клетке (на основе описанной ранее математической модели жизненного цикла ВИЧ [8]), 2) ответную реакцию внутриклеточной системы ИФН на проникновение вируса в клетку и 3) подавление действия ИФН-индуцируемых белков вспомогательными белками ВИЧ.

РЕПЛИКАЦИЯ ВИЧ В КЛЕТКЕ

Жизненный цикл ВИЧ (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) начинается со связывания вируса с клеточным рецептором (CD4) и корецептором (CCR5 или CXCR4) с последующим слиянием с мембраной клетки-хозяина. Вирион проникает внутрь клетки, где происходит процесс обратной транскрипции. Синтезированная ДНК-копия вирусного генома (кДНК) попадает в ядро и интегрируется в геном клетки.

В ядре происходит процесс транскрипции полноразмерной (g), однократно сплайсированной (ss) и двукратно сплайсированной (ds) молекул РНК, которые затем перемещаются в цитоплазму. Образовавшиеся мРНК кодируют вирусные белки-предшественники: Gag-Pol, Gag и Env (gp160), — необходимые для сборки новых вирионов, регуляторные белки Tat и Rev, вспомогательные белки: Nef, Vpr и Vif, а также Vpr (ВИЧ-1) или Vpx (ВИЧ-2). Белки, необходимые для сборки нового вириона, включая белок Vpr, и молекулы вирусной РНК перемещаются к мембране. Белки и молекулы вирусной РНК, находящиеся на мембране, собираются в превирионный комплекс. Затем происходит почкование созревшего вириона и его выход из клетки [8–12].

ОТВЕТ СИСТЕМЫ ИНТЕРФЕРОНА НА ПРОНИКНОВЕНИЕ ВИЧ В КЛЕТКУ

Проникший в клетку вирус распознается клеточными рецепторами, включая RIG1-подобный рецептор, в результате чего запускается сигнальный каскад реакций, приводящих к активации факторов транскрипции IRF3 и NF- κ B. Эти факторы транслируются в ядро и стимулируют транскрипцию ИФН-стимулируемых генов (ISGs), кодирующих ИФН [4, 13, 14]. Вышедшие во внеклеточное пространство молекулы ИФН воздействуют на соседние клетки, активируя сигнальный каскад с участием белков STAT1 и STAT2, которые индуцируют экспрессию ISGs, кодирующих белки APOBEC3, SAMHD1, Tetherin [14]. Эти белки регулируют различные стадии репликации вируса в

клетке: APOBEC3 и SAMHD1 препятствуют процессу обратной транскрипции, Tetherin — выходу созревшего вириона из клетки [4, 15–18]. APOBEC3 дезаминирует основания на первой синтезированной цепи кДНК, в результате получается “испорченная” кДНК вируса [19]. SAMHD1 — фермент, дефосфорилирующий трифосфаты дезоксинуклеозидов до нуклеозидов и за счет этого подавляющий обратную транскрипцию [20, 21]. Поверхность белка Tetherin покрыта жгутиками, которые одновременно “цепляются” за вирион и клеточную мембрану, противодействуя тем самым выходу вириона из клетки [22].

ПОДАВЛЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ИФН-ИНДУЦИРОВАННЫХ БЕЛКОВ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫМИ БЕЛКАМИ ВИЧ

Действию ИФН-стимулированных белков препятствуют вспомогательные белки вируса: Vpr (ВИЧ-1), Vpx (ВИЧ-2) и Vif (ВИЧ-1). Vpr взаимодействует с клеточным белком Tetherin, Vpx — с SAMHD1, Vif — с APOBEC3 [4]. Принцип действия вспомогательных белков ВИЧ состоит в образовании комплекса с соответствующим ИФН-стимулированным белком с последующей деградацией последнего, но не вирусного белка [23].

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Математическая модель, сформулированная в данной работе, представлена в виде системы из 37 нелинейных обыкновенных дифференциальных уравнений. Система включает 78 параметров. Модель применима как для ВИЧ-1, так и для ВИЧ-2 при обнулении параметров процессов, которые в ней не присутствуют. Уравнения системы описывают изменения численности вирусных белков и РНК в ходе рассматриваемых стадий репликации ВИЧ в зараженной клетке и ответ системы ИФН.

В табл. 1 приведены параметры, используемые в математической модели, их описание, значения и размерности. Ключевые блоки системы процессов, включающих репликацию вируса, активацию системы ИФН и блокировку ее действия вспомогательными белками ВИЧ, представлены на рис. 1.

УРАВНЕНИЯ МОДЕЛИ

Проникновение ВИЧ в клетку

Проникновение вируса в клетку происходит в три этапа:

- 1) связывание вириона с клеточным рецептором CD4 (гликопротеин gp120 связывается с молекулами CD4 на поверхности Т-клеток),
- 2) связывание с корецептором (CCR5 или CXCR4),
- 3) слияние вирусной оболочки с мембраной клетки-хозяина.

Таблица 1. Значения параметров модели

Параметр	Описание	Значение ^a	Ссылки
k_{bind}	Константа скорости связывания вириона с мембраной	(2.1, 6.0) 3.1 ч^{-1}	[24–26]
d	Константа скорости деградации свободных вирионов	(0.38, 1.5) 0.38 ч^{-1}	[27, 28]
d_{bound}	Константа скорости деградации связанных вирионов	$(4.8 \times 10^{-4}, 1.9 \times 10^{-3})$ 0.0008 ч^{-1}	[29, 30]
k_{fuse}	Константа скорости слияния вириона с клеткой	(0.42, 2.2) 0.7 ч^{-1}	[26, 31, 32]
k_{RT}	Константа скорости обратной транскрипции	(0.43, 1.02) 0.43 ч^{-1}	[33–35]
$d_{\text{RNA}_{\text{cor}}}$	Величина, обратная времени жизни вирусной РНК	0.21 ч^{-1}	[36]
$d_{\text{DNA}_{\text{cor}}}$	Величина, обратная времени жизни вирусной ДНК в цитоплазме	(0.016, 0.2) 0.03 ч^{-1}	[37–40]
k_{DNA_i}	Константа скорости транспортировки вирусной ДНК в ядро	0.12 ч^{-1}	[33, 39]
$d_{\text{DNA}_{\text{nuc}}}$	Величина, обратная времени жизни свободной, невстроенной вирусной ДНК в ядре	0.001 ч^{-1}	[37]
k_{int}	Константа скорости интеграции вирусной ДНК в геном клетки	(0.07, 10) 0.14 ч^{-1}	[33, 41–44]
$d_{\text{DNA}_{\text{int}}}$	Величина, обратная времени жизни интегрированной в хромосому ДНК	0.00002 ч^{-1}	[45]
f_{APO}	Константа скорости ингибирования обратной транскрипции вирусной РНК белком АРОВЕСЗ	0.35 ч^{-1}	[46]
f_{SAM}	Константа скорости ингибирования обратной транскрипции вирусной РНК белком SAMHD1	1.6 ч^{-1}	[47]
TR_{cell}	Уровень базальной транскрипции полноразмерной РНК ВИЧ в клетке	15 ч^{-1}	[33, 48]
TR_{Tat}	Уровень транскрипции, индуцированный трансактивацией Tat (величина насыщения белка Tat)	(1000, 1500) 1500 ч^{-1}	[33, 48]
θ_{Rev}	Пороговое значение концентрации Rev, при котором скорость экспорта полноразмерной мРНК (mRNA_g) и однократно сплайсированной мРНК (mRNA_{ss}) ВИЧ достигает 50% от максимальной	(12, 6.0×10^5) 77000 молекул	[33, 40, 48]
θ_{Tat}	Пороговое значение концентрации Tat, при котором скорость транскрипции вирусной РНК достигает 50% от максимальной	1000 молекул	[33, 40, 48]
β	Ингибирующий эффект белка Rev на процессы сплайсинга, параметризующий снижение скорости сплайсинга в $1/(1 - \beta)$ раз при достижении белком Rev уровня сатурации	(0.82, 0.95) 0.9	[33]
$k_{\text{tp,RNA}}$	Константа скорости транспортировки вирусной РНК к мембране	(1.44, 43.2) 2.8 ч^{-1}	[49]
k_{eRNA_j}	Константа скорости экспорта вирусных РНК из ядра полноразмерной (RNA_g), $j = \{g\}$; однократно сплайсированной (RNA_{ss}), $j = \{ss\}$	(2.1, 4.6) 2.3 ч^{-1}	[33, 48, 50]
$k_{\text{eRNA}_{ds}}$	Константа скорости экспорта двукратно сплайсированной вирусной РНК (RNA_{ds}) из ядра	4.6 ч^{-1}	[33, 48, 50]
$k_{ss\text{RNA}_g}$	Константа скорости синтеза однократно сплайсированной вирусной РНК (RNA_{ss})	(2, 3) 2.4 ч^{-1}	[33, 48, 50]
$k_{ds\text{RNA}_{ss}}$	Константа скорости синтеза двукратно сплайсированной вирусной РНК (RNA_{ds})	(2, 3) 2.4 ч^{-1}	[33, 48, 50]
d_{RNA_j}	Константа скорости деградации mRNA_j , $j = \{g, ss, ds\}$	(0.077, 0.25) 0.12 ч^{-1}	[33, 48, 50]
$d_{p,\text{Tat}}$	Константа скорости деградации белка Tat	(0.04, 0.173) 0.04 ч^{-1}	[33, 48, 50]

Таблица 1. Продолжение

Параметр	Описание	Значение ^a	Ссылки
$d_{p,Rev}$	Константа скорости деградации белка Rev	(0.04, 0.173) 0.07 ч ⁻¹	[33, 48, 50]
$d_{p,j}$	Константа скорости деградации белка $j, j = \{\text{Gag-Pol, Gag}\}$	(0.05, 0.39) 0.09 ч ⁻¹	[33, 34]
$d_{p,gp160}$	Константа скорости деградации белка gp160	0.02 ч ⁻¹	[33]
d_{Vpu}	Константа скорости деградации белка Vpu	0.39 ч ⁻¹	[33]
d_{Vpx}	Константа скорости деградации белка Vpx	0.019 ч ⁻¹	[51]
d_{Vif}	Константа скорости деградации белка Vif	1.38 ч ⁻¹	[52]
f_{ij}	Доля mRNA _i , кодирующей белок P_j , $i = \{\text{g, ss, ds}\}$, $j = \{\text{Gag-Pol, Gag, gp160, Vpu, Vpx, Vif}\}$		
$f_{g,GagPol}$		0.05	[33]
$f_{g,Gag}$		0.95	[33]
$f_{ss,gp160}$		0.64	[^b]
$f_{ds,Rev}$		(0.095, 0.238) 0.2	[33, 48]
$f_{ds,Tat}$		0.025	[33]
$f_{ss,Vpu}$		0.062	[^b]
$f_{ss,Vpx}$		0.073	[^b]
$f_{ss,Vif}$		0.145	[^b]
k_{trans}	Константа скорости трансляции белков	(50, 1000) 524 [белок] [мРНК] ⁻¹ ч ⁻¹	[33, 48, 50, 53–55]
$d_{mem,GagPol}$	Константа скорости деградации белка Gag-Pol на мембране	0.004 ч ⁻¹	[56]
$d_{mem,Gag}$	Константа скорости деградации белка Gag на мембране	0.004 ч ⁻¹	[56]
$d_{mem,gp160}$	Константа скорости деградации белка gp160 на мембране	0.014 ч ⁻¹	[57]
$k_{tp,j}$	Константа скорости транспортировки белка P_j к мембране, $j = \{\text{Gag-Pol, Gag, gp160}\}$	(1.386, 432) 2.8 ч ⁻¹	[33, 49, 58]
$k_{tp,Vpu}$	Константа скорости транспортировки белка Vpu к мембране	(1.386, 432) 2.8 ч ⁻¹	[33, 49, 58]
k_{comb}	Константа скорости сборки компонент вируса в новый вирион	(6, 12) 8 ч ⁻¹	[59, 60]
N_{RNA}	Число молекул mRNA _g в новом вирионе	2 молекулы	[59, 61]
N_{GagPol}	Число молекул Gag-Pol в новом вирионе	(125, 250) 250 молекул	[59, 62]
N_{Gag}	Число молекул Gag в новом вирионе	(2 500, 5000) 5000 молекул	[59, 62]
N_{gp160}	Число молекул gp160 в новом вирионе	(12, 105) 24 молекулы	[62, 63]
d_{comb}	Константа скорости деградации вириона	(0.33, 1.25) 0.52 ч ⁻¹	[60]
k_{bud}	Константа скорости отпочковывания вириона	(1.3, 4.5) 2 ч ⁻¹	[60]
$d_{bud} = d$	Константа скорости деградации вируса	(0.38, 1.5) 0.38 ч ⁻¹	[28]
k_{mat}	Константа скорости созревания вириона	2.4 ч ⁻¹	[64]
f_{Teth}	Константа скорости захвата вирионов белком Tetherin	0.08 ч ⁻¹	[22]
k_{RIG1}	Константа скорости активации белка RIG1	0.48 ч ⁻¹	[14]
d_{RIG1}	Константа скорости потери активности белка RIG1	0.4 ч ⁻¹	[14]

Таблица 1. Окончание

Параметр	Описание	Значение ^а	Ссылки
k_{IRF3}	Константа скорости активации белка IRF3	(0.01, 0.02) 0.015 нМ ч ⁻¹	[14]
d_{IRF3}	Константа скорости деградации белка IRF3	(0.001, 0.002) 0.0015 ч ⁻¹	[65]
$k_{\text{NFκB}}$	Константа скорости активации белка NF-κB	(0.01, 0.02) 0.0134 нМ ч ⁻¹	[53–55]
$d_{\text{NFκB}}$	Константа скорости деградации белка NF-κB	0.00026 ч ⁻¹	[53–55]
k_{IFN_i}	Константа скорости синтеза внутриклеточного ИФН	1.79 пг мл ⁻¹ нМ ⁻¹ ч ⁻¹	[14]
d_{IFN_i}	Константа скорости деградации внутриклеточного ИФН	0.08 ч ⁻¹	[14]
d_{IFN_e}	Константа скорости деградации внеклеточного ИФН	0.15 ч ⁻¹	[14]
k_{IFN_e}	Константа скорости выхода ИФН из клетки	0.13 ч ⁻¹	[14]
k_{STAT}	Константа скорости синтеза комплекса STAT12	0.01 нМ мл пг ⁻¹ ч ⁻¹	[14]
d_{STAT}	Константа скорости деградации комплекса STAT12	(0.0001, 0.0003) 0.0002 ч ⁻¹	[55]
k_{ISG}	Константа скорости активации трансляции белков, кодируемых ISGs	0.1 нМ ⁻¹ ч ⁻¹	[14]
d_{APO}	Константа скорости деактивации белка APOBEC3	0.087 ч ⁻¹	[46]
d_{SAM}	Константа скорости деактивации белка SAMHD1	0.16 ч ⁻¹	[66]
d_{Teth}	Константа скорости деактивации белка Tetherin	(0.03, 0.08) 0.044 ч ⁻¹	[67]
f_{Vif}	Константа скорости деактивации белка APOBEC3 белком Vif	0.000007 ч ⁻¹	[46]
f_{Vpx}	Константа скорости деактивации белка SAMHD1 белком Vpx	0.000007 ч ⁻¹	[68]
f_{Vpu}	Константа скорости деактивации белка Tetherin белком Vpu	0.000007 ч ⁻¹	[67]

^аВ скобках указан диапазон значений параметра.
^бИспользованы данные с сайта <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAPI/landmark.html> на 28.02.2020.

Связывание вириона с CD4⁺ Т-клеткой моделируется двумя уравнениями, описывающими скорости изменения числа свободных и связанных с рецепторами вирионов:

$$\frac{d[V_{\text{free}}]}{dt} = -k_{\text{bind}} [V_{\text{free}}] - d[V_{\text{free}}], \tag{1}$$

$$\frac{d[V_{\text{bound}}]}{dt} = k_{\text{bind}} [V_{\text{free}}] - (k_{\text{fuse}} + d_{\text{bound}})[V_{\text{bound}}], \tag{2}$$

где V_{free} — число свободных вирусных частиц вне клетки, V_{bound} — число вирионов, связанных с рецептором CD4 и корецептором.

Обратная транскрипция

После слияния мембран вирион проникает внутрь клетки, где происходит разделение нуклеокапсида и высвобождение вирусной РНК, которая представлена двумя копиями плюс-цепей, в цитоплазму клетки. Под действием вирусного белка — обратной транскриптазы — на каждой це-

пи вирусной РНК синтезируется комплементарная ей цепь ДНК (минус-цепь), а затем уже на этой цепи комплементарная ей плюс-цепь ДНК. В результате образуется двухцепочечная вирусная ДНК. Успешному протеканию обратной транскрипции препятствуют клеточные белки APOBEC3 и SAMHD1. Обратная транскрипция моделируется как обобщенная реакция для трех процессов:

- 1) синтез минус-цепи ДНК на вирусной РНК,
- 2) синтез плюс-цепи ДНК,
- 3) образование двухцепочечной ДНК.

Эти процессы можно представить следующими уравнениями:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{RNA}_{\text{cor}}]}{dt} = & k_{\text{fuse}} [V_{\text{bound}}] - \\ & - \left(k_{\text{RT}} + d_{\text{RNA}_{\text{cor}}} \right) \times \\ & \times [\text{RNA}_{\text{cor}}] - f_{\text{APO}} [\text{RNA}_{\text{cor}}][\text{APOBEC3}] - \\ & - f_{\text{SAM}} [\text{RNA}_{\text{cor}}][\text{SAMHD1}], \end{aligned} \tag{3}$$

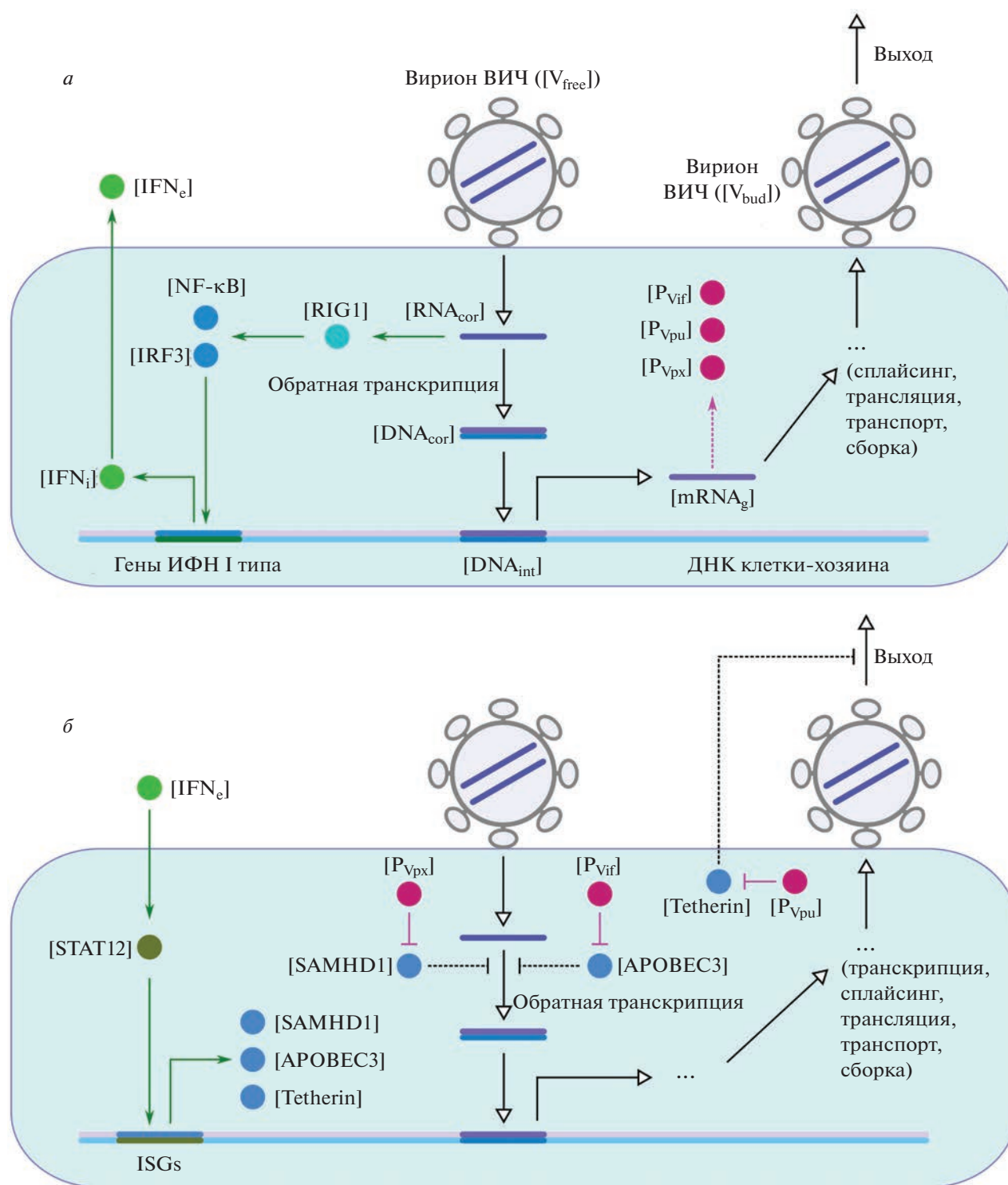


Рис. 1. Обобщенная схема основных процессов внутриклеточного онтогенеза ВИЧ и реакции системы ИФН, представленные в модели. *а* – Репликация вируса (—>), синтез вспомогательных вирусных белков (--->), распознавание вируса, приводящее к секреции ИФН (—>); *б* – сигнальный путь ИФН, приводящий к образованию белков, блокирующих стадии вирусной репликации (—>), блокирование вспомогательными вирусными белками этих факторов (—). Серым цветом обозначены следующие стадии процесса репликации вируса: транскрипция вирусных мРНК, сплайсинг, трансляция белков, транспорт к мембране, сборка вирусных частиц; подробные схемы этих процессов представлены в работе [8].

$$\frac{d[\text{DNA}_{\text{cor}}]}{dt} = k_{\text{RT}} [\text{RNA}_{\text{cor}}] - (k_{\text{DNA}_i} + d_{\text{DNA}_{\text{cor}}}) [\text{DNA}_{\text{cor}}], \quad (4)$$

где RNA_{cor} — число молекул геномной РНК в цитоплазме, DNA_{cor} — число молекул вирусной ДНК, синтезированных в процессе обратной транскрипции.

Интеграция вирусной ДНК в геном

После завершения фазы обратной транскрипции в CD4^+ Т-клетке синтезированную вирусную ДНК связывает вирусный фермент интегразы, который вместе с другими белками формирует преинтеграционный комплекс для транспортировки вирусной ДНК в ядро клетки. Под действием интегразы ДНК встраивается в геном. Процесс встраивания вирусной ДНК в хромосомную ДНК клетки-хозяина назван интеграцией, а вирусная ДНК, встроившаяся в геном клетки, — провирусом [8].

$$\frac{d[\text{DNA}_{\text{nuc}}]}{dt} = k_{\text{DNA}_i} [\text{DNA}_{\text{cor}}] - (k_{\text{int}} + d_{\text{DNA}_{\text{nuc}}}) [\text{DNA}_{\text{nuc}}], \quad (5)$$

$$\frac{d[\text{DNA}_{\text{int}}]}{dt} = k_{\text{int}} [\text{DNA}_{\text{nuc}}] - d_{\text{DNA}_{\text{int}}} [\text{DNA}_{\text{int}}]. \quad (6)$$

Здесь DNA_{nuc} — число молекул вирусной ДНК в ядре, DNA_{int} — число молекул вирусной ДНК, интегрированных в геном клетки.

