

ISSN 0026-8984

Том 57, Номер 5

Сентябрь - Октябрь 2023



МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 57, номер 5, 2023

ОБЗОРЫ

Ассоциированные с опухолью фибробласты: гетерогенность и бимодальность в онкогенезе

Н. А. Лунина, Д. Р. Сафина, С. В. Костров 739

Цифровая ПЦР: обзор применения высокочувствительного диагностического инструмента

К. В. Копылова, Э. В. Каспаров, И. В. Марченко, М. В. Смольникова 771

Роль WGR-домена в функционировании белков PARP1 и PARP2

*Н. В. Малюченко, А. Н. Коровина, А. А. Саулина,
В. М. Студитский, А. В. Феофанов* 782

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

Сравнительный анализ мутационных спектров митохондриальных геномов в популяциях человека

Б. А. Малярчук 792

Анализ полных геномов вируса аспермии томата указывает на реассортацию в российских изолятах вируса из хризантемы

*А. А. Шевелева, Г. С. Краснов, А. В. Кудрявцева, А. В. Снежкина,
Е. В. Булавкина, С. Н. Чирков* 797

Эффективность экспрессионных систем на основе *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* для получения мутантов рибонуклеазы биназы

*А. И. Надырова, А. С. Коснырев, В. В. Ульянова, Е. В. Дудкина,
В. И. Вершинина, О. Н. Ильинская* 807

Изменение профиля метилирования ДНК CD14⁺ моноцитов при первично-прогрессирующем рассеянном склерозе

*И. С. Киселев, О. Г. Кулакова, О. А. Батурина,
М. Р. Кабилов, А. Н. Бойко, О. О. Фаворова* 819

Ассоциация полиморфных вариантов генома в области 2q32.1 с развитием вазовагальных обмороков

*Н. А. Матвеева, Б. В. Титов, Е. А. Базылева, Е. А. Кучинская,
М. С. Козин, А. В. Фаворов, А. В. Певзнер, О. О. Фаворова* 827

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* регулируется экспрессией гена *pejire* в периферических тканях и нервной системе

*Л. А. Коваль, Е. Н. Прошкина, Н. В. Земская, И. А. Соловьёв,
Е. В. Щеболева, М. В. Шапошников, А. А. Москалев* 833

Механизм бимодального воздействия DL-бутионинсульфоксимида на конститутивный рецептор андростана и X-рецептор прегнана *in vitro*

*Ю. В. Абаленихина, А. В. Шулькин, А. А. Сеидкулиева, Е. Д. Рокунов,
Ф. Т. Гаджиева, Е. Н. Якушева* 853

Неструктурный белок 3 вируса гепатита С повышает секрецию интерлейкина-1β в клетках НЕК293Т с реконструированной инфламмасомой NLRP3

А. А. Латанова, К. К. Тучинская, Е. С. Стародубова, В. Л. Карпов 863

Изменения содержания и активности отдельных форм протеасом в образцах коры головного мозга при развитии патологии у мышей линии 5xFAD

*А. В. Морозов, А. В. Буров, С. Ю. Фуников, Е. В. Тетерина,
Т. М. Астахова, П. А. Ерохов, А. А. Устюгов, В. Л. Карпов*

873

Динамические изменения активности и содержания отдельных форм протеасом в образцах коры головного мозга при старении мышей C57BL/6

*А. В. Буров, С. Ю. Фуников, Т. М. Астахова, Е. В. Тетерина, В. О. Небогатилов,
П. А. Ерохов, А. А. Устюгов, В. Л. Карпов, А. В. Морозов*

886

БИОИНФОРМАТИКА

Пространственные модели пьезобелков и сетей белок-белковых взаимодействий у трихоплекса (пластинчатые)

А. В. Кузнецов, И. Ю. Гришин, Д. Н. Втюрина

895

МЕТОДЫ

Метод латексной агглютинации как альтернатива реакции гемагглютинации вирусов гриппа

*П. А. Иванов, А. В. Ляшко, С. А. Ионов, Д. В. Щербинин, И. А. Руднева,
А. А. Шилов, Н. И. Бунькова, М. М. Шмаров, Т. А. Тимофеева*

898

Правила для авторов

907

УДК 616-006;576.54

АССОЦИИРОВАННЫЕ С ОПУХОЛЬЮ ФИБРОБЛАСТЫ: ГЕТЕРОГЕННОСТЬ И БИМОДАЛЬНОСТЬ В ОНКОГЕНЕЗЕ

© 2023 г. Н. А. Лунина^а, *, Д. Р. Сафина^а, С. В. Костров^а^аНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

*e-mail: lunina-na.img@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.01.2023 г.

После доработки 03.04.2023 г.

Принята к публикации 03.04.2023 г.

Ассоциированные с опухолями фибробласты часто являются основным компонентом микроокружения опухоли, создающим ту самую “почву”, в которой успешно развиваются злокачественные клетки. Ассоциированные с опухолью фибробласты могут способствовать росту опухоли, инвазии, метастазированию и устойчивости к терапии. Однако клинические испытания стратегий лечения, нацеленных на такие фибробласты, в основном заканчивались неудачей. Более того, появились данные, что ассоциированные с опухолью фибробласты способны сдерживать развитие опухоли. В этом обзоре рассмотрены текущие представления о функциональной гетерогенности ассоциированных с опухолью фибробластов, их бимодальности в развитии и прогрессии опухолей. Понимание стимулирующей и сдерживающей развитие опухоли активностей ассоциированных с опухолями фибробластов может способствовать разработке новых диагностических и терапевтических подходов.

Ключевые слова: ассоциированные с опухолями фибробласты, гетерогенность, маркеры, онкогенез, метастазирование, строма опухоли, микроокружение опухоли

DOI: 10.31857/S0026898423050105, EDN: YVVDRL

ВВЕДЕНИЕ

Ассоциированные с опухолью фибробласты (CAF), признанные одними из самых распространенных клеток в микроокружении опухоли (TME), представляют собой высокогетерогенные клетки мезенхимального происхождения с разнообразными функциями, которые могут либо способствовать, либо ограничивать прогрессию опухоли [1, 2]. Предполагается, что значительные различия между отдельными субпопуляциями CAF во многом связаны с особенностями их происхождения [3, 4]. Также важно отметить, что свойства CAF могут динамически меняться по мере развития опухоли. Всесторонняя характеристика опухолеобразующей и сдерживающей рост опухоли активностей подтипов CAF, включая то, как эти сложные бимодальные функции развива-

ются и подчиняются опухолевым клеткам в ходе прогрессии опухоли, может способствовать разработке новых диагностических и терапевтических подходов [2].

Опухольстимулирующие воздействия CAF обусловлены секрецией ими множества факторов, усиливающих пролиферацию опухолевых клеток. Кроме того, в ходе онкогенеза CAF активно участвуют в обмене коллагена и в формировании его сшивок, что приводит к десмоплазии опухоли (т.е. к избыточному отложению коллагена в TME) и увеличению ее жесткости [5]. CAF ответственны за ремоделирование внеклеточного матрикса (ECM), активно участвуя в его протеоллизе, сшивании и сборке, что может способствовать процессам миграции и инвазии злокачественных клеток [6]. Процессы ангиогенеза и

Сокращения: CAF – ассоциированные с опухолями фибробласты; myCAF – миофибробластные CAF; iCAF – воспалительные CAF; COL11A1 – альфа-1 цепь коллагена типа I1; CSF1 – колониестимулирующий фактор 1; CTGF – фактор роста соединительной ткани; ECM – внеклеточный матрикс; EMT – эпителиально-мезенхимальный переход; FAP – белок активации фибробластов; FGF – фактор роста фибробластов; FSP-1 – фибробласт-специфичный белок 1 (или S100A4); HGF – фактор роста гепатоцитов; HIF1 – индуцируемый гипоксией фактор 1; IGF1 – инсулиноподобный фактор роста 1; IL – интерлейкин; LIF – лейкоингибирующий фактор; NF – нормальные (резидентные, покоящиеся) фибробласты; PDAC – аденокарцинома протоков поджелудочной железы; PDGF – фактор роста тромбоцитов; PDGFR α/β – рецепторы α и β фактора роста тромбоцитов; PDPN – подоплатин; PGF – фактор роста плаценты; POSTN – периостин, белок внеклеточного матрикса; ROS – активные формы кислорода; SDF1 – фактор 1 стромальных клеток (или CXCL12); sc-RNA-seq – секвенирование РНК единичной клетки; α -SMA – альфа-актин гладких мышц (продукт гена ACTA2); TGF- β – трансформирующий фактор роста бета; TME – микроокружение опухоли; TNF- α – фактор некроза опухоли альфа; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

лимфангиогенеза при раке могут быть усилены секретом CAF, в основном за счет секреции ангиогенных факторов [7–9]. Путем иммуноредактирования опухолевые клетки и клетки ТМЕ, включая CAF, могут регулировать проопухолевые и защитные механизмы иммунной системы во время онкогенеза, при этом CAF становятся медиаторами иммуносупрессии, способствуя прогрессированию опухоли [10].

Обнаружение перечисленных проонкогенных функций CAF привело к тому, что CAF стали рассматривать как привлекательную терапевтическую мишень, однако попытки воздействия на эти клетки в основном заканчивались неудачей, а в некоторых случаях ускоряли прогрессирование опухоли и приводили к ухудшению выживаемости.

К настоящему времени накопилось много данных о гетерогенности CAF и разнонаправленности их функций. В этом обзоре мы рассмотрим функциональную гетерогенность CAF в развитии и прогрессии опухолей.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ CAF

В настоящее время к фибробластам относят интерстициальные клетки мезенхимального происхождения, которые не являются эпителиальными, эндотелиальными или иммунными клетками. Фибробласты — это, возможно, наиболее пластичные и универсальные клетки, которые способствуют структурному поддержанию тканей и участвуют в процессах заживления ран в большинстве органов. Однако при раке происхо-

дит такое приспособление обычных физиологических процессов, которое создает благоприятную микросреду для успешного роста опухоли [11]. Согласно одной из версий, принадлежащей Гарольду Дворжаку, рак ведет себя как “раны... которые никогда не заживают”, а трансформация стромы в опухольассоциированную, обусловлена “неудачным заживлением ран” [12].

CAF можно рассматривать как фибробласты, расположенные внутри опухоли или рядом с ней. Одно время CAF считались гомогенной популяцией стромальных клеток, продуцирующих различные факторы и компоненты ECM и ответственных за 3D архитектуру опухоли. Однако многочисленные исследования, проведенные за последние два десятилетия, показали, что CAF гетерогенны по своему происхождению, фенотипу, функциям и присутствию в опухолях [1–4, 13, 14].

CAF происходят как из резидентных клеток ТМЕ (фибробластов, звездчатых клеток поджелудочной железы или печени, эпителиальных клеток (через эпителиально-мезенхимальный переход (EMT)), эндотелиальных клеток (через эндотелиально-мезенхимальный переход), перицитов и адипоцитов (через трансдифференцировку)), так и из отдаленных клеток (например, мезенхимальных стволовых клеток костного мозга) [2, 3]. Прямая корреляция между функцией определенного подтипа CAF и его происхождением точно не установлена. Скорее всего, CAF, происходящие из разных источников, имеют функционально различные фенотипы [14]. В табл. 1 представлены основные данные о путях происхождения CAF.

Таблица 1. Происхождение CAF

Тип исходных клеток	Способ активации	Пути активации	Ссылка
Резидентные покоящиеся фибробласты	TGF- β , PDGF, EGF, FGF, BMP, Sonic Hedgehog (SHH) Взаимодействие с соседними клетками Воспалительные факторы Физические изменения ECM, жесткость и состав Физиологический стресс Геномный стресс, разрушение ДНК, хемо- и радиотерапии, гипоксия Индукция тканевого ингибитора MPP-1 (TIMP-1) Витамины A и D	ERK, SHH/SMO, NF- κ B Notch IL-1 активирует путь NF- κ B, IL-6 активирует пути STAT/JAK/STAT Активация фактора транскрипции YAP Факторы теплового шока ROS, HIF-1 α IL-6/STAT3 SMAD или ренин-ангиотензиновая система SMAD-опосредованный сигнальный путь EMT EndoMT ERK, SHH/SMO, NF- κ B	[1, 15–21] [22] [23, 24] [25–27] [28] [14, 29–32] [33] [34–36] [37–40] [41, 42] [43] [43–49]
Мезенхимальные стромальные клетки Эпителиальные клетки Эндотелиальные клетки Перициты, адипоциты, фиброциты и звездчатые клетки Опухолевые стволовые клетки	EV из клеток рака молочной железы и рака яичников TGF- β TGF- β , SMAD TGF- β , CXCL12, PDGF TGF- β	Поддержание мультипотентности и фенотипической пластичности	[50, 51]

Тем не менее, точное происхождение CAF часто остается неясным из-за их фенотипической и функциональной пластичности и отсутствия четко определенных биомаркеров происхождения. Разнообразие источников происхождения усиливает гетерогенность популяций CAF [52].

Лучше всего изучено происхождение CAF из резидентных фибробластов. Покоящиеся фибробласты активируются в ответ на повреждение тканей, во время заживления ран и как следствие неоплазии [2, 53, 54]. В микроокружении опухоли потенциальные стимулы, активирующие фибробласты, включают морфогенетический белок кости (bone morphogenetic protein (BMP), интерлейкины (IL)-1 и -6, фактор роста тромбоцитов (PDGF), Sonic hedgehog (SHH), активные формы кислорода (ROS), TGF- β , а также фактор некроза опухоли (TNF). Эти стимулы выделяются опухолевыми клетками и другими стромальными клетками, включая сами CAF [1, 15, 55]. Морфология активированных CAF изменяется от веретенообразной формы к крестообразной или звездчатой. Кроме того, активация CAF обычно сопровождается изменениями секрета (усилением способности синтеза регуляторных молекул и компонентов ECM), пролиферативного статуса и экспрессии определенных маркеров, например таких, как α -актин гладких мышц (α -SMA) [34]. CAF становятся склонными к миграции и метаболически активными, в них экспрессируется панель генов, отличная от панели в покоящихся фибробластах [1, 23, 56].

МАРКЕРЫ CAF

Наиболее часто CAF идентифицируют с использованием таких маркеров, как α -SMA, белок активации фибробластов (FAP), рецепторы PDGF (PDGFR α и β), подоплатин (PDPN) и виментин [57, 58]. Однако из-за гетерогенности CAF ни один из этих маркеров не способен выявить все CAF. К тому же многие маркеры встречаются и в других клетках. В табл. 2 приведены основные маркеры CAF и их характеристики. Рассмотрим подробнее несколько наиболее известных маркеров CAF.

α -SMA

α -SMA, продукт гена *ACTA2*, входит в семейство актинов — высококонсервативных белков, которые играют важную роль в подвижности, структуре и целостности клеток, составляя основу их цитоскелета. Повышенная экспрессия α -SMA в активированных фибробластах способствует их лучшей сократимости (с участием микрофиламентов), а также быстрейшему созреванию грануляционной ткани — новой соединительной ткани, которая образуется на поверхности раны в процессе

заживления [83]. α -SMA стал одним из основных маркеров популяций миофибробластных CAF (myCAF) [77, 84] и важным прогностическим фактором у онкологических больных [85–87]. Однако α -SMA нельзя рассматривать как строго специфичный маркер фибробластов, поскольку гладкомышечные клетки и перициты также могут синтезировать этот белок на высоком уровне [88, 89].

FAP

Белок активации фибробластов α , или FAP, — интегральный мембранный белок типа II, принадлежащий к семейству мембраносвязанных сериновых протеаз [90]. Высокая представленность FAP характерна для процессов регенерации в тканях, фиброза и дегенерации внеклеточного матрикса фибробластами, в которые вовлечена его протеазная и коллагеназная активности [60]. Показано также, что FAP активируется в мезенхимальных тканях плода [91], его экспрессия выявлена в строме более 90% образцов исследованных эпителиальных опухолей. FAP часто используют в качестве маркера CAF [57, 61, 62, 90]. Как и α -SMA, FAP является важным прогностическим фактором течения опухолевого процесса. Moreno-Ruiz и соавт. изучали маркеры фибробластов FAP и α -SMA в хорошо аннотированной клинической когорте немелкоклеточного рака легкого. Высокий уровень экспрессии FAP идентифицирован ими как независимый неблагоприятный прогностический маркер во всей исследуемой популяции и в гистологической подгруппе аденокарцином. Обнаружены статистически значимые зависимости между наличием мутаций p53 и высокими уровнями α -SMA и FAP [92].

Ингибиторы FAP и моноклональные антитела к FAP предложено использовать в иммунотерапии опухолей [93, 94]. Были проведены клинические испытания талабостата (низкомолекулярный ингибитор FAP) и сибротузумаба (моноклональное антитело к FAP). Однако оба препарата не показали клинической эффективности у пациентов с колоректальным раком и не прошли испытания фазы II.

PDGFR α/β

PDGFR — это поверхностные рецепторы факторов роста тромбоцитов с тирозинкиназной активностью, представленные на таких клетках, как фибробласты, астроциты, нейропредшественники и перициты [73]. Выделяют два основных типа PDGFR — PDGFR α и PDGFR β .

PDGFR служат маркерами любых фибробластов; а сверхэкспрессия PDGFR выявлена в CAF в нескольких типах опухолей, таких как глиома, рак предстательной железы и рак яичников [95].

Таблица 2. Основные маркеры CAF и маркеры, отличающие CAF, от других типов клеток

Маркер	Расположение в клетке	Клетки, экспрессирующие маркер		Описание	Виды опухолей	Ссылка
		CAF (подтип CAF), NF	другие типы клеток			
CALD1	Цитоплазма	Нет	Перициты	Отрицательный маркер фибробластов, положителен для перицитов		[57]
COL1	Цитоплазма	NF, CAF		Гистохимический маркер популяции фибробластов	Колоректальный рак	[57]
COL11A1	Цитоплазма	CAF		Компонент ECM		
				Специфичный для CAF, позволяет отличить рак поджелудочной железы от хронического воспаления	Опухоли поджелудочной железы	[59]
				Компонент ECM		
EPSCAM	Мембрана	Нет	Эпителиальные клетки	Маркер эпителиальных клеток		[57]
FAP	Мембрана	CAF, нет в туCAF	Эпителиальные клетки при EMT	FAP ⁺ CAF стимулируют опухоли через иммунозависимые и иммунонезависимые механизмы, основные продуценты иммуносупрессивных цитокинов, таких как CXCL12 и CCL2	Большинство опухолей	[60–62]
FSP1 (ген <i>S100A4</i>)	Цитоплазма, ядро	NF	Макрофаги	Маркер NF и, реже, CAF	Большинство опухолей	[43, 63, 64]
GLI1	Цитоплазма, ядро	NF, CAF	Мезенхимальные клетки	Маркирует субпопуляцию фибробластов, связанную с сосудистой сетью и протоками поджелудочной железы. Экспрессия увеличивается при прогрессировании опухоли поджелудочной железы	Опухоли поджелудочной железы	[65]
HOXB6	Ядро	NF	Мезенхимальные клетки	Маркирует субпопуляцию фибробластов, рассеянную по всей поджелудочной железе	Опухоли поджелудочной железы	[65]
ITGA11	Мембрана	CAF	Опухолевые клетки, макрофаги	Сверхэкспрессия в некоторых подтипах CAF	Немелкоклеточный рак легкого	[57]
LRRC15	Мембрана	CAF		Экспрессия гена управляется TGF-β. Корреляция со слабым противоопухолевым иммунитетом	PDAC	[66]
LY6C (ген <i>Ly6c-1</i>)	Мембрана	iCAF	Миелоидные клетки	Определяет популяцию iCAF у мыши в сочетании с другими маркерами CAF	Опухоли поджелудочной железы	[67, 68]
MEFLIN (ген <i>ISLR</i>)	GPI-связанный мембранный белок	гCAF	Мезенхимальные стволовые клетки	Маркер гCAF, одерживающих рост опухолей	Рак желудка и поджелудочной железы	[69–71]
MFAP5		CAF		Специфичен для CAF, экспрессия MFAP5 может варьировать в зависимости от подтипа CAF	Колоректальный рак, плоскоклеточный рак полости рта и языка	[72]

Таблица 2. Окончание

Маркер	Расположение в клетке	Клетки, экспрессирующие маркер		Описание	Виды опухолей	Ссылка
		CAF (подтип CAF), NF	другие типы клеток			
NG2	Мембрана	CAF	Опухолевые клетки и макрофаги	Сверхэкспрессия в некоторых подтипах CAF. Неспецифичен для фибробластов и экспрессируется опухолевыми клетками и макрофагами.		[57]
PDGFR α , PDGFR β (гены <i>PDG-FRA</i> , <i>PDG-FRB</i>)	Мембрана	NF, CAF	Астроциты, нейтропредшественники, перicytes	Панфибробластные маркеры. Субпопуляция фибробластов с маркерами PDGFR α ^{low} /PDGFR β ^{high} связана с повышенным риском рецидива протокового рака молочной железы <i>in situ</i> .	Большинство опухолей	[22, 57, 73, 74]
PDPN	Мембрана	NF, CAF, myCAF	Эпителиальные опухолевые клетки и воспалительные макрофаги	Маркер myCAF. Прогностический маркер метастазирования.	Большинство опухолей	[75]
PECAM1	Поверхность клетки	Нет	Эндотелиальные клетки	Отрицательный маркер для CAF.		[57]
POSTN	Цитоплазма	NF, CAF		Различия в экспрессии для разных подтипов CAF.	Большинство опухолей	[76]
PTPRC	Поверхность клетки	Нет	Лейкоциты	Отрицательный маркер CAF.		[57]
α -SMA (ген <i>ACTA2</i>)	Цитоплазма	NF, CAF, myCAF	Гладкомышечные клетки и перicytes	Различия в экспрессии в разных подтипах CAF. Нет в подтипе CAF-A.	Большинство опухолей	[76–80]
SMARCD3	Цитоплазма	CAF		SMARCD3 способствует активации CAF и метастазированию по пути SMARCD3-WNT5A/TGF- β -MAPK14-SMARCD3.	Колоректальный рак	[81]
SMTN	Поверхность клетки	Нет	Гладкомышечные клетки	Отрицательный маркер фибробластов.		[57]
TAGLN	Цитоплазма	NF, CAF		Различная специфичность для разных подтипов CAF.	Большинство опухолей	[76]
TN-C	Цитоплазма	CAF	Миелоидные и T-клетки	Экспрессия некоторыми субпопуляциями CAF.		[57]
VIM	Цитоплазма	NF, CAF	Макрофаги, адипоциты, миоциты, эпителиальные клетки, претерпевающие EMT.	Не является CAF-специфичным, широко экспрессируется всеми фибробластами и многими другими клетками.	Большинство опухолей	[82]

Преимущество PDGFR α/β в качестве маркеров заключается в их поверхностной локализации и представленности на большинстве субпопуляций фибробластов в опухолях.

PDGFR, как и FAP, считаются потенциальной мишенью для противоопухолевой терапии, поскольку активность путей PDGFR в CAF заметно повышена во многих опухолях.

COL11A1

Повышенная экспрессия гена *COL11A1*, кодирующего один из коллагенов, синтезируемых в CAF, позволяет отличить рак поджелудочной железы от ее хронического воспаления [59]. Сверхэкспрессия *COL11A1* в десмопластических областях опухолей, состоящих в основном из CAF, наблюдаемая при различных онкологических заболеваниях, но не при воспалении, делает *COL11A1* уникальным маркером CAF [96]. Иммуногистохимический анализ рака поджелудочной железы и яичников позволяет идентифицировать субпопуляцию CAF, которая характеризуется высоким уровнем экспрессии *COL11A1* [97]. В целом, эти исследования показывают, что CAF служат основным источником *COL11A1* в опухолях [96], что делает этот белок перспективным для использования в качестве терапевтической мишени.

SMARCD3

Еще один маркер CAF, SMARCD3 (SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin, Subfamily D, Member 3), был обнаружен при изучении микроокружения колоректальных опухолей [81]. Этот маркер принадлежит к семейству SWI/SNF, члены которого обладают геликазной и АТФазной активностью и могут регулировать транскрипцию генов, влияя на структуру хроматина. Показано, что SMARCD3 экспрессируется в основном в CAF, что позволяет рассматривать этот белок в качестве нового прогностического маркера и потенциальной мишени для терапии опухолей. Оказалось, что SMARCD3 может способствовать активации CAF и метастазированию колоректального рака через петлю положительной обратной связи SMARCD3-WNT5A/TGF- β -MAPK14-SMARCD3. Построена карта сигнального пути, активируемого SMARCD3, а также предложены несколько соединений, способных ингибировать этот белок [81].

В настоящее время известно уже несколько десятков маркеров CAF, основные из которых приведены в табл. 2.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ CAF

Изучение CAF с использованием различных методов, включая протеомный анализ, тран-

скриптомный анализ РНК единичной клетки (scRNA-seq), проточную цитометрию и мультиплексное окрашивание, показало высокую гетерогенность CAF и существование отдельных субпопуляций этих клеток [14, 98–100]. Разные субпопуляции CAF в разных опухолях содержат свои наборы идентификационных маркеров. Так, пространственно разные субпопуляции CAF в составе одной опухоли имеют разные наборы маркеров. Транскриптомный анализ разных срезов одного образца предстательной железы, содержащей мультифокальные поражения, выявил значительную пространственную неоднородность как эпителиального, так и стромального компонентов, что еще раз подтвердило существование субпопуляций CAF [101]. Более того, разные CAF, по-видимому, группируются в определенных местах ТМЕ относительно опухоли. Например, α -SMA-экспрессирующие и FAP-позитивные myCAF расположены в непосредственной близости к опухолевым клеткам, в то время как “воспалительные” CAF (iCAF) со сниженной экспрессией α -SMA обнаружены в плотной строме [13, 68]. Кроме субпопуляций myCAF и iCAF [67, 79, 87, 102, 103], описанных при различных типах рака, идентифицированы и другие субпопуляции CAF, экспрессирующие такие биомаркеры, как FAP, декорин (DCN), PDPN и другие [58, 98–100, 104–107].