Транскрипция

Транскрипция вирусной РНК с интегрированной в геном хозяина провирусной ДНК начинается, когда клетка-хозяин получает сигнал активации. В ядре идет синтез трех типов вирусной мРНК: полноразмерной mRNA_g (~9 т.н.), однократно сплайсированной mRNA_{ss} (~4 т.н.) и двукратно сплайсированной mRNA_{ds} (~2 т.н.) [9]. После транскрипции все эти мРНК транспортируются в цитоплазму: полноразмерная mRNA_{C_g} , однократно сплайсированная $\text{mRNA}_{C_{ss}}$, двукратно сплайсированная $\text{mRNA}_{C_{ds}}$. Существует временная регуляция транскрипции и экспорта в цитоплазму вирусных мРНК с помощью вирусных белков Tat и Rev.

$$\frac{d[\text{mRNA}_g]}{dt} = TR[\text{DNA}_{\text{int}}] - (k_{e\text{RNA}_g} f_{\text{Rev}} + k_{ss\text{RNA}_g} (1 - \beta f_{\text{Rev}}) + d_{\text{RNA}_g}) \times [\text{mRNA}_g], \quad (7)$$

$$\frac{d[\text{mRNA}_{ss}]}{dt} = (1 - \beta f_{\text{Rev}}) k_{ss\text{RNA}_g} [\text{mRNA}_g] - (k_{e\text{RNA}_{ss}} f_{\text{Rev}} + d_{\text{RNA}_{ss}} + k_{ds\text{RNA}_{ss}} (1 - \beta f_{\text{Rev}})) \times [\text{mRNA}_{ss}], \quad (8)$$

$$\frac{d[\text{mRNA}_{ds}]}{dt} = k_{ds\text{RNA}_{ss}} (1 - \beta f_{\text{Rev}}) [\text{mRNA}_{ss}] - (k_{e\text{RNA}_{ds}} + d_{\text{RNA}_{ds}}) [\text{mRNA}_{ds}], \quad (9)$$

$$\frac{d[\text{mRNA}_{C_g}]}{dt} = f_{\text{Rev}} k_{e\text{RNA}_g} [\text{mRNA}_g] - (d_{\text{RNA}_g} + k_{tp,\text{RNA}}) [\text{mRNA}_{C_g}], \quad (10)$$

$$\frac{d[\text{mRNA}_{C_{ss}}]}{dt} = f_{\text{Rev}} k_{e\text{RNA}_{ss}} [\text{mRNA}_{ss}] - d_{\text{RNA}_{ss}} [\text{mRNA}_{C_{ss}}], \quad (11)$$

$$\frac{d[\text{mRNA}_{C_{ds}}]}{dt} = k_{e\text{RNA}_{ds}} [\text{mRNA}_{ds}] - d_{\text{RNA}_{ds}} [\text{mRNA}_{C_{ds}}]. \quad (12)$$

Функция скорости транскрипции, обозначенная TR (ч^{-1}), представлена в виде:

$$TR = TR_{\text{cell}} + TR_{\text{Tat}} f_{\text{Tat}},$$

зависимости f_{Tat} и f_{Rev} описываются уравнениями Михаэлиса–Ментен [8, 33, 48, 50]:

$$f_{\text{Tat}} = \frac{[\text{P}_{\text{Tat}}]}{\theta_{\text{Tat}} + [\text{P}_{\text{Tat}}]}, \quad f_{\text{Rev}} = \frac{[\text{P}_{\text{Rev}}]}{\theta_{\text{Rev}} + [\text{P}_{\text{Rev}}]}.$$

Трансляция вирусных белков

Вирусные мРНК кодируют как белки, входящие в состав вириона и необходимые для его сборки: Tat, Rev, белки-предшественники Gag-Pol, Gag, Env (gp160), — так и вспомогательные белки ВИЧ: Vpr, Vpx, Vif, — противодействующие ответу системы ИФН.

$$\frac{d[\text{P}_{\text{Tat}}]}{dt} = k_{\text{trans}} f_{ds,\text{Tat}} [\text{mRNA}_{C_{ds}}] - d_{\text{Tat}} [\text{P}_{\text{Tat}}], \quad (13)$$

$$\frac{d[\text{P}_{\text{Rev}}]}{dt} = k_{\text{trans}} f_{ds,\text{Rev}} [\text{mRNA}_{C_{ds}}] - d_{\text{Rev}} [\text{P}_{\text{Rev}}], \quad (14)$$

$$\frac{d[\text{P}_{\text{GagPol}}]}{dt} = k_{\text{trans}} f_{g,\text{GagPol}} [\text{mRNA}_{C_g}] - (d_{\text{GagPol}} + k_{tp,\text{GagPol}}) [\text{P}_{\text{GagPol}}], \quad (15)$$

$$\frac{d[\text{P}_{\text{Gag}}]}{dt} = k_{\text{trans}} f_{g,\text{Gag}} [\text{mRNA}_{C_g}] - (d_{\text{Gag}} + k_{tp,\text{Gag}}) [\text{P}_{\text{Gag}}], \quad (16)$$

$$\frac{d[P_{gp160}]}{dt} = k_{trans} f_{ss, gp160} [mRNA_{C_{ss}}] - (d_{gp160} + k_{tp, gp160}) [P_{gp160}], \quad (17)$$

$$\frac{d[P_{Vpu}]}{dt} = k_{trans} f_{ss, Vpu} [mRNA_{C_{ss}}] - (d_{Vpu} + k_{tp, Vpu}) [P_{Vpu}], \quad (18)$$

$$\frac{d[P_{Vpx}]}{dt} = k_{trans} f_{ss, Vpx} [mRNA_{C_{ss}}] - d_{Vpx} [P_{Vpx}], \quad (19)$$

$$\frac{d[P_{Vif}]}{dt} = k_{trans} f_{ss, Vif} [mRNA_{C_{ss}}] - d_{Vif} [P_{Vif}]. \quad (20)$$

Здесь: P_j — число молекул белка j в цитоплазме, $j = \{Tat, Rev, Gag-Pol, Gag, gp160, Vpu, Vpx, Vif\}$.

Сборка и созревание вирусных частиц

На поздней фазе цикла репликации ВИЧ белки-предшественники Gag-Pol, Gag, Env (gp160) и молекулы вирусной РНК перемещаются к мембране.

$$\begin{aligned} \frac{d[P_{mem, GagPol}]}{dt} &= k_{tp, GagPol} [P_{GagPol}] - \\ &- d_{mem, GagPol} [P_{mem, GagPol}] - \\ &- k_{comb} N_{GagPol} [RNA_{mem}] \prod_{j=1}^3 [P_{mem, j}], \end{aligned} \quad (21)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[P_{mem, Gag}]}{dt} &= k_{tp, Gag} [P_{Gag}] - d_{mem, Gag} [P_{mem, Gag}] - \\ &- k_{comb} N_{Gag} [RNA_{mem}] \prod_{j=1}^3 [P_{mem, j}], \end{aligned} \quad (22)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[P_{mem, gp160}]}{dt} &= k_{tp, gp160} [P_{gp160}] - \\ &- d_{mem, gp160} [P_{mem, gp160}] - k_{comb} N_{gp160} [RNA_{mem}] \times \\ &\times \prod_{j=1}^3 [P_{mem, j}], \end{aligned} \quad (23)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[RNA_{mem}]}{dt} &= k_{tp, RNA} [mRNA_{C_g}] - \\ &- d_{RNA_g} [RNA_{mem}] - \\ &- k_{comb} N_{RNA} [RNA_{mem}] \prod_{j=1}^3 [P_{mem, j}]. \end{aligned} \quad (24)$$

Здесь

$$\prod_{j=1}^3 [P_{mem, j}] = [P_{mem, GagPol}] [P_{mem, Gag}] [P_{mem, gp160}],$$

где $P_{mem, j}$ — число молекул белка j на мембране, $j = \{Gag-Pol, Gag, gp160\}$; RNA_{mem} — число молекул полноразмерной РНК на мембране.

На мембране происходит сборка и образование превирального комплекса (V_{vion}), который затем от нее отпочковывается (V_{bud}). Первоначально незрелый отпочковавшийся вирион впоследствии созревает (V_{mat}) и выходит из клетки — уже как инфекционная вирусная частица. Процессу выхода препятствует ИФН-стимулированный белок Tetherin. Вспомогательный вирусный белок Vpu транспортируется к мембране для захвата молекул белка Tetherin.

$$\begin{aligned} \frac{d[V_{vion}]}{dt} &= k_{comb} [RNA_{mem}] \prod_{j=1}^3 [P_{mem, j}] - \\ &- (k_{bud} + d_{comb}) [V_{vion}], \end{aligned} \quad (25)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[V_{bud}]}{dt} &= k_{bud} [V_{vion}] - (k_{mat} + d_{bud}) [V_{bud}] - \\ &- f_{Teth} [V_{bud}] [Tetherin], \end{aligned} \quad (26)$$

$$\frac{d[V_{mat}]}{dt} = k_{mat} [V_{bud}] - d[V_{mat}], \quad (27)$$

$$\frac{d[P_{mem, Vpu}]}{dt} = k_{tp, Vpu} [P_{Vpu}] - d_{Vpu} [P_{mem, Vpu}], \quad (28)$$

где $P_{mem, Vpu}$ — число молекул белка Vpu на мембране.

Активация синтеза интерферона в клетке

В распознавании вирусной РНК в клетке участвуют белки RIG1, NF-κB и IRF3, индуцирующие транскрипцию генов, экспрессия которых приводит к синтезу внутриклеточного ИФН.

$$\frac{d[RIG1]}{dt} = k_{RIG1} [RNA_{cor}] - d_{RIG1} [RIG1], \quad (29)$$

$$\frac{d[NF-\kappa B]}{dt} = k_{NF\kappa B} [RIG1] - d_{NF\kappa B} [NF-\kappa B], \quad (30)$$

$$\frac{d[IRF3]}{dt} = k_{IRF3} [RIG1] - d_{IRF3} [IRF3], \quad (31)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[IFN_i]}{dt} &= k_{IFN_i} ([IRF3] + [NF-\kappa B]) - \\ &- d_{IFN_i} [IFN_i] - k_{IFN_e} [IFN_i], \end{aligned} \quad (32)$$

где IFN_i — концентрация внутриклеточного ИФН (пг мл⁻¹).

Синтез ИФН-стимулированных белков

Синтезированный ИФН выходит из клетки и связывается с соответствующим рецептором IFNAR на мембране других клеток, активируя димеризацию белков STAT1 и STAT2 с образова-

Таблица 2. Параметры, к которым функционал J наиболее чувствителен

Параметр	(–)	Параметр	(+)
k_{ISG}	234.7	TR_{Tat}	299.8
k_{STAT}	234.3	k_{RT}	260.2
$N_{\text{Gag}}k_{\text{comb}}$	200.3	$f_{\text{g,Gag}}k_{\text{trans}}$	200.6
k_{tpRNA}	188.2	k_{comb}	200.3
f_{SAM}	119.0	k_{fuse}	152.9
f_{Teth}	88.6	k_{DNA_i}	144.0
d	73.7	k_{int}	108.6
d_{Vpu}	54.5	k_{mat}	106.6
d_{DNAcor}	41.9	k_{bind}	81.0
d_{comb}	40.3	d_{IFN_e}	80.6
Θ_{Rev}	33.5	f_{Vpu}	63.9
d_{RNAss}	32.2	$f_{\text{ss,Vpu}}$	63.9

нием гомодимера $(\text{STAT1})_2$ или гетеродимера STAT1-STAT2 (в модели обозначен как STAT12). Эти димерные комплексы индуцируют активацию ISGs в ядре, в том числе кодирующих белки-супрессоры репликации ВИЧ: APOBEC3 , SAMHD1 , Tetherin . В уравнениях для APOBEC3 , SAMHD1 и Tetherin учтена убыль этих белков за счет их деактивации вспомогательными белками ВИЧ:

$$\frac{d[\text{IFN}_e]}{dt} = k_{\text{IFN}_e}[\text{IFN}_i] - d_{\text{IFN}_e}[\text{IFN}_e], \quad (33)$$

$$\frac{d[\text{STAT12}]}{dt} = k_{\text{STAT}}[\text{IFN}_e] - d_{\text{STAT}}[\text{STAT12}], \quad (34)$$

$$\frac{d[\text{APOBEC3}]}{dt} = k_{\text{ISG}}[\text{STAT12}] - (d_{\text{APO}} + f_{\text{Vif}}[\text{P}_{\text{Vif}}])[\text{APOBEC3}], \quad (35)$$

$$\frac{d[\text{SAMHD1}]}{dt} = k_{\text{ISG}}[\text{STAT12}] - (d_{\text{SAM}} + f_{\text{Vpx}}[\text{P}_{\text{Vpx}}])[\text{SAMHD1}], \quad (36)$$

$$\frac{d[\text{Tetherin}]}{dt} = k_{\text{ISG}}[\text{STAT12}] - (d_{\text{Teth}} + f_{\text{Vpu}}[\text{P}_{\text{mem,Vpu}}])[\text{Tetherin}] \quad (37)$$

Здесь IFN_e – концентрация ИФН вне клетки (пг мл^{-1}).

Анализ чувствительности модели

Параметры модели, представленные в табл. 1, основаны на литературных данных [14, 22, 24–68]

и оценены на основе различных экспериментальных систем. Часть параметров по внутриклеточной репликации ВИЧ прокалибрована в работе [8]. Численные значения скоростей образования и деградации некоторых белков, а также коэффициентов воздействия одних белков на другие неизвестны. В данной работе мы оценивали значения соответствующих параметров, исходя из имеющихся данных по их влиянию на ингибируемые ими белки. Параметры f_{APO} , f_{SAM} , f_{Teth} , отвечающие за ингибирование стадий репликации ВИЧ соответствующими ИФН-стимулируемыми белками (APOBEC3 , SAMHD1 , Tetherin), определены путем согласования динамики переменных модели и экспериментальных данных [22, 47, 69]. Так, в результате взаимодействия ИФН-стимулированных и вспомогательных белков количество вирусной ДНК, полученной в результате обратной транскрипции, падает в среднем на 50% при наличии APOBEC3 [69] и еще на 50% при наличии SAMHD1 [47], белок Tetherin сокращает выход вирионов на 40% [22].

Таким образом, параметры модели можно варьировать в определенных диапазонах, что связано с недостатком экспериментальных данных, однако использованные нами оценки позволяют успешно описать кинетику рассматриваемых процессов. Появление новых количественных данных о внутриклеточных процессах реакции системы ИФН при ВИЧ-инфекции позволит уточнить соответствующие параметры модели и интервалы их физиологической изменчивости.

В табл. 2 приведены параметры модели (p_i), к вариации которых функционал $J(p) = \int_0^T V_{\text{mat}} dt$, равный площади под кривой числа вышедших из клетки частиц вируса на временном интервале $[0, T]$, имеет наибольшую чувствительность, и значения нормированных компонент вектора градиента функционала ($p_i \frac{\partial J}{\partial p_i}$). Параметры разделены на две группы: имеющие так называемый “отрицательный” эффект (при небольшом увеличении значения параметра значение функционала уменьшается) и “положительный” эффект (при увеличении значения параметра функционал увеличивается).

Анализ чувствительности модели к малым возмущениям параметров позволил определить наиболее значимые для репликации ВИЧ четыре стадии ответной реакции системы ИФН, которые могут быть потенциальными мишенями для противовирусных препаратов.

1. Активация димеризации белков STAT1 и STAT2 с образованием гомодимера $(\text{STAT1})_2$ или гетеродимера STAT1-STAT2 и последующая активация синтеза ИФН-стимулированных белков

(k_{STAT} — константа скорости синтеза гетеродимера STAT12).

2. Активация синтеза ИФН-стимулированных белков (k_{ISG} — константа скорости активации трансляции белков, кодируемых ISGs).

3. Противодействие белка SAMHD1 процессу обратной транскрипции (f_{SAM} — константа скорости подавления синтеза ДНК белком SAMHD1).

4. Ингибирование выхода созревших вирионов во внеклеточное пространство белком Tetherin (f_{Teth} — константа скорости захвата вирионов белком Tetherin).

Анализ чувствительности модели выполнен с помощью метода сопряженных уравнений [70, 71]; программная реализация метода сопряженных уравнений — на языке Python.

ЧИСЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Расчеты на модели (1)–(37) произведены для значений параметров модели, приведенных в табл. 1, при нулевом векторе начальных данных, кроме двух его компонент: числа свободных вирусных частиц: $V_{\text{free}}(0) = 4$ (частицы) — и внеклеточного ИФН: $\text{IFN}_e(0) = 100$ (пг/мл). На рис. S1a–e и рис. S2a–g (см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/4/suppr_Gainova_rus.pdf) приведены графики процессов в инфицированной клетке. Наиболее детальные экспериментальные данные по всему жизненному циклу ВИЧ приведены в работе [40]. Кинетические кривые (рис. S1 и S2), отражающие основные стадии репликации ВИЧ, соответствуют процессам, приведенным на рис. 1. Сравнение расчетов для различных концентраций внеклеточного ИФН: $\text{IFN}_e(0) = 0$ (пг/мл) и $\text{IFN}_e(0) = 100$ (пг/мл), — показало (рис. S2d), что при нулевой начальной концентрации внеклеточного ИФН суммарное число вышедших из клетки вирусных частиц увеличивается почти на порядок, а уменьшение начальной концентрации в два раза: $\text{IFN}_e(0) = 50$ (пг/мл) — увеличивает это число примерно в 1.5 раза. Аналогично, сравнивая суммарное количество произведенного внутриклеточного ИФН для различных концентраций: $\text{IFN}_e(0) = 0, 50, 100$ (пг/мл) (рис. S2e), — заключаем, что это количество уменьшается в 4 раза при $\text{IFN}_e(0) = 100$ (пг/мл) по сравнению с результатами, полученными при нулевой начальной концентрации внеклеточного ИФН.

На рис. S3 и S4 (см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/4/suppr_Gainova_rus.pdf) проанализировано суммарное количество произведенного внутриклеточного ИФН и суммарное число вышедших из клетки вирусов при варьировании параметров модели ($d, d_{\text{comb}}, d_{\text{DNAcor}}, k_{\text{int}}, k_{\text{fuse}}, k_{\text{RT}}$)

для начальных данных: $V_{\text{free}}(0) = 4$ (частицы), $\text{IFN}_e(0) = 0$ (пг/мл).

На рис. S3a, б представлены графики для трех различных значений параметра d , где d — скорость деградации свободных вирионов, $d = 0.9, 1.5, 0.38$ (ч^{-1}) (последнее значение, d_{tab} , — табличное, см. табл. 1). Показано, что суммарное число вышедших из клетки вирусов при $d = 0.9$ (ч^{-1}) почти в два раза меньше, чем при $d = d_{\text{tab}}$, и в 7 раз меньше при $d = 1.5$ (ч^{-1}), чем при $d = d_{\text{tab}}$. При варьировании параметра d_{comb} (скорость деградации вириона) суммарное число вышедших из клетки вирусов меняется незначительно (рис. S3в), а графики суммарного количества произведенного внутриклеточного ИФН (рис. S3г) при всех трех значениях этого параметра: $d_{\text{comb}} = 0.33, 1.25, 0.52$ (ч^{-1}) (последнее значение — из табл. 1) — совпадают. На рис. S3д, S3е представлены графики при изменении параметра d_{DNAcor} , где d_{DNAcor} — величина, обратная времени жизни провирусной ДНК в цитоплазме; $d_{\text{DNAcor}} = 0.016, 0.2, 0.03$ (ч^{-1}) (последнее значение — из табл. 1). Показано, что увеличение значения параметра d_{DNAcor} до 0.2 (ч^{-1}) по сравнению с табличным уменьшает суммарное число вышедших из клетки вирусов почти в два раза.

Графики расчетов при варьировании параметров: k_{int} (скорость интеграции), k_{fuse} (скорость слияния вириона с клеткой), k_{RT} (скорость обратной транскрипции) — представлены на рис. S4. Здесь можно отметить графики S4б и S4д (см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/4/suppr_Gainova_rus.pdf). На рис. S4б показано, что суммарное число вышедших из клетки вирусов при $k_{\text{int}} = 10$ в 2.5 раза больше, чем при $k_{\text{int}} = 0.07$. На рис. S4д показано существенное влияние изменения скорости обратной транскрипции на суммарное количество произведенного внутриклеточного ИФН: при $k_{\text{RT}} = 1.02$ (ч^{-1}) это количество в два раза меньше, чем при табличном значении $k_{\text{RT}} = 0.43$ (ч^{-1}).

Расчеты выполнены с помощью пакета программ STEP [72], разработанного в Институте математики им. С.Л. Соболева СО РАН (г. Новосибирск).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследований, посвященных моделированию реакции системы ИФН внутри клеток достаточно мало [73, 74]. В данной работе нами впервые построена и прокалибрована высокоразмерная модель, интегрирующая процессы репликации ВИЧ в клетке, индукцию реакции ИФН внутриклеточной системы врожденного иммунитета и противодействие ей со стороны вирусных белков. По-

строенная модель позволяет изучить в деталях взаимодействие системы ИФН и противодействующих ей вирусных механизмов и найти в этой “запутанной” сети чувствительные стадии для использования в качестве терапевтических мишеней [75–77]. Например, анализ чувствительности позволяет заключить, что ингибирование выхода созревших вирионов ВИЧ белком Tetherin — одно из наиболее значимых воздействий на продукцию инфекционных вирусов. Скорость захвата вирусных белков (f_{Teth}) оказывает существенный “отрицательный” эффект на созревание вирионов, тогда как скорость захвата белка Tetherin белком Vpu (f_{Vpu}) входит в список параметров с наибольшим “положительным” эффектом для вируса. Не исключено, что блокирование функций вирусного белка Vpu можно рассматривать как потенциальную мишень в таргетной терапии ВИЧ.

Следует отметить, что все построенные модели учитывают исключительно противовирусный эффект системы ИФН. Вместе с тем, в исследованиях хронических вирусных инфекций установлена роль ИФН в развитии воспалительных реакций иммунной системы и негативной регуляции активности клеток врожденного и адаптивного иммунитета, что приводит к ослаблению иммунных реакций [78–80]. Эта двоякая роль ИФН свидетельствует о нелинейности и плейотропии регуляторных процессов, индуцируемых этими цитокинами на длительных временных промежутках, что связано с активацией большого числа ISGs. Таким образом, необходимо дальнейшее развитие моделей для описания регуляторных механизмов влияния ИФН на клетки при вирусных инфекциях, характеризующихся длительной персистенцией.

Разработка новых мультимодальных подходов, сочетающих антиретровирусную и иммуномодулирующую терапию с участием ИФН, к лечению хронических инфекций, вызванных ВИЧ (более 1 млн инфицированных в Российской Федерации), требует познания сложнейших механизмов, определяющих специфическую модальность действия ИФН. Полученные в нашей работе результаты — еще один шаг на пути познания этих механизмов, что позволит выделить в качестве перспективных мишеней для воздействия наиболее значимые контуры в многоуровневых сетях регуляции в иммунной системе [75, 81].

Авторы благодарны рецензентам и редакторам за важные замечания и исправления в процессе работы над статьей.

Работа выполнена в рамках Государственного задания (проект FWNF-2022-0015; И.А. Гайнова) и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-01-00352; А.Е. Соболева, Д.С. Гребенников, Г.А. Боcharов).

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. Zinkernagel R.M., Hengartner H. (2004) On immunity against infections and vaccines: credo 2004. *Scand J. Immunol.* **60**(1–2), 9–13.
Erratum in: *Scand J. Immunol.* **60**(3), 327.
<https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01460.x>
2. Hardy G., Sieg S., Rodriguez B., Anthony D., Asaad R., Jiang W., Mudd J., Schacker T., Funderburg N., Pilch-Cooper H., Debernardo R., Rabin R., Lederman M., Harding C. (2013) Interferon- α is the primary plasma type-I IFN in HIV-1 infection and correlates with immune activation and disease markers. *PLoS One.* **8**, e56527.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056527>
3. Sandler N.G., Bosinger S.E., Estes J.D., Zhu R., Tharp G.K., Boritz E., Levin D., Wijeyesinghe S., Makamdop K., del Prete G., Hill B., Timmer J.K., Reiss E., Yarden G., Darko S., Contijoch E., Todd J.P., Silvestri G., Nason M., Norgren Jr. R., Keele B., Rao S., Langer J., Lifson J., Schreiber G., Douek D. (2014) Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature.* **511**, 601–605.
<https://doi.org/10.1038/nature13554>
4. Doyle T., Goujon C., Malim M.H. (2015) HIV and interferons: who's interfering with whom? *Nat. Rev.* **13**, 403–413.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3449>
5. Browne E.P., Letham B., Rudin C. (2016) A computational model of inhibition of HIV-1 by interferon- α . *PLoS One.* **11**(3), e0152316.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152316>
6. Lavigne G.M., Russell H., Sherry B., Ke R. (2021) Autocrine and paracrine interferon signalling as ‘ring vaccination’ and ‘contact tracing’ strategies to suppress virus infection in a host. *Proc. R. Soc. B.* **288**(1945), 20203002.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2020.3002>
7. Iwasaki A. (2012) A virological view of innate immune recognition. *Annu. Rev. Microbiol.* **66**, 177–196.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150203>
8. Shcherbatova O., Grebennikov D., Sazonov I., Meyershans A., Bocharov G. (2020) Modeling of the HIV-1 life cycle in productively infected cells to predict novel therapeutic targets. *Pathogens.* **9**(4), 255.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9040255>
9. Черешнев В.А., Бажан С.И., Бахметьев Б.А., Гайнова И.А., Боcharов Г.А. (2012) Системный анализ патогенеза ВИЧ инфекции. *Успехи современной биологии.* **132**(2), 115–140.
10. Chereshevnev V.A., Bocharov G., Bazhan S., Bachmetev B., Gainova I., Likhoshvai V., Argilaguet J.M., Martinez J.P., Rump J.A., Mothe B., Brander C., Meyershans A. (2013) Pathogenesis and treatment of HIV infection: the cellular, the immune system and the neuroendocrine systems perspective. *Int. Rev. Immunol.*