В табл. 3 представлены субпопуляции CAF и их маркеры (использованы данные [2] и [84]). Не установлено, совпадают ли свойства субпопуляций CAF, выделенных из разных образцов разных видов рака. К сожалению, вызывают затруднения и различия в обозначении субпопуляций, используемые разными исследователями. Важно отметить, что классификацию субпопуляций CAF, построенную по данным только транскриптомного анализа, необходимо подтверждать функциональными исследованиями. Транскриптомные профили подтипов CAF могут зависеть от вида опухоли, ее стадии или индивидуальных особенностей пациентов, что подчеркивает необходимость выявления как универсальных, так и специфических биомаркеров CAF (или подтипов CAF) с использованием образцов из больших когорт пациентов и нескольких модельных систем [2].

Возможно, гетерогенность CAF потенциально отражает ситуацию, аналогичную наблюдаемой в опухолевых стволовых клетках. Как и CAF, опухолевые стволовые клетки очень пластичны и экспрессируют различные маркеры, которые меняются со временем [125]. Таким образом, название опухолевой стволовой клетки в большей степени относится к состоянию конкретной клетки, чем к отдельному типу клеток. Вероятно, субпопуляции CAF также можно рассматривать как разные динамические состояния фибробластов. Неоднородность маркеров CAF может быть полезной в терапии опухолей, поскольку гипотети-

Таблица 3. Гетерогенность CAF: субпопуляции CAF, выявленные при разных типах рака

Субпопуляция CAF	Маркеры и характеристика субпопуляции CAF	Источник, модель	Метод	Ссылка
<i>PDAC</i>				
myCAF	α -SMA, THY1, TAGLN, CTGF, IGFBP3, COL12A1, THBS2, LRRC15	Человек, KPC – мышинная модель	RNAseq, sc-RNAseq	[13, 67, 68, 108]
iCAF	IL-6, CXCL1, CXCL12, CCL2, PDGFR α , HAS1			
Антигенпредставляющие CAF (apCAF)	H2-ABI, MHCII, CD74, SAA3, SLPI, FSP1			
Подтип A	POSTN. Негативный прогноз			
Подтип B	MYH11, α -SMA. Умеренный прогноз	Человек	NanoString nCounter	[104]
Подтип C	PDPN, α -SMA. Позитивный прогноз			
Подтип D	α -SMA			
LRRC15 ^{pos}	LRRC15 ^{pos} , CD105, SERPINE2, COL15A1 Опухольстимулирующие myCAF. TGF β -активированный фенотип	Человек. KPP, KPC – мышинные модели	sc-RNAseq	[66]
DPP4 ^{pos}	DPP4, LY6C1, PDGFR α iCAF, активирован IL-1			
apCAF в мезотелии	CD74, H2-ABI, PDPN, DPP4 Мезотелиальные/apCAF			
CD105 ^{pos}	CD105, POSTN, CXCL14, COL6A1 Опухоль-пермиссивные CAF, активирован TGF β	KPC – мышинная модель, GEMM – генно-инженерные модели мышей	Мультиомиксные исследования	[109]
CD105 ^{neg}	CD74, H2-ABI, CXCL2, GSI1, SAA3 PDPN, VIM, COL1A1, COL1A2, α -SMA CD105 ^{neg} – противоопухолевый иммунитет, супрессия опухоли			
Сдерживающие рост опухоли CAF (rCAF)	MEFLIN Супрессия нарушений тканевой дифференцировки	Человек, KPC/Meftin-KO – мышинная модель	Иммуногистохимия, in situ гибридизация	[70, 110]
Способствующие росту опухоли CAF (pCAF)	Повышение α -SMA			

Таблица 3. Продолжение

Субпопуляция CAF	Маркеры и характеристика субпопуляции CAF	Источник, модель	Метод	Ссылка
Колоректальный рак				
CAF-A (FAP-CAF)	FAP, MMP2, DCN	Человек	sc-RNAseq	[87, 111]
CAF-B (α -SMA-CAF)	α -SMA, TAGLN, PDGF α			
Рак головы и шеи				
myCAF	α -SMA, MYLK, MYL9	Человек	sc-RNAseq	[103]
CAF1	FAP, PDPN, COL1A2, THY1, VIM, CAV1, MMP11			
CAF2	FAP, PDPN, FOS, JUN, FGF7, TGF-B2			
Рак легкого				
Кластер 1	Экспрессия генов ECM	Человек	sc-RNAseq	[112]
Кластер 2	α -SMA myCAF-фенотип			
Кластер 4	Представлены на периферии опухоли			
Кластер 5	Высокая сигнатура гена <i>mTOR</i> . Представлены в центре опухоли			
Кластер 7	Высокая сигнатура гена <i>mTOR</i> . Представлены на периферии опухоли			
Меланома				
S1	CD34 Иммунные CAF	B16-F10 мышиная модель	sc-RNAseq	[113]
S2	TNC Десмопластические CAF			
S3	α -SMA Сократительные CAF			

Таблица 3. Продолжение

Субпопуляция CAF	Маркеры и характеристика субпопуляции CAF	Источник, модель	Метод	Ссылка
<i>Рак молочной железы</i>				
vCAF	VEGFA, NID2, α -SMA, PDGFR β Сосудистые CAF. Участие в ангиогенезе	MMTV-PyMT мышиная модель	sc-RNAseq	[99]
mCAF	FBLN1, PDGFR α , DCN, VCAN, COL14A1, CXCL14 Матричные CAF. Участие в продукции матрикса, в фиброзе. Понижение при прогрессии			
cCAF	PDGFR β Циклические CAF			
dCAF	SCRG1, SOX9 CAF, ассоциированные с развитием опухоли. Участие в ЕМТ с образованием злокачественных клеток			
myCAF	α -SMA, LRRC15 TGF β -активированные myCAF	4T1 мышиная модель	sc-RNAseq	[114, 115]
iCAF	IL-6, C3, CD34, DPP4 (CD26), LY6C1 Воспаление и регуляция/рекрутирование иммунных клеток			
vCAF	VEGFA, α SMA, LRRC15 Сосудистые CAF. Участие в ангиогенезе			
iCAF	CD74+ Активированные интерфероном CAF. Индукция при блокаде TGF- β			
myCAF	α -SMA, PDPN, FAP, COL1A1, COL1A2 TGF- β активированные myCAF	Человек	sc-RNAseq	[116]
iCAF	CD34, CXCL1, CXCL12, CXCL13 Воспаление и регуляция/рекрутирование иммунных клеток			

Таблица 3. Окончание

Субпопуляция CAF	Маркеры и характеристика субпопуляции CAF	Источник, модель	Метод	Ссылка
CAF-S1	FAP, FSP-1, α -SMA, CD29 Повышение уровней FAP и α -SMA; восемь подкластеров CAF; при тройном негативном раке молочной железы	Человек	Проточная цито- флуориметрия FACS и sc-RNAseq	[79, 117–119]
CAF-S2	CD29			
CAF-S3	CD29			
CAF-S4	CD29, α -SMA			
PDPN-CAF	Шесть подкластеров: иммунорегулирующие E (CXCL12), иммунорегулирующие L(SAA3), ECM-модулирующие (фибриллин 1), заживляющие раны (α -SMA), воспалительные A(CXCL1), воспалительные B(IL-6)	4T1 – мышиная модель	sc-RNAseq	[121]
S100A4-CAF	Два подкластера:CAF, участвующие в фолдинге белка (HSPD1), антигенпредставляющие CAF (SPPI1)			
<i>Холангиокарцинома</i>				
myCAF	α -SMA, HAS2, COL1A1, COL8A1, COL15A1, SERPINF1	ICC, KRAS/p19, Yap/AKT мышиные модели	sc-RNAseq	[120]
iCAF	CXCL12, HGF, RGS5, цитокины, хемокины			
mesoCAF	Мезотелин. Мезотелиальные CAF			
<i>Рак желудка</i>				
myCAF	α -SMA, COL1A1			
iCAF	CXCL12, IL6, CXCL14			
eCAF (ECM)	MMP14, LOXL2, POSTN	Человек	sc-RNAseq	[122]
<i>Рак мочевого пузыря</i>				
myo-CAF	RGS5, MYL9, MYH11			
iCAF	PDGFR α , CXCL12, IL-6, CXCL14, CXCL1, CXCL2	Человек	sc-RNAseq	[123]
<i>Рак предстательной железы</i>				
CAF-S1	α -SMA, PDGFR β			
CAF-S2	PDGFR α , CREB3L1, PLAGL1			
CAF-S3	α -SMA, HOXB2, MAFB	Человек	sc-RNAseq	[124]

чески она позволяет специфически воздействовать на разные субпопуляции CAF.

Вероятно, разные субпопуляции CAF выполняют разные функции: от прямого воздействия на пролиферацию опухолевых клеток, их выживание, химиорезистентность, инвазию и метастазирование, до эффектов, опосредованных изменениями в ECM, сосудистой сети и иммунных клетках TME. Более того, CAF могут сдерживать онкогенез [126].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК И CAF

CAF способны модулировать и прогрессирование опухолей, и противоопухолевый иммунитет как прямо, так и косвенно, зависимым от контекста образом [1, 2]. Такие регуляторные функции могут осуществляться с помощью факторов роста, цитокинов и хемокинов, включая СС-хемокин 2 (CCL2), CCL5, колониестимулирующий фактор 1 (CSF1), СХС-хемокин 5 (CXCL5), CXCL9, CXCL10, CXCL12 (известный как фактор 1, полученный из стромальных клеток (SDF1)), фактор роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF1), фактор роста соединительной ткани (CTGF), PDGF, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, LIF, простагландин E2 (PGE2) и TGF- β [2]. Показано, что LIF, IGF1, HGF, IL-6, WNT5a и BMP4 индуцируют сигнальные взаимодействия CAF с опухолевыми клетками, которые способствуют росту и прогрессированию опухоли [2].

CAF секретируют множество факторов, таких как TGF- β 1, CXCL-12, FGF, POSTN, остеопонтин (OPN), HGF, IL-6 и IL-22, которые непосредственно стимулируют пролиферацию опухолевых клеток *in vitro* и рост опухоли *in vivo* посредством активации соответствующих сигнальных путей [127–134]. Показано, что эти факторы способствуют выживаемости опухолевых клеток, блокируя апоптоз за счет повышения экспрессии антиапоптотических белков, таких как BCL-2 и MCL-1. При этом происходит и снижение экспрессии проапоптотических белков, таких как BAX (BCL-2-ассоциированный X-белок) [126, 127]. CAF непосредственно стимулируют миграцию и инвазию опухолевых клеток, что может быть связано с секрецией TGF- β , IL-32, PDGF и FGF, которые индуцируют EMT, полимеризацию/деполимеризацию актина и подвижность клеток [135–138].

Рост и развитие опухоли, способность опухолевых клеток к метастазированию сильно зависят от образования новых кровеносных сосудов, необходимых для снабжения опухоли кислородом и питательными веществами [139]. Опухолевые

клетки перестраивают окружающие клетки и внеклеточный матрикс, способствуя ангиогенезу [140]. CAF могут продуцировать такие ангиогенные факторы, как VEGF, PDGF, TGF- β , CXCL12 или HGF, индукция которых определяется несколькими причинами, из которых наиболее важную роль играет гипоксия [141]. Ангиогенные факторы способствуют ремоделированию ECM, пролиферации эндотелиальных клеток и привлечению эндотелиальных клеток и перицитов в опухоль [7, 142, 143]. PDGF и VEGF также оказывают аутокринное действие на CAF, дополнительно стимулируя выработку таких проангиогенных факторов, как IL-6, IL-8 и фактор роста плаценты (PGF) [144, 145]. Кроме того, CAF могут усиливать рост сосудов посредством васкулогенного процесса, в котором задействованы пути Rho/ROCK и передача сигналов YAP [146].

В настоящее время CAF считаются основным источником иммуносупрессивной активности в TME [147]. Фибробласты могут влиять на инфльтрацию иммунными клетками либо непосредственно — через секретируемые цитокины и хемокины и белки клеточной поверхности, либо косвенно — посредством отложения различных компонентов ECM и ремоделирования матрикса, от которого зависит внутриопухолевая локализация и миграция иммунных клеток. CAF влияют на рекрутирование, поляризацию и функции иммунных клеток в микроокружении опухолей вырабатывая такие хемокины, как IL-1, CCL22, CXCL12, CCL2 и другие [148, 149]. Например, CXCL1, CXCL5 и IL-8, секретируемые FGF-активированными CAF, индуцируют рекрутирование макрофагов в опухоли [150–152]. Причем, если CCL2, CCL3 и CCL5 рекрутируют моноциты и макрофаги, способствуя развитию опухоли [153], то CXCL8 и CXCL14 опосредуют противоопухолевые эффекты [154, 155].

TGF- β , CXCL1 и IL-10, секретируемые CAF, ингибируют функцию естественных киллерных (NK) клеток, CD8⁺ Т-лимфоцитов, Th1-лимфоцитов и дендритных клеток [156–158]. Предполагается, что CAF влияют как на врожденный, так и на адаптивный иммунный ответ [159].

Неожиданной особенностью CAF стала их бимодальность в онкогенезе: они проявляют как стимулирующую, так и сдерживающую рост опухоли активность [1, 2, 13, 60, 68, 78, 160, 161]. Механизмы, лежащие в основе противоопухолевых функций CAF, зависят, вероятно, от усиления противоопухолевого иммунитета, передачи сигналов, ингибирующих опухоль, и выработки определенных компонентов ECM в качестве барьеров для инвазии и распространения опухолевых клеток [2]. В табл. 4 суммированы различные (иногда противоположные) данные о влиянии CAF на онкогенез. Видно, что различные субпо-

Таблица 4. Влияние CAF на онкогенез

Вид опухоли	Подтип CAF (маркеры)	Влияние на онкогенез	Факторы и пути	Примечания	Ссылка
PDAC	iCAF (IL-6) myCAF (α-SMA) arCAF антигенпредставля- ющие	Стимулируют Стимулируют Стимулируют	IL-6, IL-8, CXCL1, CXCL2, CCL2, CXCL12, CFD, LMNA, DPT, AGTR1 Воспалительные пути IFNγ, TNF/NF-κB, IL-2/STAT5, IL-6/JAK/STAT3 α-SMA, TAGLN, MYL9, TPM1, TPM2, MMP11, POSTN, NOX MHC класса II, CD74	IL-1 активирует iCAF через JAK–STAT, ингибирование JAK/STAT переводит iCAF в myCAF Активируют CD4 ^{pos} Т-клетки антигенспецифичным образом	[13, 67, 68, 102]
	LRRC15 ^{pos} CAF	Стимулируют	TGF-β	Коррелируют с плохим прогнозом	[66]
	rCAF(мефлин)-сдер- живающие	Подавляют	Мефлин ^{pos} / α-SMA ^{low/neg}		[70, 110]
	rCAF(MXRA8)	Подавляют	MXRA8	Трансмембранный белок типа I с неизвестной молекулярной функ- цией	[162]
	meCAF метаболические	Стимулируют	Активный гликолиз в meCAF	У раковых клеток – окислительное фосфорилирование	[163]
	PDGFRα ^{pos} CAF	Стимулируют	SAA1, ортолог SAA3 мыши, MPP6	Высокие уровни SAA1 коррели- руют с худшей выживаемостью	[164]
	TGF-β1 ^{pos} CAF	Стимулируют	TGF-β1 усиливает экспрессию ATF4 по пути TGFβ1/SMAD2/3	ATF4 непосредственно связывается с промоторной областью ABCC1 для активации транскрипции	[165]
	myCAF	Стимулируют	BATF3, IL-12B, ITGB8, CD4 и IFNAR1	CAF и лейкоциты в непосредствен- ной близости от PDAC значительно отличаются от удаленных от опу- холи	[166]
	CAF	Стимулируют	miRNA-320a, PTEN/PI3Kc		[167]
	PDPN ^{pos} CAF RAMP3 ^{neg} CAF	Стимулируют Подавляют	Передача сигналов SRC/CAS/PDPN опосредуется RAMP3	PDPN-положительные CAF – отличный признак злокаче- ственности опухоли	[168]
Рак поджелудочной железы					
Раковые клетки поджелудочной железы PAN02					

Таблица 4. Продолжение

Вид опухоли	Подтип CAF (маркеры)	Влияние на онкогенез	Факторы и пути	Примечания	Ссылка
Метастазы в печень рака поджелудочной железы	myCAF iCAF	Стимулируют и подавляют Стимулируют	Гиалуронан, коллаген типа I HGF	Гиалуронан и HGF способствуют онкогенезу. Коллаген типа I подавляет рост опухоли, что объясняет двойные функции CAF при раке	[169]
Культирование Саран-1 с AD-MSC	myCAF в AD-CAF iCAF в AD-CAF	Стимулируют Стимулируют	ACTA2 и CTGF CXCL1, IL-6 и LIF	AD-MSC дифференцируются в AD-CAF при совместном культивировании с клетками Саран-1	[170]
Первичные опухоли легкого	ApCAF	Стимулируют	PD-L2, FASL	От мышей, несущих опухоль LSL-KRAS ^{G12D/pos} ; p53 ^{LSL-R270H/ER}	[171]
Немелкоклеточный рак легкого (HMPЛ)	CAF	Стимулируют	miR-20a из CAFs снижала PTEN и усиливала активацию пути PI3K/AKT	CAF способны стимулировать прогрессирование HMPЛ и химиорезистентность.	[172]
Аденокарцинома легкого	Иммуносупрессивные CAF myCAF, Пролиферативные CAF	Стимулируют Стимулируют Стимулируют	IGFBP6, IFITM3, LGALS. IFITM3 способствует онкогенезу через сигнальный путь TGF-β. UBE2T, TK1, CXCL12, KPNA2, HMGB3 ECM, CCL2, TGF-β и другие цитокины PRC1 (белок, ассоциированный с митотическим веретеном), киназа Aurora A (AURKA), FGFI	IGFBP6 — мощный индуктор апоптоза Нокдаун KPNA2 ослабляет инвазивность CAF Приводят к фиброзу, иммуномодуляции и метастазированию. Способствуют пролиферации раковых клеток и росту опухоли	[173]
Линии мезотелиомы плевры: NCI-H2052, MSTO-211H, NCI-H2452	Линии эмбриональных миофибробластов: IMR-90 и MRC-5	Стимулируют	Сигнальные пути MAPK и RAF	Среда от IMR-90 дает гораздо более сильный эффект, чем от MRC-5. Сигнальные пути MAPK и RAF существенно нарушаются в NCI-H2052	[174]
HMPЛ	CAF	Подавляют	miR-491-3p, FGF5	FGF5 — это ген-мишень для miR-491-3p. Сверхэкспрессия miR-491-3p подавляет рост HMPЛ <i>in vivo</i>	[175]
Плоскоклеточный рак легкого	CAF: две подгруппы	Стимулируют	AEBP1	Сверхэкспрессия AEBP1 — это плохой прогноз у пациентов	[176]

Таблица 4. Продолжение

Вид опухоли	Подтип CAF (маркеры)	Влияние на онкогенез	Факторы и пути	Примечания	Ссылка
Аденокарцинома легкого	SDF-1 ^{pos} CAF	Стимулируют	SDF-1, CXCR4, β-катенин, RPARδ	SDF-1 усиливает инвазивность и EMT за счет усиления регуляции CXCR4, β-катенина и RPARδ	[177]
	CTHRC1 ^{pos} CAF	Стимулируют	CTHRC1/WNT/β-катенин	CAF стимулируют миграцию, инвазивность и EMT раковых клеток	[178]
	S100A4 ^{pos} CAF	Стимулируют	S100A4, компоненты ECM, Тенасцин-С, VEGF-A	Потеря S100A4 ^{pos} CAF коррелирует с уменьшением метастазирования	[179]
Рак молочной железы	FAP ^{pos} /CAF-S1 содержит восемь кластеров: 0/ECM-myCAF 3/TGFβ-myCAF	Стимулируют Стимулируют	PD-1, CTLA4 в Treg, сигнализация TGF-β		[117]
	CD10 ^{pos} GPR77 ^{pos} CAF	Стимулируют	CD10 и GPR77, пути NF-κB	CD10 ^{pos} GPR77 ^{pos} CAF способствуют образованию опухолей и химиорезистентности, GPR77, рецептор C5a	[180]
Рак молочной железы эстрогенно-ложительный (ER ^{pos})	CD146 ^{neg} CAF CD146 ^{pos} CAF	Стимулируют Подавляют	CD146	Преобладание CD146 ^{neg} CAF коррелирует с худшими исходами у пациентов Поддерживают эстрогензависимую пролиферацию	[181]
	CAF-S1 (myCAF) CAF-S4 (myCAF)	Стимулируют	CXCL12, OX40L, PD-L2, JAM2, B7H3, CD73 и DPP4	CAF-S1 привлекают CD4 ^{pos} CD25 ^{pos} Т-лимфоциты и удерживают их с помощью OX40L, PD-L2 и JAM2	[79]

Таблица 4. Продолжение

Вид опухоли	Подтип CAF (маркеры)	Влияние на онкогенез	Факторы и пути	Примечания	Ссылка
	1) LY6C1 ^{high} CAF (iCAF); 2) α -SMA ^{high} CAF (myCAF) 3) CAF, связанные с клеточным циклом 4) CD53 ^{high} CAF 5) CRABP1 ^{high} CAF (mCAF) 6) CD74 ^{high} CAF (apCAF)	Стимулируют	1) CCL2, IL-6, IL-33 и CXCL12 2) TGFB1, TGFB2, CTGF, PGF, VEGFA, WNT5A 5) CRABP1, LAMA2, SPON1, DCN, LUM, MMP19 6) CD74 и другие белки МНС класса II, кератины KRT7, KRT8, KRT18 и FSP1 (S100A4)	iCAF и apCAF также обнаружены в нормальной ткани молочной железы, по-видимому, эти фенотипы не индуцируются опухолью	[114]
	CAF	Стимулируют	Повышенная экспрессия секретируемого бигликана (BGN) в CAF	Бигликан указывает на плохой прогноз и коррелирует с иммуносупрессивным TME	[182]
	CAF ^{pos} CAF ^{neg}	Стимулируют Подавляют	ADAMTS12, AEBP1, COL10A1, COL11A1, CXCL11, CXCR6, EDNRA, EPRK1, WNT7B Пути внеклеточного матрикса. Иммуно-связанные пути	Подтип CAF ^{neg} связан с более длительной общей выживаемостью и большим количеством иммунных клеток, чем CAF ^{pos}	[183]
Рак молочной железы	FOSL2 ^{pos} CAF	Стимулируют	FOSL2 /WNT5A, эстроген/cAMP/PKA, FZD5/NF- κ B/ERK	Способствуют VEGF-независимому ангиогенезу	[184]
	CTHRC1 ^{pos} CAF	Стимулируют	CTHRC1/WNT/ β -катенин	CTHRC1 ^{pos} CAF стимулируют миграцию, инвазивность и EMT клеток рака молочной железы, активируя сигнальный путь WNT/ β -катенина	[185]
Метастазы в лимфоузлах при раке молочной железы	CAF-S1 CAF-S4	Стимулируют Стимулируют	CXCL12 и TGF- β NOTCH	CAF-S4 индуцирует инвазию раковых клеток в трех измерениях посредством передачи сигналов NOTCH. Пациенты с высоким уровнем CAF-S4 склонны к развитию поздних отдаленных метастазов	[119]

Таблица 4. Продолжение

Вид опухоли	Подтип CAF (маркеры)	Влияние на онкогенез	Факторы и пути	Примечания	Ссылка
Рак молочной железы мыши E0771 и 4T1	CAF	Стимулируют	NADPH-оксидаза 4 (NOX4), NRF2, BIRC5	NOX4 способствует аутофагии в CAF и выживанию CAF посредством активации NRF2, главного регулятора реакции на окислительный стресс	[186]
Рак желудка диффузного типа	CEF (фибробласты обученные с помощью CAF без участия раковых клеток)	Стимулируют	ASP ^{high} /IDO-1 ^{high} /KYN ^{high} /α-SMA ^{neg} CEF, NF-κB-опосредованная экспрессия воспалительных цитокинов и белка ECM асперина (ASP ^N)	ASP ^N способствует распространению опухоли и подавлению Т-клеточек	[187]
Рак желудка	iCAF eCAF	Стимулируют Стимулируют	IL-6 и CXCL12 POSTN	Взаимодействуют с Т-клетками Пронизывающая подгруппа CAF	[122]
	CAF	Стимулируют	IL-17, IL-23 и TNF-α, активация путей AKT и p38, JAK2/STAT3	CAF коррелируют с плохим прогнозом пациентов. IL-17а способствует миграции и инвазии клеток рака желудка	[188, 189]
	CAF-A CAF-B	Стимулируют Стимулируют	MMP2, FAP и COL1A2 α-SMA, PDGF-A и TAGLN	Экспрессия генов, связанных с EMT, повышена только в субпопуляции CAF	[87]
Колоректальный рак человека	enCAF adCAF vaCAF meCAF erCAF cyCAF	Стимулируют	TNFSF14-LTBR, IL-6F3 и IL-6-IL-6ST	Подтипы CAF, выделенные по изменению уровня мРНК, связанных с энтодермой (enCAF) с адгезией (adCAF) с сосудами (vaCAF) с мезенхимой (meCAF) с эндоплазматическим ретикуломом (erCAF) с клеточным циклом (cyCAF)	[190]
	CAF, полученные из NF с помощью экзосом, содержащих miR-10b	Стимулируют	TGF-β и α-SMA. Подавление экспрессии PI3K и снижение активности пути PI3K/AKT/mTOR	Эти CAF способны стимулировать рост опухоли <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	[191]

Таблица 4. Продолжение

Вид опухоли	Подтип CAF (маркеры)	Влияние на онкогенез	Факторы и пути	Примечания	Ссылка
	WNT2 ^{pos} CAF	Стимулируют	WNT2 через сигнальные каскады SOCS3/p-JAK2/p-STAT3	Секретируемый CAF WNT2 подавляет опосредованный дендритными клетками противоопухолевый Т-клеточный ответ	[192]
	CCL5 ^{pos} MMP3 ^{pos} CAF	Стимулируют	TSG-6, ERK, JAK2-STAT3, CCL5, MMP3, CD44-EGFR	TSG-6 связан с плохим прогнозом и метастазированием. TSG-6 активирует ERK и приводит к EMT посредством облегчения образования комплекса CD44-EGFR на клеточной мембране	[193]
	CAF четырех типов	Подавляют	BCL9, WNT/β-катенин	CAF влияют на иммунный надзор, связанный с раком, путем ингибирования передачи сигналов WNT	[194]
	Шесть субпопуляций CAF	Стимулируют	CCL2 и CXCL12	CCL2 может регулировать рост опухоли, миграцию раковых клеток, нейтрализация этого хемокина лишает способности к миграции	[152, 195]
Рак предстательной железы	CAF	Стимулируют	FGF7, IL-6, MMP2, MMP11, IL-17RB, но значительно более низкая экспрессия FGF10, IL-17RB и CXCL14	CAF из опухоли, резистентной к андрогенной депривации, экспрессируют MMP11 и NF-κB на значительно более высоком уровне, а TGF-β на более низком	[196]
Высокодифференцированный серозный рак яичников (HGSOC)	CAF-S1 (иммуноупрессивная) CAF-S2 CAF-S3 CAF-S4	Стимулируют	CXCL12β накапливается в CAF-S1 посредством miR-141/200a-зависимого механизма	CXCL12β играет решающую роль в иммуносупрессивной активности CAF-S1, надежный фактор прогноза при HGSOC	[118]
Рак яичников	DDR2 ^{pos} POSTN ^{pos} CAF DDR2 ^{neg} POSTN ^{pos} CAF DDR2 ^{neg} POSTN ^{neg} CAF	Стимулируют	DDR2, POSTN, ITGB1	Инвазия опухолевыми клетками в 3 раза выше при наличии DDR2 ^{pos} POSTN ^{pos} CAF по сравнению с DDR2 ^{neg} POSTN ^{neg} CAF	[197]

Таблица 4. Окончание

Вид опухоли	Подтип САФ (маркеры)	Влияние на онкогенез	Факторы и пути	Примечания	Ссылка
	САФ	Стимулируют	AXL, GPR176, ITGBL1 и TIMP3 идентифицированы как OvCa-специфичные САФ-маркеры	Четыре САФ-специфичных гена создают новую прогностическую сигнатуру	[198]
Гепатоцеллюлярная карцинома	САФ	Стимулируют	IL-6, STAT3, индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO)	Иммуносупрессивный эффект САФ на дендритные клетки. IL-6 из САФ активирует STAT3 в дендритных клетках, приводя к выработке IDO	[199]
	S100A4 ^{pos} САФ	Стимулируют	S100A4	Истощение клеток S100A4 ^{pos} при инъекции ганглиовира снизило фенотип стволовой опухоли	[200]
	<i>Другие</i>				
Фибросаркома, вызванная инъекцией канцерогена	(FSP1) ^{pos} /S100A4 ^{pos} -САФ	Подавляют	FSP1 ^{pos} / S100A4 ^{pos} САФ	Коллагеновая инкапсуляция канцерогенов в месте инъекции защищает от развития опухоли	[201]
Плоскоклеточный рак полости рта (OSCC)	CD68 ^{pos} α-SMA ^{pos} САФ	Стимулируют	CD68, классический маркер макрофагов	CD68 ^{pos} САФ участвуют в инициации опухоли и способствуют плохому прогнозу при OSCC	[202]
	САФ-N САФ-D	Стимулируют Стимулируют	Гиалуронан TGF-β1	Два подтипа САФ, которые способствуют инвазии клеток OSCC с помощью различных механизмов	[203]
	САФ GU-OSCC САФ GS-OSCC OSCC)	Стимулируют Стимулируют	MMP2	Способствуют инвазии кератиноцитов <i>in vitro</i> паракринным способом	[204]
OSCC	САФ	Подавляют	miR-138	miR-138 в САФ, полученных из OSCC, подавляют рост опухоли	[205]
	САФ	Стимулируют	TGF-β/SOX9, Y (SRY)-BOX9 (SOX9)	САФ способствуют миграции и инвазии опухолевых клеток. SOX9 способствует ЕМТ. Положительная корреляция с плохим прогнозом	[206]

пуляции CAF по-разному влияют на онкогенез. Использование трансгенных мышей, у которых удалены CAF или запрещена передача сигналов активации CAF в строме опухоли, позволило получить прямые доказательства противоопухолевых эффектов CAF.

Бифункциональность CAF изучена с помощью математического моделирования. Создана математическая модель взаимодействий между фибробластами и опухолевыми клетками [207], основанная на нелинейных дифференциальных уравнениях, которые описывают биохимические реакции основных факторов, участвующих в коммуникации фибробластов и раковых клеток. Взаимодействия между двумя типами клеток проиллюстрированы динамическим моделированием путей TGF- β и LIF, определена роль сигнальных молекул в прогрессировании или остановке роста опухоли [207].

Новые методы, такие как sc-RNA-seq и основанная на масс-спектрометрии цитометрия (CyTOF), а также мультиплексная проточная цитометрия и мультиплексное иммуноокрашивание, значительно облегчили идентификацию и валидацию биомаркеров разных субпопуляций CAF на транскрипционном или белковом уровнях. Для дальнейшей оценки прогностической ценности CAF необходимо проведение дополнительных исследований с использованием клинических образцов и клинически значимых модельных систем, которые позволят понять функции отдельных субпопуляций CAF. Текущие данные указывают на то, что определенные субпопуляции CAF имеют сходные характеристики и сигнатуры экспрессии генов при разных типах рака, в то время как другие субпопуляции, вероятно, существенно различаются при разных типах рака из-за гетерогенного клеточного происхождения CAF.

Метаболический статус CAF

Популяции CAF характеризуются метаболической гетерогенностью. ТМЕ обычно определяют как гипоксическую, лишенную питательных веществ кислую среду, к которой клетки стромы адаптируются посредством метаболического перепрограммирования [208]. Внеклеточные везикулы, секретируемые CAF, могут снижать окислительное фосфорилирование в митохондриях опухолевых клеток, усиливать их гликолиз и глутаминзависимое восстановительное карбоксилирование [209]. Горизонтальный перенос мтДНК с везикулами приводит к восстановлению окислительного фосфорилирования и выходу метастатических клеток рака молочной железы, устойчивых к гормональной терапии из состояния метаболического покоя [210].

Заклученные в везикулы метаболиты способны перепрограммировать метаболизм реципиентных клеток. Более того, идентифицирован *de novo* “готовый” перенос таких метаболитов, как аминокислоты, липиды и промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот, от CAF к опухолевым клеткам. Интернализация этих метаболитов может способствовать росту и прогрессии опухоли [209, 211].

Метаболический гомеостаз при различных состояниях питания в ТМЕ может быть частично обеспечен метаболической пластичностью CAF. Когда питательных веществ достаточно, CAF находятся в состоянии с повышенным метаболизмом глюкозы и глутамина для питания окружающих опухолевых клеток; когда питательные вещества истощаются и накапливаются побочные продукты метаболизма, активируется состояние CAF с усиленным глюконеогенезом молочной кислоты и детоксикацией NH_4^+ для устойчивого преобразования метаболитов [212].

Некоторые субпопуляции CAF претерпевают метаболические изменения и становятся катаболическими CAF. В число биомаркеров этого катаболического фенотипа CAF входят пониженный уровень кавеолина-1 (CAV-1) [213] и повышенный уровень переносчика монокарбоксилата 4 (MCT4) [214]. CAV-1 в большом количестве синтезируется в покоящихся фибробластах. Отсутствие экспрессии CAV-1 считается маркером аутофагии, указывающим на снижение митохондриального метаболизма (окислительное фосфорилирование), усиление гликолиза и окислительного стресса [215]. MCT4, экспрессия которого контролируется HIF-1, является основным клеточным экспортером лактата [216]. Катаболические фибробласты и анаболические опухолевые клетки образуют “метаболическое сцепление”. Эта метаболическая связь существует при различных злокачественных новообразованиях человека, таких как рак молочной железы, рак головы и шеи и рак предстательной железы [217–219]. Основными сигнальными путями катаболических CAF являются HIF1- α , NF- κ B и TGF- β , способствующие аутофагии, гликолизу, окислительному стрессу и старению [220]. Катаболические CAF для поддержки микросреды опухолей генерируют местное “митохондриальное топливо”: жирные кислоты, глутамин, кетоновые тела, лактат. Замечено, что не все CAF становятся катаболическими. Существуют и катаболические, и анаболические CAF. Катаболические изменения CAF могут быть обращены вспять после лечения антиоксидантами [221–223].

Сопровождается ли трансформация CAF, сдерживающих рост опухоли, в CAF, способствующих развитию опухоли, изменениями катаболического фенотипа? Ответ до сих пор не ясен.

CAF и резистентность к лечению опухолей

Huang и соавт. обнаружили, что радиационно устойчивые ткани рака носоглотки постоянно инфильтрируются большим количеством CAF по сравнению с радиочувствительными тканями опухоли. Дальнейшие исследования показали, что CAF индуцируют формирование радиорезистентности и способствуют выживанию опухолевых клеток после облучения через путь IL-8/NF- κ B, уменьшая вызванное облучением повреждение ДНК и активируя его репарацию. Лечение трансластомом, ингибитором CAF, снижало выживаемость опухолевых клеток и ослабляло радиорезистентность [224].

CAF играют также важную роль в формировании химиорезистентности, используя различные механизмы, такие как секреция цитокинов и микроРНК, увеличение количества опухолевых стволовых клеток и снижение биодоступности лекарственных средств за счет образования стромального барьера [225]. CAF повышают устойчивость клеток рака молочной железы, толстой кишки и поджелудочной железы к химиотерапевтическим агентам, таким как гемцитабин и доксорубин, а также к комбинированной химиотерапии (доксорубин + 5-фторурацил + цисплатин), вырабатывая IL-6, IL-17A, PDGF и IGF, которые активируют NF- κ B и пути ERK в опухолевых клетках, способствуя стабилизации антиапоптотических белков и пролиферации опухолевых стволовых клеток [226–230]. Например, IL-6 увеличивает выживаемость клеток рака молочной железы путем передачи сигналов ERK, которые стабилизируют антиапоптотический белок MCL-1 [226, 231]. CAF служат источником внеклеточных везикул, которые содержат регуляторные микроРНК, такие как miR-98-5p и miR-522. Когда везикулы захватываются опухолевыми клетками, микроРНК могут способствовать формированию устойчивости к цисплатину путем подавления ингибитора циклинзависимой киназы CDKN1A и ферроптоза, механизма запрограммированной клеточной гибели, который характеризуется накоплением перекисей липидов и отсутствием ответа клеток на антиоксиданты [232, 233]. Доставка химиотерапевтических средств при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы и раке молочной железы мешает физический барьер, обусловленный секрецией гиалуроновой кислоты и коллагена CAF. В частности, гиалуронан создает высокое давление интерстициальной жидкости, ограничивая распространение препарата и вызывая сосудистый коллапс [234–237].

Динамика изменений CAF при развитии опухоли

Пластичность и гетерогенность CAF могут иметь два основных объяснения: (1) существова-

ние динамических переходов между фенотипами CAF, способствующими или сдерживающими развитие опухоли в зависимости от сложного контекста TME; (2) широкий спектр независимых субпопуляций CAF с различными функциями [2].

Наблюдаемая картина бимодальности CAF приводит к закономерному предположению о возможности постепенных изменений CAF в ходе онкогенеза. В самом деле, сравнительный анализ позволяет различить покоящиеся CAF, ограничивающие и способствующие прогрессии опухоли CAF [161, 238]. Покоящиеся CAF и CAF, сдерживающие развитие опухоли, часто находят на ранних стадиях рака, тогда как CAF, способствующие развитию опухоли, присутствуют преимущественно на поздних стадиях заболевания. Постоянное взаимодействие между CAF и опухолевыми клетками приводит к хронической активации CAF. Взаимные изменения CAF и опухолевых клеток продолжаются на всех стадиях онкогенеза.

Важную роль в прогрессии опухоли играет ее микроокружение, однако основной механизм, который позволяет уравновесить эффекты стимуляции или ингибирования опухоли ее микроокружением, пока неизвестен.

Если нормальные фибробласты действительно динамически изменяются — дифференцируются в CAF с формированием опухоли-ограничивающего состояния, а затем приобретают онкогенные функции [239–242], тогда предотвращение функционального изменения CAF, при котором формируется фенотип, поддерживающий прогрессирование опухоли, является важной задачей противоопухолевой терапии.

ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНАЯ ГЛАВА: НОВАЯ ПАРАДИГМА ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

Глубокое понимание межклеточного взаимодействия в строме опухоли и функций различных типов клеток имеет решающее значение для разработки новых подходов к терапии опухолей. Предполагается, что эффективным может быть одновременное воздействие на опухолевые и стромальные клетки, особенно на онкоподдерживающие субпопуляции CAF.

CAF представляют собой уникальный и клинически значимый компонент TME, важный для понимания сложного взаимодействия между клетками TME и опухоли. Функциональная и фенотипическая гетерогенность, присущая CAF, представляет, с одной стороны, проблему, а с другой, обуславливает возможность разработки более специфических и персонализированных терапий.

В TME CAF сосуществуют с опухолевыми клетками, обеспечивая им паракринную нишу и пита-

тельные вещества, необходимые для роста опухоли. Разрыв этого контакта может оказаться решающим для открытия новых терапевтических путей.

В результате динамического межклеточного молекулярного диалога между опухолью и стромой происходит усиление специфических проканцерогенных фенотипов и функций неопластических клеток. Однако в некоторых случаях сигнальные пути противоположным образом регулируются в опухоли и в окружающей ее области, поэтому терапевтические стратегии должны учитывать равновесие опухоль-строма. Недавно были проанализированы четыре основных сигнальных пути, участвующих в меланомогенезе: TGF- β , MAPK, WNT/ β -катенин и Нурро [243]. Сделан вывод, что с терапевтической точки зрения опухоль и строму можно рассматривать как уникальную функциональную единицу. Ремоделирование ЕСМ, по-видимому, играет центральную роль в биологии меланомы, поскольку активация важных путей передачи сигналов, участвующих в меланомогенезе, чрезвычайно чувствительна к механотрансдукции. Эта точка зрения подразумевает сдвиг терапевтического подхода от неопластических клеточно-ориентированных стратегий к стромоцентрическим. Предлагается перепроверить уже используемые в клинической практике молекулы с учетом межклеточного молекулярного диалога опухолевых и неопухолевых клеток. По-видимому, разработка стратегий, способных одновременно воздействовать на клетки меланомы и CAF, представляет собой исключительную возможность для прецизионной терапии рака [243].

Необходимы дополнительные исследования, особенно использующие современные биоинформатические методы в сочетании с базовыми научными подходами, которые позволят понять функции CAF — этого критического компонента ТМЕ. К счастью, технологические достижения последних лет открывают новые возможности в понимании сложной биологии CAF при раке.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1062).

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. Kalluri R. (2016) The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **16**(9), 582–598.
2. Chen Y., McAndrews K.M., Kalluri R. (2021) Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **18**(12), 792–804.

3. LeBleu V.S., Kalluri R. (2018) A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact. *Dis. Model Mech.* **11**(4), dmm029447.
4. Patel A.K., Singh S. (2020) Cancer associated fibroblasts: phenotypic and functional heterogeneity. *Front. Biosci.* **25**(5), 961–978.
5. Nissen N.I., Karsdal M., Willumsen N. (2019) Collagens and cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to cancer biology. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **38**(1), 115.
6. Liu T., Zhou L., Li D., Andl T., Zhang Y. (2019) Cancer-associated fibroblasts build and secure the tumor microenvironment. *Front. Cell. Dev. Biol.* **7**, 60.
7. Wang F.T., Sun W., Zhang J.T., Fan Y.Z. (2019) Cancer-associated fibroblast regulation of tumor neoangiogenesis as a therapeutic target in cancer. *Oncol. Lett.* **17**(3), 3055–3065.
8. Gao P., Li C., Chang Z., Wang X., Xuan M. (2018) Carcinoma associated fibroblasts derived from oral squamous cell carcinoma promote lymphangiogenesis via c-Met/PI3K/AKT *in vitro*. *Oncol. Lett.* **15**(1), 331–337.
9. Yoshida G.J., Azuma A., Miura Y., Orimo A. (2019) Activated fibroblast program orchestrates tumor initiation and progression; molecular mechanisms and the associated therapeutic strategies. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(9), 2256.
10. Monteran L., Erez N. (2019) The dark side of fibroblasts: cancer-associated fibroblasts as mediators of immunosuppression in the tumor microenvironment. *Front. Immunol.* **10**, 1835.
11. Foster D.S., Jones R.E., Ransom R.C., Longaker M.T., Norton J.A. (2018) The evolving relationship of wound healing and tumor stroma. *JCI Insight*. **3**(18), e99911.
12. Dvorak H.F. (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N. Engl. J. Med.* **315**(26), 1650–1659.
13. Öhlund D., Handly-Santana A., Biffi G., Elyada E., Almeida A.S., Ponz-Sarvisé M., Corbo V., Oni T.E., Hearn S.A., Lee E.J., Chio I.I.C., Hwang C.-I., Tiriác H., Baker L.A., Engle D.D., Feig C., Kultti A., Egeblad M., Fearon D.T., Crawford J.M., Clevers H., Park Y., Tuveson D.A. (2017) Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* **214**(3), 579–596.
14. Sahai E., Astsaturov I., Cukierman E., DeNardo D.G., Egeblad M., Evans R.M., Fearon D., Gretchen F.R., Hingorani S.R., Hunter T., Hynes R.O., Jain R.K., Janowitz T., Jorgensen C., Kimmelman A.C., Kolonin M.G., Maki R.G., Powers R.S., Puré E., Ramirez D.C., Scherz-Shouval R., Sherman M.H., Stewart S., Tlsty T.D., Tuveson D.A., Watt F.M., Weaver V., Weeraratna A.T., Werb Z. (2020) A frame work for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Cancer*. **20**(3), 174–186.
15. Erez N., Truitt M., Olson P., Arron S. T., Hanahan D. (2010) Cancer associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor promoting inflammation in an NF-kappaB-dependent manner. *Cancer Cell*. **17**(2), 135–147.
16. Rønnov-Jessen L., Petersen O.W., Kotliansky V.E., Bissell M.J. (1995) The origin of the myofibroblasts in

- breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J. Clin. Investig.* **95**(2), 859–873.
17. Zhang J., Liu J. (2013) Tumor stroma as targets for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **137**(2), 200–215.
 18. Tejada M.L., Yu L., Dong J., Jung K., Meng G., Peale F.V., Frantz G.D., Hall L., Liang X.H., Gerber H.P., Ferrara N. (2006) Tumor-driven paracrine platelet-derived growth factor receptor alpha signaling is a key determinant of stromal cell recruitment in a model of human lung carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **12**(9), 2676–2688.
 19. Boyd L.N.C., Andini K.D., Peters G.J., Kazemier G., Giovannetti E. (2022) Heterogeneity and plasticity of cancer-associated fibroblasts in the pancreatic tumor microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* **82**, 184–196.
 20. Tian H., Callahan C.A., DuPree K.J., Darbonne W.C., Ahn C.P., Scales S.J., De Sauvage F.J. (2009) Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**(11), 4254–4259.
 21. Elenbaas B., Weinberg R.A. (2001) Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp. Cell Res.* **264**(1), 169–184.
 22. Strell C., Paulsson J., Jin S.B., Tobin N.P., Mezheyski A., Roswall P., Mutgan C., Mitsios N., Johansson H., Wickberg S.M., Svedlund J., Nilsson M., Hall P., Mulder J., Radisky D.C., Pietras K., Bergh J., Lendahl U., Wärnberg F., Östman A. (2019) Impact of epithelial-stromal interactions on peritumoral fibroblasts in ductal carcinoma *in situ*. *J. Natl. Cancer Inst.* **111**(9), 983–995.
 23. Albrengues J., Bertero T., Grasset E., Bonan S., Maiel M., Bourget I., Philippe C., Herraiz Serrano C., Benamar S., Croce O., Sanz-Moreno V., Meneguzzi G., Feral C.C., Cristofari G., Gaggioli C. (2015) Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nat. Commun.* **6**, 10204.
 24. Albrengues J., Bourget I., Pons C., Butet V., Hofman P., Tartare-Deckert S., Feral C.C., Meneguzzi G., Gaggioli C. (2014) LIF mediates proinvasive activation of stromal fibroblasts in cancer. *Cell Rep.* **7**(5), 1664–1678.
 25. Avery D., Govindaraju P., Jacob M., Todd L., Monslow J., Pure E. (2018) Extracellular matrix directs phenotypic heterogeneity of activated fibroblasts. *Matrix Biol.* **67**, 90–106.
 26. Calvo F., Ege N., Grande-Garcia A., Hooper S., Jenkins R.P., Chaudhry S.I., Harrington K., Williamson P., Moeendarbary E., Charras G., Sahai E. (2013) Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Cell. Biol.* **15**(6), 637–646.
 27. Amatangelo M.D., Bassi D.E., Klein-Szanto A.J., Cukierman E. (2005) Stroma-derived three-dimensional matrices are necessary and sufficient to promote desmoplastic differentiation of normal fibroblasts. *Am. J. Pathol.* **167**(2), 475–488.
 28. Ferrari N., Ranftl R., Chicherova I., Slaven N.D., Moeendarbary E., Farrugia A.J., Lam M., Semianikova M., Westergaard M.C.W., Tchou J., Magnani L., Calvo F. (2019) Dickkopf-3 links HSF1 and YAP/TAZ signalling to control aggressive behaviours in cancer-associated fibroblasts. *Nat. Commun.* **10**(1), 130.
 29. Fordyce C., Fessenden T., Pickering C., Jung J., Singla V., Berman H., Tlsty T. (2010) DNA damage drives an activin α -dependent induction of cyclooxygenase-2 in premalignant cells and lesions. *Cancer Prev. Res. (Phila)* **3**(2), 190–201.
 30. Costa A., Scholer-Dahirel A., Mechta-Grigoriou F. (2014) The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* **25**, 23–32.
 31. Zou B., Liu X., Zhang B., Gong Y., Cai C., Li P., Chen J., Xing S., Chen J., Peng S., Pokhrel B., Ding L., Zeng L., Li J. (2018) The expression of FAP in hepatocellular carcinoma cells is induced by hypoxia and correlates with poor clinical outcomes. *J. Cancer.* **9**(18), 3278–3286.
 32. Radisky D.C., Levy D.D., Littlepage L.E., Liu H., Nelson C.M., Fata J.E., Leake D., Godden E.L., Albertson D.G., Nieto M.A., Werb Z., Bissell M.J. (2005) Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature.* **436**(7047), 123–127.
 33. Zheng X., Xu M., Yao B., Wang C., Jia Y., Liu Q. (2016) IL-6/STAT3 axis initiated CAFs via up-regulating TIMP-1 which was attenuated by acetylation of STAT3 induced by PCAF in HCC microenvironment. *Cell. Signal.* **28**(9), 1314–1324.
 34. Liu T., Han C., Wang S., Fang P., Ma Z., Xu L., Yin R. (2019) Cancer-associated fibroblasts: an emerging target of anti-cancer immunotherapy. *J. Hematol. Oncol.* **12**(1), 86.
 35. Shany S., Sigal-Batikoff I., Lamprecht S. (2016) Vitamin D and myofibroblasts in fibrosis and cancer: at cross-purposes with TGF- β /SMAD signaling. *Anti-cancer Res.* **36**(12), 6225–6234.
 36. Sherman M.H., Yu R.T., Engle D.D., Ding N., Atkins A.R., Tiriach H., Collisson E.A., Connor F., Van Dyke T., Kozlov S., Martin P., Tseng T.W., Dawson D.W., Donahue T.R., Masamune A., Shimosegawa T., Apte M.V., Wilson J.S., Ng B., Lau S.L., Gunton J.E., Wahl G.M., Hunter T., Drebin J.A., O'Dwyer P.J., Liddle C., Tuveson D.A., Downes M., Evans R.M. (2014) Vitamin D receptor-mediated stromal reprogramming suppresses pancreatitis and enhances pancreatic cancer therapy. *Cell.* **159**(1), 80–93.
 37. Quante M., Tu S.P., Tomita H., Gonda T., Wang S.S.W., Takashi S., Baik G.H., Shibata W., Diprete B., Betz K.S., Friedman R., Varro A., Tycko B., Wang T.C. (2011) Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell.* **19**(2), 257–272.
 38. Kim W., Barron D.A., SanMartin R., Chan K.S., Tran L.L., Yang F., Ressler S.J., Rowley D.R. (2014) RUNX1 is essential for mesenchymal stem cell proliferation and myofibroblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**(46), 16389–16394.
 39. Cho J.A., Park H., Lim E.H., Kim K.H., Choi J.S., Lee J.H., Shin J.W., Lee K.W. (2011) Exosomes from ovarian cancer cells induce adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to acquire the physical and