- 32(3), 282–306.
<https://doi.org/10.3109/08830185.2013.779375>
11. Li G., Clercq E.De. (2016) HIV genome-wide protein associations: a review of 30 years of research. *ASM J. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**(3), 679–731.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00065-15>
12. Черешнев В.А., Бочаров Г.А., Ким А.В., Бажан С.И., Гайнова И.А., Красовский А.Н., Шмагель Н.Г., Иванов А.В., Сафронов М.А., Третьякова Р.М. (2016) Введение в задачи моделирования и управления динамикой ВИЧ-инфекции. Москва–Ижевск, Институт компьютерных исследований. 230 с.
13. Neil S., Bieniasz P. (2009) Human immunodeficiency virus, restriction factors, and interferon. *J. Interferon Cytokine Res.* **29**(9), 569–580.
<https://doi.org/10.1089/jir.2009.0077>
14. Rinas M. (2016) Data-driven modeling of the dynamic competition between virus infection and the antiviral interferon response. *Dissertation for the degree of Doctor of Natural Sciences*. Combined Faculty for the Natural Sciences and Mathematics of the University of Heidelberg, Germany. http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/18987/1/Thesis_Melanie_Rinas.pdf.
15. Marsili G., Remoli A.L., Sgarbanti M., Perrotti E., Fragale A., Battistini A. (2012) HIV-1, interferon and the interferon regulatory factor system: an interplay between induction, antiviral responses and viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev.* **23**, 255–270.
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.06.001>
16. Colomer-Lluch M., Ruiz A., Moris A., Prado J.G. (2018) Restriction factors: from intrinsic viral restriction to shaping cellular immunity against HIV-1. *Front. Immunol.* **9**, 2876.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02876>
17. Зотова А.А., Атемасова А.А., Филатов А.В., Мазуров Д.В. (2019) Факторы рестрикции вируса иммунодефицита человека и их неоднозначная роль в инфекции. *Молекуляр. биология.* **53**(2), 240–255.
18. Chintala K., Mohareer K., Banerjee S. (2021) Dodging the host interferon-stimulated gene mediated innate immunity by HIV-1: a brief update on intrinsic mechanisms and counter-mechanisms. *Front. Immunol.* **12**, 716927.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.716927>
19. Gillick K., Pollpeter D., Phalora P., Kim E.-Y., Wolinsky S.M., Malim M.H. (2013) Suppression of HIV-1 infection by APOBEC3 proteins in primary human CD4⁺ T cells is associated with inhibition of processive reverse transcription as well as excessive cytidine deamination. *J. Virol.* **87**(3), 1508–1517.
<https://doi.org/10.1128/JVI.02587-12>
20. Goldstone D.C., Ennis-Adeniran V., Hedden J.J., Groom H.C.T., Rice G.I., Christodoulou E., Walker P.A., Kelly G., Haire L.F., Yap M.W., de Carvalho L.P.S., Stoye J.P., Crow Y.J., Taylor I.A., Webb M. (2011) HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature.* **480**(7377), 379–382.
<https://doi.org/10.1038/nature10623>
21. Descours B., Cribier A., Chable-Bessia C., Ayinde D., Rice G., Crow Y., Yatim A., Schwartz O., Laguette N., Benkirane M. (2012) SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4⁺ T-cells. *Retrovirology.* **9**(1), 87.
<https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-87>
22. Casartelli N., Sourisseau M., Feldmann J., Guivel-Benhassine F., Mallet A., Marcelin A.-G., Guatelli J., Schwartz O. (2010) Tetherin restricts productive HIV-1 cell-to-cell transmission. *PLoS Pathog.* **6**(6), e1000955.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000955>
23. Strebel K. (2013) HIV accessory proteins versus host restriction factors. *Curr. Opin. Virol.* **3**(6), 692–699.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.08.004>
24. Doranz B.J., Baik S.S.W., Doms R.W. (1999) Use of a gp120 binding assay to dissect the requirements and kinetics of human immunodeficiency virus fusion events. *J. Virol.* **73**, 10346–10358.
25. Doms R.W., Moore J.P. (2000) HIV-1 membrane fusion. *J. Cell Biol.* **151**, F9–F14.
26. Gallo S.A., Finnegan C.M., Viard M., Raviv Y., Dimitrov A., Rawat S.S., Puri A., Durell S., Blumenthal R. (2003) The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim. Biophys. Acta.* **1614**, 36–50.
27. Bocharov G., Chereshev V., Gainova I., Bazhan S., Bachmetyev B., Argilaguet J., Martinez J., Meyerhans A. (2012) Human immunodeficiency virus infection: from biological observations to mechanistic mathematical modelling. *Math. Model. Nat. Phenom.* **7**, 78–104.
28. Ramratnam B., Bonhoeffer S., Binley J., Hurley A., Zhang L., Mittler J.E., Markowitz M., Moore J.P., Perelson A.S., Ho D.D. (1999) Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis. *Lancet.* **354**, 1782–1785.
29. Finzi D., Siliciano R.F. (1998) Viral dynamics in HIV-1 infection. *Cell.* **93**, 665–671.
30. Heesters B.A., Lindqvist M., Vagefi P.A., Scully E.P., Schildberg F.A., Altfeld M., Walker B.D., Kaufmann D.E., Carroll M.C. (2015) Follicular dendritic cells retain infectious HIV in cycling endosomes. *PLoS Pathog.* **11**, 1–18.
31. Raviv Y., Viard M., Bess J., Jr., Blumenthal R. (2002) Quantitative measurement of fusion of HIV-1 and SIV with cultured cells using photosensitized labeling. *Virology.* **293**, 243–251.
32. Gallo S.A., Reeves J.D., Garg H., Foley B., Doms R.W., Blumenthal R. (2006) Kinetic studies of HIV-1 and HIV-2 envelope glycoprotein-mediated fusion. *Retrovirology.* **3**, 90.
<https://doi.org/10.1186/1742-4690-3-90>
33. Reddy B., Yin J. (1999) Quantitative intracellular kinetics of HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **15**, 273–283.
34. Zarrabi N., Mancini E., Tay J., Shahand S., Sloot P.M. (2010) Modeling HIV-1 intracellular replication: two simulation approaches. *Procedia Comput. Sci.* **1**, 555–564.
35. Hu W.S., Hughes S.H. (2012) HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**(10), a006882.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882>
36. Brussel A., Sonigo P. (2004) Evidence for gene expression by unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA species. *J. Virol.* **78**, 11263–11271.
37. Murray J.M., McBride K., Boesecke C., Bailey M., Amin J., Suzuki K., Baker D., Zaunders J.J., Emery S., Cooper D.A., Koelsch K.K., Kelleher A.D., PINT STUDY TEAM. (2012) Integrated HIV DNA accumulates prior to treatment while episomal HIV DNA records ongoing transmission afterwards. *AIDS.* **26**(5), 543–550.
38. Vandegraaff N., Kumar R., Burrell C.J., Li P. (2001) Kinetics of human immunodeficiency virus type 1

- (HIV) DNA integration in acutely infected cells as determined using a novel assay for detection of integrated HIV DNA. *J. Virol.* **75**, 11253–11260.
39. Barbosa P., Charneau P., Dumey N., Clavel F. (1994) Kinetic analysis of HIV-1 early replicative steps in a coculture system. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. **10**, 53–59.
 40. Mohammadi P., Desfarges S., Barha I., Joos B., Zanger N., Muñoz M., Günthard H.F., Beerenwinkel N., Telenti A., Ciuffi A. (2013) 24 hours in the life of HIV-1 in a T cell line. *PLoS Pathog.* **9**(1), e1003161. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003161>
 41. Andreadis S.T., Palsson B.O. (1996) Kinetics of retrovirus mediated gene transfer: the importance of intracellular half-life of Retroviruses. *J. Theor. Biol.*, **182**, 1–20.
 42. Pellegrino M.G., Li G., Potash M.J., Volsky D.J. (1991) Contribution of multiple rounds of viral entry and reverse transcription to expression of human immunodeficiency virus type 1. A quantitative kinetic study. *J. Biol. Chem.* **266**, 1783–1788.
 43. Butler S.L., Hansen M.S., Bushman F.D. (2001) A quantitative assay for HIV DNA integration *in vivo*. *Nat. Med.* **7**, 631–634.
 44. Kustikova O.S., Wahlers A., Kuhlcke K., Stahle B., Zander A.R., Baum C., Fehse B. (2003) Dose finding with retroviral vectors: correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. *Blood*. **102**, 3934–3937.
 45. Siliciano J.D., Kajdas J., Finzi D., Quinn T.C., Chadwick K., Margolick J.B., Kovacs C., Gange S.J., Siliciano R. (2003) Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4⁺ T cells. *Nat. Med.* **9**, 727–728.
 46. Hultquist J.F., Harris R.S. (2009) Leveraging APOBEC3 proteins to alter the HIV mutation rate and combat AIDS. *Future Virol.* **4**(6), 605. <https://doi.org/10.2217/fvl.09.59>
 47. Laguette N., Sobhian B., Casartelli N., Ringeard M., Chable-Bessia C., Ségéral E., Yatim A., Emiliani S., Schwartz O., Benkirane M. (2013) SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*. **474**, 654–657. <https://doi.org/10.1038/nature10117>
 48. Kim H., Yin J. (2005) Robust growth of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Biophys. J.* **89**, 2210–2221.
 49. Chen J., Grunwald D., Sardo L., Galli A., Plisov S., Nikolaitchik O.A., Chen D., Lockett S., Larson D.R., Pathak V.K., Hu W.-Sh. (2014) Cytoplasmic HIV-1 RNA is mainly transported by diffusion in the presence or absence of Gag protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**(48), E5205–E5213. <https://doi.org/10.1073/pnas.14131691>
 50. Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M., Bazhan S.I., Gainova I.A., Chereshnev V.A., Bocharov G.A. (2014) Mathematical model of the Tat-Rev regulation of HIV-1 replication in an activated cell predicts the existence of oscillatory dynamics in the synthesis of viral components. *BMC Genomics*. **15**(Suppl. 12), S1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-S12-S1>
 51. Müller B., Tessmerand U., Schubert U., Kräusslich H.-S. (2000) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than gag and is phosphorylated in infected cells. *J. Virol.* **74**(20), 9727–9731.
 52. Goila-Gaur R., Strebel K. (2008) HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity. *Retrovirology*. **5**, 51. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-51>
 53. Schwanhäusser B., Busse D., Li N., Dittmar G., Schuchhardt J., Wolf J., Chen W., Selbach M. (2011) Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. **473**, 337–342.
 54. Schwanhäusser B., Busse D., Li N., Dittmar G., Schuchhardt J., Wolf J., Chen W., Selbach M. (2013) Correction: Corrigendum: Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. **495**, 126–127.
 55. Buccitelli C., Selbach M. (2020) mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat. Rev. Genet.* **21**, 630–644.
 56. Qu N., Ma Z., Zhang M., Rushdi M.N., Krueger C.J., Chen A.K. (2018) Inhibition of retroviral Gag assembly by non-silencing miRNAs promotes autophagic viral degradation. *Protein Cell*. **9**, 640–651.
 57. Hare J.F., Taylor K. (1991) Mechanisms of plasma membrane protein degradation: recycling proteins are degraded more rapidly than those confined to the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 5902–5906.
 58. Inamdar K., Floderer C., Favard C., Muriaux D. (2019) Monitoring HIV-1 assembly in living cells: insights from dynamic and single molecule microscopy. *Viruses*. **11**(1), 72. <https://doi.org/10.3390/v11010072>
 59. Sundquist W.I., Krausslich H.G. (2012) HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**(7), a006924. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006924>
 60. Ivanchenko S., Godinez W.J., Lampe M., Kräusslich H.G., Eils R., Rohr K., Bräuchle C., Müller B., Lamb D.C. (2009) Dynamics of HIV-1 assembly and release. *PLoS Pathog.* **5**(11), e1000652. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000652>
 61. Freed E.O. (2015) HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**(8), 484–496. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3490>
 62. Swanson C.M., Malim M.H. (2008) SnapShot: HIV-1 proteins. *Cell*. **133**(4), 742. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.005>
 63. Chojnacki J., Staudt T., Glass B., Bingen P., Engelhardt J., Anders M., Schneider J., Müller B., Hell S.W., Krausslich H.G. (2012) Maturation-dependent HIV-1 surface protein redistribution revealed by fluorescence nanoscopy. *Science*. **338**, 524–528.
 64. Könnnyü B., Sadiq S.K., Turányi T., Hírmondó R., Müller B., Kräusslich H.G., Coveney P.V., Müller V. (2013) Gag-Pol processing during HIV-1 virion maturation: a systems biology approach. *PLoS Comput. Biol.* **9**(6), e1003103. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003103>
 65. Prakash A., Levy D.E. (2006) Regulation of IRF7 through cell type-specific protein stability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**(1), 50–56.
 66. Gelais C.S., Kim S.H., Ding L., Yount J.S., Ivanov D., Spearman P., Wu L. (2016) A putative cyclin-binding motif in human samhd1 contributes to protein phosphorylation, localization, and stability. *J. Biol. Chem.* **291**(51), 26332–26342.
 67. Dubé M., Bego M., Paquay C., Cohen E. (2010) Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. *Retrovirology*. **7**, 114. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-114>

68. Baldauf H.M., Pan X., Erikson E., Schmidt S., Dadacha W., Burggraf M., Schenkova K., Ambiel I., Wabnitz G., Gramberg T., Panitz S., Flory E., Landau N.R., Sertel S., Rutsch F., Lasitschka F., Kim B., König R., Fackler O.T., Keppler O.T. (2012) SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4⁺ T-cells. *Nat. Med.* **18**(11), 1682–1688.
69. Bishop K.N., Verma M., Kim E.-Y., Wolinsky S.M., Malim M.H. (2008) APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts. *PLoS Pathog.* **4**(12), e1000231. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000231>
70. Марчук Г.И. (2006) Сопряженные уравнения и их применения. *Труды ИММ УрО РАН.* **12**(1), 184–195.
71. Marchuk G.I., Shutyaev V., Bocharov G. (2005) Adjoint equations and analysis of complex systems: application to virus infection modelling. *J. Comput. Appl. Math.* **184**(1), 177–204.
72. Фадеев С.И., Покровская С.А., Березин А.Ю., Гайнова И.А. (1998) Пакет программ СТЕР для численного исследования систем нелинейных уравнений и автономных систем общего вида. Описание работы пакета СТЕР на примерах задач из учебного курса “Инженерная химия каталитических процессов”. Новосибирск: НГУ. 198 с.
73. Rand U., Rinas M., Schwert J., Nöhren G., Linnes M., Kröger A., Flossdorf M., Kály-Kullai K., Hauser H., Höfer T., Köster M. (2012) Multi-layered stochasticity and paracrine signal propagation shape the type-I interferon response. *Mol. Syst. Biol.* **8**, 584.
74. Huang Y., Dai H., Ke R. (2019) Principles of effective and robust innate immune response to viral infections: a multiplex network analysis. *Front. Immunol.* **10**, 1736. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01736>
75. He B., Tran J.T., Sanchez D.J. (2019) Manipulation of type I interferon signaling by HIV and AIDS-associated viruses. *J. Immunol. Res.* **4**, 8685312. <https://doi.org/10.1155/2019/8685312>
76. Conway J.M., Ribeiro R.M. (2018) Modeling the immune response to HIV infection. *Curr. Opin. Syst. Biol.* **12**, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2018.10.006>
77. Ranganath N., Sandstrom T.S., Fadel S., Côté S.C., Angel J.B. (2016) Type I interferon responses are impaired in latently HIV infected cells. *Retrovirology.* **13**(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0302-9>
78. Cheng L., Yu H., Li G., Li F., Ma J., Li J., Chi L., Zhang L., Su L. (2017) Type I interferons suppress viral replication but contribute to T cell depletion and dysfunction during chronic HIV-1 infection. *JCI Insight.* **2**(12), e94366. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.94366>
79. Carnathan D., Lawson B., Yu J., Patel K., Billingsley J.M., Tharp G.K., Delmas O.M., Dawoud R., Wilkinson P., Nicolette C., Cameron M.J., Sekaly R.P., Bosinger S.E., Silvestri G., Vanderford T.H. (2018) Reduced chronic lymphocyte activation following interferon alpha blockade during the acute phase of simian immunodeficiency virus infection in rhesus macaques. *J. Virol.* **92**(9), e01760-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01760-17>
80. Sanchez D.J., Miranda D., Jr., Marsden M.D., Dizon T.M.A., Bontemps J.R., Davila S.J., Del Mundo L.E., Ha T., Senaati A., Zack J.A., Cheng G. (2015) Disruption of type I interferon induction by HIV infection of T cells. *PLoS One.* **10**(9), e0137951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137951>
81. Wong H.S., Germain R.N. (2018) Robust control of the adaptive immune system. *Semin. Immunol.* **36**, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.12.009>

Mathematical Modeling of HIV Replication and the Response of the Interferon System

I. A. Gainova^{1, *}, A. E. Soboleva², D. S. Grebennikov^{3, 4}, and G. A. Bocharov^{3, 4}

¹Sobolev Institute of Mathematics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

²Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

³Marchuk Institute of Numerical Mathematics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119333 Russia

⁴Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

*e-mail: gajnova@math.nsc.ru

Developing physiologically meaningful mathematical models that describe multilevel regulation in a complex network of immune processes, in particular, of the system of interferon-regulated virus reproduction processes, is a fundamental scientific problem, within the framework of an interdisciplinary systematic approach to research in immunology. Here, we have presented a detailed high-dimensional model describing HIV (human immunodeficiency virus) replication, the response of type I interferon (IFN) to penetration the virus into cell, and suppression of the action of IFN-induced proteins by HIV accessory ones. As a result, developed model for the first time includes interactions of all three processes. The mathematical model is a system of 37 non-linear ordinary differential equations including 78 parameters. The peculiarity of the model is that it describes not only the processes of the IFN response of the cell to virus infection, but also the mechanisms used by the virus to prevent effects of the IFN system.

Keywords: mathematical model, human immunodeficiency virus, replication, accessory proteins, type I interferon, interferon response, interferon-stimulated proteins

АПАТИНИБ СУПРЕССИРУЕТ ОПОСРЕДОВАННОЕ МАКРОФАГАМИ ПОВЕДЕНИЕ КЛЕТОК ГЕПАТОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ, МОДУЛИРУЯ ПЕРЕДАЧУ СИГНАЛОВ VEGFR2/STAT3/PD-L1¹

© 2023 г. Т. Yin^{a, 2}, С. В. Fu^{a, 2}, D. D. Wu^{a, *}, L. Nie^a, Н. Chen^a, Y. Wang^a

^aDepartment of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Hubei Cancer Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430034 China

*e-mail: wudongde2000okok@163.com

Поступила в редакцию 26.10.2022 г.

После доработки 23.12.2022 г.

Принята к публикации 16.01.2023 г.

Гепатоклеточная карцинома (НСС) — наиболее часто диагностируемый первичный рак печени. В прогрессии опухолей могут участвовать опухолеассоциированные макрофаги, фенотипически сходные с макрофагами M2, которые секретируют цитокины, супрессирующие иммунный ответ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. Изучена роль макрофагов M2 в прогрессии НСС и влияние ингибитора рецептора 2 фактора роста сосудистого эндотелия — апатиниба. В качестве модели НСС использовали клеточную линию Hepb3. Макрофаги M2 получены путем дифференцировки клеток THP-1. Для кокультивирования макрофагов M2 и клеток Hepb3 использовали ячейку Transwell. Жизнеспособность и пролиферативную способность клеток определяли методами ССК-8 и EdU. Метастатический потенциал клеток оценивали, используя метод определения миграции Transwell. Уровни экспрессии цитокинов определяли с помощью иммуноферментного анализа. Активацию оси VEGFR2/STAT3/PD-L1 количественно оценивали с помощью вестерн-блоттинга. Показано, что сокультивирование с макрофагами M2 способствовало пролиферации, повышению жизнеспособности, продукции цитокинов, инвазии и миграции клеток Hepb3. При кокультивировании значительно увеличивалась секреция TGF-β1, IL-6, MMP-9 и VEGF. Апатиниб супрессировал индуцируемую макрофагами M2 пролиферацию, жизнеспособность клеток Hepb3, их инвазию и миграцию. Более того, апатиниб заметно снижал уровни экспрессии p-VEGFR2, p-STAT3 и PD-L1 в клетках Hepb3 в условиях кокультивирования. Таким образом, апатиниб может супрессировать опосредуемое опухолеассоциированными макрофагами поведение клеток НСС посредством модуляции сигнального пути VEGFR2/STAT3/PD-L1.

Ключевые слова: гепатоклеточная карцинома, опухолеассоциированные макрофаги, опухолевые клетки, апатиниб, VEGFR2

DOI: 10.31857/S0026898423040237, **EDN:** QMAQDY

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Parkin D.M., Piñeros M., Znaor A., Bray F. (2021) Cancer statistics for the year 2020: an overview. *Int. J. Cancer*. **149**, 778–789.
2. Caines A., Selim R., Salgia R. (2020) The Changing global epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin. Liver Dis.* **24**, 535–547.
3. Pascual S., Herrera I., Irurzun J. (2016) New advances in hepatocellular carcinoma. *World J. Hepatol.* **8**, 421–438.
4. Laplane L., Duluc D., Bikfalvi A., Larmonier N., Pradeu T. (2019) Beyond the tumour microenvironment. *Int. J. Cancer*. **145**, 2611–2618.
5. Yin Y., Yao S., Hu Y., Feng Y., Li M., Bian Z., Zhang J., Qin Y., Qi X., Zhou L., Fei B., Zou J., Hua D., Huang Z. (2017) The immune-microenvironment confers chemoresistance of colorectal cancer through macrophage-derived IL6. *Clin. Cancer Res.* **23**, 7375–7387.
6. Qian B.Z., Pollard J.W. (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. **141**, 39–51.

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

² Tao Yin и Changbo Fu внесли равный вклад в выполнение работы.

7. Pittet M.J., Michielin O., Migliorini D. (2022) Clinical relevance of tumour-associated macrophages. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **19**, 402–421.
8. Martínez V.G., Rubio C., Martínez-Fernández M., Segovia C., López-Calderón F., Garín M.I., Teixeira A., Munera-Maravilla E., Varas A., Sacedón R., Guerrero F., Villacampa F., de la Rosa F., Castellano D., López-Collazo E., Paramio J.M., Vicente Á., Dueñas M. (2017) BMP4 induces M2 macrophage polarization and favors tumor progression in bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* **23**, 7388–7399.
9. Lu H., Clauser K.R., Tam W.L., Fröse J., Ye X., Eaton E.N., Reinhardt F., Donnenberg V.S., Bhargava R., Carr S.A., Weinberg R.A. (2014) A breast cancer stem cell niche supported by juxtacrine signalling from monocytes and macrophages. *Nat. Cell Biol.* **16**, 1105–1117.
10. Daurkin I., Eruslanov E., Stoffs T., Perrin G.Q., Algood C., Gilbert S.M., Rosser C.J., Su L.M., Vieweg J., Kusmartsev S. (2011) Tumor-associated macrophages mediate immunosuppression in the renal cancer microenvironment by activating the 15-lipoxygenase-2 pathway. *Cancer Res.* **71**, 6400–6409.
11. Xiao P., Long X., Zhang L., Ye Y., Guo J., Liu P., Zhang R., Ning J., Yu W., Wei F., Yu J. (2018) Neutrotensin/IL-8 pathway orchestrates local inflammatory response and tumor invasion by inducing M2 polarization of tumor-associated macrophages and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma cells. *Oncoimmunology*. **7**, e1440166.
12. Bellmunt J., Powles T., Vogelzang N.J. (2017) A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: the future is now. *Cancer Treat. Rev.* **54**, 58–67.
13. Llovet J.M., Castet F., Heikenwalder M., Maini M.K., Mazzaferro V., Pinato D.J., Pikarsky E., Zhu A.X., Finn R.S. (2022) Immunotherapies for hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **19**, 151–172.
14. Zhang H. (2015) Apatinib for molecular targeted therapy in tumor. *Drug. Des. Devel. Ther.* **9**, 6075–6081.
15. Scott A.J., Messersmith W.A., Jimeno A. (2015) Apatinib: a promising oral antiangiogenic agent in the treatment of multiple solid tumors. *Drugs Today (Barc)*. **51**, 223–229.
16. Chen X., Qiu T., Zhu Y., Sun J., Li P., Wang B., Lin P., Cai X., Han X., Zhao F., Shu Y., Chang L., Jiang H., Gu Y. (2019) A single-arm, phase II study of apatinib in refractory metastatic colorectal cancer. *Oncologist*. **24**, 883–e407.
17. Zhao S., Ren S., Jiang T., Zhu B., Li X., Zhao C., Jia Y., Shi J., Zhang L., Liu X., Qiao M., Chen X., Su C., Yu H., Zhou C., Zhang J., Camidge D.R., Hirsch F.R. (2019) Low-dose apatinib optimizes tumor microenvironment and potentiates antitumor effect of PD-1/PD-L1 blockade in lung cancer. *Cancer Immunol. Res.* **7**, 630–643.
18. Li L., Yu R., Cai T., Chen Z., Lan M., Zou T., Wang B., Wang Q., Zhao Y., Cai Y. (2020) Effects of immune cells and cytokines on inflammation and immunosuppression in the tumor microenvironment. *Int. Immunopharmacol.* **88**, 106939.
19. Saraswati S., Alhaider A., Abdelgadir A.M., Tanwer P., Korashy H.M. (2019) Phloretin attenuates STAT-3 activity and overcomes sorafenib resistance targeting SHP-1-mediated inhibition of STAT3 and Akt/VEGFR2 pathway in hepatocellular carcinoma. *Cell. Commun. Signal.* **17**, 127.
20. Wen S., Shao G., Zheng J., Zeng H., Luo J., Gu D. (2019) Apatinib regulates the cell proliferation and apoptosis of liver cancer by regulation of VEGFR2/STAT3 signaling. *Pathol. Res. Pract.* **215**, 816–821.
21. Anderson N.M., Simon M.C. (2020) The tumor microenvironment. *Curr. Biol.* **30**, R921–r925.
22. Ngambenjawong C., Gustafson H.H., Pun S.H. (2017) Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **114**, 206–221.
23. DeNardo D.G., Ruffell B. (2019) Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 369–382.
24. Mao X., Xu J., Wang W., Liang C., Hua J., Liu J., Zhang B., Meng Q., Yu X., Shi S. (2021) Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Mol. Cancer*. **20**, 131.
25. Laoui D., Van Overmeire E., De Baetselier P., Van Ginderachter J.A., Raes G. (2014) Functional relationship between tumor-associated macrophages and macrophage colony-stimulating factor as contributors to cancer progression. *Front. Immunol.* **5**, 489.
26. Fantuzzi L., Tagliamonte M., Gauzzi M.C., Lopalco L. (2019) Dual CCR5/CCR2 targeting: opportunities for the cure of complex disorders. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 4869–4886.
27. Campagnolo L., Telesca C., Massimiani M., Stuhlmann H., Angelico M., Lenci I., Manzia T.M., Taricotti L., Lehmann G., Baiocchi L. (2016) Different expression of VEGF and EGFL7 in human hepatocellular carcinoma. *Dig. Liver Dis.* **48**, 76–80.
28. Bhoori S., Mazzaferro V. (2020) Combined immunotherapy and VEGF-antagonist in hepatocellular carcinoma: a step forward. *Lancet Oncol.* **21**, 740–741.
29. Hu X., Zhang J., Xu B., Jiang Z., Ragaz J., Tong Z., Zhang Q., Wang X., Feng J., Pang D., Fan M., Li J., Wang B., Wang Z., Zhang Q., Sun S., Liao C. (2014) Multicenter phase II study of apatinib, a novel VEGFR inhibitor in heavily pretreated patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Int. J. Cancer*. **135**, 1961–1969.
30. Hu X., Cao J., Hu W., Wu C., Pan Y., Cai L., Tong Z., Wang S., Li J., Wang Z., Wang B., Chen X., Yu H. (2014) Multicenter phase II study of apatinib in non-triple-negative metastatic breast cancer. *BMC Cancer*. **14**, 820.
31. Wang Q., Gao J., Di W., Wu X. (2020) Anti-angiogenesis therapy overcomes the innate resistance to PD-1/PD-L1 blockade in VEGFA-overexpressed mouse tumor models. *Cancer Immunol. Immunother.* **69**, 1781–1799.
32. Zheng B., Ren T., Huang Y., Guo W. (2018) Apatinib inhibits migration and invasion as well as PD-L1 expression in osteosarcoma by targeting STAT3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **495**, 1695–1701.
33. Cai X., Wei B., Li L., Chen X., Liu W., Cui J., Lin Y., Sun Y., Xu Q., Guo W., Gu Y. (2020) Apatinib enhanced anti-PD-1 therapy for colon cancer in mice via

- promoting PD-L1 expression. *Int. Immunopharmacol.* **88**, 106858.
34. Kambhampati S., Bauer K.E., Bracci P.M., Keenan B.P., Behr S.C., Gordan J.D., Kelley R.K. (2019) Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma and Child-Pugh class B cirrhosis: safety and clinical outcomes in a retrospective case series. *Cancer.* **125**, 3234–3241.
 35. El-Khoueiry A.B., Sangro B., Yau T., Crocenzi T.S., Kudo M., Hsu C., Kim T.Y., Choo S.P., Trojan J., Welling T.H.R., Meyer T., Kang Y.K., Yeo W., Chopra A., Anderson J., Dela Cruz C., Lang L., Neely J., Tang H., Dastani H.B., Melero I. (2017) Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet.* **389**, 2492–2502.
 36. Pardoll D.M. (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer.* **12**, 252–264.
 37. Bu L.L., Yu G.T., Wu L., Mao L., Deng W.W., Liu J.F., Kulkarni A.B., Zhang W.F., Zhang L., Sun Z.J. (2017) STAT3 Induces Immunosuppression by Upregulating PD-1/PD-L1 in HNSCC. *J. Dent. Res.* **96**, 1027–1034.
 38. Xie C., Zhou X., Liang C., Li X., Ge M., Chen Y., Yin J., Zhu J., Zhong C. (2021) Apatinib triggers autophagic and apoptotic cell death via VEGFR2/STAT3/PD-L1 and ROS/Nrf2/p62 signaling in lung cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **40**, 266.