- functional characteristics of tumor-supporting myofibroblasts. *Gynecol. Oncol.* **123**(2), 379–386.
40. Cho J.A., Park H., Lim E.H., Lee K.W. (2012) Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in to myofibroblast-like cells. *Int. J. Oncol.* **40**(1), 130–138.
 41. Kalluri R., Weinberg R.A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**(6), 1420–1428.
 42. Kahounová Z., Kurfürstová D., Bouchal J., Kharaishvili G., Navrátil J., Remšík J., Šimečková Š., Študent V., Kozubík A., Souček K. (2018) The fibroblast surface markers FAP, anti-fibroblast, and FSP are expressed by cells of epithelial origin and may be altered during epithelial-to-mesenchymal transition. *Cytometry A.* **93**(9), 941–951.
 43. Zeisberg E.M., Potenta S., Xie L., Zeisberg M., Kalluri R. (2007) Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* **67**(21), 10123–10128.
 44. Hosaka K., Yang Y., Seki T., Fischer C., Dubey O., Fredlund E., Hartman J., Religa P., Morikawa H., Ishii Y., Sasahara M., Larsson O., Cossu G., Cao R., Lim S., Cao Y. (2016) Pericyte-fibroblast transition promotes tumor growth and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**(38), E5618–E5627.
 45. Abe R., Donnelly S.C., Peng T., Bucala R., Metz C.N. (2001) Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J. Immunol.* **166**(12), 7556–7562.
 46. Kidd S., Spaeth E., Watson K., Burks J., Lu H., Klopp A., Andreeff M., Marini F.C. (2012) Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One.* **7**(2), e30563.
 47. Jotzu C., Alt E., Welte G., Li J., Hennessy B.T., Devarajan E., Krishnappa S., Pinilla S., Droll L., Song Y.H. (2011) Adipose tissue derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor derived factors. *Cell. Oncol.* **34**(1), 55–67.
 48. Omary M.B., Lugea A., Lowe A.W., Pandol S.J. (2007) The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J. Clin. Invest.* **117**(1), 50–59.
 49. Yin C., Evason K.J., Asahina K., Stainier D.Y.R. (2013) Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J. Clin. Invest.* **123**(5), 1902–1910.
 50. Haviv I., Polyak K., Qiu W., Hu M., Campbell I. (2009) Origin of carcinoma associated fibroblasts. *Cell Cycle Georget. Tex.* **8**(4), 589–595.
 51. Nair N., Calle A.S., Zahra M.H., Prieto-Vila M., Oo A.K.K., Hurley L., Vaidyanath A., Seno A., Masuda J., Iwasaki Y., Tanaka H., Kasai T., Seno M. (2017) A cancer stem cell model as the point of origin of cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment. *Sci. Rep.* **7**(1), 6838.
 52. Gascard P., Tlsty T. (2016) Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev.* **30**(9), 1002–1019.
 53. Liu Q., Liao Q., Zhao Y. (2017) Chemotherapy and tumor microenvironment of pancreatic cancer. *Cancer Cell Int.* **17**, 68.
 54. Whittle M.C., Hingorani S.R. (2019) Fibroblasts in pancreatic ductal adenocarcinoma: biological mechanisms and the targets. *Gastroenterology.* **156**(7), 2085–2096.
 55. Theiss A.L., Simmons J.G., Jobin C., Lund P.K. (2005) Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J. Biol. Chem.* **280**(43), 36099–36109.
 56. Zhang D., Wang Y., Shi Z., Liu J., Sun P., Hou X., Zhang J., Zhao S., Zhou B.P., Mi J. (2015) Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts by IDH3α downregulation. *Cell. Rep.* **10**(8), 1335–1348.
 57. Nurmik M., Ullmann P., Rodriguez F., Haan S., Letellier E. (2020) In search of definitions: cancer-associated fibroblasts and their markers. *Int. J. Cancer.* **146**(4), 895–905.
 58. Joshi R.S., Kanugula S.S., Sudhir S., Pereira M.P., Jain S., Aghi M.K. (2021) The role of cancer-associated fibroblasts in tumor progression. *Cancers (Basel).* **13**(6), 1399.
 59. Kleinert R., Prenzel K., Stoecklein N., Alakus H., Bollschweiler E., Holscher A., Warnecke-Eberz U. (2015) Gene expression of Col11A1 is a marker not only for pancreas carcinoma but also for adenocarcinoma of the papilla of Vater, discriminating between carcinoma and chronic pancreatitis. *Anticancer Res.* **35**(11), 6153–6158.
 60. Öhlund D., Elyada E., Tuveson D. (2014) Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J. Exp. Med.* **211**(8), 1503–1523.
 61. Feig C., Jones J.O., Kraman M., Wells R.J., Deonarine A., Chan D.S., Connell C.M., Roberts E.W., Zhao Q., Caballero O.L., Teichmann S.A., Janowitz T., Jodrell D.I., Tuveson D.A., Fearon D.T. (2013) Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**(50), 20212–20217.
 62. Lee H.O., Mullins S.R., Franco-Barraza J., Valianou M., Cukierman E., Cheng J.D. (2011) FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells. *BMC Cancer.* **11**, 245.
 63. Strutz F., Okada H., Lo C.W., Danoff T., Carone R.L., Tomaszewski J.E., Neilson E.G. (1995) Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J. Cell. Biol.* **130**(2), 393–405.
 64. Osterreicher C.H., Penz-Osterreicher M., Grivennikov S.I., Guma M., Koltsova E.K., Datz C., Sasik R., Hardiman G., Karin M., Brenne D.A. (2011) Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflammatory subpopulation of macrophages in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**(1), 308–313.
 65. Garcia P.E., Adoumie M., Kim E.C., Zhang Y., Scales M.K., El-Tawil Y.S., Shaikh A.Z., Wen H.-J., Bednar F., Allen B.L., Wellik D.M., Crawford H.C., Pasca di Magliano M. (2020) Differential contribution of pancreatic fibroblast subsets to the pancreatic can-

- cer stroma. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **10**(3), 581–599.
66. Dominguez C.X., Muller S., Keerthivasan S., Koepfen H., Hung J., Gierke S., Breart B., Foreman O., Bainbridge T.W., Castiglioni A., Senbabaoglu Y., Modrusan Z., Liang Y., Junttila M.R., Klijn C., Burgon R., Turley S.J. (2020) Single-cell RNA sequencing reveals stromal evolution into LRRC15⁺ myofibroblasts as a determinant of patient response to cancer immunotherapy. *Cancer Discov.* **10**(2), 232–253.
 67. Elyada E., Bolisetty M., Laise P., Flynn W.F., Courtois E.T., Burkhart R.A., Teinor J.A., Belleau P., Biffi G., Lucito M.S., Sivajothi S., Armstrong T.D., Engle D.D., Yu K.H., Hao Y., Wolfgang C.L., Park Y., Preall J., Jaffee E.M., Califano A., Robson P., Tuveson D.A. (2019) Cross-species single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma reveals antigen-presenting cancer-associated fibroblasts. *Cancer Discov.* **9**(8), 1102–1123.
 68. Biffi G., Oni T.E., Spielman B., Hao Y., Elyada E., Park Y., Preall J., Tuveson D.A. (2019) IL1-induced JAK/STAT signaling is antagonized by TGFβ to shape CAF heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discov.* **9**(2), 282–301.
 69. Maeda K., Enomoto A., Hara A., Asai N., Kobayashi T., Horinouchi A., Maruyama S., Ishikawa Y., Nishiyama T., Kiyoi H., Kato T., Ando K., Weng L., Mii S., Asai M., Mizutani Y., Watanabe O., Hirooka Y., Goto H., Takahashi M. (2016) Identification of meflin as a potential marker for mesenchymal stromal cells. *Sci. Rep.* **6**, 22288.
 70. Mizutani Y., Kobayashi H., Iida T., Asai N., Masamune A., Hara A., Esaki N., Ushida K., Mii S., Shiraki Y., Ando K., Weng L., Ishihara S., Ponik S.M., Conklin M.W., Haga H., Nagasaka A., Miyata T., Matsuyama M., Kobayashi T., Fujii T., Yamada S., Yamaguchi J., Wang T., Woods S.L., Worthley D., Shimamura T., Fujishiro M., Hirooka Y., Enomoto A., Takahashi M. (2019) Meflin-positive cancer-associated fibroblasts inhibit pancreatic carcinogenesis. *Cancer Res.* **79**(20), 5367–5381.
 71. Li S., Zhao W., Sun M. (2020) An analysis regarding the association between the ISLR gene and gastric carcinogenesis. *Front. Genet.* **11**, 620.
 72. Yeung C.L.A., Co N.-N., Tsuruga T., Yeung T.-L., Kwan S.Y., Leung C.S., Li Y., Lu E.S., Kwan K., Wong K.-K., Schmandt R., Lu K.H., Mok S.C. (2016) Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1. *Nat. Commun.* **7**, 11150.
 73. Funa K., Sasahara M. (2013) The roles of PDGF in development and during neurogenesis in the normal and diseased nervous system. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **9**(2), 168–181.
 74. Farahani R.M., Xaymardan M. (2015) Platelet-derived growth factor receptor alpha as a marker of mesenchymal stem cells in development and stem cell biology. *Stem Cells Int.* **2015**, 362753.
 75. Hu G., Wang S., Xu F., Ding Q., Chen W., Zhong K., Huang L., Xu Q. (2018) Tumor-infiltrating Podoplanin⁺ fibroblasts predict worse outcome in solid tumors. *Cell. Physiol. Biochem.* **51**(3), 1041–1050.
 76. Planche A., Bacac M., Provero P., Fusco C., Delorenzi M., Stehle J.-C., Stamenkovic I. (2011) Identification of prognostic molecular features in the reactive stroma of human breast and prostate cancer. *PLoS One.* **6**(5), e18640.
 77. Mezawa Y., Orimo A. (2016) The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas. *Cell Tissue Res.* **365**(3), 675–689.
 78. Ozdemir B.C., Pentcheva-Hoang T., Carstens J.L., Zheng X., Wu C.C., Simpson T.R., Laklai H., Sugimoto H., Kahlert C., Novitskiy S.V., De Jesus-Acosta A., Sharma P., Heidari P., Mahmood U., Chin L., Moses H.L., Weaver V.M., Maitra A., Allison J.P., LeBleu V.S., Kalluri R. (2015) Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. *Cancer Cell.* **28**(6), 831–833.
 79. Costa A., Kieffer Y., Scholer-Dahirel A., Pelon F., Bourachot B., Cardon M., Sirven P., Magagna I., Fuhrmann L., Bernard C., Bonneau C., Kondratova M., Kuperstein I., Zinovyev A., Givel A.M., Parrini M.C., Soumelis V., Vincent-Salomon A., Mechta-Grigoriou F. (2018) Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer. *Cancer Cell.* **33**(3), 463–479.
 80. Zhou J., Wang X.H., Zhao Y.X., Chen C., Xu X.Y., Sun Q., Wu H.-Y., Chen M., Sang J.-F., Su L., Tang X.-Q., Shi X.-B., Yin Zhang Y., Yu Q., Yao Y.-Z., Zhang W.-J. (2018) Cancer-associated fibroblasts correlate with tumor-associated macrophages infiltration and lymphatic metastasis in triple negative breast cancer patients. *J. Cancer.* **9**(24), 4635–4641.
 81. Jiang M., Wang H., Chen H., Han Y. (2020) SMARCD3 is potential prognostic marker and therapeutic target in CAFs. *Aging.* **12**(20), 20835–20861.
 82. Stock K., Estrada M., Vidic S., Gjerde K., Rudisch A., Santo V.E., Barbier M., Blom S., Arundkar S.C., Irwin Selvam I., Osswald A., Stein Y., Gruenewald S., Brito C., van Weerden W., Rotter V., Boghaert E., Oren M., Sommergruber W., Chong Y., de Hoogt R., Graeser R. (2016) Capturing tumor complexity *in vitro*: comparative analysis of 2D and 3D tumor models for drug discovery. *Sci. Rep.* **6**, 28951.
 83. Micallef L., Vedrenne N., Billet F., Coulomb B., Darby I.A., Desmoulière A. (2012) The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair.* **5**(Suppl. 1), S5.
 84. Menezes S., Okail M.H., Jalil S.M.A., Kocher H.M., Cameron A.J.M. (2022) Cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer: new subtypes, new markers, new targets. *J. Pathol.* **257**(4), 526–544.
 85. Surowiak P., Murawa D., Materna V., Maciejczyk A., Pudelko M., Ciesla S., Breborowicz J., Murawa P., Zabel M., Dietel M., Lage H. (2007) Occurrence of stromal myofibroblasts in the invasive ductal breast cancer tissue is an unfavourable prognostic factor. *Anticancer Res.* **27**(4C), 2917–2924.
 86. Tsujino T., Seshimo I., Yamamoto H., Ngan C.Y., Ezumi K., Takemasa I., Ikeda M., Sekimoto M., Matsura N., Monden M. (2007) Stromal myofibroblasts

- predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**(7), 2082–2090.
87. Li H., Courtois E., Sengupta D., Tan Y., Chen K.H., Goh J.J.L., Kong S.L., Chua C., Hon L.K., Tan W.S., Wong M., Choi P.J., Wee L.J.K., Hillmer A.M., Tan I.B., Robson P., Prabhakar S. (2017) Reference component analysis of single-cell transcriptomes elucidates cellular heterogeneity in human colorectal tumors. *Nat. Genet.* **49**(5), 708–718.
 88. Bergers G., Song S. (2005) The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol.* **7**(4), 452–464.
 89. Latif N., Sarathchandra P., Chester A., Yacoub M.H. (2014) Expression of smooth muscle cell markers and co-activators in calcified aortic valves. *Eur. Heart J.* **36**(21), 1335–1345.
 90. Плешкан В.В., Алексеенко И.В., Тюлькина Д.В., Кузьмич А.И., Зиновьева М.В., Свердлов Е.Д. (2016) Белок активации фибробластов FAP как возможная мишень в противоопухолевой стратегии. *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.* **34**(3), 90–97.
 91. Brennen W., Isaacs J., Denmeade S. (2012) Rationale behind targeting fibroblast activation protein expressing carcinoma-associated fibroblasts as a novel chemotherapeutic strategy. *Mol. Cancer Ther.* **11**(2), 257–266.
 92. Moreno-Ruiz P., Corvigno S., te Grootenhuis N.C., La Fleur L., Backman M., Strell C., Mezheyeuski A., Hoelzlwimmer G., Klein C., Botling J., Micke P., Östman A. (2021) Stromal FAP is an independent poor prognosis marker in non-small cell lung adenocarcinoma and associated with p53 mutation. *Lung Cancer.* **155**, 10–19.
 93. Narra K., Mullins S., Lee H., Strzemkowski-Brun B., Magalong K., Christiansen V.J., McKee P.A., Egleston B., Cohen S.J., Weiner L.M., Meropol N.J., Cheng J.D. (2007) Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting fibroblast activation protein in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biol. Ther.* **6**(11), 1691–1699.
 94. Hofheinz R., al-Batran S., Hartmann F., Hartung G., Jäger D., Renner C., Tanswell P., Kunz U., Amelsberg A., Kuthan H., Stehle G. (2003) Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: an early phase II trial of sibrotuzumab in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncology.* **26**(1), 44–48.
 95. Heldin C. (2013) Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell. Commun. Signal.* **11**, 97.
 96. Nallanthighal S., Heiserman J.P., Cheon D.-J. (2021) Collagen type XI alpha 1 (COL11A1): a novel biomarker and a key player in cancer. *Cancers (Basel).* **13**(5), 935.
 97. Jia D.Y., Liu Z.Q., Deng N., Tan T.Z., Huang R.Y.J., Taylor-Harding B., Cheon D.J., Lawrenson K., Wiedemeyer W.R., Walts A.E., Karlan B.Y., Orsulic S. (2016) A COL11A1-correlated pan-cancer gene signature of activated fibroblasts for the prioritization of therapeutic targets. *Cancer Lett.* **382**(2), 203–214.
 98. Louault K., Liand R.-R., DeClerck Y.A. (2020) Cancer-associated fibroblasts: understanding their heterogeneity. *Cancers (Basel).* **12**(11), 3108.
 99. Bartoschek M., Oskolkov N., Bocci M., Lovrot J., Larsson C., Sommarin M., Madsen C.D., Lindgren D., Pekar G., Karlsson G., Ringnér M., Bergh J., Björklund Å., Pietras K. (2018). Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing. *Nat. Commun.* **9**(1), 5150.
 100. Walter S.G., Scheidt S., Nibler R., Gaisendrees C., Zarghooni K., Schildberg F.A. (2021) In-depth characterization of stromal cells within the tumor microenvironment yields novel therapeutic targets. *Cancers (Basel).* **13**(6), 1466.
 101. Berglund E., Maaskola J., Schultz N., Friedrich S., Marklund M., Bergenstråhle J., Tarish F., Tanoglidis A., Vickovic S., Larsson L., Salmén F., Ogris C., Wallenborg K., Lagergren J., Ståhl P., Sonnhämmer E., Helleday T., Lundeberg J. (2018) Spatial maps of prostate cancer transcriptomes reveal an unexplored landscape of heterogeneity. *Nat. Commun.* **9**(1), 2419.
 102. Hosein A.N., Huang H., Wang Z., Parmar K., Du W., Huang J., Maitra A., Olson E., Verma U., Brekken R.A. (2019) Cellular heterogeneity during mouse pancreatic ductal adenocarcinoma progression at single-cell resolution. *JCI Insight.* **5**(16), e129212.
 103. Puram S.V., Tirosh I., Parikh A.S., Patel A.P., Yizhak K., Gillespie S., Rodman C., Luo C.L., Mroz E.A., Emerick K.S., Deschler D.G., Varvares M.A., Mylvaganam R., Rozenblatt-Rosen O., Rocco J.W., Faquin W.C., Lin D.T., Regev A., Bernstein B.E. (2017) Single-cell transcriptomic analysis of primary and metastatic tumor ecosystems in head and neck cancer. *Cell.* **171**(7), 1611–1624.
 104. Neuzillet C., Tijeras-Raballand A., Ragulan C., Cros J., Patil Y., Martinet M., Erkan M., Kleeff J., Wilson J., Apte M., Tosolini M., Wilson A.S., Delvecchio F.R., Bousquet C., Paradis V., Hammel P., Sadanandam A., Kocher H.M. (2019) Inter- and intra-tumoural heterogeneity in cancer-associated fibroblasts of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Pathol.* **248**(1), 51–65.
 105. Олейникова Н.А., Данилова Н.В., Михайлов И.А., Семина Е.В., Мальков П.Г. (2020) Опухоль-ассоциированные фибробласты и их значение в прогрессии злокачественных новообразований. *Архив патологии.* **82**(1), 68–77.
 106. Dang H., Harryvan T.J., Hawinkels L.J.A.C. (2021) Fibroblast subsets in intestinal homeostasis, carcinogenesis, tumor progression, and metastasis. *Cancers (Basel).* **13**(2), 183.
 107. Karta J., Bossicard Y., Kotzamanis K., Dolznig H., Letellier E. (2021) Mapping the metabolic networks of tumor cells and cancer-associated fibroblasts. *Cells.* **10**(2), 304.
 108. Steele N.G., Biffi G., Kemp S.B., Zhang Y., Drouillard D., Syu L.-J., Hao Y., Oni T.E., Brosnan E., El-yada E., Doshi A., Hansma C., Espinoza C., Abbas A., The S., Irizarry-Negron V., Halbrook C.J., Franks N.E., Hoffman M.T., Brown K., Carpenter E.S., Nwosu Z.C., Johnson C., Lima F., Anderson M. A., Park Y., Crawford H.C., Lyssiotis C.A., Frankel T.L., Rao A., Bednar F., Dlugosz A.A., Preall J.B., Tuveson D.A., Al-

- len B.L., di Magliano M.P. (2021) Inhibition of hedgehog signaling alters fibroblast composition in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **27**(7), 2023–2037.
109. Hutton C., Heider F., Blanco-Gomez A., Banyard A., Kononov A., Zhang X., Karim S., Paulus-Hock V., Watt D., Steele N., Kemp S., Hogg E.K.J., Kelly J., Jackstadt R.-F., Lopes F., Menotti M., Chisholm L., Lamarca A., Valle J., Sansom O.J., Springer C., Malliri A., Marais R., di Magliano M.P., Zelenay S., Morton J.P., Jørgensen C. (2021) Single-cell analysis defines a pancreatic fibroblast lineage that supports antitumor immunity. *Cancer Cell.* **39**(9), 1227–1244.e20.
 110. Miyai Y., Esaki N., Takahashi M., Enomoto A. (2020) Cancer-associated fibroblasts that restrain cancer progression: hypotheses and perspectives. *Cancer Sci.* **111**(4), 1047–1057.
 111. Zhang L., Li Z., Skrzypczynska K.M., Fang Q., Zhang W., O'Brien S.A., He Y., Wang L., Zhang Q., Kim A., Gao R., Orf J., Wang T., Sawant D., Kang J., Bhatt D., Lu D., Li C.-M., Rapaport A.S., Perez K., Ye Y., Wang S., Hu X., Ren X., Ouyang W., Shen Z., Egen J.G., Zhang Z., Yu X. (2020) Single-cell analyses inform mechanisms of myeloid-targeted therapies in colon cancer. *Cell.* **181**(2), 442–459.e29.
 112. Lambrechts D., Wauters E., Boeckx B., Aibar S., Nittner D., Burton O., Bassez A., Decaluwé H., Pircher A., Van den Eynde K., Weynand B., Verbeken E., De Leyn P., Liston A., Vansteenkiste J., Carmeliet P., Aerts S., Thienpont B. (2018) Phenotype molding of stromal cells in the lung tumor microenvironment. *Nat. Med.* **24**(8), 1277–1289.
 113. Davidson S., Fremova M., Riedel A., Mahata B., Pramanik J., Huuhtanen J., Kar G., Vento-Tormo R., Hagai T., Chen X., Haniffa M.A., Shields J.D., Teichmann S.A. (2020) Single-cell RNA sequencing reveals a dynamic stromal niche that supports tumor growth. *Cell Rep.* **31**(7), 107628.
 114. Sebastian A., Hum N.R., Martin K.A., Gilmore S.F., Peran I., Byers S.W., Wheeler E.K., Coleman M.A., Loots G.G. (2020) Single-cell transcriptomic analysis of tumor-derived fibroblasts and normal tissue-resident fibroblasts reveals fibroblast heterogeneity in breast cancer. *Cancers (Basel)*. **12**(5), 1307.
 115. Grauel A.L., Nguyen B., Ruddy D., Laszewski T., Schwartz S., Chang J., Chen J., Piquet M., Pelletier M., Yan Z., Kirkpatrick N.D., Wu J., deWeck A., Riester M., Hims M., Geyer F.C., Wagner J., MacIsaac K., Deeds J., Diwanji R., Jayaraman P., Yu Y., Simmons Q., Weng S., Raza A., Minie B., Dostalek M., Chikhegowda P., Ruda V., Iartchouk O., Chen N., Thierry R., Zhou J., Pruteanu-Malinici I., Fabre C., Engelman J.A., Dranoff G., Cremasco V. (2020) TGF β -blockade uncovers stromal plasticity in tumors by revealing the existence of a subset of interferon-licensed fibroblasts. *Nat. Commun.* **11**(1), 6315.
 116. Wu S.Z., Roden D.L., Wang C., Holliday H., Harvey K., Cazet A.S., Murphy K.J., Pereira B., Al-Eryani G., Bartonicek N., Hou R., Torpy J.R., Junankar S., Chan C.-L., Lam C.E., Hui M.N., Gluch L., Beith J., Parker A., Robbins E., Segara D., Mak C., Cooper C., Warriar S., Forrest A., Powell J., O'Toole S., Cox T.R., Timpson P., Lim E., Liu X.S., Swarbrick A. (2020) Stromal cell diversity associated with immune evasion in human triple-negative breast cancer. *EMBO J.* **39**(19), e104063.
 117. Kieffer Y., Hocine H.R., Gentric G., Pelon F., Bernard C., Bourachot B., Lameiras S., Albergante L., Bonneau C., Guyard A., Tarte K., Zinovyev A., Baulande S., Gerard Zalcman G., Vincent-Salomon A., Mechta-Grigoriou F. (2020) Single-cell analysis reveals fibroblast clusters linked to immunotherapy resistance in cancer. *Cancer Discov.* **10**(9), 1330–1351.
 118. Givel A.M., Kieffer Y., Scholer-Dahirel A., Sirven P., Cardon M., Pelon F., Magagna I., Gentric G., Costa A., Bonneau C., Mieulet F., Vincent-Salomon A., Mechta-Grigoriou F. (2018) miR200-regulated CXCL12 β promotes fibroblast heterogeneity and immunosuppression in ovarian cancers. *Nat. Commun.* **9**(1), 1056.
 119. Pelon F., Bourachot B., Kieffer Y., Magagna I., Mermet-Meillon F., Bonnet I., Costa A., Givel A.-M., Attieh Y., Barbazan J., Bonneau C., Fuhrmann L., Descroix S., Vignjevic D., Silberzan P., Parrini M.C., Vincent-Salomon A., Mechta-Grigoriou F. (2020) Cancer-associated fibroblast heterogeneity in axillary lymph nodes drives metastases in breast cancer through complementary mechanisms. *Nat. Commun.* **11**(1), 404.
 120. Affo S., Nair A., Brundu F., Ravichandra A., Bhattacharjee S., Matsuda M., Chin L., Filliol A., Wen W., Song X., Decker A., Worley J., Caviglia J.M., Yu L., Yin D., Saito Y., Savage T., Wells R.G., Mack M., Zender L., Arpaia N., Remotti H.E., Rabadan R., Sims P., Leblond A.L., Weber A., Riener M.O., Stockwell B.R., Gaublomme J., Llovet J.M., Kalluri R., Michalopoulos G.K., Seki E., Sia D., Chen X., Califano A., Schwabe R.F. (2021) Promotion of cholangiocarcinoma growth by diverse cancer-associated fibroblast subpopulations. *Cancer Cell.* **39**(6), 866–882.e11.
 121. Friedman G., Levi-Galibov J., David E., Bornstein C., Giladi A., Dadiani M., Mayo A., Halperin C., Pevsner-Fischer M., Lavon H., Mayer S., Nevo R., Stein Y., Balint-Lahat N., Barshack I., Ali H.R., Caldas C., Nili-Gal-Yam E., Alon U., Amit I., Scherz-Shouval R. (2020) Cancer-associated fibroblast compositional change with breast cancer progression linking the ratio of S100A4⁺ and PDPN⁺ CAFs to clinical outcome. *Nat. Cancer.* **1**(7), 692–708.
 122. Li X., Sun Z., Peng G., Xiao Y., Guo J., Wu B., Li X., Zhou W., Li J., Li Z., Bai C., Zhao L., Han Q., Zhao R.C., Xiaoyue Wang X. (2022) Single-cell RNA sequencing reveals a pro-invasive cancer-associated fibroblast subgroup associated with poor clinical outcomes in patients with gastric cancer. *Theranostics.* **12**(2), 620–638.
 123. Chen Z., Zhou L., Liu L., Hou Y., Xiong M., Yang Y., Hu J., Chen K. (2020) Single-cell RNA sequencing highlights the role of inflammatory cancer-associated fibroblasts in bladder urothelial carcinoma. *Nat. Commun.* **11**(1), 5077.
 124. Chen S., Zhu G., Yang Y., Wang F., Xiao Y.-T., Zhang N., Bian X., Yasheng Zhu Y., Yu Y., Liu F., Dong K., Mariscal J., Liu Y., Soares F., Yau H.L., Zhang B., Chen W., Wang C., Chen D., Guo Q., Yi Z., Liu M.,

- Fraser M., De Carvalho D.D., Boutros P.C., Di Vizio D., Jiang Z., Van der Kwast T., Berlin A., Wu S., Wang J., He H.H., Ren S. (2021) Single-cell analysis reveals transcriptomic remodellings in distinct cell types that contribute to human prostate cancer progression. *Nat. Cell Biol.* **23**(1), 87–98.
125. Qureshi-Baig K., Ullmann P., Haan S., Letellier E. (2017) Tumor-initiating cells: a criTICal review of isolation approaches and new challenges in targeting strategies. *Mol. Cancer.* **16**(1), 40.
126. Wang Z., Yang Q., Tan Y., Tang Y., Ye J., Yuan B., Yu W. (2021) Cancer-associated fibroblasts suppress cancer development: the other side of the coin. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 613534.
127. Huang C., Wang X.-L., Qi F.-F., Pang Z.-L. (2020) Berberine inhibits epithelial-mesenchymal transition and promotes apoptosis of tumour-associated fibroblast-induced colonic epithelial cells through regulation of TGF- β signalling. *J. Cell Commun. Signal.* **14**(1), 53–66.
128. Wang S., Su X., Xu M., Xiao X., Li X., Li H., Keating A., Zhao R.C. (2019) Exosomes secreted by mesenchymal stromal/stem cell-derived adipocytes promote breast cancer cell growth via activation of Hippo signaling pathway. *Stem Cell Res. Ther.* **10**(1), 117.
129. Ao M., Franco O.E., Park D., Raman D., Williams K., Hayward S.W. (2007) Cross-talk between paracrine-acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium. *Cancer Res.* **67**(9), 4244–4253.
130. Todaro M., Gaggiani M., Catalano V., Benfante A., Iovino F., Biffoni M., Apuzzo T., Sperduti I., Volpe S., Cocorullo G., Gulotta G., Dieli F., De Maria R., Stass G. (2014) CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell.* **14**(3), 342–356.
131. Han D., Wang M., Yu Z., Yin L., Liu C., Wang J., Liu Y., Jiang S., Ren Z., Yin J. (2019) FGF5 promotes osteosarcoma cells proliferation via activating MAPK signaling pathway. *Cancer Manag. Res.* **11**, 6457–6466.
132. Li H., Zhang Q., Wu Q., Cui Y., Zhu H., Fang M., Zhou X., Sun Z., Yu J. (2019) Interleukin-22 secreted by cancer-associated fibroblasts regulates the proliferation and metastasis of lung cancer cells via the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway. *Am. J. Transl. Res.* **11**(7), 4077–4088.
133. Ma H., Wang J., Zhao X., Wu T., Huang Z., Chen D., Liu Y., Ouyang G. (2020) Periostin promotes colorectal tumorigenesis through integrin-FAK-Src pathway-mediated YAP/TAZ activation. *Cell Rep.* **30**(3), 793–806.e6.
134. Zhang M., Shi R., Guo Z., He J. (2020) Cancer-associated fibroblasts promote cell growth by activating ERK5/PD-L1 signaling axis in colorectal cancer. *Pathol. Res. Pract.* **216**(4), 152884.
135. Wang R., Sun Y.-Q., Yu W., Yan Y., Qiao M., Jiang R., Guan W., Wang L. (2019) Downregulation of miRNA-214 in cancer-associated fibroblasts contributes to migration and invasion of gastric cancer cells through targeting FGF9 and inducing EMT. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **38**(1), 20.
136. Shu C., Zha H., Long H., Wang X., Yang F., Gao J., Hu C., Zhou L., Guo B., Zhu B. (2020) C3a-C3aR signaling promotes breast cancer lung metastasis via modulating carcinoma associated fibroblasts. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **39**(1), 11.
137. Wen S., Hou Y., Fu L., Xi L., Yang D., Zhao M., Qin Y., Sun K., Teng Y., Liu M. (2019) Cancer-associated fibroblast (CAF)-derived IL32 promotes breast cancer cell invasion and metastasis via integrin β 3–p38 MAPK signalling. *Cancer Lett.* **442**, 320–332.
138. Neri S., Miyashita T., Hashimoto H., Suda Y., Ishibashi M., Kii H., Watanabe H., Kuwata T., Tsuboi M., Goto K., Menju T., Sonobe M., Date H., Ochiai A., Ishii G. (2017) Fibroblast-led cancer cell invasion is activated by epithelial-mesenchymal transition through platelet-derived growth factor BB secretion of lung adenocarcinoma. *Cancer Lett.* **395**, 20–30.
139. Folkman J. (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.* **29**(6, Suppl 16), 15–18.
140. Kuriyama N., Yoshioka Y., Kikuchi S., Azuma N., Ochiya T. (2020) Extracellular vesicles are key regulators of tumor neovasculature. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 611039.
141. Hlatky L., Tsionou C., Hahnfeldt P., Coleman C.N. (1994) Mammary fibroblasts may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced vascular endothelial growth factor up-regulation and protein expression. *Cancer Res.* **54**(23), 6083–6086.
142. Inoue K.-I., Kishimoto S., Akimoto K., Sakuma M., Toyoda S., Inoue T., Yoshida K.-I., Shimoda M., Suzuki S. (2019) Cancer-associated fibroblasts show heterogeneous gene expression and induce vascular endothelial growth factor A (VEGFA) in response to environmental stimuli. *Ann. Gastroenterol. Surg.* **3**(4), 416–425.
143. San Martin R., Barron D.A., Tuxhorn J.A., Ressler S.J., Hayward S.W., Shen X., Laucirica R., Wheeler T.M., Gutierrez C., Ayala G.E., Ittmann M., Rowley D.R. (2014) Recruitment of CD34(+) fibroblasts in tumor-associated reactive stroma: the reactive microvasculature hypothesis. *Am. J. Pathol.* **184**(6), 1860–1870.
144. Herrera A., Herrera M., Guerra-Perez N., Galindo-Pumariño C., Larriba M.J., García-Barberán V., Gil B., Giménez-Moyano S., Ferreira-Monteagudo R., Veiguillas P., Candia A., Peña R., Pinto J., García-Bermejo M.L., Muñoz A., García de Herreros A., Bonilla F., Carrato A., Peña C. (2018) Endothelial cell activation on 3D-matrices derived from PDGF-BB-stimulated fibroblasts is mediated by snail1. *Oncogenesis.* **7**(9), 76.
145. Unterleuthner D., Neuhold P., Schwarz K., Janker L., Neuditschko B., Nivarthi H., Crncec I., Kramer N., Unger C., Hengstschläger M., Eferl R., Moriggl R., Sommergruber W., Gerner C., Dolznig H. (2020) Cancer-associated fibroblast-derived WNT2 increases tumor angiogenesis in colon cancer. *Angiogenesis.* **23**(2), 159–177.
146. Sewell-Loftin M.K., Bayer S.V.H., Crist E., Hughes T., Joison S.M., Longmore G.D., George S.C. (2017) Cancer-associated fibroblasts support vascular growth through mechanical force. *Sci. Rep.* **7**(1), 12574.

147. Barrett R.L., Pure E. (2020) Cancer-associated fibroblasts and their influence on tumor immunity and immunotherapy. *Elife*. **9**, e57243.
148. Ziani L., Chouaib S., Thiery J. (2018) Alteration of the antitumor immune response by cancer-associated fibroblasts. *Front. Immunol.* **9**, 414.
149. Poltavets V., Kochetkova M., Pitson S.M., Samuel M.S. (2018) The role of the extracellular matrix and its molecular and cellular regulators in cancer cell plasticity. *Front. Oncol.* **8**, 431.
150. Zhao X., Ding L., Lu Z., Huang X., Jing Y., Yang Y., Chen S., Hu Q., Ni Y. (2020) Diminished CD68⁺ cancer-associated fibroblast subset induces regulatory T-cell (Treg) infiltration and predicts poor prognosis of oral squamous cell carcinoma patients. *Am. J. Pathol.* **190**(4), 886–899.
151. Bordinon P., Bottoni G., Xu X., Popescu A.S., Truan Z., Guenova E., Kofler L., Jafari P., Ostano P., Röcken M., Neel V., Dotto G.P. (2019) Dualism of FGF and TGF- β signaling in heterogeneous cancer-associated fibroblast activation with ETV1 as a critical determinant. *Cell Rep.* **28**(9), 2358–2372.
152. Vickman R.E., Broman M.M., Lanman N.A., Franco O.E., Sudyanti P.A.G., Ni Y., Ji Y., Helfand B.T., Petkewicz J., Paterakos M.C., Crawford S.E., Ratliff T.L., Hayward S.W. (2020) Heterogeneity of human prostate carcinoma-associated fibroblasts implicates a role for subpopulations in myeloid cell recruitment. *Prostate*. **80**(2), 173–185.
153. Robinson S.C., Scott K.A., Balkwill F.R. (2002) Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF- α . *Eur. J. Immunol.* **32**(2), 404–412.
154. Sukkurwala A.Q., Martins I., Wang Y., Schlemmer F., Ruckstuhl C., Durchschlag M., Michaud M., Senovilla L., Sistigu A., Ma Y., Vacchelli E., Sulpice E., Gidrol X., Zitvogel L., Madeo F., Galluzzi L., Kepp O., Kroemer G. (2013) Immunogenic reticulon exposure occurs through haphylo genetically conserved stress pathway involving the chemokine CXCL8. *Cell Death Differ.* **21**(1), 59–68.
155. Tessema M., Klinge D.M., Yingling C.M., Do K., Van Neste L., Belinsky S.A. (2010) Re-expression of CXCL14, a common target for epigenetic silencing in lung cancer, induces tumor necrosis. *Oncogene*. **29**(37), 5159–5170.
156. Raker V.K., Domogalla M.P., Steinbrink K. (2015) Tolerogenic dendritic cells for regulatory T cell induction in man. *Front. Immunol.* **6**, 569.
157. Flavell R.A., Sanjabi S., Wrzesinski S.H., Licona-Limón P. (2010) The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β . *Nat. Rev. Immunol.* **10**(8), 554–567.
158. Park Y.P., Choi S.-C., Kiesler P., Gil-Krzewska A., Borrego F., Weck J., Krzewski K., Coligan J.E. (2011) Complex regulation of human NKG2D-DAP10 cell surface expression: opposing roles of the c cytokines and TGF-1. *Blood*. **118**(1), 3019–3027.
159. Harper J., Sainson R.C.A. (2014) Regulation of the anti-tumour immune response by cancer-associated fibroblasts. *Semin. Cancer Biol.* **25**, 69–77.
160. Mills L.D., Zhang Y., Marler R.J., Herreros-Villanueva M., Zhang L., Almada L.L., Couch F., Wetmore C., Pasca di Magliano M., Fernandez-Zapico M.E. (2013) Loss of the transcription factor GLI1 identifies a signaling network in the tumor microenvironment mediating KRAS oncogene-induced transformation. *J. Biol. Chem.* **288**(17), 11786–11794.
161. Sugimoto H., Mundel T.M., Kieran M.W., Kalluri R. (2006) Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol. Ther.* **5**(12), 1640–1646.
162. Ichihara R., Shiraki Y., Mizutani Y., Iida T., Miyai Y., Esaki N., Kato A., Mii S., Ando R., Hayashi M., Takami H., Fujii T., Takahashi M., Enomoto A. (2022) Matrix remodeling-associated protein 8 is a marker of a subset of cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *Pathol. Int.* **72**(3), 161–175.
163. Wang Y., Liang Y., Xu H., Zhang X., Mao T., Cui J., Yao J., Wang Y., Jiao F., Xiao X., Hu J., Xia Q., Zhang X., Wang X., Sun Y., Fu D., Shen L., Xu X., Xue J., Wang L. (2021) Single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma identifies a novel fibroblast subtype associated with poor prognosis but better immunotherapy response. *Cell Discov.* **7**(1), 36.
164. Djurec M., Graña O., Lee A., Troulé K., Espinet E., Cabras L., Navas C., Blasco M.T., Martín-Díaz L., Burdiel M., Li J., Liu Z., Vallespinós M., Sanchez-Bueno F., Sprick M.R., Trumpp A., Sainz B.Jr., Al-Shahrour F., Rabadan R., Guerra C., Barbacid M. (2018) Saa3 is a key mediator of the protumorigenic properties of cancer-associated fibroblasts in pancreatic tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **115**(6), E1147–E1156.
165. Wei L., Lin Q., Lu Y., Li G., Huang L., Fu Z., Chen R., Zhou Q. (2021) Cancer-associated fibroblasts-mediated ATF4 expression promotes malignancy and gemcitabine resistance in pancreatic cancer via the TGF- β 1/SMAD2/3 pathway and ABCC1 transactivation. *Cell Death Disease*. **12**(4), 334.
166. Han S., Fu D., Tushoski G.W., Meng L., Herremans K.M., Riner A.N., Geoge T.J., Huo Z., Hughes S.J. (2022) Single-cell profiling of microenvironment components by spatial localization in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Theranostics*. **12**(11), 4980–4992.
167. Zhao M., Zhuang A., Fang Y. (2022) Cancer-associated fibroblast-derived exosomal miRNA-320a promotes macrophage M2 polarization *in vitro* by regulating PTEN/PI3K γ signaling in pancreatic cancer. *J. Oncol.* **2022**, 9514697.
168. Dai K., Tanaka M., Kamiyoshi A., Sakurai T., Ichikawa-Shindo Y., Kawate H., Cui N., Wei Y., Tanaka M., Kakiyama S., Matsui S., Shindo T. (2020) Deficiency of the adrenomedullin-RAMP3 system suppresses metastasis through the modification of cancer-associated fibroblasts. *Oncogene*. **39**(9), 1914–1930.
169. Bhattacharjee S., Hamberger F., Ravichandra A., Miller M., Nair A., Affo S., Filliol A., Chin L., Savage T.M., Yin D., Wirsik N.M., Mehal A., Arpaia N., Seki E., Mack M., Zhu D., Sims P.A., Kalluri R., Stanger B.Z., Olive K.P., Schmidt T., Wells R.G., Mederacke I., Schwabe R.F. (2021) Tumor restriction by type I collagen opposes tumor-promoting effects of cancer-associated fibroblasts. *J. Clin. Invest.* **131**(11), e146987.

170. Miyazaki Y., Mori N., Akagi Y., Oda T., Kida Y.S. (2022) Potential metabolite markers for pancreatic cancer identified by metabolomic analysis of induced cancer-associated fibroblasts. *Cancers* (Basel). **14**(6), 1375.
171. Lakins M.A., Ghorani E., Munir H., Martins C.P., Shields J.D. (2018) Cancer-associated fibroblasts induce antigen-specific deletion of CD8 + T cells to protect tumour cells. *Nat. Commun.* **9**(1), 948.
172. Shi L., Zhu W., Huang Y., Zhuo L., Wang S., Chen S., Zhang B., Ke B. (2022) Cancer-associated fibroblast-derived exosomal microRNA-20a suppresses the PTEN/PI3K-AKT pathway to promote the progression and chemoresistance of non-small cell lung cancer. *Clin. Transl. Med.* **12**(7), e989.
173. Kim D., Kim J.S., Cheon I., Kim S.R., Chun S.H., Kim J.J., Lee S., Yoon J.S., Hong S.A., Won H.S., Kang K., Ahn Y.H., Ko Y.H. (2022) Identification and characterization of cancer-associated fibroblast subpopulations in lung adenocarcinoma. *Cancers* (Basel). **14**(14), 3486.
174. Mathilakathu A., Wessolly M., Mairinger E., Uebner H., Kreidt D., Brcic L., Steinborn J., Greimelmaier K., Wohlschlaeger J., Schmid K.W., Mairinger F.D., Borchert S. (2022) Cancer-associated fibroblasts regulate kinase activity in mesothelioma cell lines via paracrine signaling and thereby dictate cell faith and behavior. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(6), 3278.
175. Zhang G., Zheng H., Wang L. (2022) miR-491-3p functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by targeting fibroblast growth factor 5. *Oncol. Rep.* **48**(3), 164.
176. Sugai M., Yanagawa N., Shikanai S., Hashimoto M., Saikawa H., Osakabe M., Saito H., Maemondo M., Sugai T. (2022) Correlation of tumor microenvironment-related markers with clinical outcomes in patients with squamous cell carcinoma of the lung. *Transl. Lung Cancer Res.* **11**(6), 975–990.
177. Wang Y., Lan W., Xu M., Song J., Mao J., Li C., Du X., Jiang Y., Li E., Zhang R., Wang Q. (2021) Cancer-associated fibroblast-derived SDF-1 induces epithelial-mesenchymal transition of lung adenocarcinoma via CXCR4/ β -catenin/PPAR δ signalling. *Cell Death Dis.* **12**(2), 214.
178. Li H., Liu W., Zhang X., Wang Y. (2021) Cancer-associated fibroblast-secreted collagen triple helix repeat containing-1 promotes breast cancer cell migration, invasiveness and epithelial-mesenchymal transition by activating the Wnt/ β -catenin pathway. *Oncol. Lett.* **22**(6), 814.
179. O'Connell J.T., Sugimoto H., Cooke V.G., MacDonald B.A., Mehta A.I., LeBleu V.S., Dewar R., Rocha R.M., Brentani R.R., Resnick M.B., Neilson E.G., Zeisberg M., Kalluri R. (2011) VEGF-A and tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**(38), 16002–16007.
180. Su S., Chen J., Yao H., Liu J., Yu S., Lao L., Wang M., Luo M., Xing Y., Chen F., Huang D., Zhao J., Yang L., Liao D., Su F., Li M., Liu Q., Song E. (2018) CD10+GPR77+ cancer-associated fibroblasts promote cancer formation and chemoresistance by sustaining cancer stemness. *Cell.* **172**(4), 841–856.e16.
181. Brechbuhl H.M., Finlay-Schultz J., Yamamoto T.M., Gillen A.E., Cittelly D.M., Tan A.C., Sams S.B., Pillai M.M., Elias A.D., Robinson W.A., Sartorius C.A., Kabos P. (2017) Fibroblast subtypes regulate responsiveness of luminal breast cancer to estrogen. *Clin. Cancer Res.* **23**(7), 1710–1721.
182. Zheng S., Zou Y., Tang Y., Yang A., Liang J.Y., Wu L., Tian W., Xiao W., Xie X., Yang L., Xie J., Wei W., Xie X. (2022) Landscape of cancer-associated fibroblasts identifies the secreted biglycan as a protumor and immunosuppressive factor in triple-negative breast cancer. *Oncoimmunology.* **11**(1), 2020984.
183. Wang M., Feng R., Chen Z., Shi W., Li C., Liu H., Wu K., Li D., Li X. (2022) Identification of cancer-associated fibroblast subtype of triple-negative breast cancer. *J. Oncol.* **2022**, 6452636.
184. Wan X., Guan S., Hou Y., Qin Y., Zeng H., Yang L., Qiao Y., Liu S., Li Q., Jin T., Qiu Y., Liu M. (2021) FOSL2 promotes VEGF-independent angiogenesis by transcriptionally activating Wnt5a in breast cancer-associated fibroblasts. *Theranostics.* **11**(10), 4975–4991.
185. Li H., Liu W., Zhang X., Wang Y. (2021) Cancer-associated fibroblast-secreted collagen triple helix repeat containing-1 promotes breast cancer cell migration, invasiveness and epithelial-mesenchymal transition by activating the Wnt/ β -catenin pathway. *Oncol. Lett.* **22**(6), 814.
186. Mir S., Golden B.D.O., Griess B.J., Vengoji R., Tom E., Kosmacek E.A., Oberley-Deegan R.E., Talmon G.A., Band V., Teoh-Fitzgerald M.L. (2022) Upregulation of Nox4 induces a pro-survival Nrf2 response in cancer-associated fibroblasts that promotes tumorigenesis and metastasis, in part via Birc5 induction. *Breast Cancer Res.* **24**(1), 48.
187. Itoh G., Takagane K., Fukushi Y., Kuriyama S., Umakoshi M., Goto A., Yanagihara K., Yashiro M., Tanaka M. (2022) Cancer-associated fibroblasts educate normal fibroblasts to facilitate cancer cell spreading and T-cell suppression. *Mol. Oncol.* **16**(1), 166–187.
188. Zhang J., Li S., Zhao Y., Ma P., Cao Y., Liu C., Zhang X., Wang W., Chen L., Li Y. (2020) Cancer-associated fibroblasts promote the migration and invasion of gastric cancer cells via activating IL-17a/JAK2/STAT3 signaling. *Ann. Transl. Med.* **8**(14), 877.
189. Zhang J., Ji C., Li W., Mao Z., Shi Y., Shi H., Ji R., Qian H., Xu W., Zhang X. (2020) Tumor-educated neutrophils activate mesenchymal stem cells to promote gastric cancer growth and metastasis. *Front. Cell. Dev. Biol.* **8**, 788.
190. Zhao Z., Li W., Zhu L., Xu B., Jiang Y., Ma N., Liu L., Qiu J., Zhang M. (2022) Construction and verification of a fibroblast-related prognostic signature model for colon cancer. *Front. Genet.* **13**, 908957.
191. Dai G., Yao X., Zhang Y., Gu J., Geng Y., Xue F., Zhang J. (2018) Colorectal cancer cell-derived exosomes containing mir-10b regulate fibroblast cells via the PI3K/Akt pathway. *Bull. Cancer.* **105**(4), 336–349.
192. Huang T.X., Tan X.Y., Huang H.S., Li Y.T., Liu B.L., Liu K.S., Chen X., Chen Z., Guan X.Y., Zou C., Fu L. (2022) Targeting cancer-associated fibroblast-

- secreted WNT2 restores dendritic cell-mediated anti-tumour immunity. *Gut*. **71**(2), 333–344.
193. Liu B., Liu T., Liu Y., Feng X., Jiang X., Long J., Ye S., Chen D., Wang J., Yang Z. (2022) TSG-6 promotes cancer cell aggressiveness in a CD44-dependent manner and reprograms normal fibroblasts to create a prometastatic microenvironment in colorectal cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **18**(4), 1677–1694.
 194. Yang M., Wei Z., Feng M., Zhu Y., Chen Y., Zhu D. (2021) Pharmacological inhibition and genetic knock-down of BCL9 modulate the cellular landscape of cancer-associated fibroblasts in the tumor-immune microenvironment of colorectal cancer. *Front. Oncol.* **11**, 603556.
 195. Bonollo F., Thalmann G.N., Kruithof-de Julio M., Karkampouna S. (2020) The role of cancer-associated fibroblasts in prostate cancer tumorigenesis. *Cancers*. **12**(7), 1887.
 196. Eiro N., Fernández-Gómez J.M., Gonzalez-Ruiz de León C., Fraile M., Gonzalez-Suarez J., Lobo-Rodríguez B., García-Rodríguez J., Escaf S., Vizoso F.J. (2022) Gene expression profile of stromal factors in cancer-associated fibroblasts from prostate cancer. *Diagnostics* (Basel). **12**(7), 1605.
 197. Akinjiyan F.A., Dave R.M., Alpert E., Longmore G.D., Fuh K.C. (2022) DDR2 expression in cancer-associated fibroblasts promotes ovarian cancer tumor invasion and metastasis through periostin-ITGB1. *Cancers* (Basel). **14**(14), 3482.
 198. Zeng L., Wang X., Wang F., Zhao X., Ding Y. (2022) Identification of a gene signature of cancer-associated fibroblasts to predict prognosis in ovarian cancer. *Front. Genet.* **13**, 925231.
 199. Cheng J.T., Deng Y.N., Yi H.M., Wang G.Y., Fu B.S., Chen W.J., Liu W., Tai Y., Peng Y.W., Zhang Q. (2016) Hepatic carcinoma-associated fibroblasts induce IDO-producing regulatory dendritic cells through IL-6-mediated STAT3 activation. *Oncogenesis*. **5**(2), e198.
 200. Jiao J., González Á., Stevenson H.L., Gagea M., Sugimoto H., Kalluri R., Beretta L. (2018) Depletion of S100A4+ stromal cells does not prevent HCC development but reduces the stem cell-like phenotype of the tumors. *Exp. Mol. Med.* **50**(1), e422.
 201. Zhang J., Chen L., Liu X., Kammertoens T., Blankenstein T., Qin Z. (2013) Fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells prevent carcinoma through collagen production and encapsulation of carcinogens. *Cancer Res.* **73**(9), 2770–2781.
 202. Zhao X., Ding L., Lu Z., Huang X., Jing Y., Yang Y., Chen S., Hu Q., Ni Y. (2020) Diminished CD68+ cancer-associated fibroblast subset induces regulatory T-cell (Treg) infiltration and predicts poor prognosis of oral squamous cell carcinoma patients. *Am. J. Pathol.* **190**(10), 886–899.
 203. Costea D.E., Hills A., Osman A.H., Thurlow J., Kalna G., Huang X., Murillo C.P., Parajuli H., Suliman S., Kulasekara K.K., Johannessen A.C., Partridge M. (2013) Identification of two distinct carcinoma-associated fibroblast subtypes with differential tumor-promoting abilities in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **73**(13), 3888–3901.
 204. Hassona Y., Cirillo N., Heesom K.J., Parkinson E.K., Prime S.S. (2014) Senescent cancer-associated fibroblasts secrete active MMP-2 that promotes keratinocyte dis-cohesion and invasion. *Br. J. Cancer*. **111**(6), 1230–1237.
 205. Rajthala S., Parajuli H., Dongre H.N., Ljøkel B., Hoven K.M., Kvalheim A., Lybak S., Neppelberg E., Sapkota D., Johannessen A.C., Costea D.-E. (2022) MicroRNA-138 abates fibroblast motility with effect on invasion of adjacent cancer cells. *Front. Oncol.* **12**, 833582.
 206. Haga K., Yamazaki M., Maruyama S., Kawaharada M., Suzuki A., Hoshikawa E., Chan N.N., Funayama A., Mikami T., Kobayashi T., Izumi K., Tanuma J.I. (2021) Crosstalk between oral squamous cell carcinoma cells and cancer-associated fibroblasts via the TGF- β /SOX9 axis in cancer progression. *Transl. Oncol.* **14**(12), 101236.
 207. Heidary Z., Ghaisari J., Moein S., Javanmard S.H. (2020) The double-edged sword role of fibroblasts in the interaction with cancer cells; an agent-based modeling approach. *PLoS One*. **15**(5), e0232965.
 208. Shi R., Tang Y.Q., Miao H. (2020) Metabolism in tumor microenvironment: implications for cancer immunotherapy. *Med. Comm.* **1**(1), 47–68.
 209. Zhao H., Yang L., Baddour J., Achreja A., Bernard V., Moss T., Marini J.C., Tudawe T., Seviour E.G., San Lucas F.A., Alvarez H., Gupta S., Maiti S.N., Cooper L., Peehl D., Ram P.T., Maitra A., Nagrath D. (2016) Tumor microenvironment derived exosomes pleiotropically modulate cancer cell metabolism. *Elife*. **5**, e10250.
 210. Sansone P., Savini C., Kurelac I., Chang Q., Amato L.B., Strillacci A., Stepanova A., Iommarini L., Mastroleo C., Daly L., Galkin A., Thakur B.K., Soplop N., Uryu K., Hoshino A., Norton L., Bonafé M., Cricca M., Gasparre G., Lyden D., Bromberg J. (2017) Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**(43), E9066–E9075.
 211. Gonda A., Kabagwira J., Senthil G.N., Wall N.R. (2019) Internalization of exosomes through receptor-mediated endocytosis. *Mol. Cancer Res.* **17**(2), 337–347.
 212. Yan W., Wu X., Zhou W., Fong M.Y., Cao M., Liu J., Liu X., Chen C.-H., Fadare O., Pizzo D.P., Wu J., Liu L., Liu X., Chin A.R., Ren X., Chen Y., Locasale J.W., Wang S.E. (2018) Cancer-cell-secreted exosomal miR-105 promotes tumour growth through the MYC-dependent metabolic reprogramming of stromal cells. *Nat. Cell. Biol.* **20**(5), 597–609.
 213. Martinez-Outschoorn U.E., Whitaker-Menezes D., Lin Z., Flomenberg N., Howell A., Pestell R.G., Lisanti M.P., Sotgia F. (2011) Cytokine production and inflammation drive autophagy in the tumor microenvironment: role of stromal caveolin-1 as a key regulator. *Cell Cycle*. **10**(11), 1784–1793.
 214. Whitaker-Menezes D., Martinez-Outschoorn U.E., Lin Z., Ertel A., Flomenberg N., Witkiewicz A.K., Birbe R.C., Howell A., Pavlides S., Gandara R., Pestell R.G., Sotgia F., Philp N.J., Lisanti M.P. (2011) Evidence for a stromal-epithelial “lactate shuttle” in