Apatinib Suppressed Macrophage-Mediated Malignant Behavior of Hepatocellular Carcinoma Cells via Modulation of VEGFR2/STAT3/PD-L1 Signaling

T. Yin¹, C. B. Fu¹, D. D. Wu¹ *, L. Nie¹, H. Chen¹, and Y. Wang¹

¹Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Hubei Cancer Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430034 China

*e-mail: wudongde2000okok@163.com

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most frequently diagnosed primary liver tumor worldwide. Tumor-associated macrophages (TAMs) usually have a similar phenotype to M2-like macrophages and can participate in tumor progression by secreting cytokines to suppress the immune response of tumor-infiltrating lymphocytes. We investigated the role of M2 macrophages in HCC progression and explored the effects of vascular endothelial growth factor receptor 2 inhibitor – apatinib. As a cellular model of HCC, Hepb3 cell line was used. M2 macrophages were obtained by differentiation of THP-1 cells. The Transwell chamber was used to co-culture M2 macrophages and Hepb3 cells. CCK-8 assay and EdU assay were conducted to measure cell viability and proliferation capacity. Transwell migration assay was conducted to estimate cellular metastatic potential. Cytokine expression levels were assessed by ELISA. Western blot was used to quantify the activation of the VEGFR2/STAT3/PD-L1 axis. It has been shown that co-culture with M2 macrophages increased proliferation, viability, cytokine production, invasion, and migration of Hepb3 cells. The secretion of TGF- β 1, IL-6, MMP-9, and VEGF was significantly increased after co-culture. Apatinib suppressed M2 macrophage-induced proliferation, cell viability, invasion, and migration of Hepb3 cells. Moreover, apatinib remarkably decreased expression levels of p-VEGFR2, p-STAT3, and PD-L1 in Hepb3 cells under the co-culture conditions. In conclusion, apatinib treatment could suppress TAMs-mediated cancer cell behaviors of HCC cells via modulation of the VEGFR2/STAT3/PD-L1 signaling pathway.

Keywords: hepatocellular carcinoma, tumor-associated macrophages, cancer cell behaviors, apatinib, VEGFR2

АНАЛИЗ СЛУЧАЙНОЙ ИНТЕГРАЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА-6, УПАКОВАННОГО В КЛЕТКИ Sf9 НАСЕКОМЫХ¹

© 2023 г. М. Н. Zhang^{a, b}, X. M. Liu^{a, b, *}, C. Zhang^{a, b, **}

^a*School of Biomedical Engineering (Suzhou), Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei, 230026 China*

^b*Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, 215163 China*

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

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

Поступила в редакцию 14.11.2022 г.

После доработки 20.01.2023 г.

Принята к публикации 24.01.2023 г.

В последнее время растет озабоченность по поводу интеграции в геном вектора рекомбинантного аденоассоциированного вируса (гAAV), используемого для генной терапии. Аденоассоциированный вирус дикого типа (AAV) специфически интегрируется в *AAVS1*-сайт генома человека, в то время как гAAV случайным образом интегрируется в хромосомы хозяина с низкой частотой. Проанализированы события случайной интеграции конструкции гAAV6-EGFP, упакованной в клетки Sf9 насекомых. Производственная платформа Baculo-Sf9 обладает преимуществами суспензионной культуры клеток насекомых Sf9: высокой плотностью и возможностью крупномасштабного производства векторов гAAV. В проведенном исследовании использованы различные дозы вектора гAAV6-EGFP, продуцируемого Baculo-Sf9, для трансдукции клеток HEK293T и A549-имплантированных опухолей *in vitro* и *in vivo*. Методами проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии оценена эффективность экспрессии гена *egfp* и интенсивность флуоресценции EGFP. С помощью инвертированной гнездовой ПЦР и секвенирования ДНК идентифицированы случайные сайты интеграции генома гAAV6-EGFP в хромосомы человека. По результатам анализа *in vitro* показано, что эффективность экспрессии репортерной конструкции стабилизировалась через 20 суток, а частота случайной интеграции составляла 0.2–4.2%. В исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo* выявлено, что случайная интеграция гAAV6 зависела от дозы конструкта. По результатам секвенирования идентифицировано два случайных сайта интеграции, которые находятся на хромосомах человека 8 и 12. На основании полученных данных можно сделать вывод, что для безопасной генной терапии следует использовать как можно более низкие дозы вектора гAAV.

Ключевые слова: рекомбинантный аденоассоциированный вирус, бакуловирусовая система Sf9, случайная интеграция, инвертированная гнездовая ПЦР

DOI: 10.31857/S0026898423040262, EDN: QMEZVF

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bulcha J.T., Wang Y., Ma H., Tai P.W.L., Gao G. (2021) Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Sig. Transduc. Target. Ther.* **6**, 53.
2. Lundstrom K. (2018) Viral vectors in gene therapy. *Diseases.* **6**, 42.
3. Scott L.J. (2015) Alipogene tiparvovec: a review of its use in adults with familial lipoprotein lipase deficiency. *Drugs.* **75**, 175–182.
4. Darrow J.J. (2019) Luxturna: FDA documents reveal the value of a costly gene therapy. *Drug Discov. Today.* **24**, 949–954.
5. Urquhart L. (2019) FDA new drug approvals in Q2 2019. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 575.
6. Keam S.J. (2022) Eladocagene exuparvovec: first approval. *Drugs.* **82**, 1427–1432.
7. Blair H.A. (2022) Valoctocogene roxaparvovec: first approval. *Drugs.* **82**, 1505–1510.
8. Rutledge E.A., Russell D.W. (1997) Adeno-associated virus vector integration junctions. *J. Virol.* **71**, 8429–8436.
9. Kotin R.M., Menninger J.C., Ward D.C., Berns K.I. (1991) Mapping and direct visualization of a region-

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

- specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics*. **10**, 831–834.
10. Linden R.M., Ward P., Giraud C., Winocour E., Berns K.I. (1996) Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 11288–11294.
 11. Boftsi M., Whittle F.B., Wang J., Shepherd P., Burger L.R., Kaifer K.A., Lorson C.L., Joshi T., Pintel D.J., Majumder K. (2022) The adeno-associated virus 2 genome and Rep 68/78 proteins interact with cellular sites of DNA damage. *Hum. Mol. Genet.* **31**, 985–998.
 12. Morales L., Gambhir Y., Bennett J., Stedman H.H. (2020) Broader implications of progressive liver dysfunction and lethal sepsis in two boys following systemic high-dose AAV. *Mol. Ther.* **28**, 1753–1755.
 13. Palazzi X., Pardo I.D., Sirivelu M.P., Newman L., Kumpf S.W., Qian J., Franks T., Lopes S., Liu J., Monarski L., Casinghino S., Ritenour C., Ritenour H., Dubois C., Olson J., Graves J., Alexander K.E., Coskran T., Lanz T.A., Brady J., McCarty D., Suryanarayan S., Whiteley L.O. (2022) Biodistribution and tolerability of AAV-PHP.B-CBh-SMN1 in Wistar Han rats and cynomolgus macaques reveal different toxicologic profiles. *Hum. Gene Ther.* **33**, 175–187.
 14. Chandler L.C., Yusuf I.H., McClements M.E., Barnard A.R., MacLaren R.E., Xue K. (2020) Immunomodulatory effects of hydroxychloroquine and chloroquine in viral infections and their potential application in retinal gene therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4972.
 15. Vasileva A., Linden R.M., Jessberger R. (2006) Homologous recombination is required for AAV-mediated gene targeting. *Nucleic Acids Res.* **34**, 3345–3360.
 16. Chandler R.J., LaFave M.C., Varshney G.K., Burgess S.M., Venditti C.P. (2016) Genotoxicity in mice following AAV gene delivery: a safety concern for human gene therapy? *Mol. Ther.* **24**, 198–201.
 17. Rumachik N.G., Malaker S.A., Poweleit N., Maynard L.H., Adams C.M., Leib R.D., Cirolia G., Thomas D., Stamnes S., Holt K., Sinn P., May A.P., Paulk N.K. (2020) Methods matter: standard production platforms for recombinant AAV produce chemically and functionally distinct vectors. *Mol. Ther.* **18**, 98–118.
 18. Schnepf B.C., Clark K.R., Klemanski D.L., Pacak C.A., Johnson P.R. (2003) Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J. Virol.* **77**, 3495–3504.
 19. Li Y., Yin Y., Ma J., Sun Y., Zhou R., Cui B., Zhang Y., Yang J., Yan X., Liu Z., Ma Z. (2020) Combination of AAV-mediated *NUPR1* knockdown and trifluoperazine induces premature senescence in human lung adenocarcinoma A549 cells in nude mice. *Oncol. Rep.* **43**, 681–688.
 20. Carbone L., Carbone E.T., Yi E.M., Bauer D.B., Lindstrom K.A., Parker J.M., Austin J.A., Seo Y., Gandhi A.D., Wilkerson J.D. (2012) Assessing cervical dislocation as a humane euthanasia method in mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **51**, 352–356.
 21. Tu T., Jilbert A.R. (2017) Detection of hepatocyte clones containing integrated hepatitis B virus DNA using inverse nested PCR. *Methods Mol. Biol.* **1540**, 97–118.
 22. Saito S., Ohno S.I., Harada Y., Oikawa K., Fujita K., Mineo S., Gondo A., Kanno Y., Kuroda M. (2019) rAAV6-mediated miR-29b delivery suppresses renal fibrosis. *Clin. Exp. Nephrol.* **23**, 1345–1356.
 23. Tu L., Sun L., Xue J., Zhang Y., Lu Y. (2012) Efficient and durable gene delivery of self complementary adeno-associated virus 6 vector and impact of pre-existing immunity. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* **29**, 1150–1155 (in Chinese).
 24. Wang D., Zhou Q., Qiu X., Liu X., Zhang C. (2022) Optimizing rAAV6 transduction of primary T cells for the generation of anti-CD19 AAV-CAR-T cells. *Biomed. Pharmacother.* **150**, 113027.
 25. Bak R.O., Dever D.P., Porteus M.H. (2018) CRISPR/Cas9 genome editing in human hematopoietic stem cells. *Nat. Protoc.* **13**, 358–376.
 26. Wilkinson A.C., Dever D.P., Baik R., Camarena J., Hsu I., Charlesworth C.T., Morita C., Nakauchi H., Porteus M.H. (2021) Cas9-AAV6 gene correction of β -globin in autologous HSCs improves sickle cell disease erythropoiesis in mice. *Nat. Commun.* **12**, 686.
 27. Bengtsson N.E., Tasfaout H., Hauschka S.D., Chamberlain J.S. (2021) Dystrophin gene-editing stability is dependent on dystrophin levels in skeletal but not cardiac muscles. *Mol. Ther.* **29**, 1070–1085.
 28. Eyquem J., Mansilla-Soto J., Giavridis T., van der Stegen S.J., Hamieh M., Cunanan K.M., Odak A., Gonen M., Sadelain M. (2017) Targeting a CAR to the *TRAC* locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*. **543**, 113–117.
 29. Ciuffi A., Ronen K., Brady T., Malani N., Wang G., Berry C.C., Bushman F.D. (2009) Methods for integration site distribution analyses in animal cell genomes. *Methods*. **47**, 261–268.
 30. Nakai H., Yant S.R., Storm T.A., Fuess S., Meuse L., Kay M.A. (2001) Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction *in vivo*. *J. Virol.* **75**, 6969–6976.
 31. Miller D.G., Trobridge G.D., Petek L.M., Jacobs M.A., Kaul R., Russell D.W. (2005) Large-scale analysis of adeno-associated virus vector integration sites in normal human cells. *J. Virol.* **79**, 11434–11442.
 32. Malik P., McQuiston S.A., Yu X.J., Pepper K.A., Krall W.J., Podsakoff G.M., Kurtzman G.J., Kohn D.B. (1997) Recombinant adeno-associated virus mediates a high level of gene transfer but less efficient integration in the K562 human hematopoietic cell line. *J. Virol.* **71**, 1776–1783.
 33. Duan D., Sharma P., Dudus L., Zhang Y., Sanlioglu S., Yan Z., Yue Y., Ye Y., Lester R., Yang J., Fisher K.J., Engelhardt J.F. (1999) Formation of adeno-associated virus circular genomes is differentially regulated by adenovirus E4 ORF6 and E2a gene expression. *J. Virol.* **73**, 161–169.

34. Kaepfel C., Beattie S.G., Fronza R., van Logtenstein R., Salmon F., Schmidt S., Wolf S., Nowrouzi A., Glimm H., von Kalle C., Petry H., Gaudet D., Schmidt M. (2013) A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat. Med.* **19**, 889–891.
35. McAlister V.J., Owens R.A. (2007) Preferential integration of adeno-associated virus type 2 into a polypyrimidine/polypurine-rich region within AAVS1. *J. Virol.* **81**, 9718–9726.
36. Bijlani S., Pang K.M., Sivanandam V., Singh A., Chatterjee S. (2021) The role of recombinant AAV in precise genome editing. *Fron. Genome Ed.* **3**, 799722.
37. Miller D.G., Petek L.M., Russell D.W. (2004) Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat. Genet.* **36**, 767–773.
38. Schultz B.R., Chamberlain J.S. (2008) Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. *Mol. Ther.* **16**, 1189–1199.
39. Nakai H., Iwaki Y., Kay M.A., Couto L.B. (1999) Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver. *J. Virol.* **73**, 5438–5447.
40. Yang C.C., Xiao X., Zhu X., Ansardi D.C., Epstein N.D., Frey M.R., Matera A.G., Samulski R.J. (1997) Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration *in vivo* and *in vitro*. *J. Virol.* **71**, 9231–9247.
41. Sabatino D.E., Bushman C.F.D., Chandler R.J., Crystal R.G., Davidson B.L., Dolmetsch R., Eggan K.C., Gao G., Gil-Farina I., Kay M.A., McCarty D.M., Montini E., Ndu A., Yuan J. (2022) Evaluating the state of the science for adeno-associated virus (AAV) integration: an integrated perspective. *Mol. Ther.* **30**, 2646–2663.
42. Game J.C. (1993) DNA double-strand breaks and the *RAD50-RAD57* genes in *Saccharomyces*. *Semin. Cancer Biol.* **4**, 73–83.
43. Smih F., Rouet P., Romanienko P.J., Jasin M. (1995) Double-strand breaks at the target locus stimulate gene targeting in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* **23**, 5012–5019.
44. Miller D.G., Petek L.M., Russell D.W. (2003) Human gene targeting by adeno-associated virus vectors is enhanced by DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3550–3557.
45. Donsante A., Vogler C., Muzyczka N., Crawford J.M., Barker J., Flotte T., Campbell-Thompson M., Daly T., Sands M.S. (2001) Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther.* **8**, 1343–1346.
46. Bell P., Mosconi A.D., McCarter R.J., Wu D., Gao G., Hoang A., Sanmiguel J.C., Sun X., Wivel N.A., Raper S.E., Furth E.E., Batshaw M.L., Wilson J.M. (2006) Analysis of tumors arising in male B6C3F1 mice with and without AAV vector delivery to liver. *Mol. Ther.* **14**, 34–44.
47. Chandler R.J., LaFave M.C., Varshney G.K., Trivedi N.S., Carrillo-Carrasco N., Senac J.S., Wu W., Hoffmann V., Elkahoul A.G., Burgess S.M., Venditti C.P. (2015) Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J. Clin. Invest.* **125**, 870–880.
48. Senis E., Mosteiro L., Wilkening S., Wiedtke E., Nowrouzi A., Afzal S., Fronza R., Landerer H., Abad M., Niopek D., Schmidt M., Serrano M., Grimm D. (2018) AAV vector-mediated *in vivo* reprogramming into pluripotency. *Nat. Commun.* **9**, 2651.
49. Gil-Farina I., Fronza R., Kaepfel C., Lopez-Franco E., Ferreira V., D'Avola D., Benito A., Prieto J., Petry H., Gonzalez-Aseguinolaza G., Schmidt M. (2016) Recombinant AAV integration is not associated with hepatic genotoxicity in nonhuman primates and patients. *Mol. Ther.* **24**, 1100–1105.
50. Zen Z., Espinoza Y., Bleu T., Sommer J.M., Wright J.F. (2004) Infectious titer assay for adeno-associated virus vectors with sensitivity sufficient to detect single infectious events. *Hum. Gene Ther.* **15**, 709–715.
51. Mietzsch M., Grasse S., Zurawski C., Weger S., Bennett A., Agbandje-McKenna M., Muzyczka N., Zolotukhin S., Heilbronn R. (2014) OneBac: platform for scalable and high-titer production of adeno-associated virus serotype 1–12 vectors for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **25**, 212–222.
52. Dalwadi D.A., Calabria A., Tiyaaboonchai A., Posey J., Naugler W.E., Montini E., Grompe M. (2021) AAV integration in human hepatocytes. *Mol. Ther.* **29**, 2898–2909.

Random Integration Analysis of Recombinant Adeno-Associated Virus 6 Packaged in Sf9 Insect Cells

M. H. Zhang^{1, 2}, X. M. Liu^{1, 2, *}, and C. Zhang^{1, 2, **}

¹*School of Biomedical Engineering (Suzhou), Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei, 230026 China*

²*Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou, 215163 China*

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

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

Recently, there have been growing concerns over the integration of recombinant adeno-associated virus (rAAV) used in gene therapy. Wild-type adeno-associated virus (AAV) site specifically integrates into *AAVS1* site of human genome, while rAAV randomly integrates into host chromosomes at low frequencies. This research

aims to study the random integration events of rAAV6-EGFP packaged in Sf9 insect cells. Baculo-Sf9 manufacturing platform has the advantages of high-density suspension culture of Sf9 insect cells and large-scale production of rAAV vectors. In this study, we used different doses of Baculo-Sf9 produced rAAV6-EGFP to transduce HEK293T cells and A549-implanted tumors *in vitro* and *in vivo*. Using flow cytometry and fluorescence microscopy, we studied their *EGFP* gene expression efficiencies and EGFP fluorescence intensities. Using inverse nested PCR and DNA sequencing, random integration sites of rAAV6-EGFP genome into human chromosomes were identified. *In vitro* results showed that gene expression efficiencies became stable after 20 days and random integration frequencies were 0.2–4.2%. Both *in vitro* and *in vivo* results indicated that random integration of Baculo-Sf9 rAAV6 was dose-dependent. Sequencing results showed two random integration sites, which were on human chromosomes 8 and 12. The findings suggest that we should use as low dose of rAAV vector as possible for safe gene therapy.

Keywords: recombinant adeno-associated virus, Baculo-Sf9 manufacturing platform, random integration, inverse nested PCR

УДК 579.61:616.002.2,57.03

IL-8 СВЯЗЫВАЕТ ПУТИ NF-κB и Wnt/β-КАТЕНИН ПРИ ПЕРСИСТЕНТНОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ОТВЕТЕ, ВЫЗВАННОМ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ *Helicobacter pylori*¹

© 2023 г. L. Lin^a, *, B. Xie^b, J. Shi^c, C. M. Zhou^d, J. Yi^b, J. Chen^b, J. X. He^e, H. L. Wei^b, **

^aDepartment of Hematology & Oncology, Gansu Provincial Maternity and Child-Care Hospital,
Lanzhou, Gansu, 730050 China

^bKey Laboratory of Preclinical Study for New Drugs of Gansu Province, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University,
Lanzhou, Gansu, 730000 China

^cDepartment of Blood Transfusion, The Second Hospital of Lanzhou University,
Lanzhou, Gansu, 730000 China

^dDepartment of Clinical Laboratory Center, The First Hospital of Lanzhou University,
Lanzhou, Gansu, 730000 China

^eBasic Medical College, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu, 730000 China

*e-mail: gsfy_2021@sina.com

**e-mail: weihulai@lzu.edu.cn

Поступила в редакцию 03.08.2022 г.

После доработки 17.01.2023 г.

Принята к публикации 03.02.2023 г.

Инфекция *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) иногда вызывает стойкий воспалительный ответ в эпителиальных клетках слизистой оболочки желудка человека, что может приводить к возникновению рака. Однако основной механизм канцерогенеза пока не выяснен. Нами разработаны модели хронической инфекции *H. pylori* в клетках GES-1 и на мышцах C57BL/6J. Для определения уровня интерлейкина-8 (IL-8) использовали иммуоверментный анализ. Экспрессию мРНК и белков NF-κB p65, IL-8, Wnt2 и β-катенина определяли методами ПЦР в режиме реального времени, иммуноблотинга, иммунофлуоресцентного окрашивания и иммуногистохимии. Инфекцию *H. pylori* у мышей оценивали с помощью экспресс-теста на уреазу, окрашивания гематоксилином—эозином и серебрения по Вартину—Старри. Исследование морфологических изменений в слизистой оболочке желудка проводили методом электронной микроскопии. Выявлено, что в клетках слизистой оболочки желудка, инфицированных *H. pylori*, наряду с активацией сигнального пути NF-κB и повышением концентрации IL-8, значимо повышалась экспрессия Wnt2. На основании этих результатов можно предполагать, что IL-8 позитивно регулирует экспрессию гена *Wnt2*. При исследовании хронической инфекции *H. pylori* на модели мышей C57BL/6J показано, что у экспериментальных животных повышена частота предраковых поражений в ткани слизистой оболочки желудка. При сравнении ультраструктурных изменений в клетках слизистой оболочки желудка и анализе взаимосвязи между сигнальным путем NF-κB и экспрессией Wnt2 обнаружено, что инфекция *H. pylori* активирует сигнальные пути NF-κB, а массивное высвобождение IL-8 положительно коррелирует с высокой экспрессией белка Wnt2. Как следствие, активация сигнального пути Wnt/β-catenin может быть вовлечена в злокачественную трансформацию клеток слизистой оболочки желудка. Таким образом, хроническая инфекция *H. pylori* может приводить к персистентному воспалительному ответу: активировать путь NF-κB, способствовать высвобождению IL-8 и тем самым активировать путь Wnt/β-catenin. IL-8, по-видимому, играет роль линкера в сцеплении этих двух сигнальных путей.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, интерлейкин-8, Wnt2, NF-κB, сигнальные пути, воспаление, рак желудка

DOI: 10.31857/S0026898423040134, **EDN:** QLUKEJ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dvorak H.F. (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *New Engl. J. Med.* **315**, 1650–1659.
2. Medzhitov R. (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. **449**, 819–826.
3. Dias A., Garcia C., Majewski M., Wallner G., McCallum R.W., Poplawski C., Sarosiek J. (2011) Gastric

¹ Статья представлена авторами на английском языке.

- juice prostaglandins and peptide growth factors as potential markers of chronic atrophic gastritis, intestinal metaplasia and gastric cancer: their potential clinical implications based on this pilot study. *Dig. Dis. Sci.* **56**, 3220–3225.
4. Hussain S.P., Harris C.C. (2007) Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int. J. Cancer.* **121**, 2373–2380.
 5. Murata M. (2018) Inflammation and cancer. *Environ. Health Prevent. Med.* **23**, 50.
 6. (2020) Erratum: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **70**, 313.
 7. Vogtman E., Goedert J.J. (2016) Epidemiologic studies of the human microbiome and cancer. *Br. J. Cancer.* **114**, 237–242.
 8. Parsonnet J. (1994) Gastric adenocarcinoma and *Helicobacter pylori* infection. *Western J. Med.* **161**, 60.
 9. Valenzuela M.A., Canales J., Corvalan A.H., Quest A.F. (2015) *Helicobacter pylori*-induced inflammation and epigenetic changes during gastric carcinogenesis. *W. J. Gastroenterol.* **21**, 12742–12756.
 10. Clarke S.J., Chua W., Moore M., Kao S., Phan V., Tan C., Charles K., McMillan D.C. (2011) Use of inflammatory markers to guide cancer treatment. *Clin. Pharmacol. Ther.* **90**, 475–478.
 11. Pflug K.M., Sitcheran R. (2020) Targeting NF- κ B-inducing kinase (NIK) in immunity, inflammation, and cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(22), 8470.
 12. Taniguchi K., Karin M. (2018) NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 309–324.
 13. Cartwright T., Perkins N.D., Wilson C.L. (2016) NFKB1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer. *FEBS J.* **283**, 1812–1822.
 14. Valovka T., Hottiger M.O. (2011) p65 controls NF- κ B activity by regulating cellular localization of I κ B β . *Biochem. J.* **434**, 253–263.
 15. Maeda S., Omata M. (2008) Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Sci.* **99**, 836–842.
 16. Greten F.R., Eckmann L., Greten T.F., Park J.M., Li Z.W., Egan L.J., Kagnoff M.F., Karin M. (2004) IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell.* **118**, 285–96.
 17. Keates S., Hitti Y.S., Upton M., Kelly C.P. (1997) *Helicobacter pylori* infection activates NF- κ B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology.* **113**, 1099–1109.
 18. Gambhir S., Vyas D., Hollis M., Aekka A., Vyas A. (2015) Nuclear factor kappa B role in inflammation associated gastrointestinal malignancies. *World J. Gastroenterol.* **21**, 3174–3183.
 19. Palena C., Hamilton D.H., Fernando R.I. (2012) Influence of IL-8 on the epithelial-mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future Oncol.* **8**, 713–722.
 20. Visciano C., Liotti F., Prevete N., Cali G., Franco R., Collina F., de Paulis A., Marone G., Santoro M., Melillo R.M. (2015) Mast cells induce epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell features in human thyroid cancer cells through an IL-8-Akt-Slug pathway. *Oncogene.* **34**, 5175–5186.
 21. Clevers H., Nusse R. (2012) Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell.* **149**, 1192–205.
 22. Chiurillo M.A. (2015) Role of the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer: an in-depth literature review. *World J. Exp. Med.* **5**, 84–102.
 23. Katoh M. (2003) WNT2 and human gastrointestinal cancer (review). *Int. J. Mol. Med.* **12**, 811–816.
 24. Kikuchi A., Yamamoto H., Kishida S. (2007) Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell. Signal.* **19**, 659–671.
 25. MacDonald B.T., Tamai K., He X. (2009) Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Develop. Cell.* **17**, 9–26.
 26. Katoh M. (2001) Frequent up-regulation of WNT2 in primary gastric cancer and colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* **19**, 1003–1007.
 27. Cheng X.X., Wang Z.C., Chen X., Sun Y., Kong Q.Y., Liu J., Gao X., Guan H.W., Li H. (2005) Frequent loss of membranous E-cadherin in gastric cancers: a cross-talk with Wnt in determining the fate of β -catenin. *Clin. Exp. Metastasis.* **22**, 85–93.
 28. Lin L., Wei H., Yi J., Xie B., Chen J., Zhou C., Wang L., Yang Y. (2019) Chronic CagA-positive *Helicobacter pylori* infection with MNNG stimulation synergistically induces mesenchymal and cancer stem cell-like properties in gastric mucosal epithelial cells. *J. Cell. Biochem.* **120**, 17635–17649.
 29. Keszei A.P., Goldbohm R.A., Schouten L.J., Jakszyn P., van den Brandt P.A. (2013) Dietary N-nitroso compounds, endogenous nitrosation, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes in the Netherlands Cohort Study. *Am. j. Clin. Nutr.* **97**, 135–146.
 30. Jakszyn P., Bingham S., Pera G., Agudo A., Luben R., Welch A., Boeing H., Del Giudice G., Palli D., Saieva C., Krogh V., Sacerdote C., Tumino R., Panico S., Berglund G., Siman H., Hallmans G., Sanchez M.J., Larranaga N., Barricarte A., Chirlaque M.D., Quiros J.R., Key T.J., Allen N., Lund E., Carneiro F., Linseisen J., Nagel G., Overvad K., Tjonneland A., Olsen A., Bueno-de-Mesquita H.B., Ocke M.O., Peeters P.H., Numans M.E., Clavel-Chapelon F., Trichopoulou A., Fenger C., Stenling R., Ferrari P., Jenab M., Norat T., Riboli E., Gonzalez C.A. (2006) Endogenous versus exogenous exposure to N-nitroso compounds and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST) study. *Carcinogenesis.* **27**, 1497–1501.
 31. Ah-Koon L., Lesage D., Lemadre E., Souissi I., Fagard R., Varin-Blank N., Fabre E.E., Schischmanoff O. (2016) Cellular response to alkylating agent MNNG is impaired in STAT1-deficient cells. *J. Cell. Mol. Med.* **20**, 1956–1965.
 32. Zhang C., Cai T., Zeng X., Cai D., Chen Y., Huang X., Gan H., Zhuo J., Zhao Z., Pan H., Li S. (2018) Astragaloside IV reverses MNNG-induced precancerous lesions of gastric carcinoma in rats: regulation on glycolysis through miRNA-34a/LDHA pathway. *Phytother. Res.* **32**, 1364–1372.

33. Yan Z. ., Xu T.T., An Z.T., Hu Y., Chen W.Z., Zhu F.S. (2018) Injury of human gastric epithelial GES-1 cells by MNNG and its effects on Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Sheng Li Xue Bao* (in Chinese). **70**, 262–268.
34. Tsukamoto T., Mizoshita T., Tatematsu M. (2007) Animal models of stomach carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* **35**, 636–648.
35. Alm R.A., Trust T.J. (1999) Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. *J. Mol. Med.* **77**, 834–846.
36. Zhang Y., Sun H., Chen X., Li J., Zhao H., Geng L., Li B. (2016) Functional profile of gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori* strains. *Microb. Pathog.* **95**, 77–81.
37. Wang L., Zhou Y., Peng J., Zhang Z., Jiang D.J., Li Y.J. (2008) Role of endogenous nitric oxide synthase inhibitor in gastric mucosal injury. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **86**, 97–104.
38. Guo X.B., Guo L., Zhi Q.M., Ji J., Jiang J.L., Zhang R.J., Zhang J.N., Zhang J., Chen X.H., Cai Q., Li J.F., Yan M., Gu Q.L., Liu B.Y., Zhu Z.G., Yu Y.Y. (2011) *Helicobacter pylori* induces promoter hypermethylation and downregulates gene expression of IRX1 transcription factor on human gastric mucosa. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **26**, 1685–1690.
39. Nurmi A., Vartiainen N., Pihlaja R., Goldsteins G., Yrjanheikki J., Koistinaho J. (2004) Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits translocation of nuclear factor κ-B in neurons and protects against brain ischaemia with a wide therapeutic time window. *J. Neurochem.* **91**, 755–765.
40. Zhang B., Xu J., Quan Z., Qian M., Liu W., Zheng W., Yin F., Du J., Zhi Y., Song N. (2018) Klotho protein protects human keratinocytes from UVB-induced damage possibly by reducing expression and nuclear translocation of NF-κB. *Med. Sci. Monit.* **24**, 8583–8591.
41. Fernandes J.C., Martel-Pelletier J., Pelletier J.P. (2002) The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology.* **39**, 237–246.
42. Monick M.M., Aksamit T.R., Geist L.J., Hunninghake G.W. (1994) Dexamethasone inhibits IL-1 and TNF activity in human lung fibroblasts without affecting IL-1 or TNF receptors. *Am. J. Physiol.* **267**, L33–L38.
43. Seidel P., Merfort I., Hughes J.M., Oliver B.G., Tamm M., Roth M. (2009) Dimethylfumarate inhibits NF-κB function at multiple levels to limit airway smooth muscle cell cytokine secretion. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **297**, L326–L339.
44. Liu A.Q., Xie Z., Chen X.N., Feng J., Chen J.W., Qin F.J., Ge L.Y. (2017) Fas-associated factor 1 inhibits tumor growth by suppressing *Helicobacter pylori*-induced activation of NF-κB signaling in human gastric carcinoma. *Oncotarget.* **8**, 7999–8009.
45. Shalapour S., Karin M. (2015) Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. *J. Clin. Investig.* **125**, 3347–3355.
46. David J.M., Dominguez C., Hamilton D.H., Palena C. (2016) The IL-8/IL-8R axis: a double agent in tumor immune resistance. *Vaccines.* **4**(3), 22.
47. Perugorria M.J., Olaizola P., Labiano I., Esparza-Baquer A., Marzioni M., Marin J.J.G., Bujanda L., Banales J.M. (2019) Wnt-beta-catenin signalling in liver development, health and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 121–136.
48. Basu S., Cheriyaundath S., Ben-Ze'ev A. (2018) Cell-cell adhesion: linking Wnt/β-catenin signaling with partial EMT and stemness traits in tumorigenesis. *F1000Res.* **7**, 1488.

IL-8 Links NF-κB and Wnt/β-Catenin Pathways in Persistent Inflammatory Response Induced by Chronic *Helicobacter pylori* Infection

L. Lin^{1, *}, B. Xie², J. Shi³, C. M. Zhou⁴, J. Yi², J. Chen², J. X. He⁵, and H. L. Wei^{2, **}

¹Department of Hematology & Oncology, Gansu Provincial Maternity and Child-Care Hospital, Lanzhou, Gansu, 730050 China

²Key Laboratory of Preclinical Study for New Drugs of Gansu Province, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu, 730000 China

³Department of Blood Transfusion, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu, 730000 China

⁴Department of Clinical Laboratory Center, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu, 730000 China

⁵Basic Medical College, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu, 730000 China

*e-mail: gsfy_2021@sina.com

**e-mail: weihulai@lzu.edu.cn

Helicobacter pylori (*H. pylori*) infection can cause persistent inflammatory response in human gastric mucosal epithelial cells, which may result in the occurrence of cancer. However, the underlying mechanism of carcinogenesis has not been elucidated yet. Herein, we established the models of chronic *H. pylori* infection in GES-1 cells and C57BL/6J mice. Interleukin 8 (IL-8) level was detected by ELISA. The expression of NF-κB p65, IL-8, Wnt2 and β-catenin mRNA and proteins was evaluated by real-time PCR, Western blotting, immunofluorescence staining, and immunohistochemistry. The infection of *H. pylori* in mice was evaluated by rapid urease test, H&E staining and Warthin–Starry silver staining. The morphological changes of gastric mucosa were observed by electron microscopy. Our results showed that in *H. pylori* infected gastric mucosal cells along with activation of NF-κB signaling pathway and increase of IL-8 level, the expression of Wnt2 was

also increased significantly, which preliminarily indicates that IL-8 can positively regulate the expression of *Wnt2*. Studies in chronic *H. pylori* infected C57BL/6J mice models showed that there was an increased incidence of premalignant lesions in the gastric mucosa tissue. Through comparing changes of gastric mucosal cell ultrastructure and analyzing the relationship between NF- κ B signaling pathway and *Wnt2* expression, we found that *H. pylori* infection activated NF- κ B signal pathways, and the massive release of IL-8 was positively correlated with the high expression of *Wnt2* protein. Subsequently, the activated Wnt/ β -catenin signal pathways may be involved in the malignant transformation of gastric mucosal cells. Collectively, *H. pylori* chronic infection may continuously lead to persistent inflammatory response: activate NF- κ B pathway, promote IL-8 release and thereby activate Wnt/ β -catenin pathway. IL-8 probably plays an important role of a linker in coupling these two signal pathways.

Keywords: *Helicobacter pylori*, interleukin 8, *Wnt2*, NF- κ B, signaling pathway, inflammation, gastric cancer

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.152.211

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ Dnmt3a
С ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ АНАЛОГАМИ S-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНА
И S-АДЕНОЗИЛГОМОЦИСТЕИНА© 2023 г. В. Л. Филонов^а, М. А. Хомутов^а, А. В. Сергеев^б, А. Л. Хандажинская^а, С. Н. Кочетков^а,
Е. С. Громова^{б, *}, А. Р. Хомутов^{а, **}^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия^бХимический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: gromova@genebee.msu.ru

**e-mail: alexkhom@list.ru

Поступила в редакцию 02.11.2022 г.

После доработки 08.12.2022 г.

Принята к публикации 08.12.2022 г.

Реакции ферментативного метилирования, катализируемые метилтрансферазами, играют важнейшую роль в метаболизме клеток. Основным донором метильных групп в этих реакциях служит S-аденозил-L-метионин. Акцепторами метильных групп могут быть нуклеиновые кислоты, белки, а также различные низкомолекулярные соединения. У млекопитающих метилирование остатков цитозина по положению C5 в CpG-последовательностях ДНК осуществляется *de novo* ДНК-метилтрансферазой Dnmt3a, а “рисунок метилирования” относится к факторам, определяющим эпигенетическую регуляцию экспрессии генов. В настоящей работе впервые исследовано взаимодействие фосфонистых и фосфоновых аналогов S-аденозил-L-метионина и S-аденозил-L-гомоцистеина, в которых карбоксильная группа заменена на соответствующий фосфорсодержащий фрагмент, с каталитическим доменом Dnmt3a. В реакции метилирования ДНК, катализируемой Dnmt3a, эти аналоги S-аденозил-L-метионина оказались лишь в 2 раза менее эффективными донорами метильной группы, чем природный S-аденозил-L-метионин. Оба фосфорсодержащих аналога S-аденозил-L-гомоцистеина, природного ингибитора метилтрансфераз, проявляли близкую ингибиторную активность в отношении Dnmt3a и были примерно в 4 раза менее активными, чем S-аденозил-L-гомоцистеин. Весьма неожиданной оказалась сопоставимость величин активностей фосфонистых и фосфоновых аналогов S-аденозил-L-метионина и S-аденозил-L-гомоцистеина, поскольку геометрия и заряд фосфорсодержащих фрагментов существенно различаются. Обсуждаются возможности использования фосфоаналогов S-аденозил-L-метионина и S-аденозил-L-гомоцистеина в качестве инструментов исследования метилтрансфераз.

Ключевые слова: метилирование ДНК, S-аденозил-L-метионин, S-аденозил-L-гомоцистеин, фосфорорганические аналоги, субстраты, ингибиторы

DOI: 10.31857/S0026898423040079, EDN: QLCJBH

ВВЕДЕНИЕ

Реакции переноса одноуглеродных остатков, в том числе реакции метилирования, катализируемые метилтрансферазами, играют важную роль в метаболизме клеток, а S-аденозил-L-метионин

(AdoMet) — основной донор метильных групп, занимает второе место после АТФ по разнообразию биохимических превращений, в которых он участвует [1]. Субстратами реакций метилирования служат ДНК, РНК, белки, а также низкомолекулярные соединения, а AdoMet может рассматриваться как второй субстрат во всех этих превращениях. Метилирование ДНК является одним из факторов, определяющих эпигенетическую регуляцию экспрессии генов эукариот [2, 3]. У млекопитающих метилированию подвергаются остатки цитозина по C5-положению в CpG-последовательностях ДНК, а распределение метилированных оснований образует “рисунок метилирования”, который устанавливается *de novo* C5-ДНК-метилтрансферазой (МТазой) Dnmt3a

Сокращения: МТазы — C5-ДНК-метилтрансферазы; Dnmt3a-CD — каталитический домен ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a; AdoMet — S-аденозил-L-метионин; AdoMet-P_H — 5'-{S-[3-амино-3-(гидрогидроксифосфорил)пропил]-S-метил}-5'-дезоксаденозин; AdoMet-P₅ — 5'-{S-[3-амино-3-(дигидроксифосфорил)пропил]-S-метил}-5'-дезоксаденозин; AdoHcy — S-аденозил-L-гомоцистеин; AdoHcy-P_H — 5'-[3-амино-3-(гидрогидроксифосфорил)пропил]-5'-дезоксаденозин; AdoHcy-P₅ — 5'-[3-амино-3-(дигидроксифосфорил)пропил]-5'-дезоксаденозин; PLP — пиридоксаль-5'-фосфат.

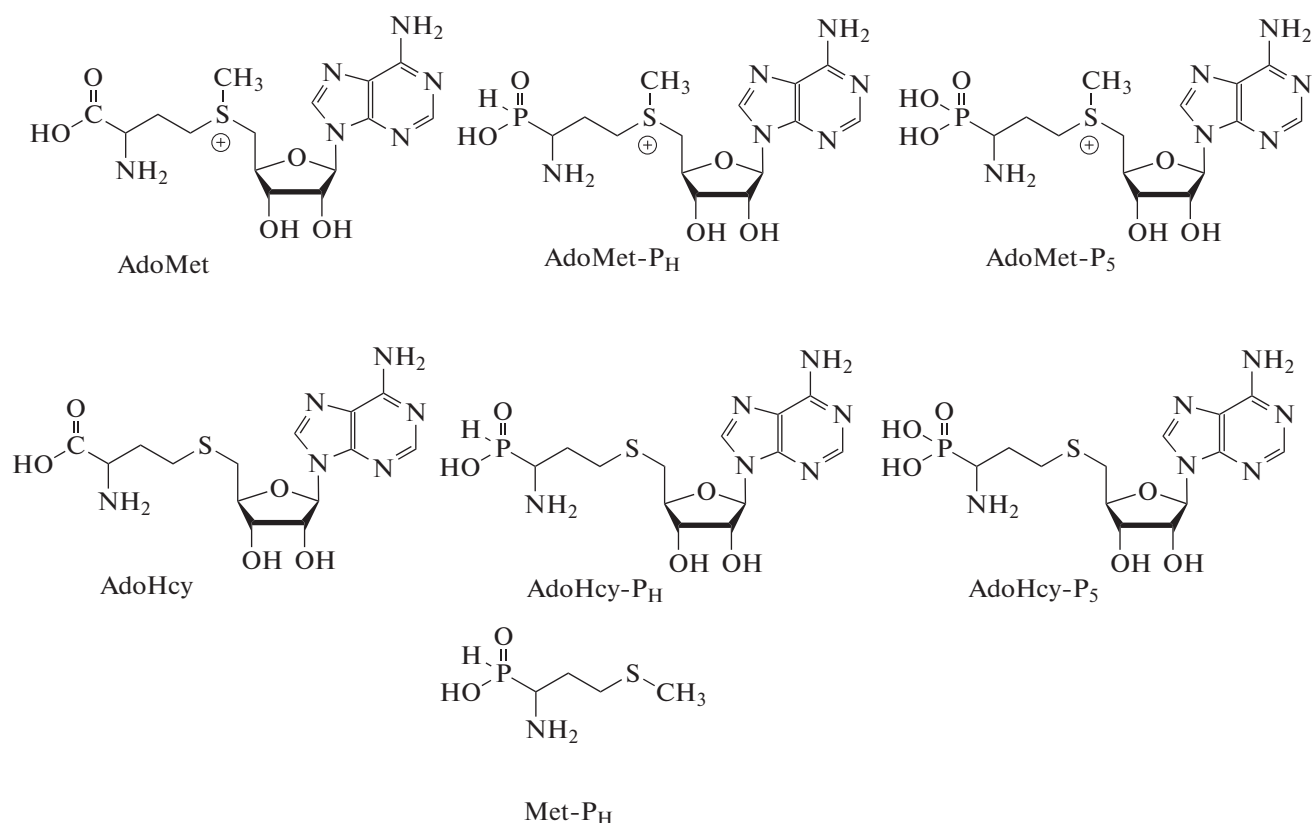


Рис. 1. Структуры *S*-аденозил-*L*-метионина (AdoMet), *S*-аденозил-*L*-гомоцистеина (AdoHcy), их фосфонистых (AdoMet-P_H и AdoHcy-P_H) и фосфоновых (AdoMet-P₅ и AdoHcy-P₅) аналогов, соответственно, а также фосфонистого аналога метионина (Met-P_H).

[4, 5]. Нарушения метилирования ДНК часто выявляют при онкологических заболеваниях — при общем гипометилировании генома наблюдается локальное гиперметилирование промоторных участков генов-супрессоров опухолей, а снижение активности МТаз приводит к реактивации этих генов и подавлению роста опухолевых клеток [6].

Как правило, модификации сульфониевого центра, amino- или карбоксильной групп AdoMet приводят к полной или частичной потере его сродства к ферменту [7]. Необычная способность МТазы Dnmt3a использовать вместо AdoMet некоторые его аналоги выделяет этот фермент среди других метилтрансфераз. В ряду производных AdoMet, в которых метильная группа сульфониевого центра заменена на этильную или пропильную, скорость переноса алкильного заместителя резко падает с увеличением его размера [8, 9]. Модификации AdoMet по аминогруппе метионинового фрагмента приводят к потере субстратных свойств AdoMet. Метилловый и этиловый эфиры AdoMet оказались донорами метильных групп в реакции, катализируемой прокариотической CpG-узнающей МТазой M.SssI, но несколько худшими, чем AdoMet [10]. Сходство каталитиче-

ских механизмов прокариотических цитозинных МТаз [11, 12] и соответствующих эукариотических ферментов [4] открывает дополнительные возможности для исследования Dnmt3a при помощи аналогов AdoMet с модифицированной HOOC-группой. Следует отметить, что подобные аналоги должны иметь свободную аминогруппу и сульфониевый центр, важные для их продуктивного связывания в активном центре Dnmt3a [13].

В настоящей работе химическими инструментами исследований служили фосфорорганические аналоги AdoMet и *S*-аденозил-*L*-гомоцистеина (AdoHcy), в которых карбоксильная группа заменена на фосфорсодержащий фрагмент (рис. 1), а основным из них был фосфонистый аналог AdoMet (AdoMet-P_H). Известно, что этот аналог является донором метильной группы в тРНК-метилтрансферазных реакциях (использована суммарная тРНК и препарат суммарных метилтрансфераз *E. coli* [14]). AdoMet-P_H синтезируется в клетках L1210, растущих в среде, содержащей фосфонистый аналог метионина (рис. 1, Met-P_H) [15]. AdoMet-P_H в отличие от AdoMet химически стабилен [16], а поскольку механизмы химического гидролиза AdoMet и AdoMet-лиазной реак-

ции заключаются во внутримолекулярном алкилировании карбоксильной группы, приводящем к образованию лактона гомосерина и 5'-метилтиоаденозина [17], то AdoMet-Р_н можно рассматривать не только как функционально активный, но и как катаболически устойчивый миметик AdoMet. Взаимодействие фосфоаналогов AdoMet и AdoHcy (рис. 1) с ДНК-метилтрансферазами ранее не изучали. В настоящей работе исследована способность AdoMet-Р_н и AdoMet-Р₅ (рис. 1) служить донорами метильной группы в реакции метилирования ДНК, катализируемой Dnmt3a, а также ингибирование этой реакции фосфоаналогами AdoHcy – AdoHcy-Р_н и AdoHcy-Р₅ (рис. 1).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Фосфоаналоги AdoMet и AdoHcy синтезированы согласно [18]. AdoMet, AdoHcy, остальные реагенты и соли получены от фирм “Sigma” (США), “Merck” (Германия), “Helicon” (Россия). Каталитический домен МТазы Dnmt3a (Dnmt3a-CD) выделяли согласно [19]. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда [20]. Эндонуклеаза рестрикции Hin6I получена от компании “Сибэнзим” (Россия). В работе использовали FAM-меченый 30-звенный ДНК-дуплекс (fGCGC/CGCGf):

5'-FAM-CTGAATACTACTTTGCGCTCTCTAACCTGAT

3'-GAC TTATGATGAACGCGAGAGATTGGACTA-FAM

который содержит метилируемый CpG-сайт в составе последовательности G*CGC – сайта узнавания Hin6I (звездочкой указаны места расщепления). Олигонуклеотиды, содержащие флуоресцентный краситель 6(5)-карбоксифлуоресцеин (FAM), присоединенный к 5'-концу через аминоклипер –NH–(CH₂)₆–, получены от компании “Синтол” (Россия). Буферный раствор А содержал 20 мМ HEPES-NaOH (pH 7.5), 100 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ 1,4-дителиотреитол.

Анализ образования тройного комплекса ДНК·(Dnmt3a-CD)·AdoHcy. Константу диссоциации (K_d) комплекса определяли с помощью метода поляризации флуоресценции прямым титрованием раствора ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf раствором Dnmt3a-CD. Смесь (120 мкл), содержащую 10 нМ ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf и 100 мкМ AdoHcy или его фосфоаналога в буфере А, инкубировали в течение 2 мин и регистрировали значение поляризации флуоресценции. Затем полученную смесь титровали 2 мкМ раствором Dnmt3a-CD, прибавляя аликвоты (0.5–2.0 мкл) фермента до конечной концентрации 700 нМ, и регистрировали значение поляризации флуоресценции через 2 мин после каждого прибавления. Зависимости поляризации флуоресценции от

концентрации фермента обрабатывали в соответствии с методикой, описанной в [19], используя уравнение Хилла:

$$\theta = \frac{(P - P_0)}{(P_m - P_0)} = \frac{[E]^n}{[E]^n + [K_d]^n},$$

где $[E]$ – концентрация Dnmt3a-CD; P_0 и P_m – значения поляризации флуоресценции свободной и полностью связанной FAM-меченой ДНК соответственно; n – коэффициент Хилла. Измерения поляризации флуоресценции ($\lambda_{ex} = 495$ нм, $\lambda_{em} = 520$ нм) проводили на приборе Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (“Varian”, США). Экспериментальные данные обрабатывали, используя программу OriginPro 2015.

Определение субстратных свойств фосфоаналогов AdoMet в реакции метилирования ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf, катализируемой Dnmt3a-CD. Эффективность метилирования ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf изучали, используя неспособность эндонуклеазы Hin6I осуществлять расщепление по метилированному сайту рестрикции (GC^mGC), аналогично [19]. Реакционную смесь, содержащую 0.3 мкМ ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf, 0.6–10 мкМ AdoMet или его фосфоаналогов (AdoMet-Р_н и AdoMet-Р₅) и 2 мкМ Dnmt3a-CD в буфере А, инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Реакцию останавливали нагреванием (95°C, 1 мин). Расщепление ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf эндонуклеазой рестрикции Hin6I (2 ед. акт. на 10 мкл смеси) проводили в той же реакционной смеси после добавления MgCl₂ (конечная концентрация 3 мкМ) в течение 60 мин при 37°C. Продукты реакции анализировали при помощи электрофореза в 20%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с 7 М мочевиной. Интенсивность флуоресценции ДНК в геле определяли с помощью Typhoon FLA 9500 (“GE Healthcare Life Science”, Австралия), используя программу Gel-QuantNET. Контролем служила смесь AdoMet или его фосфоаналогов с ДНК-дуплексом fGCGC/CGCGf и такая же смесь, содержащая Hin6I. Степень метилирования ДНК-дуплекса определяли по соотношению расщепленной и нерасщепленной ДНК, которое рассчитывали по формуле:

$$M = \frac{\omega_{R.Hin6I} - \omega_{Dnmt3a}}{\omega_{R.Hin6I}} \times 100\%,$$

где ω_{Dnmt3a} – степень расщепления ДНК эндонуклеазой после обработки Dnmt3a-CD; $\omega_{R.Hin6I}$ – степень расщепления ДНК без предварительного метилирования.