- human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer associated fibroblasts. *Cell Cycle*. **10**(11), 1772–1783.
215. Sotgia F., Martinez-Outschoorn U.E., Pavlides S., Howell A., Pestell R.G., Lisanti M.P. (2011) Understanding the Warburg effect and the prognostic value of stromal caveolin-1 as a marker of a lethal tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* **13**(4), 213.
 216. Ullah M.S., Davies A.J., Halestrap A.P. (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 alpha-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **281**(14), 9030–9037.
 217. Giatromanolaki A., Koukourakis M.I., Koutsopoulos A., Mendrinos S., Sivridis E. (2012) The metabolic interactions between tumor cells and tumor-associated stroma (TAS) in prostatic cancer. *Cancer Biol. Ther.* **13**(13), 1284–1289.
 218. Witkiewicz A.K., Whitaker-Menezes D., Dasgupta A., Philp N.J., Lin Z., Gandara R., Sneddon S., Martinez-Outschoorn U.E., Sotgia F., Lisanti M.P. (2012) Using the “reverse Warburg effect” to identify high risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers. *Cell Cycle*. **11**(6), 1108–1117.
 219. Curry J.M., Tuluc M., Whitaker-Menezes D., Ames J.A., Anantharaman A., Butera A., Leiby B., Cognetti D.M., Sotgia F., Lisanti M.P., Martinez-Outschoorn U.E. (2013). Cancer metabolism, stemness and tumor recurrence: MCT1 and MCT4 are functional biomarkers of metabolic symbiosis in head and neck cancer. *Cell Cycle*. **12**(9), 1371–1384.
 220. Martinez-Outschoorn U.E., Lisanti M.P., Sotgia F. (2014) Catabolic cancer associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. *Semin. Cancer Biol.* **25**, 47–60.
 221. Yang L., Achreja A., Yeung T.L., Mangala L.S., Jiang D., Han C., Baddour J., Marini J.C., Ni J., Nakahara R., Wahlig S., Chiba L., Kim S.H., Morse J., Pradeep S., Nagaraja A.S., Haemmerle M., Kyunghie N., Derichsweiler M., Plackemeier T., Mercado-Urbe I., Lopez-Berestein G., Moss T., Ram P.T., Liu J., Lu X., Mok S.C., Sood A.K., Nagrath D. (2016) Targeting stromal glutamine synthetase in tumors disrupts tumor microenvironment-regulated cancer cell growth. *Cell. Metab.* **24**(5), 685–700.
 222. Monti D., Sotgia F., Whitaker-Menezes D., Tuluc M., Birbe R., Berger A., Lazar M., Cotzia P., Draganova-Tacheva R., Lin Z., Domingo-Vidal M., Newberg A., Lisanti M.P., Martinez-Outschoorn U. (2017) Pilot study demonstrating metabolic and anti-proliferative effects of *in vivo* anti-oxidant supplementation with N-acetylcysteine in breast cancer. *Semin. Oncol.* **44**(3), 226–232.
 223. Zhang Y., Wei J., Xu J., Leong W.S., Liu G., Ji T., Cheng Z., Wang J., Lang J., Zhao Y., You L., Zhao X., Wei T., Anderson G.J., Qi S., Kong J., Nie G., Li S. (2018). Suppression of tumor energy supply by liposomal nanoparticle-mediated inhibition of aerobic glycolysis. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **10**(3), 2347–2353.
 224. Huang W., Zhang L., Yang M., Wu X., Wang X., Huang W., Yuan L., Pan H., Wang Y., Wang Z., Wu Y., Huang J., Liang H., Li S., Liao L., Liu L., Guan J. (2021) Cancer-associated fibroblasts promote the survival of irradiated nasopharyngeal carcinoma cells via the NF- κ B pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **40**(1), 87.
 225. Chen X., Song E. (2019) Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**(2), 99–115.
 226. Louault K., Bonneaud T.L., Séveno C., Gomez-Bougie P., Nguyen F., Gautier F., Bourgeois N., Loussouarn D., Kerdraon O., Barillé-Nion S., Jézéquel P., Campone M., Amiot M., Juin P.P., Souazé F. (2019) Interactions between cancer-associated fibroblasts and tumor cells promote MCL-1 dependency in estrogen receptor-positive breast cancers. *Oncogene*. **38**(17), 3261–3273.
 227. Zhang L., Yao J., Li W., Zhang C. (2018) MicroRNA-21 regulates cancer-associated fibroblast-mediated drug resistance in pancreatic cancer. *Oncol. Res.* **26**(6), 827–835.
 228. Lotti F., Jarrar A.M., Pai R.K., Hitomi M., Lathia J., Mace A., Gantt Jr G.A., Sukhdeo K., DeVecchio J., Vasanji A., Leahy P., Hjelmeland A.B., Kalady M.F., Rich J.N. (2013) Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *J. Exp. Med.* **210**(13), 2851–2872.
 229. Kadel D., Zhang Y., Sun H.-R., Zhao Y., Dong Q.-Z., Qin L.X. (2019) Current perspectives of cancer-associated fibroblast in therapeutic resistance: potential mechanism and future strategy. *Cell Biol. Toxicol.* **35**(5), 407–421.
 230. Mutgan A.C., Besikcioglu H.E., Wang S., Friess H., Ceyhan G.O., Demir I.E. (2018) Insulin/IGF-driven cancer cell-stroma crosstalk as a novel therapeutic target in pancreatic cancer. *Mol. Cancer*. **17**(1), 66.
 231. Borriello L., Nakata R., Sheard M.A., Fernandez G.E., Spoto R., Malvar J., Blavier L., Shimada H., Asgharzadeh S., Seeger R.C., DeClerck Y.A. (2017) Cancer-associated fibroblasts share characteristics and protumorigenic activity with mesenchymal stromal cells. *Cancer Res.* **77**(18), 5142–5157.
 232. Guo H., Ha C., Dong H., Yang Z., Ma Y., Ding Y. (2019) Cancer-associated fibroblast-derived exosomal microRNA-98-5p promotes cisplatin resistance in ovarian cancer by targeting CDKN1A. *Cancer Cell Int.* **19**, 347.
 233. Zhang H., Deng T., Liu R., Ning T., Yang H., Liu D., Zhang Q., Lin D., Ge S., Bai M., Wang X., Zhang L., Li H., Yang Y., Ji Z., Wang H., Ying G., Ba Y. (2020) CAF secreted miR-522 suppresses ferroptosis and promotes acquired chemo-resistance in gastric cancer. *Mol. Cancer*. **19**(1), 43.
 234. Shiga K., Hara M., Nagasaki T., Sato T., Takahashi H., Takeyama H. (2015) Cancer-associated fibroblasts: their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers (Basel)*. **7**(4), 2443–2458.
 235. Laklai H., Miroshnikova Y.A., Pickup M.W., Collisson E.A., Kim G.E., Barrett A.S., Hill R.C., Lakins J.N., Schlaepfer D.D., Mouw J.K., LeBleu V.S., Roy N., Novitskiy S.V., Johansen J.S., Poli V., Kalluri R., Iacobuzio-Donahue C.A., Wood L.D., Hebrok M., Hansen K., Moses H.L., Weaver V.M. (2016) Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to

- induce matricellular fibrosis and tumor progression. *Nat. Med.* **22**(5), 497–505.
236. Busch S., Acar A., Magnusson Y., Gregersson P., Rydén L., Landberg G. (2015) TGF- β receptor type-2 expression in cancer-associated fibroblasts regulates breast cancer cell growth and survival and is a prognostic marker in pre-menopausal breast cancer. *Oncogene*. **34**(1), 27–38.
 237. Provenzano P.P., Cuevas C., Chang A.E., Goel V.K., Von Ho D.D., Hingorani S.R. (2012) Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*. **21**(3), 418–429.
 238. Kobayashi H., Enomoto A., Woods S.L., Burt A.D., Takahashi M., Worthley D.L. (2019) Cancer-associated fibroblasts in gastrointestinal cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**(5), 282–295.
 239. Luga V., Zhang L., Vitoria-Petit A.M., Ogunjimi A.A., Inanlou M.R., Chiu E., Buchanan M., Hosein A.N., Basik M., Wrana J.L. (2012) Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell*. **151**(7), 1542–1556.
 240. Webber J.P., Spary L.K., Sanders A.J., Chowdhury R., Jiang W.G., Steadman R., Wymant J., Jones A.T., Kynaston H., Mason M.D., Tabi Z., Clayton A. (2015) Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene*. **34**(3), 290–302.
 241. Richards K.E., Zeleniak A.E., Fishel M.L., Wu J., Littlepage L.E., Hill R. (2017) Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells. *Oncogene*. **36**(13), 1770–1778.
 242. Giusti I., DiFrancesco M., D'ascenzo S., Palmerini M.G., Macchiarelli G., Carta G., Dolo V. (2018) Ovarian cancer-derived extracellular vesicles affect normal human fibroblast behavior. *Cancer Biol. Ther.* **19**(8), 722–734.
 243. Bellei B., Migliano E., Picardo M. (2020) A framework of major tumor-promoting signal transduction pathways implicated in melanoma-fibroblast dialogue. *Cancers* (Basel). **12**(11), 3400.

Cancer-Associated Fibroblasts: Heterogeneity and Bimodality in Oncogenesis

N. A. Lunina¹, *, D. R. Safina¹, and S. V. Kostrov¹

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

*e-mail: lunina-na.img@yandex.ru

Malignant tumors are characterized by high cellular heterogeneity, including cancerous and non-malignant cells, as well as non-cellular components that are part of the tumor microenvironment. Cancer-associated fibroblasts often form a major component of the microenvironment, providing the very “soil” in which cancer cells thrive. Cancer-associated fibroblasts may contribute to tumor growth, invasion, metastasis, and resistance to therapy. However, clinical trials of treatment strategies targeting cancer-associated fibroblasts have largely failed. Moreover, there is evidence that cancer-associated fibroblasts are able to inhibit tumor development. In this review, we aimed to present the current understanding of the functional heterogeneity of cancer-associated fibroblasts, their bimodality in tumor development, and tumor progression. Understanding the tumor-promoting and tumor-inhibiting activities of cancer-associated fibroblasts may contribute to the development of new diagnostic and therapeutic approaches.

Keywords: cancer-associated fibroblasts, heterogeneity, markers, oncogenesis, metastasis, tumor stroma, tumor microenvironment

УДК 577.2.086/.087

ЦИФРОВАЯ ПЦР: ОБЗОР ПРИМЕНЕНИЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИНСТРУМЕНТА

© 2023 г. К. В. Копылова^а, Э. В. Каспаров^а, И. В. Марченко^а, М. В. Смольникова^а, *

^аНаучно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Красноярск, 660022 Россия

*e-mail: smarinv@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.12.2022 г.

После доработки 29.03.2023 г.

Принята к публикации 29.03.2023 г.

Цифровая ПЦР (цПЦР) — метод определения абсолютного количества целевой нуклеиновой кислоты в образце — все шире используется в биологии и медицине. К важным преимуществам цПЦР относится возможность количественного определения генетического материала без построения калибровочных кривых, что позволяет выявлять даже единичные молекулы нуклеиновых кислот. В обзоре рассмотрены основные этапы становления метода цПЦР, начиная с технологии микрофлюидных чипов, до современных систем, способных обнаружить одну молекулу ДНК-мишени среди 100000 копий. Проанализирована эффективность выявления различных патогенов с помощью цПЦР, обобщены результаты исследований, иллюстрирующие инновационность данного метода. Рассмотрены возможности мультиплексного цПЦР-анализа и его использования в клинической практике. Также обсуждается роль цПЦР в развитии неинвазивных методов анализа онкологических заболеваний и вероятные пути развития технологии цПЦР, включая использование в качестве систем “point-of-care”.

Ключевые слова: цифровая ПЦР, инфекция, ДНК, онкология, вирусы, COVID-19

DOI: 10.31857/S0026898423050051, **EDN:** XWWKDS

ВВЕДЕНИЕ

Рост числа инфекционных заболеваний, а также распространенность онкологических заболеваний делают необходимой разработку новых методов, позволяющих быстро и с высокой специфичностью определять источник патологии. В начале 1980-х годов был разработан метод ПЦР, который стал незаменимым инструментом анализа нуклеиновых кислот. Амплификация с электрофоретическим выявлением продуктов, а также анализ по конечной точке со временем усовершенствовались: благодаря появлению метода ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) технология ПЦР стала доступной для лабораторной клинической практики [1–3]. Метод количественной ПЦР используется для обнаружения целевых нуклеиновых кислот в сыворотке крови, спинномозговой жидкости и образцах тканей, а также РНК или ДНК патогенов. Однако данные, полученные с использованием количественной ПЦР в разных лабораториях, могут отличаться вследствие различий в качестве матрицы, тест-систем и условий эксперимента. Кроме того, концентрация патогенов в биологических образцах часто коррелирует с тяжестью заболевания, что делает необходимым поиск более чувствительного метода, обеспечи-

вающего точное количественное определение патогенов в образце.

Проведение клинических исследований с использованием цифровой ПЦР (цПЦР) выявило некоторые преимущества этого метода для постановки правильного диагноза и мониторинга эффективности лечения. Более того, разработан метод мультиплексной цПЦР, который позволяет снизить затраты реагентов, времени, образцов и погрешность пипетирования [4, 5]. Уникальная способность цПЦР точно измерять большое количество целевых нуклеиновых кислот за одну реакцию позволяет преодолеть ограничения, связанные с количеством каналов флуоресцентного детектирования при ПЦР-РВ [6, 7]. цПЦР широко применяется для выявления нуклеиновых кислот вирусов и бактерий, а также для анализа опухолевых клеток, что актуально в связи с текущей эпидемиологической ситуацией.

ЦИФРОВАЯ ПЦР: ПРИНЦИП И ПРЕИМУЩЕСТВА

цПЦР — метод количественного определения нуклеиновых кислот, основанный на разделении общей реакционной смеси на большое количество отдельных, более мелких реакций (микроре-

акций, капель), в каждой из которых происходит амплификация со случайно распределенной молекулой ДНК. В отличие от ПЦР-РВ интенсивность сигналов флуоресценции в цПЦР регистрируется по конечной точке каждой реакции [1], а присутствие ампликонов анализируется в каждой микрореакции [8, 9]. Таким образом, термином “цифровая” обозначают присутствие либо отсутствие анализируемых биологических объектов в каждой микрореакции в дискретном количестве, а результаты анализа представляются в двоичной (бинарной) системе [10]. Важным преимуществом цифрового сигнала является снижение нагрузки на датчики обнаружения флуоресцентного сигнала, т.е. различаются только два типа сигналов — с высокой и с низкой интенсивностью. В основе обработки результатов анализа цПЦР лежит определение разницы между положительными и отрицательными реакциями амплификации, что связано с количеством молекул исследуемой нуклеиновой кислоты в образце [10]. Благодаря применению распределения Пуассона долю положительных реакций можно использовать для расчета количества копий целевого гена без построения стандартной кривой [11, 12], что обеспечивает повышенную точность и согласованность результатов, полученных в разных лабораториях [13, 14].

Важным преимуществом цПЦР перед другими методами количественного определения нуклеиновых кислот является его низкая чувствительность к ингибиторам амплификации, поскольку подсчет числа копий происходит в конечной точке, а не в режиме реального времени [2, 9, 15]. Кроме того, цПЦР способна обнаруживать небольшие количества целевой нуклеиновой кислоты на фоне большого количества других мишеней, поскольку разделение реакционной смеси на капли и амплификация по конечной точке делают этот метод менее чувствительным к конкуренции за реагенты между мишенями [16, 17].

При этом цПЦР имеет ограниченный предел обнаружения целевых молекул в связи с малым объемом пробы на реакцию и амплификацией не во всех ячейках [2, 13]. Данная особенность цПЦР критически важна для количественного определения РНК, поскольку стадия обратной транскрипции может быть неполной для некоторых РНК-мишеней, что приводит к неправильному подсчету числа копий [18]. К другой особенности цПЦР по сравнению с качественной ПЦР относится менее точное количественное определение более крупных ампликонов. Кроме того, результаты количественной детекции целевых мишеней с использованием разных платформ цПЦР и разных наборов реагентов могут различаться [19].

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПЛАТФОРМЫ цПЦР

Термин цПЦР впервые появился в 1999 г. в статье K.W. Kinzler и B. Vogelstein, которые описали количественное определение мутаций в гене *RAS* путем разделения образца на капли с последующим выполнением серии ПЦР на 384-луночных микропланшетах [20]. Однако сама методика была описана гораздо раньше, ее независимо разрабатывали несколько групп ученых. В 1988 г. ученые из Калифорнии, изучавшие праймер-ферментативную амплификацию ДНК термостабильной ДНК-полимеразой, описали метод амплификации гена β -глобина, разведенного образцом того же генома, но без этого гена. Полученные результаты позволили предположить, что даже одна копия гена β -глобина в образце может быть обнаружена и амплифицирована, а сам метод получил название “ПЦР с предельным разведением” [21]. Этот метод обладал более высокой точностью и способностью к количественному обнаружению редких молекул-мишеней, чем используемые на тот момент методы ПЦР [22]. В 1990 и 1991 г. P. Simmonds и соавт. упоминали данный метод как способ обнаружения отдельных молекул РНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [23]. В 1992 г. группа австралийских ученых под руководством A. Morley детально описала методику и принципы ПЦР с предельным разведением и утвердила ее использование в качестве количественного метода определения нуклеиновых кислот [24]. В 2003 г. K.W. Kinzler и B. Vogelstein продолжили совершенствование цПЦР и создали улучшенный метод “BEAM” (Beads, Emulsion, Amplification, Magnetism), в котором для разделения реакций вместо водного раствора использовали эмульсию, что позволило масштабировать метод до тысяч реакций за один запуск [20].

Разработка метода количественной ПЦР-РВ привела к приостановке развития технологии цПЦР. В 2007 году интерес к данной методике начал постепенно возвращаться, и уже в 2011 г. компанией “Bio-Rad” была зарегистрирована первая система капельной цПЦР (https://www.bio-rad.com/ru-ru/corporate/newsroom/bio-rad-acquires-quantalife-digital-pcr-technology?ID=Bio-Rad-Acquires-Qua_1521570626). По мере совершенствования метода увеличивалось количество и разнообразие платформ для проведения цПЦР, которые отличаются производительностью, количеством одновременно исследуемых образцов и каналами детекции, но неизменно сохраняют общую концепцию цПЦР. На данный момент лидерами в области создания приборов для проведения цПЦР являются американские компании “Bio-Rad”, “StandardBioTools”, “ThermoFisherScientific” и немецкая компания “QIAGEN”.

Первые приборы для проведения цПЦР базировались на технологии микрофлюидных чипов. В 2008 г. появилась платформа для цПЦР Bio-Mark™ HD американской компании “Fluidigm Corporation” (“StandardBioToolsInc”, США), которая позволяла проводить мультиплексный анализ с использованием четырех мишеней на образце, причем разделение, смешивание и реакции термоциклирования образцов проходили непосредственно на чипе. Продукты амплификации визуализировали с помощью системы BioMark. Подобный механизм работы данной платформы позволял снизить возникновение ошибок за счет увеличения автоматизации процесса [25, 26].

Американской компанией “ThermoFisherScientific” создана технология проведения цПЦР путем совмещения систем OpenArray® и QuantStudio® 12K FlexqPCR, также основанных на микрофлюидной технологии. Эта система позволяла анализировать соотношение мутантных генов в каплях объемом 1 пл. Как на платформе Bio-Mark™ HD, так и в данной системе можно проводить мультиплексный анализ образцов, однако при этом возможно использование только двух каналов детекции [27].

Компания “Bio-Rad” запатентовала технологически новую платформу для проведения ПЦР Bio-Rad QX100™ DropletDigital™, в которой не использовались микрочипы. Отличительная особенность анализа в такой системе заключается в соединении нескольких технологий в одной: технологии эмульгирования капель, классической ПЦР и проточной цитометрии. Высокая пропускная способность QX100™ DropletDigital обеспечивает точность и надежность анализа, высокую эффективность обработки образца (<https://www.bio-rad.com/ru-ru/life-science/digital-pcr/qx100-ddpcr-system>). Учитывая высокую эффективность обнаружения целевых молекул нуклеиновых кислот, эту систему усовершенствовали до платформы QX200, которая состоит из двух приборов – генератора капель и считывателя капель. Генератор капель разбивает каждый образец на большое количество капель, объем каждой из которых равен 1 нл, что позволяет в разы увеличить чувствительность и определить 1 копию мишени среди 100000 копий. Считыватель капель анализирует уровень флуоресценции в каждой капле, подсчитывая количество положительных (содержащих мишень) и отрицательных (пустых) капель [28].

Совершенно новая методика цПЦР-микрофлюидного анализа в нанопланшетах разработана компанией “QIAGEN”. В этой методике используется платформа для проведения цПЦР и набор планшетов с лунками, каждая из которых состоит из множества микролунок (микрореакторов), что позволяет значительно повысить повторяемость получаемых результатов по сравнению с

другими системами (<https://www.qiagen.com/ru/product-categories/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr-dpcr/dpcr-assays-kits-and-instruments>) [1, 28]. Для предотвращения загрязнения каждый нанопланшет имеет индивидуальную защитную пленку. В приборе компании “QIAGEN QIAcuity” автоматизированы все этапы обработки планшета, а именно, распределение по микролукам, термоциклирование, визуализация результатов и анализ данных. Прибор считывает флуоресценцию одновременно со всех лунок, что сокращает общее время детекции. Разнообразие планшетов (26K 24-well; 8,5K 24-well и 96-well) позволяет проводить различные эксперименты – от анализа экспрессии генов до исследования жидкой биопсии с разным количеством образцов (<https://www.qiagen.com/ru/product-categories/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr-dpcr/dpcr-assays-kits-and-instruments>) [28].

Китайской компанией “RainSure Scientific” представлена новая система анализа DropDx-2044HT, состоящая из станции подготовки образцов SG-2000 и картриджного сканера. В основе работы данной системы лежит микрофлюидная технология. Автоматическая регуляция давления и микрофлюидный картридж позволяют быстро и плавно получать однородные капли микроэмульсии (20–30 тыс. за 70 с), а высокая скорость нагрева и охлаждения – осуществлять все циклы амплификации за 45 мин. Показана возможность цифровой системы ПЦР для мультиплексного обнаружения целей, многоканального сбора сигналов флуоресценции за счет наличия в картриджном сканере пяти каналов детекции флуоресценции (<https://www.rainsureglobal.com/Sample-Prep-Station-pd42245300.html>).

В табл. 1 приведены характеристики пяти представленных сегодня на рынке технологических платформ для проведения цПЦР. Анализ доступных источников показывает, что системы различаются по типу, количественным показателям объема реакционной смеси, генерируемых капель, анализируемых образцов и т.д. В целом, в производстве таких систем наблюдаются тенденции к увеличению количества капель и уменьшению времени термоциклирования [12].

В настоящее время наблюдается тенденция к миниатюризации приборов, которая заключается в стремлении превратить существующее оборудование в более компактные системы “point-of-care” (РОС). Строение типичной платформы для цПЦР включает объемные детали для распределения образца по лункам, термоциклирования и анализа данных, некоторые системы дополнительно содержат генератор капель для обеспечения высокопроизводительного количественного определения целевых нуклеиновых кислот. Тем не менее, технологии стремительно развиваются и в будущем мы сможем использовать цПЦР для

Таблица 1. Сравнительная характеристика технологических платформ для проведения цПЦР

Прибор	BioMark™HD	QuantStudio 3D FlexqPCR	Bio-Rad QX200	QIAcuity One	DropDX-2044HT
Компания	“Fluidigm”	“Life Technologies”, “Thermo Fisher Scientific”	“Bio-Rad”	“QIAGEN”	“RainSure Scientific”
Страна-производитель	США	США	США	Германия	Китай
Тип технологической платформы	Микрочип	Микрочип	Нанолитровые капли	Нанопластина	Нанолитровые капли
Количество капель на реакцию	2 04–36960	20000	≤20000	8000/26000	≤30000
Объем реакционной смеси, мкл	25–50	20	20	12/40	20
Режим детекции нуклеиновых кислот	В режиме реального времени, по конечной точке	По конечной точке	По конечной точке	По конечной точке	По конечной точке
Продолжительность термочиклирования ПЦР, мин	120–180	120	300	120	90
Число каналов обнаружения сигнала	4	2	2	2/5	3/4/5
Чувствительность, %	0.05	-	0.001	0.01	0.01
Погрешность количественного определения, %	±10	±10	±10	±10	±10
Количество анализируемых образцов на один запуск прибора, шт.	48/ 96/192	24	96	24/96	8/16/32

применения в системах РОС. Уже описаны примеры эффективных миниатюрных систем для ПЦР-РВ [29]. Развитие технологий Lab-On-Chip способствует реализации этапов молекулярного тестирования (лизис образца, очистка нуклеиновой кислоты, обратная транскрипция РНК (если необходима), амплификация целевой области ДНК и оптическое измерение ее продуктов) на значительном уровне миниатюризации. Например, на основе метода ПЦР-РВ разработано миниатюрное устройство для обнаружения гена геммагглютинаина вируса гриппа А/Н1N1, проводящее количественный экспресс-анализ (30 циклов за 15 мин) с высокой чувствительностью и специфичностью [29].