В случае реакций с участием фосфоаналогов AdoMet степень метилирования рассчитывали относительно соответствующей реакции с использованием AdoMet.

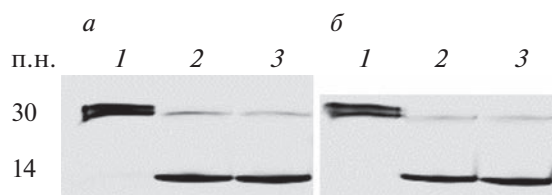


Рис. 2. Влияние AdoMet и его фосфоаналогов на активность эндонуклеазы рестрикции Hin6I. *а* – ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf (1); ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf + эндонуклеаза рестрикции Hin6I (2); ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf + эндонуклеаза рестрикции Hin6I + 25 мкМ AdoMet (3). *б* – ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf (1); ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf + эндонуклеаза рестрикции Hin6I + 25 мкМ AdoMet-Р_H (2); ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf + эндонуклеаза рестрикции Hin6I + 25 мкМ AdoMet-Р₅ (3). Продукты расщепления анализировали методом электрофореза в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной.

Определение ингибиторной активности фосфоаналогов AdoHcy в реакции метилирования ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf, катализируемой Dnmt3a-CD. Ингибиторные свойства фосфоаналогов AdoHcy (IC_{50}) оценивали, сравнивая с активностью AdoHcy. С этой целью реакционную смесь, содержащую 0.3 мкМ ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf, 0.6 мкМ AdoMet, 0–50 мкМ AdoHcy или одного из его фосфоаналогов и 2 мкМ Dnmt3a в буфере А, инкубировали в течение 60 мин при 37°C, реакцию останавливали нагреванием (95°C, 1 мин). Продукты реакции анализировали, как описано выше. Величины IC_{50} рассчитывали с помощью программы OriginPro 2015 согласно [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Активная форма Dnmt3a представляет собой тетрамер, содержащий по две молекулы Dnmt3a и регуляторного фактора Dnmt3L. В отсутствие Dnmt3L активную форму образуют четыре субъединицы Dnmt3a [21]. Субъединица Dnmt3a состоит из N-концевой регуляторной области и каталитического C-концевого домена (Dnmt3a-CD) [22], который способен осуществлять метилирование ДНК в отсутствие регуляторной части [23]. При этом каталитические свойства C-концевого домена и полноразмерного фермента идентичны [22]. В настоящей работе использован Dnmt3a-CD мыши, первичная структура которого совпадает с первичной структурой DNMT3A-CD человека [4, 24], что позволяет использовать Dnmt3a-CD мыши в качестве адекватной модели DNMT3A человека. В качестве модельного субстрата использовали FAM-меченый 30-звенный ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf [25], содержащий сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции Hin6I (GCGC). Если фрагмент CpG в составе этого сайта метилирован, то фермент не способен расщеплять модифицированный уча-

сток цепи ДНК. Флуоресцентные FAM-метки на 5'-концах модельного дуплекса позволяют определять активность Dnmt3a методом электрофореза в ПААГ, выявляя как интактный дуплекс, так и продукты его расщепления, количество которых зависит от степени метилирования [25].

Фосфоаналоги AdoMet и AdoHcy не влияют на активность эндонуклеазы рестрикции Hin6I

Метод определения активности Dnmt3a предусматривает использование двух последовательных ферментативных реакций: метилирования и расщепления ДНК-субстрата эндонуклеазой рестрикции Hin6I. Для исследования влияния фосфоаналогов AdoMet и AdoHcy на активность этой эндонуклеазы в реакционную смесь, не содержащую Dnmt3a-CD, вносили фосфоаналоги AdoMet или AdoHcy в концентрации 25 мкМ и расщепляли ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf эндонуклеазой. Оказалось, что степень расщепления этого дуплекса в присутствии как AdoMet, так и обоих его аналогов (рис. 1) составила около 90% (рис. 2). Подобные результаты получены для AdoHcy и его аналогов (данные не приведены).

Следовательно, расщепление эндонуклеазой можно проводить в той же реакционной смеси, в которой проводили метилирование, после добавления в нее ионов Mg^{2+} . Полученные данные позволили перейти к изучению субстратных свойств фосфоаналогов AdoMet и ингибиторной активности фосфоаналогов AdoHcy в реакции метилирования ДНК, катализируемое Dnmt3a.

Фосфоаналоги AdoMet являются донорами метильной группы в реакции метилирования ДНК, катализируемой Dnmt3a

Субстратом Dnmt3a служит неметилированный ДНК-дуплекс, а донор метильной группы, AdoMet, в ходе ферментативной реакции превращается в AdoHcy. Фосфоаналоги AdoMet, содержащие реакционноспособный сульфониевый центр (рис. 1), могут рассматриваться в качестве возможных доноров метильной группы несмотря на то, что карбоксильная группа AdoMet заменена на кислый фосфорсодержащий фрагмент. Метилирование ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf с использованием двух фосфоаналогов AdoMet (рис. 1) изучено при четырех различных концентрациях (0.6–10 мкМ) аналогов в течение 60 мин, так как после 60 мин дальнейшего накопления метилированной ДНК практически не наблюдается. Обнаружено, что и AdoMet-Р_H, и AdoMet-Р₅ являются примерно в 2 раза менее эффективными донорами метильных групп, чем природный AdoMet (рис. 3).

Таким образом, несмотря на существенное различие в строении фосфорсодержащих фраг-

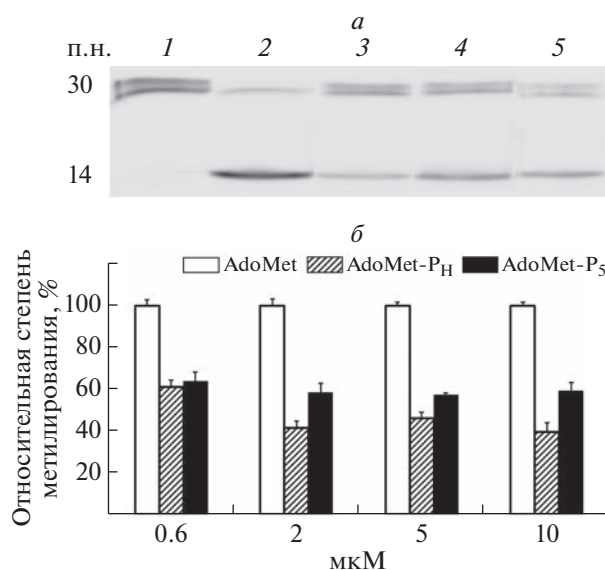


Рис. 3. Метилирование ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf МТазой Dnmt3a-CD с использованием AdoMet, AdoMet-P_H и AdoMet-P₅ в качестве доноров метильной группы. *а* – Анализ расщепления ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf эндонуклеазой Hin6I до и после метилирования (60 мин), электрофорез в 20%-ном ПААГ с 7 М мочевиной. 1 – ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf; 2 – ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf + эндонуклеаза рестрикции Hin6I; 3–5 – метилированный ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf (0.6 мкМ AdoMet или 0.6 мкМ AdoMet-P_H, или 0.6 мкМ AdoMet-P₅ соответственно) после обработки эндонуклеазой рестрикции Hin6I. *б* – Сравнение эффективности метилирования ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf при использовании в качестве доноров метильной группы AdoMet, AdoMet-P_H и AdoMet-P₅ (0.6, 2, 5 и 10 мкМ). Значения степеней метилирования приведены относительно AdoMet, среднее из шести независимых экспериментов. Указаны стандартные отклонения.

ментов, и AdoMet-P_H, и AdoMet-P₅ служат донорами метильных групп в реакции метилирования ДНК, а их активность оказалась сопоставимой с активностью AdoMet.

AdoHcy-P_H и AdoHcy-P₅ образуют тройные комплексы с ДНК-дуплексом fGCGC/CGCGf и Dnmt3a-CD

AdoHcy, копродукт реакций метилирования и эффективный природный ингибитор многих метилтрансфераз [26], взаимодействует с Dnmt3a и ДНК, формируя тройной комплекс ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf·Dnmt3a·AdoHcy. Нами изучена возможность образования и стабильность тройных комплексов ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf·Dnmt3a-CD·AdoHcy-P_H(P₅) методом поляризации флуоресценции в сравнении с комплексом, образованным AdoHcy. Константы диссоциации (K_d) этих тройных комплексов вычисляли на основе данных прямого титрования растворов,

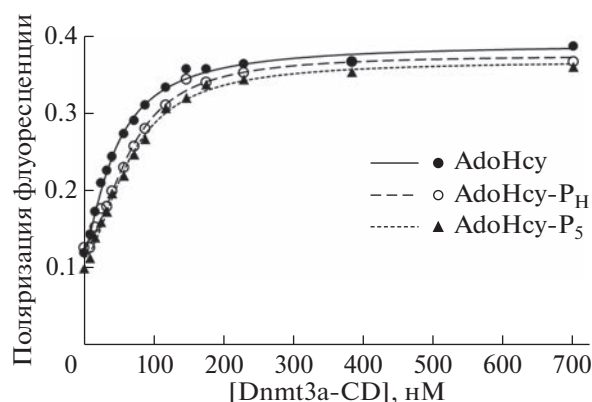


Рис. 4. Изотермы образования тройных комплексов ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf·Dnmt3a-CD·AdoHcy/AdoHcy-P_H/AdoHcy-P₅, полученные методом поляризации флуоресценции. Состав реакционной смеси: 10 нМ ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf, 100 мкМ AdoHcy, 100 мкМ AdoHcy-P_H или 100 мкМ AdoHcy-P₅ в буфере А.

содержащих ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf (10 нМ), AdoHcy или один из его фосфоаналогов (100 мкМ), раствором Dnmt3a-CD до достижения конечной концентрации фермента 700 нМ (рис. 4). Во всех случаях коэффициент Хилла (*n*) был больше единицы (табл. 1), что свидетельствовало о кооперативности связывания ДНК с Dnmt3a-CD. Значения K_d всех трех комплексов приблизительно равны (табл. 1), таким образом, строение кислого фрагмента AdoHcy мало влияет на устойчивость тройных комплексов ДНК-дуплекс fGCGC/CGCGf·Dnmt3a-CD·AdoHcy/AdoHcy-P_H(P₅).

Фосфоаналоги AdoHcy ингибируют метилирование ДНК, катализируемое Dnmt3a

Способность фосфоаналогов AdoHcy стабилизировать комплекс Dnmt3a-CD с ДНК так же эффективно, как и AdoHcy, позволяет предположить, что эти соединения могут быть и ингибиторами Dnmt3a. Ингибирующую активность фосфоаналогов AdoHcy определяли в реакционной смеси, содержащей AdoMet (0.6 мкМ), варьируя концентрации фосфоаналогов AdoHcy (0–50 мкМ). Зна-

Таблица 1. Значения констант диссоциации (K_d) и коэффициентов Хилла (*n*) тройных комплексов ДНК·Dnmt3a-CD·AdoHcy/AdoHcy-P_H/AdoHcy-P₅, рассчитанные на основании трех экспериментов

Лиганд	K_d , нМ	<i>n</i>
AdoHcy	51 ± 7	1.5 ± 0.3
AdoHcy-P _H	66 ± 2	2.2 ± 0.4
AdoHcy-P ₅	64 ± 12	1.9 ± 0.2

Примечание. Указаны стандартные отклонения.

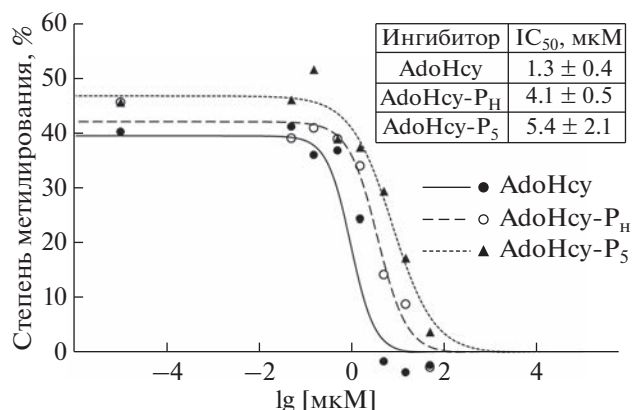


Рис. 5. Зависимость эффективности ингибирования метилирования ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf МТазой Dnmt3a-CD за 60 мин от логарифма концентрации AdoHcy, AdoHcy-P_H или AdoHcy-P₅. На вставке приведены значения IC₅₀ для AdoHcy, AdoHcy-P_H и AdoHcy-P₅, рассчитанные на основании трех независимых экспериментов. Указаны стандартные отклонения.

чения IC₅₀ для трех ингибиторов вычисляли, исходя из зависимостей степени метилирования ДНК-дуплекса fGCGC/CGCGf МТазой Dnmt3a-CD от концентрации AdoHcy, AdoHcy-P_H и AdoHcy-P₅ (рис. 5). Оказалось, что оба фосфоаналога являются ингибиторами Dnmt3a-CD, а значения IC₅₀ этих соединений близки между собой и примерно в 4 раза выше, чем у AdoHcy (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Замена карбоксильной группы в молекулах аминокислот на кислый фосфорсодержащий фрагмент приводит к аналогам разных видов, включая аминокислотные (I) и аминокислотные (II) кислоты (рис. 6).

Наиболее хорошо исследованы аминокислотные кислоты (I), которые, как правило, оказываются слабыми конкурентными ингибиторами соответствующих ферментов метаболизма аминокислот или, намного реже, субстратами, сродство которых ниже, чем у природных аминокислот [27, 28]. Это связано с тем, что фосфоновый остаток, представляющий собой двухзарядный тетраэдр, плохо моделирует плоскую карбоксильную группу. Однако существует и ряд исключений. Так, фосфоновый аналог аланина (*L*-Ala-P₅, рис. 6, R = CH₃), не содержащий реакционноспособных групп, необратимо ингибирует рацемизацию аланина [29], а фосфоновый аналог *S*-аденозил-*L*-гомоцистеина (AdoHcy-P₅, рис. 1) необратимо ингибирует AdoHcy-гидролазу [30]. Следует отметить, что в последнем случае активны как *S*-, так и *R*-изомеры, но активность *S*-изомера намного выше, чем у *R*-изомера: K_i = 345 ± 3 мкМ,

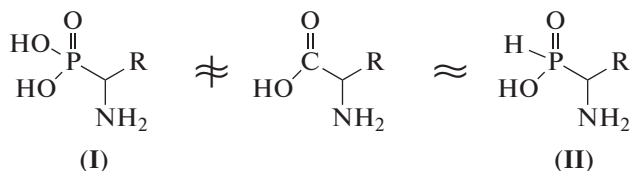


Рис. 6. Аминокислоты, их α-аминофосфоновые (I) и α-аминофосфонистые (II) аналоги.

$k_{\text{inact}} = 0.0049 \text{ мин}^{-1}$ и $K_i = 1094 \pm 49 \text{ мкМ}$, $k_{\text{inact}} = 0.0145 \text{ мин}^{-1}$ соответственно [30]. Обычно аминокислотные кислоты используют в качестве аналогов промежуточных состояний HOOC-группы. Среди соответствующих производных найдены эффективные ингибиторы ферментов, в том числе и соединения, находящие практическое применение в медицине и сельском хозяйстве [27].

Аминокислотные кислоты (II) существенно менее исследованы по сравнению с аминокислотными (I) [28]. В этом случае однозарядный фосфонистый фрагмент, представляющий собой сплюснутый тетраэдр, достаточно хорошо моделирует плоскую карбоксильную группу, поэтому аминокислотные кислоты, в отличие от аминокислотных, оказываются субстратами некоторых ферментов. Фосфонистый аналог аланина (рис. 6, II, R = CH₃) эффективно превращается под действием PLP-зависимой аланин-аминотрансферазы в фосфонистый аналог пирувата [31, 32], который является необратимым наномолярным ингибитором пируватдегидрогеназы [33]. Проксимальные фосфонистые аналоги аспарагиновой и глутаминовой кислот (рис. 6, II, R = HO(O)CCH₂- и R = HO(O)CCH₂CH₂- соответственно) превращаются PLP-зависимой аспарат-аминотрансферазой в соответствующие α-кетопосфонистые кислоты [34]. PLP-зависимая тирозин-фенол-лиаза расщепляет фосфонистый аналог тирозина с образованием фосфонистого аналога пирувата [35, 36]. Фосфонистые кислоты оказались субстратами некоторых NAD-зависимых ферментов, например, фосфонистые аналоги пирувата и лактата легко взаимопревращаются под действием лактатдегидрогеназы [31], а полуальдегид фосфонистого аналога янтарной кислоты окисляется до фосфонистого аналога сукцината под действием сукцинил-полуальдегиддегидрогеназы [37]. Фосфонистые аналоги метионина (Met-P_H, рис. 1) и AdoMet-P_H (рис. 1) не являются исключением. Еще в ранних работах показали, что Met-P_H служит субстратом обмена АТР-PP_i, катализируемого аминокислот-тРНК-синтетазой [38]. Met-P_H был субстратом PLP-зависимой Met-γ-лиазы, расщепляясь до фосфонистого аналога α-кетобутирата [39]. Met-P_H, подобно природному Met, способен индуцировать биосинтез Met-

γ -лиазы в клетках *Citrobacter intermedius* [40]. Эти данные свидетельствуют о структурно-функциональном подобии Met- P_H и Met. Наконец, образование AdoMet- P_H в клетках L1210, выращенных в присутствии нетоксичных концентраций Met- P_H , по-видимому, можно рассматривать как одну из причин ингибирования роста этих клеток, поскольку экзогенный AdoMet- P_H был даже несколько эффективнее Met- P_H [15].

В настоящей работе впервые изучена способность фосфонистого (AdoMet- P_H) и фосфонового (AdoMet- P_5) аналогов AdoMet служить донорами метильной группы в реакции, катализируемой Dnmt3a. Оказалось, что субстратные свойства этих аналогов не зависят от строения фосфорсодержащего фрагмента молекулы, и оба соединения примерно в 2 раза менее активны, чем природный AdoMet (рис. 3б). AdoHcy- P_H и AdoHcy- P_5 (рис. 1) представляют собой аналоги AdoHcy, природного ингибитора метилтрансфераз. Оба фосфоаналога в равной степени ингибировали Dnmt3a, но несколько менее эффективно, чем AdoHcy (рис. 5). Следует отметить, что преинкубация фермента с AdoHcy- P_H или AdoHcy- P_5 не влияла на эффективность торможения (данные не приведены), что может указывать на обратимый характер ингибирования фермента. Если сравнивать субстратные свойства аналогов AdoMet и ингибиторную активность аналогов AdoHcy в отношении Dnmt3a и суммарных тРНК-метилтрансфераз *E. coli*, то в последнем случае AdoMet- P_H был на 1–2 порядка активнее AdoMet- P_5 , а его сродство к ферменту было таким же, как и у природного AdoMet [14]. Аналогичные закономерности наблюдались и в случае ингибирования тРНК-метилтрансфераз *E. coli* фосфоаналогами AdoHcy [14]. Такие различия между двумя ферментами обусловлены, скорее всего, особенностями связывания субстрата в активных центрах — система связывания метионинового фрагмента AdoMet в активном центре МТаз мало зависит от ионного состояния карбоксильной группы, поскольку метиловый и этиловый эфиры AdoMet все-таки оказываются донорами метильной группы [10].

Изучение взаимодействия AdoMet- P_H с метилтрансферазами важно для создания регуляторов этих ферментов, так как очевидно, что AdoMet- P_H не будет донором метильной группы во всех метилтрансферазных реакциях. Следует отметить, что в клетках L1210, выращенных в присутствии Met- P_H , детектируется AdoMet- P_H , но не AdoHcy- P_H [15]. Можно предположить, что *de novo* синтезированный AdoMet- P_H в присутствии природного AdoMet оказывается малоэффективным субстратом метилтрансфераз. Нельзя исключить, что *de novo* синтезированный AdoMet- P_H может рас-

познаваться клетками L1210 как AdoMet подобно тому, как клетки *C. intermedius* узнают Met- P_H как Met [40]. В пользу такого предположения свидетельствуют и субстратные свойства фосфонистых аналогов аминокислот в отношении соответствующих ферментов метаболизма аминокислот (см. выше), подтверждающие, что фосфонистый остаток можно рассматривать в качестве биоизостера НООС-группы. Соответственно, если AdoMet- P_H действительно распознается клетками L1210 как AdoMet, то это может привести к изменению соотношения AdoMet/AdoHcy, критичному для эффективного протекания реакций метилирования, и ингибированию роста клеток.

Способность AdoMet- P_H быть донором метильной группы в реакции метилирования ДНК, катализируемой Dnmt3a, представляет безусловный интерес. В совокупности с описанными выше субстратоподобными превращениями Met- P_H , включая и биосинтез AdoMet- P_H в клетках L1210, формирует базу для использования этого аналога AdoMet в качестве инструмента изучения реакций, катализируемых метилтрансферазами. Химическая и ферментативная устойчивость AdoMet- P_H делает этот аналог удобным в работе, в отличие от AdoMet, недостаточно стабильного в физиологических условиях.

Настоящее исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда проект № 22-24-00368 (исследование образования тройных комплексов методом поляризации флуоресценции) и проект № 22-14-00291 (остальные части работы).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klimasauskas S., Lukinavicius G. (2008) AdoMet-dependent methyltransferases. *Chemistry of Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. John Wiley & Sons, Inc.
2. Mensah I.K., Norvil A.B., AlAbdi L., McGovern S., Petell Ch.J., He M., Gowher H. (2021) Misregulation of the expression and activity of DNA methyltransferases in cancer. *NAR Cancer*. **3**, 1–20.
3. Moore L.D., Le T., Fan G. (2013) DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. **38**, 23–38.
4. Jurkowska R.Z., Jurkowski T.P., Jeltsch A. (2011) Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem*. **12**, 206–222.
5. Bird A. (1999) DNA methylation *de novo*. *Science*. **286**, 2287–2288.
6. Gros C., Fahy J., Halby L., Dufau I., Erdmann A., Gregorie J.-M., Ausseil F., Vispé S., Arimondo P.B.

- (2012) DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches. *Biochimie*. **94**, 2280–2296.
7. Huber T.D., Johnson B.R., Zhang J., Thorson J.S. (2016) AdoMet analog synthesis and utilization: current state of the art. *Curr. Opin. Biotechnol.* **42**, 189–197.
 8. Dalhoff Ch., Lukinavicius G., Klimasauskas S., Weinhold E. (2006) Synthesis of *S*-adenosyl-*L*-methionine analogs and their use for sequence-specific transalkylation of DNA by methyltransferases. *Nat. Protoc.* **1**, 1879–1886.
 9. Klimasauskas S., Weinhold E. (2007) A new tool for biotechnology: AdoMet-dependent methyltransferases. *Trends Biotechnol.* **25**, 99–104.
 10. Wijayasinghe Y.S., Blumenthal R.M., Viola R.E. (2014) Producing proficient methyl donors from alternative substrates of *S*-adenosylmethionine synthetase. *Biochemistry*. **53**, 1521–1526.
 11. Wu J.C., Santi D.V. (1987) Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **262**, 4778–4786.
 12. Klimasauskas S., Kumar S., Roberts R.J., Cheng X. (1994) HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell*. **76**, 357–369.
 13. Tomkuvienė M., Kriukienė E., Klimašauskas S. (2016) DNA labeling using DNA methyltransferases. DNA methyltransferases – role and function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **945**, 511–535.
 14. Сырку В.И., Завалова Л.Л., Хомутов Р.М. (1986) Химическое регулирование *S*-аденозилметионинзависимых ферментативных реакций фосфорганическими аналогами *S*-аденозилметионина и *S*-аденозилгомоцистеина. *Биоорган. химия*. **12**, 839–841.
 15. Хомутов Р.М., Жуков Ю.Н., Хомутов А.Р., Хурс Е.Н., Крамер Д.Л., Миллер Дж.Т., Портер К.В. (2000) Фосфиновый аналог метионина тормозит рост лейкозных клеток L1210 и превращается в фосфиновый аналог *S*-аденозилметионина. *Биоорган. химия*. **26**, 718–720.
 16. Alferov K.V., Zhukov Yu.N., Khurs E.N., Khomutov R.M. (2003) Stable organophosphorus analogues of *S*-adenosylmethionine and *S*-methylmethionine. *Mendeleev Commun.* **13**, 243–244.
 17. Guo X., Söderholm A., Kanchugal P. S., Isaksen G.V., Warsi O., Eckhard U., Trigüis S., Gogoll A., Jerlström-Hultqvist J., Åqvist J., Andersson D.I., Selmer M. (2021) Structure and mechanism of a phage-encoded SAM lyase revises catalytic function of enzyme family. *eLife*. **10**, 1–29.
 18. Жуков Ю.Н., Хомутов А.Р., Осипова Т.И., Хомутов Р.М. (1999) Синтез фосфиновых аналогов серосодержащих аминокислот. *Изв. АН. Сер. хим.* **7**, 1360–1363.
 19. Сергеев А.В., Тевяшова А.Н., Воробьев А.П., Громова Е.С. (2019) Влияние противоопухолевого антибиотика оливомицина А и нового полусинтетического производного, оливамида, на функционирование ДНК-метилтрансферазы мыши Dnmt3a. *Биохимия*. **84**, 229–239.
 20. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
 21. Jia D., Jurkowska R.Z., Zhang X., Jeltsch A., Cheng X. (2007) Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for *de novo* DNA methylation. *Nature*. **449**, 248–251.
 22. Chen T., Li E. (2004) Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr. Top. Dev. Biol.* **60**, 55–89.
 23. Gowher H., Jeltsch A. (2002) Molecular enzymology of the catalytic domains of the Dnmt3a and Dnmt3b DNA methyltransferases. *J. Biol. Chem.* **277**, 20409–20414.
 24. Okano M., Xie S., Li E. (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* **19**, 219–220.
 25. Сергеев А.В., Кирсанова О.В., Лойко А.Г., Номероцкая Е.И., Громова Е.С. (2018) Определение степени метилирования ДНК метилтрансферазой Dnmt3a с использованием метилзависимых эндонуклеаз рестрикции. *Молекуляр. биология*. **52**, 318–325.
 26. Lu S.C., Mato J.M. (2012) *S*-adenosylmethionine in liver health, injury, and cancer. *Physiol. Rev.* **92**, 1515–1542.
 27. Kafarski P. (2020) Phosphonopeptides containing free phosphonic groups: recent advances. *RSC Adv.* **10**, 25898–25910.
 28. Horsman G.P., Zechel D.L. (2017) Phosphonate biochemistry. *Chem. Rev.* **117**, 5704–5783.
 29. Badet B., Inagaki K., Soda K., Walsh C.T. (1986) Time-dependent inhibition of *Bacillus stearothermophilus* alanine racemase by (1-aminoethyl)phosphonate isomers by isomerization to noncovalent slowly dissociating enzyme-(1-aminoethyl)phosphonate complexes. *Biochemistry*. **25**, 3275–3282.
 30. Steere J.A., Sampson P.B., Honek J.F. (2002) Synthesis of an α -aminophosphonate nucleoside as an inhibitor of *S*-adenosyl-*L*-homocysteine hydrolase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**, 457–460.
 31. Laber B., Amrhein N. (1987) Metabolism of 1-aminoethylphosphinate generates acetylphosphinate, a potent inhibitor of pyruvate dehydrogenase. *Biochem. J.* **248**, 351–358.
 32. Хомутов Р.М., Хурс Е.Н., Джавахия В.Г., Воинова Т.М., Ермолинский Б.С. (1987) 1-Аминоэтилфосфонистая кислота – новый ингибитор поликетидного пути биосинтеза природных соединений. *Биоорган. химия*. **13**, 1422–1424.
 33. Bunik V.I., Artiukhov A., Kazantsev A., Goncalves R., Daloso D., Oppermann H., Kulakovskaya E., Lukashchev N., Fernie A., Brand M., Gaunitz F. (2015) Specific inhibition by synthetic analogs of pyruvate reveals that the pyruvate dehydrogenase reaction is essential for metabolism and viability of glioblastoma cells. *Oncotarget*. **6**, 40036–40052.
 34. Хурс Е.Н., Осипова Т.И., Хомутов Р.М. (1989) Ферментативное переаминирование фосфорорганических аналогов аспартата и глутамата. *Биоорган. химия*. **15**, 552–555.
 35. Хомутов Р.М., Фалеев Н.Г., Белянкин А.В., Хурс Е.Н., Хомутов А.Р., Перышкова О.Е., Беликов В.М. (1997) 1-Амино-2-(4-гидроксифенил)этилфосфонистая кислота – новый субстрат тирозин-феноллазы. *Биоорган. химия*. **23**, 919–921.

36. Faleev N.G., Zhukov Yu.N., Khurs E.N., Gogoleva O.I., Barbolina M.V., Bazhulina N.P., Belikov V.M., Demidkina T.V., Khomutov R.M. (2000) Interaction of tyrosine phenol-lyase with phosphoroorganic analogues of substrate amino acids. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6897–6902.
37. De Biase D., Cappadocio F., Pennacchietti E., Giovannercole F., Coluccia A., Vepsäläinen J., Khomutov A. (2020) Enzymatic kinetic resolution of desmethylphosphinothricin indicates that phosphinic group is a bioisostere of carboxyl group. *Commun. Chem.* **3**, 121.
38. Biryukov A.I., Osipova T.I., Khomutov R.M. (1978) α -Aminophosphonous acids: the substrates of ATP-PPi exchange reaction, catalysed by aminoacyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* **91**, 246–248.
39. Faleev N.G., Alferov K.V., Tsvetikova M.A., Morozova E.A., Revtovich S.V., Khurs E.N., Vorob'ev M.M., Phillips R.S., Demidkina T.V., Khomutov R.M. (2009) Methionine γ -lyase: mechanistic deductions from the kinetic pH-effects. The role of the ionic state of a substrate in the enzymatic activity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1794**, 1414–1420.
40. Alferov K.V., Faleev N.G., Khurs E.N., Zhukov Yu.N., Khomutov R.M. (2002) A phosphinic analogue of methionine is a substrate of L-methionine- γ -lyase and induces the synthesis of the enzyme in *Citrobacter inter-medius* cells. *Mendeleev Commun.* **12**, 2–3.

Interaction of DNA Methyltransferase Dnmt3a with Phosphorus Analogues of S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine

V. L. Filonov¹, M. A. Khomutov¹, A. V. Sergeev², A. L. Khandazhinskaya¹, S. N. Kochetkov¹,
E. S. Gromova^{2, *}, and A. R. Khomutov^{1, **}

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

²Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: gromova@genebee.msu.ru

**e-mail: alexkhom@list.ru

Enzymatic methyltransferase reactions are of crucial importance for cellular metabolism, and S-adenosyl-L-methionine is the main donor of the methyl group. DNA, RNA, proteins, and low-molecular-weight compounds are the substrates of methyltransferases. In mammals, methylation of the C5 position of cytosine residues in CpG sequences in DNA is performed *de novo* by DNA methyltransferase Dnmt3a. “Methylation pattern” is one of the factors determining the epigenetic regulation of gene expression. In the present work, we investigated the interaction of phosphonous and phosphonic analogues of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine with the catalytic domain of Dnmt3a. The phosphonous and phosphonic analogs of S-adenosyl-L-methionine were shown to be substrates of Dnmt3a, and the efficiency of the methylation was only two times less than that of natural S-adenosyl-L-methionine. Both phosphorus-containing analogs of S-adenosyl-L-homocysteine, a natural methyltransferase inhibitor, exhibited similar inhibitory activity against Dnmt3a and were approximately four times less active than S-adenosyl-L-homocysteine. The activities of the phosphonous and phosphonic analogs turned out to be close that was quite unexpected, since the geometry and charge of the phosphorus-containing groups differ significantly. The possibilities of using phosphorus-containing analogs of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine as promising tools for the investigation of methyltransferases are discussed.

Keywords: DNA methylation, S-adenosyl-L-methionine, S-adenosyl-L-homocysteine, organophosphorous analogues, substrates, inhibitors

УДК 575.112:[593.8:577.354]

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ TRPC-МЕХАНОРЕЦЕПТОРОВ ГРЕБНЕВИКА *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865¹

© 2023 г. А. В. Кузнецов^{a, b}, Д. Н. Втюрина^{c, *}^aФедеральный исследовательский центр Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского Российской академии наук, Севастополь, 299011 Россия^bСевастопольский государственный университет, Севастополь, 299053 Россия^cФедеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: vtyurinad@gmail.com

Поступила в редакцию 03.09.2022 г.

После доработки 06.11.2022 г.

Принята к публикации 22.11.2022 г.

Гребневик (*Ctenophora*) *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 отвечает на слабое механическое раздражение интенсивной люминесценцией, однако механизм этого явления не известен. Нами проведен поиск возможных тактильных рецепторов, которые иницируют сигнальную трансдукцию, заканчивающуюся люминесценцией фотобелков. В геноме *M. leidyi* найдены три гена ортолога TRPC-белков мыши (5z96) и дрозофилы (5vkq) — ML234550a-PA (860 aa), ML03701a-PA (828 aa) и ML038011a-PA (1395 aa). Последний белок содержит длинную анкириновую спираль, состоящую из 16 ANK-доменов. Изучение аннотированных доменов и сети взаимодействий между белками интерактома позволяет предположить, что белки ML234550a-PA и ML03701a-PA осуществляют цитоплазматическую, а ML038011a-PA — внутриядерную трансдукцию механических сигналов. Пространственная реконструкция выявила различия в структуре этих белков, что может быть связано с их разными функциями в клетке. Обсуждается, какой из этих белков участвует в инициации люминесценции после механического раздражения.

Ключевые слова: *Ctenophora*, геном, механорецепторы, TRPC-каналы, интерактом**DOI:** 10.31857/S0026898423040122, **EDN:** QLQZZG

ВВЕДЕНИЕ

Представители суперсемейства ионных каналов с транзиторным рецепторным потенциалом (TRP) — эволюционно древние сенсорные белки, которые регулируют проникновение катионов кальция в клетки [1]. Эти белки отвечают за восприятие тепла, физических контактов, болевых и вкусовых ощущений, а также иногда участвуют в зрительных процессах [2]. Большинство TRP-каналов объединены в две группы: первая группа включает катионные каналы TRPA (A — анки-

рин), TRPC (C — канонический), TRPN (N — нет механорецепторного потенциала C), TRPM (M — меластатин), TRPS (S — соромеластатин), TRPV (V — ванилоидный) и TRPVL (VL — ванилоидоподобный); вторая группа содержит TRPML (L — муколипин) и TRPP (P — поликистоз) [3]. Некоторые TRP-каналы активируются соединениями, содержащимися в чесноке (аллицин), перце (капсаицин), васabi (аллилизотиоцианат), другие чувствительны к камфоре, ментолу, мяте перечной или соединениям конопли [4]. Известны TRP-каналы, которые действуют как датчики вибрации, растяжения и осмотического давления [5]. Большинство ионных каналов регулируется окружающими их липидами клеточной мембраны [6].

Мы предположили, что биологические функции TRP-рецепторов могут модулироваться “соседними” белками и низкомолекулярными лигандами, а спектральная чувствительность этих сенсоров зависит от числа анкириновых повторов (AR), что позволяет им выполнять различные

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898423040122 для авторизованных пользователей.

Сокращения: aa — аминокислотные остатки (при цифре); TRP (англ. Transient Receptor Potential) — транзиторный рецепторный потенциал; TRPC — (C — канонический); TRPA (A — анкирин); TRPN (N — нет механорецепторного потенциала C); TRPM (M — меластатин); TRPS (S — соромеластатин); TRPV (V — ванилоидный), TRPVL (VL — ванилоидоподобный); TRPML (ML — муколипин); TRPP (P — поликистоз); ANK — анкириновый домен.

функции — от терморецепторов с короткими анкириновыми спиралями и высокой резонансной частотой до тактильных рецепторов с длинными анкириновыми спиралями и низкой резонансной частотой макромолекулы [7]. В представленном исследовании проведен анализ трех белков гребневика *Mnemiopsis leidyi*, возможных кандидатов на роль механорецепторов. *M. leidyi*, геном которого полностью секвенирован [8], входит в число базальных Metazoa [9–11], которые могут использоваться при изучении эволюции сенсорных систем [12, 13].

Цель нашей работы состояла в 3D-реконструкции TRP-рецепторов гребневика *M. leidyi*. С использованием данных [7] в геноме *M. leidyi* найдены гомологичные гены и определены аминокислотные последовательности белков, кодируемых этими генами, что позволило описать доменную структуру белков, выявить их ближайших соседей в сети белок-белковых взаимодействий и восстановить трехмерную структуру исследуемых полипептидов. Такой большой класс механорецепторов, как пьезобелки [14], мы не рассматривали, так как гены этих белков в геноме *M. leidyi* предположительно отсутствуют (данные не представлены).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аминокислотные последовательности механорецепторов гребневика *M. leidyi* найдены в базе данных NCBI [8].

Множественное выравнивание полипептидных цепей и построение филогенетического дерева выполнено с помощью программ Clustal Omega (1.2.4) [15] и TreeDyn 198.3 [16] соответственно.

Профили гидрофобности по Kyte-Doolittle определяли с помощью программы ProtScale [17].

Анализ доменной структуры белков осуществляли на сервере Pfam 35.0 [18], взаимодействие доменов исследовали и визуализировали с помощью сервера STRING (Protein–Protein Interaction Networks Functional Enrichment Analysis), согласно [19].

Построение пространственных моделей механорецепторов проводили на сервере Phyre2, используя метод сравнения гомологичных аминокислотных последовательностей с известными пространственными структурами белков. Оценивали достоверность и степень покрытия исследуемых последовательностей [20].

Визуализацию молекулярных структур выполняли с использованием программ RasMol [21] и UCSF Chimera [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В основу нашего исследования положены знания о классическом механорецепторе NompC (5vkq) *Drosophila melanogaster* [23]. NompC входит в семейство TRPN-белков, включающих трансмембранный домен, область шейки и четыре анкириновых спирали. Проницаемость канала для ионов Ca^{2+} изменяется под воздействием механической нагрузки (рис. 1).

Поиск последовательностей, гомологичных NompC, первоначально выявил лишь один аннотированный TRPC-белок, кодируемый геном *M. leidyi*, а именно, белок AFK83798.1 (ML234550a-PA) с полипептидной цепью из 860 аа (рис. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/4/supp_Kuznetsov_rus.pdf) и трансмембранными участками, расположенными, начиная примерно с позиции 400 аа, в направлении к С-концу полипептидной цепи (рис. 2). Детальный анализ показал, что белок ML234550a-PA включает три анкириновых повтора в положениях 125–160, 210–239 и 245–274, каждый из которых состоит в среднем из 31 аа и участвует в белок-белковых взаимодействиях; далее следует область трансмембранных спиралей, которые начинаются в позиции 413 и заканчиваются в позиции 435; ближе к концу полипептидной цепи в положении 485–723 расположен ионный канал, имеющий шесть трансмембранных α -спиралей, две последние из которых окружают петлю, определяющую ионную селективность (рис. 3а).

Дальнейший углубленный поиск с использованием аминокислотной последовательности AFK83798.1 в качестве запроса показал, что белок ML234550a-PA имеет неаннотированные гомологи ML03701a-PA (828 аа) и ML038011a-PA (1395 аа), кодируемые геном *M. leidyi* (рис. S2, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/4/supp_Kuznetsov_rus.pdf). Оказалось, что белок ML03701a-PA длиной 828 аа, содержит два ANK-домена в позициях 150–178, 182–211 и ионный канал в положении 409–691, фланкированный трансмембранными α -спиралями с координатами 357–379 и 713–732 (рис. 3б). Другой белок, а именно ML038011a-PA, длиной 1395 аа включает два трансмембранных участка в положениях 102–124 и 134–156, два близкорасположенных ANK-домена в позициях 201–230, 234–265 и ниже еще 14 ANK-доменов в положении с 363 по 834, а также ионный канал в положении 963–1232 (рис. 3в).

Множественное выравнивание TRP-белков выявило значительные различия в их N-концевой области, где находятся анкириновые повторы, не

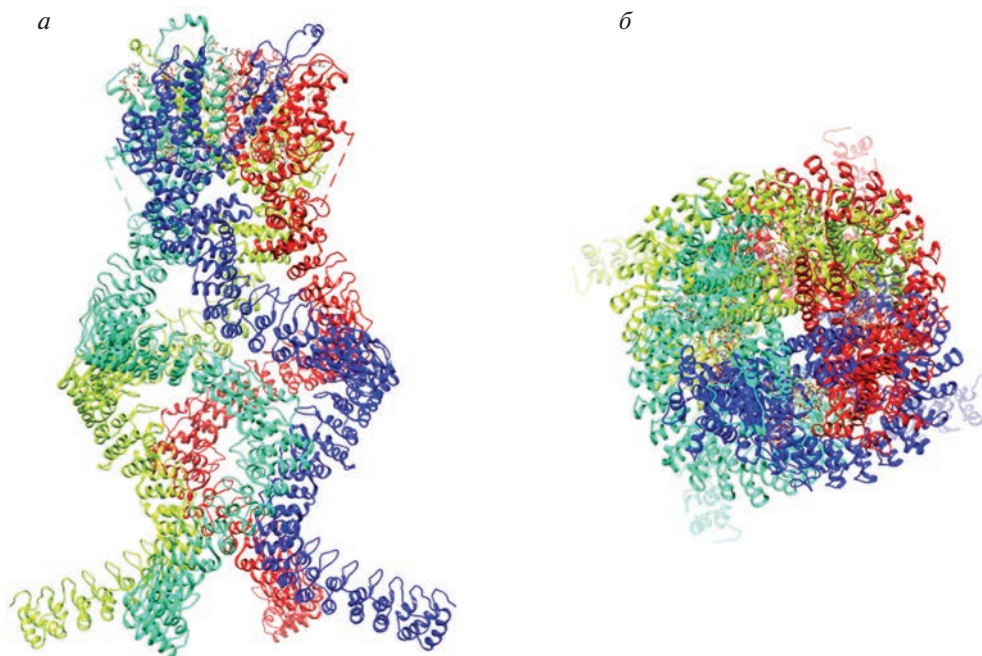


Рис. 1. Гомотетрамерная структура механотрансдуцирующего ионного канала NompC (5vkq) плодовой мушки *Drosophila melanogaster*. *a* – Вид сбоку, *б* – вид сверху. Отдельные полипептидные цепи показаны различными цветами, видна полость канала; визуализация с помощью UCSF Chimera [22].

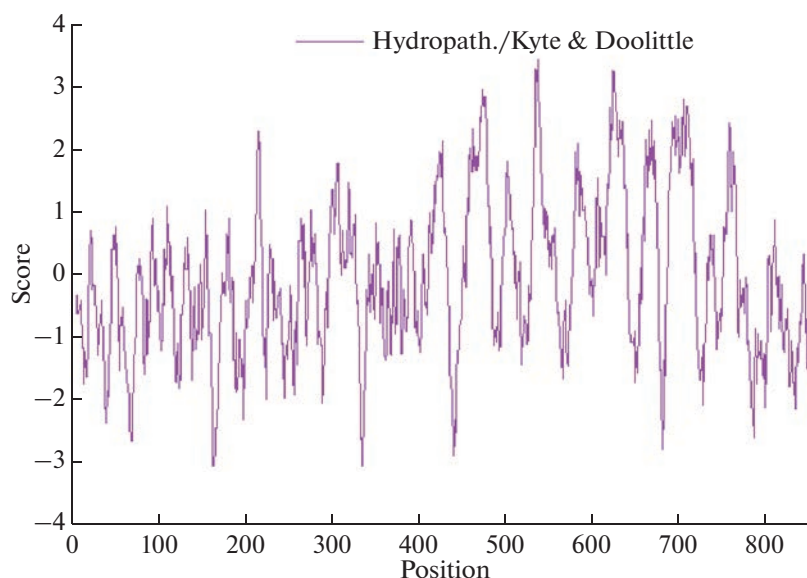


Рис. 2. График гидропатии белка AFK83798.1 (ML234550a-PA) гребневика *M. leidy* по Kyte-Doolittle [17], построенный с использованием модели линейного изменения веса, где размер окна равен 9, а области с положительным значением являются гидрофобными.

столь заметные различия в С-концевой части и достаточную консервативность средней части аминокислотной последовательности, где располагается ионпроводящий канал (данные не представлены). Проведенный далее филогенетический анализ выявил сходство между белком 5z96 мыши и белками ML234550a-PA и ML03701a-PA мнемииопсиса с малым числом анкириновых последовательностей, а

также между белком 5vkq дрозофилы и ML038011a-PA мнемииопсиса с длинными анкириновыми спиралями (рис. S3, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/4/supp_Kuznetsov_rus.pdf).

Изучение взаимодействий первого порядка белка ML234550a-PA (рис. 4a) установило его

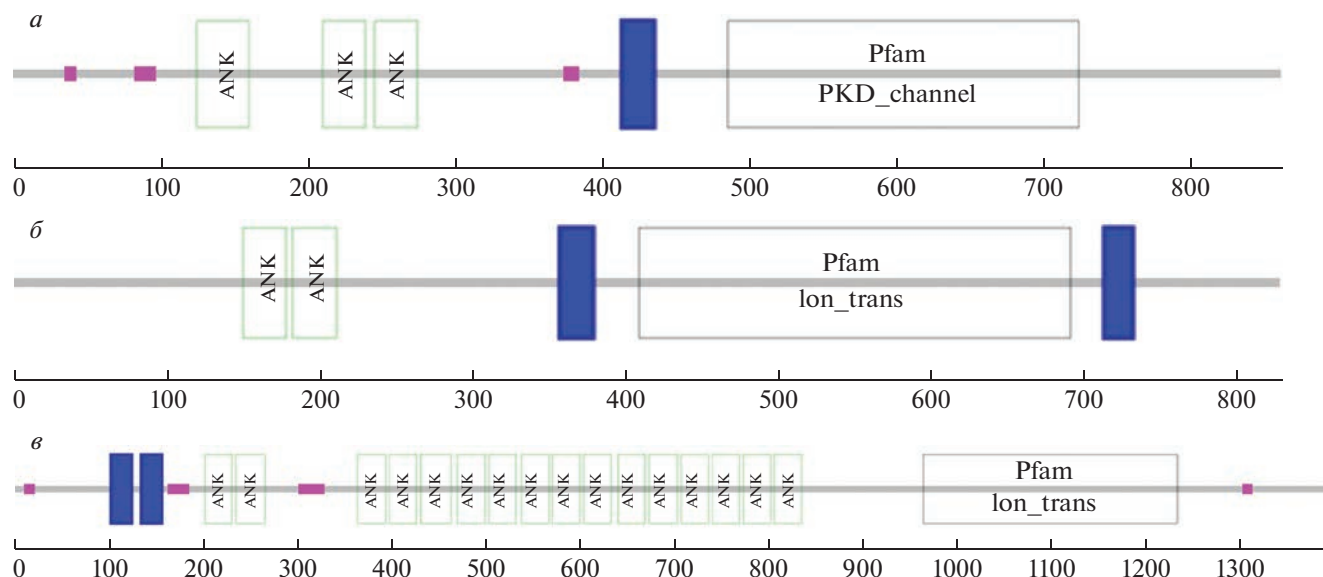


Рис. 3. Доменные структуры белков ML234550a-PA (а), ML03701a-PA (б) и ML038011a-PA (в) гребневика *M. leidy*. Шкалы внизу с шагом 100 соответствуют числу аминокислотных остатков, трансмембранные участки обозначены синим цветом, неструктурированные области – малиновым, анкириновые домены маркированы как ANK, катионный канал PKD_channel (Polycystic Kidney Disease Channel) и участок lon_trans (Ionic Transmembrane Domain) представлены большими прозрачными прямоугольниками [19].

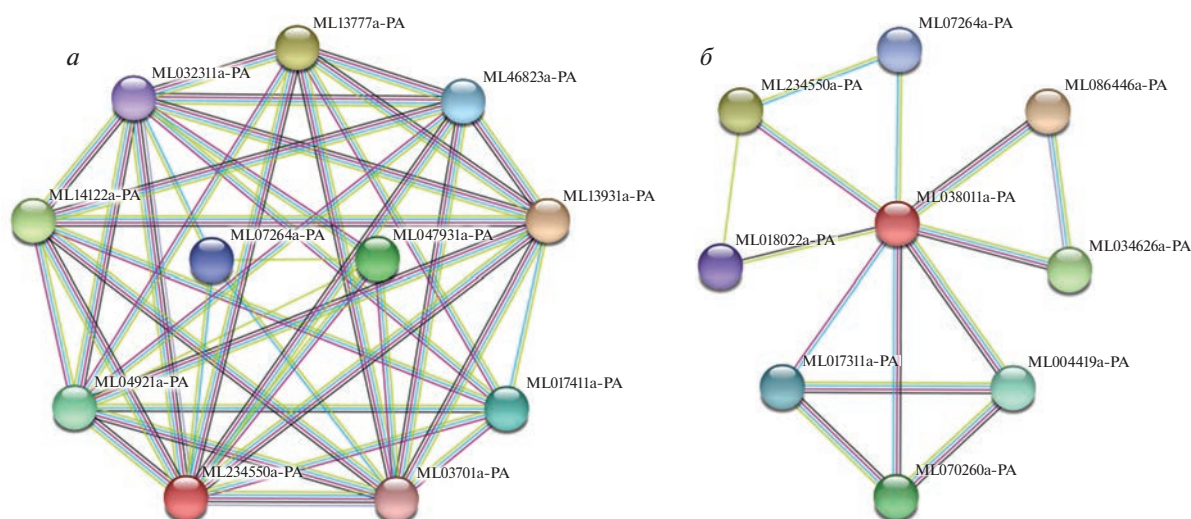


Рис. 4. Графы белок-белковых взаимодействий первого порядка для TRPC-белка AFK83798.1 (ML234550a-PA) (а) и гипотетического белка ML038011a-PA (б) из *M. leidy*, построенные с помощью сервера STRING согласно [19].

разнообразные отношения (совместное появление в разных геномах, коэкспрессия и др., общий балл 0.771) с гомологом ML03701a-PA (238.8 бит для 552 аминокислот), а также с еще девятью белками, в том числе с фосфолипазой C (ML04921a-PA). Два белка – ML047931a-PA, содержащий домены SAM (Sterile Alpha Motif) и SOAR (STIM1 Orail-Activating Region), а также ML07264a-PA с PKD-полицистиновым каналом, отличаются слабой связностью. Остальные белки имеют вы-

сокую связность, что означает высокую вероятность специфического взаимодействия по данным сервера STRING. Так, белок ML017411a-PA содержит домены FKBP_C (FKBP-type peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase, FK506-Binding Protein, FK506 – drug tacrolimus) и TPR_2 (Tetratricopeptide Repeat); ML04921a-PA включает домены EF-hand (helix-loop-helix Ca^{2+} binding motif; the index finger and thumb represent the E- and F-helices, re-

spectively), PLCXc, PLCYc (phospholipase C) и C2 (Ca²⁺-dependent membrane-targeting module); ML13777a-PA — пять доменов PDZ (binding to C-terminal peptide of other proteins); ML13931a-PA — два C1-домена и по одному домену C2 (domains of protein kinase C), S_Tkc и S_TK_X (Ser/Thr-type protein kinases); белок ML14122a-PA содержит три домена PDZ, а ML46823a-PA — один домен 7TM_GPCR_Srsx (7 transmembrane G-protein-coupled receptor class of proteins which are of the serpentine type).