Разработана система “Pathogen Analyzer” для детекции патогенов, сочетающая технологию ПЦР и тестирование антигенов. Принцип работы этой системы частично напоминает работу цПЦР-системы. Тестовый чип содержит капли гидрогеля, каждая из которых представляет собой “биосенсор”. Для экспресс-тестирования, например, на наличие в организме коронавируса SARS-CoV-2, мазок из носоглотки переносят в буферный раствор, а затем наносят на чип. Тестовый чип нагревается, таким образом проходят этапы стандартной ПЦР, но при постоянной температуре (62°C). Каждый биосенсор, как отдельный тест, содержит молекулы, длина волны излучения которых меняется при присоединении к ним целевого патогена. Анализатор определяет количество генетического материала возбудителя и отправляет окончательный результат в специально разработанное приложение для смартфона (<https://www.news-medical.net/news/20221102/New-Pathogen-Analyzer-combines-the-advantages-of-PCR-and-rapid-antigen-testing.aspx>). Это один из ярких примеров миниатюризации прибора для определенной технологии.

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ цПЦР

Мультиплексный анализ имеет ряд преимуществ перед стандартным моноплексным анализом, в число которых входят снижение стоимости реагентов, расхода образца и времени обработки, а также погрешности дозаторов и пипетирования [30]. Мультиплексирование стало возможным и для цПЦР, при этом появляется уникальная возможность точно измерять несколько мишеней за одну реакцию [4].

В зависимости от платформы проведения цПЦР существует возможность определения целевых мишеней, используя от двух до пяти каналов. В присутствии более одного зонда в реакционной смеси маркировка зондов осуществляется разными красителями [6]. При этом даже при наличии только двух каналов существует возможность обнаружения нескольких мишеней за счет

амплитудного “мультиплексирования” — внесение зондов с одинаковым флуорофором в разных концентрациях для каждой мишени. В 2021 году была показана возможность типирования и определения происхождения вируса сезонного гриппа с помощью мультиплексной цПЦР [5].

В клинической практике мультиплексная цПЦР нашла применение в типировании вируса сезонного гриппа и диагностике острого респираторного синдрома, вызванного SARS-CoV-2 [4]. В 2022 г. группой китайских ученых под руководством Xunhua Zhu разработан протокол мультиплексной цПЦР для определения четырех возбудителей вирусных инфекций центральной нервной системы — энтеровируса, парэховируса и двух типов герпесвируса — в ликворе. Мультиплексирование проводили за счет амплитудного разведения зондов для двух каналов детекции. Результаты исследования подтвердили высокую чувствительность такого анализа, использование которого позволило дискриминировать потенциально опасных возбудителей вирусных инфекций центральной нервной системы [4].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ, ВИРУСОВ И ПАРАЗИТОВ С ПОМОЩЬЮ цПЦР

Инфекционные заболевания занимают одну из ведущих позиций среди причин смертности на каждом континенте. Патогенные микроорганизмы, включая бактерии, грибы, вирусы и другие, нарушают структуру тканей, что приводит к развитию воспаления в организме хозяина.

Всемирная организация здравоохранения ежегодно сообщает о росте числа новых инфекционных заболеваний во всем мире и увеличении смертности от них, особенно в странах со средним и низким уровнем жизни. Эта тенденция обусловлена увеличением количества возбудителей, обладающих лекарственной устойчивостью (<https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>). Кроме того, высокая контактируемость вирусов, ответственных за возникновение таких современных эпидемий, как например, коронавирусная болезнь 2019 г. (COVID-19), болезни Эбола и Зика, птичий грипп H5N1, усугубляет проблемы общественного здравоохранения, поскольку приводит к огромным человеческим и финансовым потерям [31]. Поэтому именно в медицинской вирусологии цПЦР активно используется как инструмент количественного определения вирусных нуклеиновых кислот.

Благодаря цПЦР появилась возможность детектирования вирусов гепатитов, Т-клеточного лимфотропного вируса типа 1, что не удавалось сделать раньше из-за недостаточного количества материала вируса, служащего положительным контролем [32, 33]. цПЦР широко применяется

для идентификации “наследственного” интегрированного в хромосомы герпесвируса человека типа 6 (ісіННV-6). Для этого рассчитывают точное соотношение вирусных и человеческих геномов в точечной ДНК.

Для выявления и мониторинга первичных инфекций кровотока разработан протокол цПЦР, который позволяет с высокой степенью чувствительности, специфичности и в течение короткого промежутка времени обнаружить ДНК патогена [34]. Так, показана возможность с помощью цПЦР детектировать видоспецифичные гены золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* (*nuc*), *Streptococcus pneumoniae* (*lyta*) и *Escherichia coli* (*uidA*) [9]. В качестве примера можно сравнить результаты обнаружения штаммов *E. coli*, продуцирующих шига-токсин, с помощью официально валидированных методик с результатами, полученными методом цПЦР. Показано, что при сходстве получаемых результатов проведение цПЦР требует меньше времени [35]. Благодаря возможности одновременной идентификации возбудителей нескольких инфекций и динамического мониторинга изменений концентрации патогенных микроорганизмов в крови, цПЦР можно использовать для оценки эффективности лекарственной терапии и прогноза выживаемости пациентов [36–38].

Малярия, вызываемая малярийным плазмодием, представляет серьезную проблему для стран, эндемичных по этому заболеванию [39]. Низкая чувствительность микроскопического метода подсчета паразитов в капле крови приводит к тому, что в некоторых эндемичных по малярии регионах от 50 до 80% населения являются бессимптомными носителями инфекции. В настоящий момент малярию диагностируют с использованием метода ПЦР-РВ, для которого требуются калибраторы с известной концентрацией патогена и четкая кривая флуоресценции при оценке результата анализа, что усложняет процесс идентификации данных [40]. Сравнение результатов количественного определения возбудителей малярии в крови методами цПЦР и ПЦР-РВ показало, что цПЦР обеспечивает гораздо более высокую повторяемость результатов, чем ПЦР-РВ. Так, количество копий ДНК в дубликатах образцов, измеренное с помощью цПЦР, различалось в 1.5 раза, что значительно меньше, чем в случае ПЦР-РВ, где отличие составило 2.5–6 раз [41].

На сегодняшний день цПЦР активно используется для количественной оценки вирусной нагрузки SARS-CoV-2, определения инфекционности и мониторинга течения заболевания, что крайне важно для эпидемиологического надзора [42]. Эталонным методом выявления SARS-CoV-2 в настоящее время считается метод количественной ПЦР с обратной транскрипцией, однако у

этого метода существует ряд ограничений, в том числе наличие ложноотрицательных результатов [43, 44], что способствует развитию новых методов определения генетических особенностей штаммов данного патогена. Ложноотрицательные результаты ПЦР-тестов могут быть обусловлены мутациями в областях, которые служат мишенями, минимальным количеством вирусного материала в образце или влиянием ингибиторов амплификации [45]. цПЦР способна эффективно решить эту проблему, поскольку позволяет обнаружить вирусную РНК даже при низком количестве ее копий, в то время как выявить РНК вируса в таких образцах с помощью ПЦР-РВ не удастся. Так показано, что цПЦР обладает более низким пределом обнаружения (limit of detection, LOD) РНК SARS-CoV-2, чем ПЦР-РВ [46, 47].

Согласно Cassinari и соавт., цПЦР позволяет с большей чувствительностью оценить вирусную нагрузку, чем количественная ПЦР-РВ. Так, эффективность обнаружения вирусной нуклеиновой кислоты методом ПЦР-РВ составила 62% против 85% в случае цПЦР [42, 45]. Кроме того, цПЦР, как метод определения вирусной нагрузки, позволяет прогнозировать ответ пациентов с диагностированным SARS-CoV-2 на лечение, что крайне важно для подбора индивидуальной схемы терапии [48].

ДИАГНОСТИКА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ цПЦР

цПЦР, применяемую с целью молекулярно-генетической диагностики ряда заболеваний, можно использовать для подбора схемы индивидуальной таргетной терапии. Диагностику онкологических заболеваний на ранних стадиях затрудняет отсутствие видимых клинических проявлений, поэтому большой интерес имеет поиск и обнаружение специфических биомаркеров как диагностических, так и прогностических [49–51]. Перспективным направлением поиска онкомаркеров считается изучение внеклеточной ДНК, присутствующей в биологических жидкостях, поскольку доступ ко многим новообразованиям ограничен и невозможно получить образец опухолевой ткани неинвазивным способом.

Определить стадию развития некоторых опухолей можно с помощью анализа нуклеиновых кислот, циркулирующих в плазме или сыворотке крови. К свободно циркулирующим нуклеиновым кислотам относятся геномная ДНК, мтДНК, вирусные ДНК и РНК, мРНК, а также микроРНК [49, 52, 53], которые попадают в кровь в результате некротических и апоптотических изменений ткани. Для анализа внеклеточной ДНК на ранних стадиях развития злокачественных опухолей, когда ее концентрация в крови крайне

Таблица 2. Чувствительность детекции онкомаркеров с помощью различных методов

Ген	Функциональные особенности гена	Вид новообразования	Маркер	Метод обнаружения			Источник
				количественная ПЦР	ИФА	цПЦР	
<i>BRCA1</i>	Опухолевый супрессор	Рак молочной железы	Делеция	50 нг/мл	—	10 нг/мкг	[61, 62]
<i>BRCA2</i>			Изменение числа копий	57 мкг/мл	—	20 нг/мкл	[63]
<i>HER2</i>	Рецептор эпидермального фактора роста типа 2						
<i>ALK</i>	Киназа анапластической лимфомы	Рак легкого	Уровень экспрессии	—	200 нг/мкл	10 нг/мкл	[64]

низка, необходимы высокочувствительные методы. К таким методам относится цПЦР, позволяющая обнаруживать мутации в небольших количествах биологического материала.

На сегодняшний день в качестве онкомаркера рака предстательной железы используется уровень сывороточного простатспецифического антигена (prostate specific antigen, PSA). Потенциальным биомаркером рака предстательной железы может служить длинная некодирующая РНК MYU, способствующая пролиферации и миграции клеток предстательной железы [54]. Кроме этого, распространенным событием при метастатическом резистентном к кастрации раке предстательной железы является амплификация локуса андрогенного рецептора (AR). Показана возможность высокоточного определения числа копий гена *AR* во внеклеточной ДНК с использованием мультиплексной цПЦР [55].

Еще один пример — использование цПЦР для выявления мутаций в генах, ответственных за развитие рака молочной железы. Прогностическим фактором при данном заболевании служит герминальная мутация гена *BRCA15382insC* [56, 57], не выявляемая с помощью обратной транскрипции с последующей ПЦР-РВ. Описан случай, когда обнаружение делеции гена *BRCA1* методом цПЦР позволило назначить адекватное лечение, которое привело к полной морфологической регрессии опухоли [58]. Кроме того, цПЦР применяется для идентификации циркулирующих в крови клеток рака шейки матки [59, 60].

В табл. 2 представлены результаты сравнения чувствительности детекции некоторых онкомаркеров с помощью количественной ПЦР и цПЦР. Показано, что предел обнаружения при использовании цПЦР в несколько раз ниже, чем у количественной ПЦР.

Важно отметить, что присутствие внеклеточной ДНК в биологических жидкостях человека не всегда свидетельствует о развитии опухоли. Так, после трансплантации органов в организме реци-

пиента циркулирует внеклеточная донорная ДНК, что можно использовать для мониторинга маркеров отторжения трансплантата с помощью цПЦР [65].

Внеклеточная ДНК в жидкостях организма имеет неограниченное значение также для диагностики нейроопухолей [66, 67]. Глиомы — первичные опухоли, происходящие из паренхимы головного мозга, в зависимости от типа клеток делятся на астроцитомы, олигодендроглиомы и эпендимомы. Важную роль в диагностике и выборе стратегии лечения глиом играет определение степени злокачественности опухоли. Глиомы низкой степени злокачественности возникают вследствие мутации в гене *BRAF*, который кодирует киназу, отвечающую за формирование внутриклеточных сигналов, направленных на рост клетки [68]. Высокая степень злокачественности глиом обусловлена мутацией K27 в гене *H3F3A*, кодирующего гистон H3 [69]. Разработан протокол обнаружения мутации K27M гена *H3* в спинномозговой жидкости с использованием цПЦР [70]. Этот протокол оптимизирован для обнаружения внеклеточной ДНК в образцах ликвора путем введения процедуры предварительной амплификации целевой области гена *H3* и оптимизации условий проведения цПЦР. Примечательно, что данный протокол прошел апробацию на двух технологически разных платформах цПЦР: QX200 Droplet (“Bio-Rad”) и QIAcuity (“QIAGEN”); эффективность обнаружения статуса глиомы при этом была сопоставимой. В трех из четырех образцов ликвора, взятых у пациентов с K27M-положительным статусом диффузной глиомы, обе платформы позволили обнаружить мутантный аллель.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

цПЦР — это усовершенствованный метод традиционной ПЦР-РВ, позволяющий осуществлять прямой подсчет числа молекул нуклеиновых кислот. цПЦР активно используется для опреде-

ления вариации числа копий генов в генно-модифицированных организмах, при кариотипировании, на различных моделях заболеваний человека, при определении экспрессии генов, а также при осуществлении эпигенетического контроля [9, 71].

Современная технология определения нуклеиновых кислот — цПЦР — наряду с классической ПЦР и ПЦР-РВ уже занимает свою нишу в области молекулярной диагностики. За счет определения единичных целевых молекул при их низкой концентрации в образце и способности обнаружения редких вариантов мишени, обладающей низкоэффективной амплификацией, цПЦР существенно расширяет возможности для научных и клинических исследований, что крайне важно в свете вновь появляющихся патогенов и связанных с этим тяжелых заболеваний.

Авторы выражают искреннюю благодарность Красноярскому региональному центру коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН (Krasnoyarsk Regional Center of Research Equipment of Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”) за предоставление в пользование прибора для цифровой ПЦР QIAcuity One, 5plex Instrument (“QIAGEN”, 2021).

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

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с содержанием настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lei S. (2021) Digital PCR for accurate quantification of pathogens: principles, applications, challenges and future prospects. *Int. J. Biol. Macromol.* **10**, 750–759.
2. Vynck M., Trypsteen W., Thas O., Vandekerckhove L., De Spiegelaere W. (2016) The future of digital polymerase chain reaction in virology. *Mol. Diagn. Ther.* **20**, 437–447.
3. Huggett J.F., Cowen S., Foy C.A. (2015) Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin. Chem.* **61**, 79–88.
4. Zhu X., Liu P., Lu L., Zhong H., Xu M., Jia R., Su L., Cao L., Sun Y., Guo M., Sun J., Xu J. (2022) Development of a multiplex droplet digital PCR assay for detection of enterovirus, parechovirus, herpes simplex virus 1 and 2 simultaneously for diagnosis of viral CNS infections. *Viol. J.* **19**, 70.
5. Leong N.K.C., Chu D.K.W., Chu J.T.S., Tam Y.H., Ip D.K.M., Cowling B.J., Poon L.L.M. (2020) A sixplex droplet digital RT-PCR assay for seasonal influenza virus typing, subtyping, and lineage determination. *Influenza Other Respir. Viruses.* **14**, 720–729.
6. Whale A.S., Huggett J.F., Tzonev S. (2016) Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomol. Detect. Quantif.* **10**, 15–23.
7. The dMIQE Group, Huggett J.F. (2020) The digital MIQE guidelines update: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments for 2020. *Clin. Chem.* **66**, 1012–1029.
8. Mao X., Liu C., Tong H., Chen Y., Liu K. (2019) Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *Am. J. Transl. Res.* **11**, 7209–7222.
9. Chen B. (2021) Droplet digital PCR as an emerging tool in detecting pathogens nucleic acids in infectious diseases. *Clin. Chim. Acta.* **517**, 156–161.
10. Basu A.S. (2017) Digital assays part I: partitioning statistics and digital PCR. *SLAS Technol.* **22**, 369–386.
11. Pinheiro L.B., Coleman V.A., Hindson C.M., Herrmann J., Hindson B.J., Bhat S., Emslie K.R. (2012) Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal. Chem.* **84**, 1003–1011.
12. Wang K., Li B., Guo Y., Wu Y., Li Y., Wu W. (2022) An integrated digital PCR system with high universality and low cost for nucleic acid detection. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **10**, 947895.
13. Hall Sedlak R., Jerome K.R. (2014) The potential advantages of digital PCR for clinical virology diagnostics. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **14**, 501–507.
14. Tang L., Sun Y., Buelow D., Gu Z., Caliendo A.M., Pounds S., Hayden R.T. (2016) Quantitative assessment of commutability for clinical viral load testing using a digital PCR-based reference standard. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 1616–1623.
15. Sedlak R.H., Nguyen T., Palileo I., Jerome K.R., Kuypers J. (2017) Superiority of digital reverse transcription-PCR (RT-PCR) over real-time RT-PCR for quantitation of highly divergent human rhinoviruses. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 442–449.
16. Sedlak R.H., Jerome K.R. (2013) Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **75**, 1–4.
17. Hudecova I. (2015) Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clin. Biochem.* **48**, 948–956.
18. Sanders R., Mason D.J., Foy C.A., Huggett J.F. (2013) Evaluation of digital PCR for absolute RNA quantification. *Anal. Chem.* **8**, e75296.
19. Hayden R.T., Gu Z., Sam S.S., Sun Y., Tang L., Pounds S., Caliendo A.M. (2016) Comparative performance of reagents and platforms for quantitation of cytomegalovirus DNA by digital PCR. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 2602–2608.
20. Vogelstein B., Kinzler K.W. (1999) Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 9236–9241.
21. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**, 487–491.
22. Morley A.A. (2014) Digital PCR: a brief history. *Biomol. Detect. Quantif.* **1**, 1–2.
23. Simmonds P., Balfe P., Peutherer J.F., Ludlam C.A., Bishop J.O., Brown A.J. (1990) Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in

- small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J. Virol.* **64**, 864–872.
24. Sykes P.J., Neoh S.H., Brisco M.J., Hughes E., Condon J., Morley A.A. (1992) Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques*. **13**, 444–449.
 25. Sanders R., Huggett J.F., Bushell C.A., Cowen S., Scott D.J., Foy C.A. (2011) Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Anal. Chem.* **83**, 6474–6484.
 26. Qin J., Jones R.C., Ramakrishnan R. (2008) Studying copy number variations using a nanofluidic platform. *Nucl. Acids Res.* **36**, e116.
 27. Pekin D., Skhiri Y., Baret J.-C., Corre D.L., Mazutis L., Salem C.B., Millot F., Harrak A.E., Hutchison J.B., Larson J.W., Link D.R., Laurent-Puig P., Griffiths A.D., Taly V. (2011) Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab. Chip.* **11**, 2156–2166.
 28. Tan L.L., Loganathan N., Agarwalla S., Yang C., Yuan W., Zeng J., Wu R., Wang W., Duraiswamy S. (2022) Current commercial dPCR platforms: technology and market review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1–32.
 29. Garzarelli V., Chiriaco M.S., Cereda M., Autuori I., Ferrara F. (2022) Miniaturized real-time PCR systems for SARS-CoV-2 detection at the Point-of-Care. *Clin. Chim. Acta.* **536**, 104–111.
 30. Cassinari K., Alessandri-Gradt E., Chambon P., Charbonnier F., Gracias S., Beaussire L., Alexandre K., Sarafan-Vasseur N., Houdayer C., Etienne M., Caron F., Plantier J.C., Frebourg T. (2021) Assessment of multiplex digital droplet RT-PCR as a diagnostic tool for SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swabs and saliva samples. *Clin. Chem.* **67**, 736–741.
 31. Artika I.M., Wiyatno A., Ma'roef C.N. (2020) Pathogenic viruses: molecular detection and characterization. *Infect. Genet. Evol.* **81**, 104215.
 32. Brunetto G.S., Massoud R., Leibovitch E.C., Caruso B., Johnson K., Ohayon J., Fenton K., Cortese I., Jacobson S. (2014) Digital droplet PCR (ddPCR) for the precise quantification of human T-lymphotropic virus 1 proviral loads in peripheral blood and cerebrospinal fluid of HAM/TSP patients and identification of viral mutations. *J. Neurovirol.* **20**, 341–351.
 33. White R.A., Quake S.R., Curr K. (2012) Digital PCR provides absolute quantitation of viral load for an occult RNA virus. *J. Virol. Methods.* **179**, 45–50.
 34. Wouters Y., Dalloyaux D., Christenhusz A., Roelofs H.M.J., Wertheim H.F., Bleeker-Rovers C.P., te Morsche R.H., Wanten G.J.A. (2020) Droplet digital polymerase chain reaction for rapid broad-spectrum detection of bloodstream infections. *Microb. Biotechnol.* **13**, 657–668.
 35. Mancusi A., Fulgione A., Girardi S., Di Maro O., Capuano F., Proroga Y.T.R., Cristiano D. (2022) Droplet digital PCR (ddPCR) analysis for detecting shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Appl. Sci.* **12**, 3654.
 36. Shao Z., Zhu J., Wei Y., Jin J., Zheng Y., Liu J., Zhang R., Sun R., Hu B. (2022) Pathogen load and species monitored by droplet digital PCR in patients with bloodstream infections: a prospective case series study. *BMC Infect. Dis.* **22**, 771.
 37. Merino I., de la Fuente A., Domínguez-Gil M., Eiros J.M., Tedim A.P., Bermejo-Martín J.F. (2022) Digital PCR applications for the diagnosis and management of infection in critical care medicine. *Crit. Care.* **26**, 63.
 38. Hu B., Tao Y., Shao Z., Zheng Y., Zhang R., Yang X., Liu J., Li X., Sun R. (2021) A comparison of blood pathogen detection among droplet digital PCR, metagenomic next-generation sequencing, and blood culture in critically ill patients with suspected bloodstream infections. *Front. Microbiol.* **12**, 641202.
 39. Kondrashin A.V., Morozova L.F., Stepanova E.V., Turbabin N.A., Maksimova M.S., Morozov E.N. (2018) On the epidemiology of *Plasmodium vivax* malaria: past and present with special reference to the former USSR. *Malar. J.* **17**, 346.
 40. Mangold K.A., Manson R.U., Koay E.S.C., Stephens L., Regner M., Thomson R.B., Peterson L.R., Kaul K.L. (2005) Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2435–2440.
 41. Koepfli C., Nguitragool W., Hofmann N.E., Robinson L.J., Ome-Kaius M., Sattabongkot J., Felger I., Mueller I. (2016) Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR). *Sci. Rep.* **6**, 39183.
 42. Gentilini F., Turba M.E., Taddei F., Gritti T., Fantini M., Dirani G., Sambri V. (2021) Modelling RT-qPCR cycle-threshold using digital PCR data for implementing SARS-CoV-2 viral load studies. *PLoS One.* **16**, e0260884.
 43. Li Y., Yao L., Li J., Chen L., Song Y., Cai Z., Yang C. (2020) Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19. *J. Med. Virol.* **92**, 903–908.
 44. Wu J., Liu J., Zhao X., Liu C., Wang W., Wang D., Zhang C., Yu J., Jiang B., Cao H., Li L. (2019) Clinical characteristics of imported cases of COVID-19 in Jiangsu province: a multicenter descriptive study. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 706–712.
 45. Tahamtan A., Ardebili A. (2020) Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **20**, 453–454.
 46. Konka A., Lejawa M., Gaździcka J., Bochenek A., Fronczek M., Strzelczyk J.K. (2022) RT-PCR detection of SARS-CoV-2 among individuals from the upper Silesian region – analysis of 108516 tests. *Diagnostics.* **12**, 7.
 47. Suo T., Liu X., Feng J., Guo M., Hu W., Guo D., Ullah H., Yang Y., Zhang Q., Wang X., Sajid M., Huang Z., Deng L., Chen T., Liu F., Xu K., Liu Y., Zhang Q., Liu Y., Xiong Y., Chen G., Lan K., Chen Y. (2020) ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 1259–1268.
 48. Dong L., Zhou J., Niu C., Wang Q., Pan Y., Sheng S., Wang X., Zhang Y., Yang J., Liu M., Zhao Y., Zhang X., Zhu T., Peng T., Xie J., Gao Y., Wang D., Dai X., Fang X. (2021) Highly accurate and sensitive diagnostic detection of SARS-CoV-2 by digital PCR. *Talanta.* **224**, 121726.