Рассматривая коэкспрессию ортологов ML234550a-PA в других организмах, можно отметить, что TRP-белок переходного рецепторного потенциала *D. melanogaster* — это светочувствительный кальциевый канал для проникновения Ca²⁺ в сетчатку во время опосредованной фосфолипазой C (PLC) фототрансдукции. Этот белок необходим для способности видеть в темноте и при тусклом свете, он связывает кальмодулин, активируется инозитом, жирными кислотами и GTP-связывающими белками (показатель коэкспрессии 0.410).

Белок ML038011a-PA вступает во множественные взаимодействия с белками ML086446a-PA, ML034626a-PA, ML004419a-PA и ML070260a-PA, а также в менее тесные отношения с ML234550a-PA особенно с полипептидами ML017311a-PA, ML018022a-PA и ML07264a-PA (рис. 4б). Так, белок ML086446a-PA содержит рецепторный и дополнительный тирозинкиназный домены; белок ML034626a-PA включает три Hrl-домена (rho-binding domain) и каталитические домены серин/треониновой протеинкиназы; в белке ML004419a-PA имеются четыре PH-домена (Pleckstrin homology domain) и домен гистондеацетилазы [EC 3.5.1.98]; белок ML070260a-PA содержит ДНК-связывающий домен WAC_Acf1 (ATP-utilising chromatin assembly and remodelling factor), WSD-мотив (Williams-Beuren syndrome), PH-домен с мотивом цинкового пальца и бромодомен, взаимодействующий с гистонами, ацетилированными по остаткам лизина. Интересно также, что белок ML038011a-PA непосредственно взаимодействует со своим гомологом ML234550a-PA, известным как AFK83798.1. Белок ML017311a-PA, возможно, ассоциирован с хроматином, так как имеет три бромодомена и ВАН-гомолог (bromo-adjacent homology). Белок ML018022a-PA является пьезобелком с семью трансмембранными доменами и характерным пьезодоменом. Белок ML07264a-PA входит в число полицистиновых катионных PKD-каналов.

С целью понимания сенсорной роли TRPC-белка AFK83798.1 (ML234550a-PA) из *M. leidy* в

проведении сигналов о механической нагрузке была предпринята попытка определить его трехмерную структуру. Гомологическое сравнение аминокислотной последовательности AFK83798.1 с известными трехмерными структурами белков позволило выявить пространственное положение 631 аа за исключением N- и C-концов, что составляет 73% аминокислотной последовательности белка, на основе единственного шаблона C-цепи мембранного ионного канала TRPC4 (5z96) мыши [24]. Помимо этого, использовали дополнительные шаблоны, которые позволили охватить другие части исследуемого белка. В частности, в качестве одного из шаблонов использовали исходный механорецептор NompC (5vkq) *D. melanogaster* [23]. С помощью нескольких шаблонов смоделированы пространственные координаты 801 аа с достоверностью более 90%, что соответствует 93% всего белка AFK83798.1. На рис. 5 можно видеть, что пространственная модель единственной полипептидной цепи белка AFK83798.1 гребневика *M. leidy* напоминает отдельную субъединицу TRPC-канала мыши.

Моделирование с применением специальных алгоритмов позволило детально оценить достоверность модели. Так, с использованием ProQ2-алгоритма [25] достигнут средний уровень качества локального и глобального прогнозирования белковых моделей (рис. 6а). В силу того, что отдельные атомы в некоторых аминокислотных остатках могут располагаться в модели слишком близко друг к другу, большое количество пересечений может означать неудовлетворительное расположение смежных цепей или, возможно, неправильную укладку в этой области. Поэтому критерий пересечений является особенно строгим. Характер окрашивания аминокислотных остатков по количеству наблюдаемых пересечений говорит о хорошем качестве модели (рис. 6б). Ротамерный анализ также свидетельствует о том, что базовое выравнивание боковых цепей в модели осуществлено правильно (рис. 6в). Подавляющее число аминокислотных остатков в модели находится в благоприятных областях (синий), лишь несколько остатков локализируются в разрешенных (зеленый) областях (рис. 6г). Ничего не отмечено в запрещенных областях (красный) диаграммы Рамачандрана, что указывает на корректность расчетов ϕ - ψ торсионных углов полипептидного остова. Достоверность парного выравнивания запрос-шаблон по данным Hhsearch, полученная из апостериорных вероятностей, которые рассчитывали в алгоритме Forward-Backward [26], в большинстве случаев была хорошей или удовлетворительной (рис. 6д). Так как неупорядоченные и динамически гибкие области играют

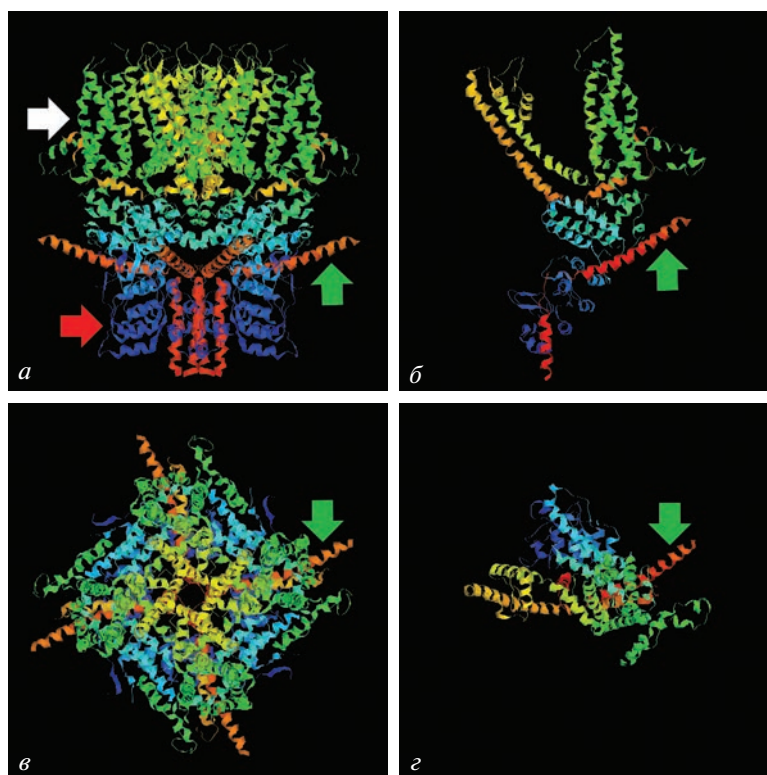


Рис. 5. Пространственная структура тетрамера мембранного TRPC-канала 5z96 домовой мыши (*a, в*) и 3D-модели одной субъединицы TRPC-белка AFK83798.1 *M. leidy* (*б, г*). Вид сбоку (*a, б*), вид сверху (*в, г*), использована спектральная окраска от N- до C-концевой части белка; белая стрелка указывает на трансмембранный домен, красная — на анкириновые повторы, которые располагаются в цитоплазме и формируют “пружину”, зеленая — на α -спираль с изломом, визуализация в RasMol [21].

важную роль в функционировании многих белков, предсказание неструктурированных областей было дополнено с помощью метода Disopred [27, 28] с приемлемым результатом (рис. 6е).

Найденные аминокислотные последовательности и созданные пространственные структуры гипотетических механосенсоров ML03701a-PA и ML038011a-PA гребневика *M. leidy* приведены на рис. S3 (см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/4/supp_Kuznetsov_rus.pdf). К сожалению, длина белка ML038011a-PA (1395 aa) (рис. S2) не позволила загрузить задачу на сервер Phyre2 и построить полную трехмерную модель. Поэтому было решено удалить часть анкириновой спирали из исходного файла с координатами атомов этого белка для построения урезанной 3D-модели (рис. S4б). Следует отметить, что помимо длинной анкириновой спирали, гипотетический белок ML038011a-PA отличается от ML03701a-PA и ML234550a-PA отсутствием цитоплазматической α -спирали с изломом, одна часть которой следует в направлении канала, а другая обращена под углом наружу тетрамерного комплекса (рис. 5, рис. S4а — отмечены зеленым цветом).

Кроме того, гипотетические белки ML03701a-PA и ML038011a-PA не взаимодействуют непосредственно друг с другом, но связываются с исходным белком ML234550a-PA (AFK83798.1) (рис. 4). Оба полипептида ML234550a-PA и ML03701a-PA имеют цитоплазматические α -спирали с изломом и короткие анкириновые спирали, как и мембранный канал TRPC4 (5z96) мыши, являющийся температурным сенсором [24], тогда как ML038011a-PA обладает структурным сходством с тактильным сенсором NompC (5vkq) дрозофилы [23], поскольку имеет длинные анкириновые спирали и не содержит надломленных α -спиралей (рис. 1, 5, рис. S4 Дополнительные материалы).

Помимо этого, белок ML038011a-PA взаимодействует с пьезобелком ML018022a-PA (рис. 4б), что может приводить к образованию надмолекулярного тактильного комплекса. Последний факт подтверждает нашу гипотезу, согласно которой биологическая функция TRP-рецепторов модулируется соседними белками. Влияние низкомолекулярных лигандов будет в дальнейшем проверено экспериментально. То, что спектральная чувствительность этих сенсоров может зависеть от длины анкиринового повтора, следует из меха-

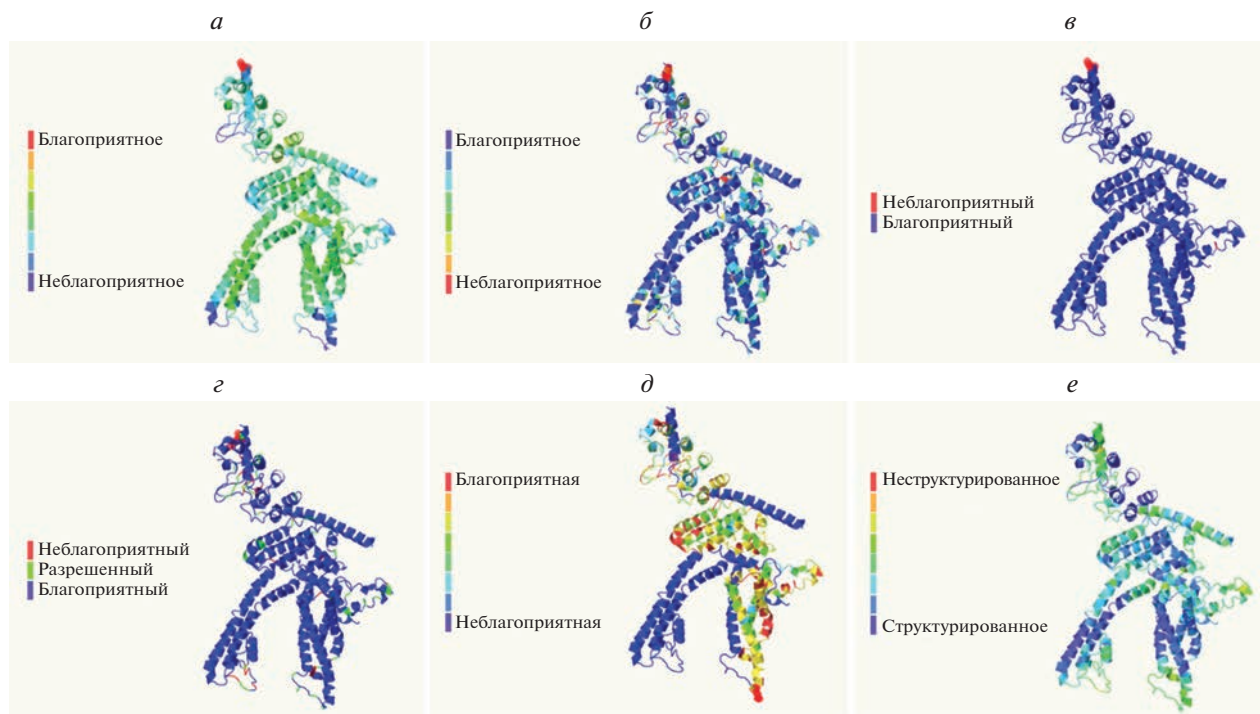


Рис. 6. Оценка качества пространственной модели TRPC-белка AFK83798.1 из *M. Leidy*. *a* — Локальное и глобальное прогнозирование; *б* — пересечения; *в* — ротамерный анализ; *г* — анализ Рамачандрана; *д* — достоверность выравнивания; *е* — предсказание неструктурированных областей. Локальное качество моделирования отмечено цветом на каждой части — от синего до красного, а изображения субъединицы белка перевернуты по сравнению с рис. 5б.

нических моделей [7]. Кроме того, анализ доменов показал, что ML038011a-PA способен опосредованно связываться с белками хроматина, в то время как ML234550a-PA взаимодействует преимущественно с цитоплазматическими белками, что, возможно, позволяет первому белку осуществлять передачу сигнала в ядро, а второму в цитоплазму клетки.

Следует отметить, что скорость передачи сигнала посредством белок-белковых взаимодействий намного ниже наблюдаемой реакции мнемнопсисов в виде люминесценции на механическое возмущение. Кроме того, фотобелки не имеют взаимодействующих доменов (данные не представлены). Следовательно, роль TRPC-каналов в передаче фотобелкам сигнала, вызванного механическим раздражением, связана со способностью каналов пропускать такие катионы, как Ca^{2+} [29], и инициировать деполяризацию потенциала покоя клеточной мембраны, которая приводит к быстрому распространению волны активации вдоль поверхности клетки и к передаче сигнала от клетки к клетке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Появление крупных инноваций и диверсификация в биологии происходят благодаря модуль-

ной эволюции [30], при этом сенсорные системы, лежащие в основе функционирования нервной системы, зародились еще на ранних этапах развития жизни [31]. TRP-каналы с транзитным рецепторным потенциалом образуют большое семейство мультимодальных молекулярных сенсоров, которые реагируют на широкий спектр стимулов, включая тепловые, механические и химические [32]. TRP-каналы обнаружены у большинства эукариот, подробно описаны у млекопитающих, но лучше всего изучены у нематоды и дрозофилы, служащих генетическими моделями [7]. При этом построение пространственных моделей мембранных белков, в том числе TRP-каналов, остается сложной задачей, несмотря на успехи в рентгеновской кристаллографии, ядерном магнитном резонансе и криогенной электронной микроскопии [33]. Создание полноразмерных гомологических структурных моделей затрудняется субъединичной природой и большим размером TRP-каналов, имеющих длинные анкириновые спирали. Кроме того, требуются дополнительные методы проверки надежности моделей [25–28].

Суперсемейство белков катионных TRP-каналов примечательно большим разнообразием механизмов активации и селективности, чем у любой другой группы белков ионных каналов. TRP-белки играют решающую роль в сенсорной

физиологии зрения, обоняния, вкуса, осязания, слуха, термо- и осмощушений, а также позволяют отдельным клеткам ощущать изменения в локальной среде. Многие TRP-каналы активируются множеством различных стимулов и функционируют как интеграторы сигналов [34] (биофизические и структурно-функциональные исследования термочувствительных TRP-каналов обобщены в обзоре [35]).

Нами впервые построены 3D-модели TRP-субъединиц механорецепторов гребневика *M. leidy* (Ctenophora). На основании пространственной реконструкции трудно предложить однозначную функцию белков ML234550a-PA (AFK83798.1) и ML03701a-PA с короткой анкириновой последовательностью. Однако гребневик *M. leidy* отвечает на механические раздражения интенсивной люминесценцией, поэтому можно предположить, что роль тактильного сенсора, при отсутствии активности других кандидатов [36], выполняет гомологичный гипотетический белок ML038011a-PA с длинными анкириновыми спиралями. Имеющиеся данные не раскрывают полностью связь между механическим раздражением и люминесценцией у *M. leidy*, но наглядно показывают сложность сигнальных комплексов и запутанность путей трансдукции, возникших в ходе эволюционного развития, что принципиально отличает их от технических систем, созданных человеком.

Можно отметить, что сенсорная активность механочувствительных рецепторов особенно важна для гидробионтов, так как вода практически не сжимаема по сравнению с воздухом и в ней лучше передаются волны давления, что мы видим на примере люминесценции гребневиков при турбулентности. Возможно, механорецепторы, как TRP-каналы, которые появились на ранних этапах эволюции [37], играют большую роль у морских животных по сравнению с сухопутными [38, 39]. При выходе жизни на сушу часть функций была утрачена, а часть модифицирована к новой среде обитания в результате диверсификации TRP-каналов [40].

Авторы благодарят М.В. Фадееву и Е.В. Сергееву за помощь в работе, О.В. Машукову, Б.Е. Аннинского, С.А. Царина, О.С. Завьялову за поддержку, К.А. Рыбакову, В.Д. Ратникова, Е.В. Моцарь и М.И. Силакова за обсуждение рукописи и рекомендации, а также анонимных рецензентов за полезные замечания, позволившие значительно улучшить манускрипт.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ФИЦ ИнБЮМ тема № 0828-2018-0002.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Himmel N.J., Cox D.N. (2020) Transient receptor potential channels: current perspectives on evolution, structure, function and nomenclature. *Proc. Biol. Sci.* **287**(1933), 20201309. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1309>
2. Cao E. (2020) Structural mechanisms of transient receptor potential ion channels. *J. Gen. Physiol.* **152**(3), e201811998. <https://doi.org/10.1085/jgp.201811998>
3. Samanta A., Hughes T.E., Moiseenkova-Bell V.Y. (2018) Transient receptor potential (TRP) channels. *Subcell. Biochem.* **87**, 141–165. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_6
4. Nilius B., Owsianik G. (2011) The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol.* **12**(3), 218. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-218>
5. Lehnert B.P., Santiago C., Huey E.L., Emanuel A.J., Renaud S., Africawala N., Alkislar I., Zheng Y., Bai L., Koutsoumpa C., Hong J.T., Magee A.R., Harvey C.D., Ginty D.D. (2021) Mechanoreceptor synapses in the brainstem shape the central representation of touch. *Cell.* **184**(22), 5608–5621. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.023>
6. Robinson C.V., Rohacs T., Hansen S.B. (2019) Tools for understanding nanoscale lipid regulation of ion channels. *Trends Biochem. Sci.* **44**(9), 795–806. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.04.00>
7. Liang X., Sun L., Liu Z. (2017) *Mechanosensory transduction in Drosophila melanogaster*. Singapore: Springer, pp. 82. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6526-2>
8. Ryan J.F., Pang K., Schnitzler C.E., Nguyen A.D., Moreland R.T., Simmons D.K., Koch B.J., Francis W.R., Havlak P., NISC Comparative Sequencing Program, Smith S.A., Putnam N.H., Haddock S.H., Dunn C.W., Wolfsberg T.G., Mullikin J.C., Martindale M.Q., Baxevanis A.D. (2013) The genome of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* and its implications for cell type evolution. *Science.* **342**(6164), 1242592. <https://doi.org/10.1126/science.1242592>
9. Moroz L.L. (2015) Convergent evolution of neural systems in ctenophores. *J. Exp. Biol.* **218**(4), 598–611. <https://doi.org/10.1242/jeb.110692>
10. Moroz L.L., Kohn A.B. (2016) Independent origins of neurons and synapses: insights from ctenophores. *Philos. Trans. R. Soc. B.* **371**(1685), 20150041. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0041>
11. Moroz L.L. (2021) Multiple origins of neurons from secretory cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 669087. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.669087>
12. Aronova M.Z. (2009) Structural models of “simple” sense organs by the example of the first Metazoa. *J. Evol. Biochem. Phys.* **45**(2), 179–196. <https://doi.org/10.1134/S0022093009020017>

13. Jékely G., Godfrey-Smith P., Keijzer F. (2021) Reafference and the origin of the self in early nervous system evolution. *Philos. Trans. R. Soc. B.* **376**(1821), 20190764. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0764>
14. Bagriantsev S.N., Gracheva E.O., Gallagher P.G. (2014) Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes. *J. Biol. Chem.* **289**(46), 31673–31681. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.612697>
15. Madeira F., Park Y.M., Lee J., Buso N., Gur T., Madhusoodanan N., Basutkar P., Tivey A.R.N., Potter S.C., Finn R.D., Lopez R. (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucl. Acids Res.* **2**(47), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>
16. Chevenet F., Brun C., Bañuls A.L., Jacq B., Christen R. (2006) TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics.* **10**(7), 439. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-439>
17. Kyte J., Doolittle R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**(1), 105–132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)
18. Mistry J., Chuguransky S., Williams L., Qureshi M., Salazar G.A., Sonnhammer E.L., Tosatto S.C.E., Paladin L., Raj S., Richardson L.J., Finn R.D., Bateman A. (2021) Pfam: The protein families database in 2021. *Nucl. Acids Res.* **49**(D1), D412–D419. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>
19. Szklarczyk D., Gable A.L., Nastou K.C., Lyon D., Kirsch R., Pyysalo S., Doncheva N.T., Legeay M., Fang T., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. (2021) The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucl. Acids Res.* **49**(D1), D605–D612. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>
20. Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J. (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **10**(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>
21. Sayle R.A., Milner-White E.J. (1995) RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.* **20**(9), 374–376. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89080-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89080-5)
22. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. (2004) UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
23. Jin P., Bulkley D., Guo Y., Zhang W., Guo Z., Huynh W., Wu S., Meltzer S., Cheng T., Jan L.Y., Jan Y.N., Cheng Y. (2017) Electron cryo-microscopy structure of the mechanotransduction channel NOMPC. *Nature.* **547**(7661), 118–122. <https://doi.org/10.1038/nature22981>
24. Duan J., Li J., Zeng B., Chen G.L., Peng X., Zhang Y., Wang J., Clapham D.E., Li Z., Zhang J. (2018) Structure of the mouse TRPC4 ion channel. *Nat. Commun.* **9**(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05247-9>
25. Ray A., Lindahl E., Wallner B. (2012) Improved model quality assessment using ProQ2. *BMC Bioinform.* **13**(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-224>
26. Russell S., Norvig P. (2010) *Intelligence Artificielle: Avec Plus de 500 Exercices*. Pearson Education, France.
27. Ward J.J., McGuffin L.J., Bryson K., Buxton B.F., Jones D.T. (2004) The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics.* **20**(13), 2138–2139. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth195>
28. Jones D.T., Cozzetto D. (2015) DISOPRED3: precise disordered region predictions with annotated protein-binding activity. *Bioinformatics.* **31**(6), 857–863. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu744>
29. Perissinotti P.P., Martínez-Hernández E., Piedras-Rentería E.S. (2021) TRPC1/5-Cav3 complex mediates leptin-induced excitability in hypothalamic neurons. *Front. Neurosci.* **15**, 679078. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.679078>
30. Watson R.A. (2006) *Compositional Evolution: The Impact of Sex, Symbiosis, and Modularity on the Gradualist Framework of Evolution*. Vienna Series in Theoretical Biology: A Bradford Book. 344 p. ISBN-10: 9780262232432
31. Oteiza P., Baldwin M.W. (2021) Evolution of sensory systems. *Curr. Opin. Neurobiol.* **71**, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.08.005>
32. Li H. (2017) TRP channel classification. *Adv. Exp. Med. Biol.* **976**, 1–8. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1088-4_1
33. Hellmich U.A., Gaudet R. (2014) Structural biology of TRP channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* **223**, 963–990. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05161-1_10
34. Venkatachalam K., Montell C. (2007) TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 387–417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
35. Voets T. (2012) Quantifying and modeling the temperature-dependent gating of TRP channels. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **162**, 91–119. https://doi.org/10.1007/112_2011_5
36. Coste B., Mathur J., Schmidt M., Earley T.J., Ranade S., Petrus M.J., Dubin A.E., Patapoutian A. (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science.* **330**(6000), 55–60. <https://doi.org/10.1126/science.1193270>
37. Peng G., Shi X., Kadowaki T. (2015) Evolution of TRP channels inferred by their classification in diverse animal species. *Mol. Phylogenet. Evol.* **84**, 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.06.016>
38. Voets T., Nilius B. (2003) TRPs make sense. *J. Membr. Biol.* **192**(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00232-002-1059-8>
39. Voets T., Talavera K., Owsianik G., Nilius B. (2005) Sensing with TRP channels. *Nat. Chem. Biol.* **1**(2), 85–92. <https://doi.org/10.1038/nchembio0705-85>
40. Kadowaki T. (2015) Evolutionary dynamics of metazoan TRP channels. *Pflugers Arch.* **467**(10), 2043–2053. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1705-5>

Spatial Reconstruction of TRPC-Mechanoreceptors of the Ctenophore *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865

A. V. Kuznetsov^{1, 2} and D. N. Vtyurina^{3, *}

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

²Sevastopol State University, Sevastopol, 299053 Russia

³Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: vtyurinad@gmail.com

Ctenophore *Mnemiopsis leidyi* A. Agassiz, 1865 responds to gentle mechanical stimulation with intense luminescence; however, the mechanism of this phenomenon is unknown. We searched for possible mechanosensitive receptors that initiate signal transduction resulting in photoprotein luminescence. The three ortholog genes of mouse (5z96) and *Drosophila* (5vkq) TRPC-proteins, such as ML234550a-PA (860 aa), ML03701a-PA (828 aa) and ML038011a-PA (1395 aa), were found in the *M. leidyi* genome. The latter protein contains a long ankyrin helix consisting of 16 ANK domains. Study of the annotated domains and the network of interactions between the interactome proteins suggests that the ML234550a-PA and ML03701a-PA proteins carry out cytoplasmic, but ML038011a-PA provides intranuclear transduction of mechanical signals. Spatial reconstruction of the studied proteins revealed differences in their structure, which may be related to various functions of these proteins in the cell. The question of which of these proteins is involved in the initiation of luminescence after mechanical stimulation is discussed.

Keywords: Ctenophora, genome, mechanoreceptors, TRPC channels, interactome

ОПЕЧАТКА

DOI: 10.31857/S0026898423040286, EDN: XOKSQJ

В статье *А. Ш. Заклуты, В. Ю. Шиловой, О. Г. Зацепиной* “Влияние нокаута основных генов транссульфурации на паттерн белкового синтеза у *D. melanogaster*”, опубликованной в № 1 2023 года, том 57, на странице 146 допущена ошибка.

Напечатано: Работа проведена при поддержке Российского научного фонда (№ 2017-74-30030-П).

Правильно: Работа проведена при поддержке Российского научного фонда (грант 17-74-30030-П).