49. Телышева Е.Н. (2017) Свободно-циркулирующая ДНК плазмы крови. Возможности применения в онкологии. *Вестник РНЦПР*. **17**, 2.
50. Sarhadi V.K., Armengol G. (2022) Molecular biomarkers in cancer. *Biomolecules*. **12**, 1021.
51. Wang S., Zhang K., Tan S., Xin J., Yuan Q., Xu H., Xu X., Liang Q., Christiani D.C., Wang M., Liu L., Du M. (2021) Circular RNAs in body fluids as cancer biomarkers: the new frontier of liquid biopsies. *Mol. Cancer*. **20**, 13.
52. Szilágyi M., Pös O., Márton É., Buglyó G., Soltész B., Keserű J., Penyige A., Szemes T., Nagy B. (2020) Circulating cell-free nucleic acids: main characteristics and clinical application. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 6827.
53. Pös O., Biró O., Szemes T., Nagy B. (2018) Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *Eur. J. Hum. Genet.* **26**, 937–945.
54. Liu D., Yin H., Wang Y., Cao Y., Yin J., Zhang J., Yin H., Zhao X. (2021) Development of a highly sensitive digital PCR assay to quantify long non-coding RNA MYU in urine samples which exhibited great potential as an alternative diagnostic biomarker for prostate cancer. *Transl. Androl. Urol.* **10**, 3815–3825.
55. Du M., Huang C.-C., Tan W., Kohli M., Wang L. (2020) Multiplex digital PCR to detect amplifications of specific androgen receptor loci in cell-free DNA for prognosis of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancers*. **12**, E2139.
56. Бит-Сава Е.М. (2014) Наследственные характеристики *BRCA1* 5382insC/chek2/blm-ассоциированного рака молочной железы. *Сибирский Онкол. Журн.* **6**, 15–18.
57. Mehta A., Diwan H., Gupta G., Nathany S., Agnihotri S., Dhanda S. (2022) Founder *BRCA1* mutations in Nepalese population. *J. Pathol. Transl. Med.* **56**, 212–216.
58. Цыганов М.М., Тарабановская Н.А., Дерюшева И.В., Ибрагимов М.И., Казанцева П.В., Певзнер А.М., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В. (2019) Ответ на неoadъювантную химиотерапию с включением препаратов платины у больной раком молочной железы с делецией гена *BRCA1* в опухоли. *Сибирский Онкол. Журн.* **18**, 103–108.
59. Каюкова Е.В. (2019) Возможности жидкостной биопсии в диагностике и мониторинге цервикального рака. *Сибирский Онкол. Журн.* **18**, 92–101.
60. Tewari K.S., Sill M.W., Monk B.J., Penson R.T., Moore D.H., Lankes H.A., Ramondetta L.M., Landrum L.M., Randall L.M., Oaknin A., Leitao M.M., Eisenhauer E.L., DiSilvestro P., Van Le L., Pearl M.L., Burke J.J., Salani R., Richardson D.L., Michael H.E., Kindelberger D.W., Birrer M.J. (2020) Circulating tumor cells in advanced cervical cancer: NRG oncology-gynecologic oncology group study 240 (NCT 00803062). *Mol. Cancer Ther.* **19**, 2363–2370.
61. Buleje J., Guevara-Fujita M., Acosta O., Huaman F.D.P., Danos P., Murillo A., Pinto J.A., Araujo J.M., Aguilar A., Ponce J., Vigil C., Castaneda C., Calderon G., Gomez H.L., Fujita R. (2017) Mutational analysis of *BRCA1* and *BRCA2* genes in Peruvian families with hereditary breast and ovarian cancer. *Mol. Genet. Genomic Med.* **5**, 481–494.
62. Weigelt B., Comino-Méndez I., de Bruijn I., Tian L., Meisel J.L., García-Murillas I., Fribbens C., Cutts R., Martelotto L.G., Ng C.K., Lim R.S., Selenica P., Piscuoglio S., Aghajanian C., Norton L., Murali R., Hyman D.M., Borsu L., Arcila M.E., Konner J., Reis-Filho J.S., Greenberg R.A., Robson M.E., Turner N.C. (2017) Diverse *BRCA1* and *BRCA2* reversion mutations in circulating cell-free DNA of therapy-resistant breast or ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **23**, 6708–6720.
63. He H.-J., Almeida J.L., Lund S.P., Steffen C.R., Choquette S., Cole K.D. (2016) Development of NIST standard reference material 2373: genomic DNA standards for HER2 measurements. *Biomol. Detect. Quantif.* **8**, 1–8.
64. Zhou R., Cai Y., Shen S., Sha M., Li Z., Head S.R., Wang Y. (2018) A digital PCR based assay to detect all ALK fusion species. *Front. Lab. Med.* **2**, 49–54.
65. Beck J., Bierau S., Balzer S., Andag R., Kanzow P., Schmitz J., Gaedcke J., Moerer O., Slotto J.E., Walson P., Kollmar O., Oellerich M., Schütz E. (2013) Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury. *Clin. Chem.* **59**, 1732–1741.
66. Mair R., Mouliere F. (2022) Cell-free DNA technologies for the analysis of brain cancer. *Br. J. Cancer*. **126**, 371–378.
67. McEwen A.E., Leary S.E.S., Lockwood C.M. (2020) Beyond the blood: CSF-derived cfDNA for diagnosis and characterization of CNS tumors. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 45.
68. Bouchè V., Aldegheri G., Donofrio C.A., Fioravanti A., Roberts-Thomson S., Fox S.B., Schettini F., Generali D. (2021) BRAF signaling inhibition in glioblastoma: which clinical perspectives? *Front. Oncol.* **11**, 772052.
69. Castel D., Philippe C., Calmon R., Le Dret L., Truffaux N., Boddaert N., Pagès M., Taylor K.R., Saulnier P., Lacroix L., Mackay A., Jones C., Sainte-Rose C., Blauwblomme T., Andreuolo F., Puget S., Grill J., Varlet P., Debily M.-A. (2015) Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol. (Berl.)*. **130**, 815–827.
70. Zaytseva M., Usman N., Salnikova E., Sanakoeva A., Valiakhmetova A., Chervova A., Papusha L., Novichkova G., Druy A. (2022) Methodological challenges of digital PCR detection of the histone H3 K27M somatic variant in cerebrospinal fluid. *Pathol. Oncol. Res.* **28**, 1610024.
71. Sahu R., Vishnuraj M.R., Srinivas Ch., Dadimi B., Megha G.K., Pollumahanti N., Malik S.S., Vaithiyannathan S., Rawool D.B., Barbuddhe S.B. (2021) Development and comparative evaluation of droplet digital PCR and quantitative PCR for the detection and quantification of *Chlamydia psittaci*. *J. Microbiol. Methods*. **190**, 106318.

Digital PCR as a Highly Sensitive Diagnostic Tool: a Review

K. V. Kopylova¹, Ed. W. Kasparov¹, I. V. Marchenko¹, and M. V. Smolnikova¹, *

¹*Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, 660022 Russia*

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

Nowadays digital PCR (dPCR) is a nucleic acid quantification method widely used in genetic analysis. One of the most significant advantages of dPCR over other methods is the possibility for absolute quantitative determination of genetic material without construction of calibration curves, which allows one to detect even single molecules of nucleic acids, and, hence, early diagnosis of diseases. A specific characteristic of dPCR is the detection of the analyzed biological object in each microreaction, followed by the presentation of the analysis results in a binary system, thereby giving the method name. The key aspects of developing the dPCR method, i.e. from the first devices based on microfluidic chip technology to modern systems capable of measuring a target at a concentration of up to 1 in 100000 copies were shown in the current work. We analyzed the data on the detection of various pathogens using dPCR, as well as summarized various study results demonstrating the innovativeness of this method “point-of-care”. Both the possibilities of multiplex dPCR analysis and its potential in clinical practice were presented. The review also addresses the issue of the dPCR role in the development of non-invasive methods for oncological diseases to be analyzed. Possible ways of developing dPCR technology were emphasized, including the use as a “point-of-care” systems.

Keywords: digital PCR, dPCR, infection, DNA, oncology, virus, COVID-19

РОЛЬ WGR-ДОМЕНА В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ БЕЛКОВ PARP1 И PARP2

© 2023 г. Н. В. Малюченко^{a, *, **}, А. Н. Коровина^a, А. А. Саулина^a,
В. М. Студитский^{a, b}, А. В. Феофанов^{a, c}

^aБиологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119234 Россия

^bFox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA 19111-2497 USA

^cИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
Москва, 117997 Россия

*e-mail: mal_nat@mail.ru

**e-mail: malyuchenkonv@my.msu.ru

Поступила в редакцию 21.03.2023 г.

После доработки 02.05.2023 г.

Принята к публикации 02.05.2023 г.

Белки PARP1 и PARP2 входят в семейство поли(ADP-рибоза)полимераз, вовлеченных в регуляцию репарации и репликации ДНК, процессинг РНК, биогенеза рибосом, транскрипции, а также в процессы деления и гибели клеток. PARP1 и PARP2 считаются перспективными мишенями для разработки противоопухолевых препаратов и могут найти применение для лечения сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Ранее показано, что домен WGR играет центральную роль в функционировании белков PARP1 и PARP2. В обзоре рассмотрены механизмы участия домена WGR в функционировании белков PARP1 и PARP2, которые имеют ряд как схожих, так и специализированных свойств. Понимание этих процессов представляет большой интерес для фундаментальной науки, а также будет способствовать разработке более эффективных и селективных ингибиторов PARP1 и PARP2.

Ключевые слова: PARP1, PARP2, WGR, ингибиторы PARP1, ингибиторы PARP2

DOI: 10.31857/S0026898423050129, **EDN:** EJBXO

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ PARP1 И PARP2

Семейство ядерных белков, поли(ADP-рибоза)полимераз (PARP) человека, включает в себя 17 представителей, объединенных по наличию консервативной аминокислотной последовательности каталитического центра (CAT). Характерная особенность CAT всех белков PARP (PARP-signature) – наличие ADP-рибозилтрансферазного домена (ART) [1, 2]. Ключевые представители семейства: PARP1 и PARP2 (PARP1/2) – вовлечены в регуляцию важнейших процессов в клетке, таких как репарация и репликация ДНК, процессинг РНК, биогенез рибосом, транскрипция, деление и гибель клеток [3–6]. Особую роль эти

белки играют в поддержании стабильной работы генома, поскольку выступают в роли сенсоров повреждений и запускают репарацию ДНК, а также реакции, способствующие адаптации клетки к стрессу [7–9].

PARP1 и PARP2 (PARP1/2) обладают как общими, так и самостоятельными функциями в клетке. Нокаут PARP1 в клетках и эмбрионах не приводит к гибели организма, так как белок PARP2 способен компенсировать его функции [10–12], но двойной нокаут, PARP1/2, летален для эмбрионов [12, 13]. Благодаря отличному от PARP1 репертуару узнаваемых ДНК-субстратов, которые формируются при повреждении, PARP2 обладает специфическими функциями в репара-

Сокращения: ART (ADP-ribosyltransferase) – ADP-рибозилтрансферазный домен; BRCT (BRCA1 C-terminus) – домен PARP1, содержащий С-концевой мотив BRCA1 (breast cancer 1); CAT (catalytic domain) – каталитический центр; CTR (C-terminal region) – С-концевая область; FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) – метод восстановления флуоресценции после обесцвечивания; HD (helical domain) – спиральный домен; HPF1 (histone PARylation factor 1) – фактор-1 PARилирования гистонов; NTR (N-terminal region) – N-концевая область; PAR (poly(ADP-ribose)) – поли(ADP-рибоза); PARP1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1) – поли(ADP-рибоза)полимераза-1; PARP2 (poly(ADP-ribose) polymerase 2) – поли(ADP-рибоза)полимераза-2; SSBs и DSBs (single strand breaks, double strand breaks) – одноцепочечные и двухцепочечные разрывы; WGR (tryptophan-glycine-arginine-rich domain) – домен, названный по ключевым аминокислотным остаткам: Trp (W), Gly (G) и Arg (R); XRCC1 (X-ray repair cross complementing 1) – белок-1 из группы комплементации, фактор репарации; Zn1, Zn2 и Zn3 (zinc fingers 1, 2, 3) – домены цинковых пальцев 1, 2, 3.

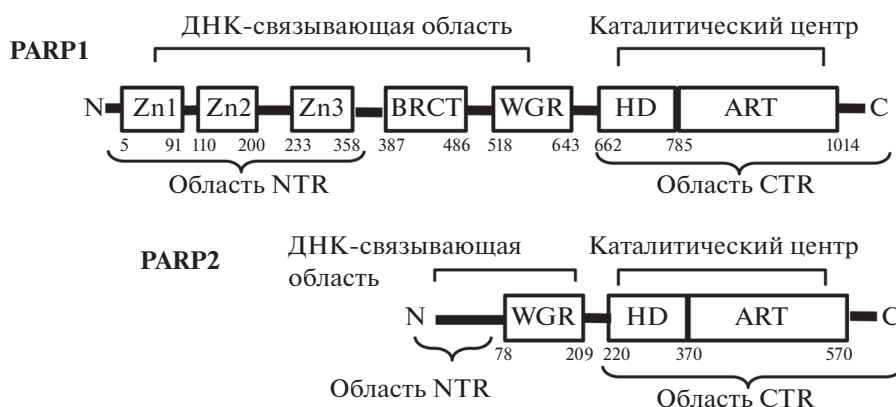


Рис. 1. Доменная структура PARP1 и PARP2. Zn1, Zn2, Zn3 – домены цинковых пальцев; BRCT – домен, родственник С-концевому домену белка репарации BRCA1; WGR – домен, названный по ключевым аминокислотным остаткам: Trp (W), Gly (G) и Arg (R); HD – спиральный домен, регулирующий каталитическую активность; ART – ADP-рибозилтрансферазный каталитический домен; NTR – N-концевая область; CTR – C-концевой участок. Рисунок представляет модифицированную версию из работы [26] (Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND)).

ции, а не полностью дублирует функции PARP1. Кроме того, PARP2 регулирует избыточную ферментативную активность PARP1, которая может приводить к гибели клетки [14]. Об этом косвенно свидетельствует снижение эффективности поли(ADP)рибозилирования (PARилирования) в присутствии обоих ферментов в сравнении с уровнем PARилирования, катализируемым только белком PARP1 [15].

PARP2 обладает также уникальными тканеспецифичными функциями в организме. Например, он играет ключевую роль в сперматогенезе [16]. PARP2 обеспечивает рецептивность эндометрия и имплантацию эмбрионов у мышей, подавляя экспрессию N-кадгерина и способствуя фосфорилированию E-кадгерина в клетках эндометрия [17, 18]. PARP2 регулирует экспрессию SIRT1 (NAD⁺-зависимой деацетилазы), предотвращая таким образом аутофагию [19]. В работе [20] показано, что PARP2 проявляет высокую активность в присутствии рННК *in vitro*, а также при генотоксическом стрессе участвует в синтезе цепей поли(ADP-рибозы) (PAR) в ядрышке – то есть в каскаде сохранения РНК во время клеточного ответа на повреждение ДНК [21, 22].

Белки PARP1 и PARP2 обладают значительной гомологией САТ-участков: они состоят из домена ART и регуляторного спирального домена (HD) (рис. 1). PARP2, как и PARP1, использует NAD⁺ в качестве донора ADP-рибозы для синтеза цепочек PAR, ковалентно присоединяя их к белкам-мишеням (реакция PARилирования) и прежде всего модифицируя себя (авто-PARилирование) [5]. PARP1/2 модифицируют белки преимущественно по остаткам аспартата и глутамата, но под действием фактора HPF1 происходит изменение специфичности PARилирования и более

предпочтительными субстратами становятся остатки серина [23]. Кроме того, PARP2 способен PARилировать ДНК по 5'-концевым фосфатам и тем самым модифицировать геномную ДНК [24]. В результате сравнительного анализа кристаллических структур каталитических доменов показано [25], что акцепторная петля в ART-доме PARP2 несет 6 уникальных остатков, отсутствующих в петле PARP1. Это приводит к увеличению размера петли и повышенной способности PARP2 генерировать разветвленные цепи PAR [5].

Несмотря на то, что функции N-концевых участков (N-terminal regions, NTR) PARP1 и PARP2 заключаются в связывании ДНК, структурное сходство между ними отсутствует. У белка PARP1 N-концевой участок хорошо структурирован и представлен тремя доменами цинковых пальцев (рис. 1). “Цинковые пальцы” обеспечивают связывание PARP1 с одноцепочечными и двухцепочечными разрывами ДНК (SSBs и DSBs соответственно), а также рядом неканонических структур ДНК: квадруплексами, крестообразными формами, шпильками [27–33]. Известно, что удаление N-конца PARP1 снижает эффективность связывания фермента с ДНК более чем в 1000 раз, при этом удаление N-конца PARP2 приводит к падению эффективности связывания с ДНК всего в 4 раза [2]. NTR PARP2 не обладает упорядоченной структурой и его роль в связывании с ДНК остается предметом для обсуждения. N-конец PARP2 несет сигналы ядерной и ядрышковой локализации и определяет транспорт PARP2 в ядро клетки, но не влияет на связывание с повреждениями ДНК [11]. Таким образом, связывание PARP2 с ДНК регулируется его NTR лишь частично.

Репертуар повреждений, которые узнает PARP2, отличается от такового для PARP1. М. Кутузов

Таблица 1. Ключевые аминокислотные остатки WGR-домена PARP1

Аминокислотный остаток PARP1	Функция	Источник
N567	ДНК-зависимая активация катализа	[32]
R589	Связывание ДНК за счет стекинга с рибозой 5'-концевого нуклеотида	[32]
R591	ДНК-зависимая активация катализа за счет формирования контактов с доменами Zn1 и HD	[38]
K633	ДНК-зависимая активация катализа	[32]

(М. Kutuzov) и соавт. [15] изучили спектр субстратов PARP2, среди которых были ДНК, содержащие SSBs, DSBs, а также одноцепочечные участки, выступающие как по концам фрагментов ДНК, так и внутри дуплекса (flaps and overhangs), бреши различной длины (gaps), липкие концы, ДНК разного размера, а также разветвленные ДНК с сочленениями 4 или 3 цепей и ДНК со шпильками. Показано, что PARP2 наиболее эффективно ($K_d < 30$ нМ) связывается с субстратами, содержащими свисающие одноцепочечные фрагменты и разветвленную ДНК. Константа диссоциации взаимодействия PARP2 с SSBs или бреши варьировала от 60 до 110 нМ, а связывание с DSBs было низкоаффинным ($K_d \sim 200$ нМ). Таким образом, PARP2 может связываться с широким спектром ДНК-структур, имитирующих интермедиаты различных стадий репарации ДНК. Кроме того, для PARP2 выявлено взаимодействие с цепями PAR, что можно объяснить схожестью их третичной структуры с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами. Так, цепи PAR эффективно индуцировали каталитическую активность PARP2, но не PARP1; причем действие PAR было более интенсивным, чем одноцепочечных ДНК или РНК [34]. Установлено, что делеция домена WGR предотвращает связывание PARP2 с ДНК, из чего следует, что этот домен играет ключевую роль в этом процессе [2].

РОЛЬ ДОМЕНА WGR В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ PARP1

Особый интерес представляет изучение функций WGR-домена PARP1. С применением биофизических и биохимических подходов определена центральная роль домена WGR в аллостерической регуляции PARP1. Она заключается в том, что распознавание повреждений ДНК “цинковыми пальцами” запускает сеть последовательных конформационных преобразований в молекуле PARP1, приводящих к активации CAT [35, 36]. Установлено, что домен WGR взаимодействует с Zn1, Zn3, CAT и ДНК и образует сеть межмолекулярных контактов, которая связывает интерфейс повреждения ДНК с доменом CAT [32] (рис. 2). С помощью масс-спектрометрии в сочетании с

водородно-дейтериевым обменом показано, что остаток R591 домена WGR образует ключевые контакты с Zn1 и HD — доменом, регулирующим активность CAT [37, 38] (табл. 1). Таким образом, остаток R591 PARP1 играет решающую роль в ДНК-зависимой активации, формируя мостик между ДНК-связывающим интерфейсом и CAT.

Кроме ключевой роли WGR домена в активации PARP1 было показано, что он играет важную роль в способности PARP1 перемещаться по ДНК. В экспериментах по лазерному микрооблучению живых клеток показано, что PARP1 может перемещаться по хроматину, сканируя повреждения ДНК [39], и очень быстро (менее чем за 10 с) в больших количествах накапливаться в местах повреждения ДНК [40]. PARP1 хорошо связывает DSBs, но при этом обладает существенным сродством к неповрежденной ДНК — миллиардам пар оснований, которые присутствуют в ядре в концентрациях ~ 100 мг/мл [41]. Парадоксальным образом высокая скорость накопления PARP1 в местах повреждений не соответствует скорости повторяющихся циклов случайной ассоциации—диссоциации при перемещении PARP1 за счет диффузии. Это наблюдение дает основание полагать, что PARP1, как и другие ДНК-связывающие белки (например, факторы транскрипции [42]), перемещается по геному, задействуя механизм, который не опирается на нерегулируемую диссоциацию—реассоциацию. В 2018 году группой Каролин Люгер (K. Luger) [41] для перемещения PARP1 по ДНК предложен механизм внутрицепочечного переноса (intrastrand transfer). В соответствии с этой моделью, PARP1 перемещается от одного сайта ДНК к другому, подобно тому, как обезьяны “кочуют” с ветки на ветку за счет переноса центра тяжести с одной конечности на другую, — поэтому этот механизм также называют “Monkey bar”.

Для проверки гипотезы “Monkey bar” использовали олигомеры с DSBs на концах, имитирующие поврежденную ДНК, а также кольцевую плазмидную ДНК, не имеющую повреждений и разрывов. Перемещение PARP1 происходило и на поврежденной, и на интактной ДНК [41]. Таким образом, этот механизм может быть реализо-

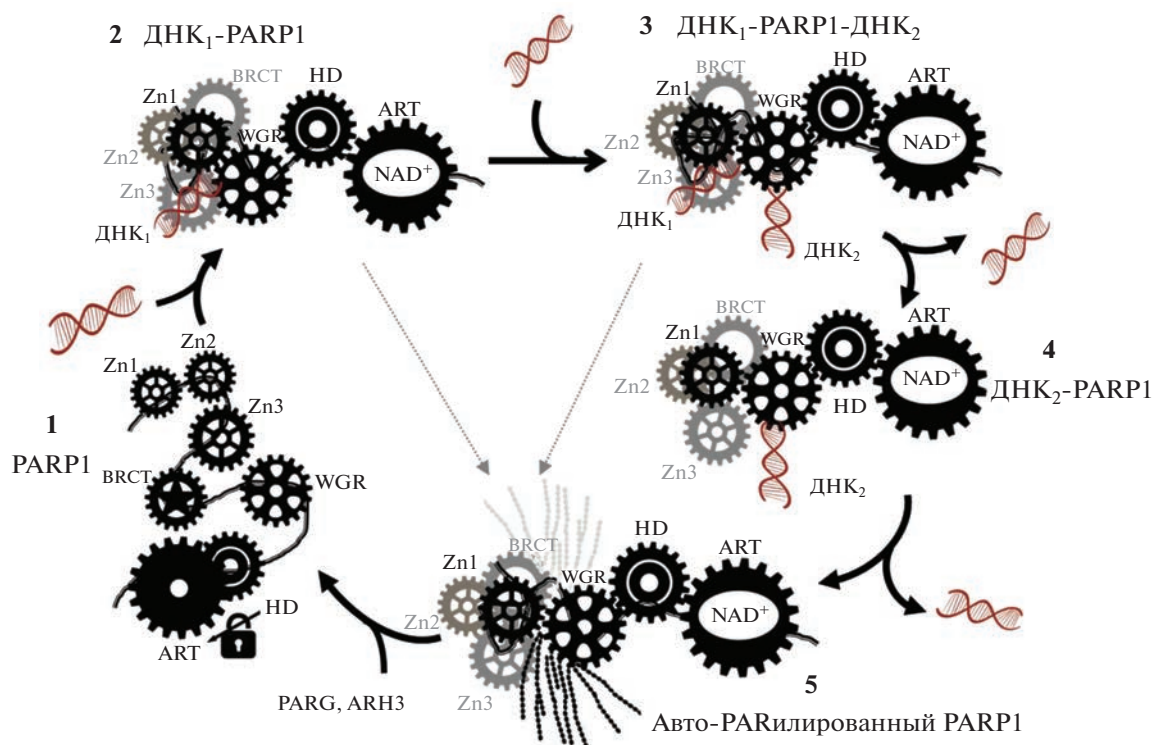


Рис. 2. Функционирование PARP1. 1 — Домены белка PARP1, не связанного с ДНК, разделены линкерными областями и располагаются подобно бусинам на нитке. HD стабилизирует каталитический домен ART в неактивном состоянии. 2 — При обнаружении повреждения ДНК домены Zn1, Zn2 и Zn3 группируются вокруг разрыва ДНК и преимущественно за счет Zn1 образуют междоменные контакты с WGR. WGR в свою очередь взаимодействует с HD, что приводит к дестабилизации конформации последнего и формированию более гибкой и динамичной конформации ART, обеспечивая тем самым доступ NAD^+ к активному центру. Так, домены PARP1, перемещаясь подобно зубчатого механизма, последовательно индуцируют его каталитическую активность. 3 — При появлении конкурентной ДНК домены PARP1 могут диссоциировать от исходного сайта и взаимодействовать с новым (пояснение в тексте). Происходит формирование тройного комплекса PARP1 с двумя сайтами ДНК. 4 — В результате конформационных перестроек может происходить диссоциация PARP1 от исходного сайта и связывание с новым. Так реализуется механизм перемещения PARP1 по ДНК по механизму “Monkey bar”. 5 — В результате поступления NAD^+ в активный центр происходит ПАРИрование целевых белков и, прежде всего, авто-ПАРИрование. При авто-ПАРИровании происходит высвобождение PARP1 от ДНК (за счет электростатического отталкивания отрицательно заряженных полимеров PAR и ДНК) и возвращение к исходной, более релаксированной, структуре.

ван и при перемещении PARP1 по хроматину в поисках дефектов ДНК.

Такой способ перемещения позволяет PARP1 эффективно сканировать геном и быстро связываться с новыми участками ДНК. При обнаружении повреждения сродство PARP1 к ДНК резко увеличивается, фермент останавливается на дефектном участке и запускает процесс репарации. С помощью флуоресцентной анизотропии показано, что в растворе, в котором присутствовали флуоресцентно меченные олигомеры ДНК ($\text{ДНК}_\text{ф}$), PARP1 и конкурентная ДНК ($\text{ДНК}_\text{к}$), происходит формирование тройного комплекса $\text{ДНК}_\text{ф}$ -PARP1- $\text{ДНК}_\text{к}$ и конформационная перестройка PARP1 [43]. Для образования тройного комплекса с одновременно связанными двумя разными молекулами ДНК требуется два отдельных сайта связывания ДНК. В молекуле PARP1 присутствует три домена цинковых пальцев (Zn1,

Zn2, Zn3) и WGR, которые могут вносить вклад в подобное связывание ДНК (рис. 1). С целью определить, участвует ли один или несколько из этих доменов в образовании тройного комплекса, необходимого для эффективного высвобождения ДНК, М. Langelier и др. [32] сконструировали делеционные мутанты PARP1, в которых отсутствовал один из этих доменов. Для всех мутантов измерили скорость ассоциации и диссоциации. Показано, что мутанты с делецией цинковых пальцев (ΔZn1 , ΔZn2 и ΔZn3) работали так же, как PARP1 дикого типа, в то время как мутант ΔWGR , терял способность формировать тройной комплекс. Аналогично вел себя мутант PARP1 с точечной мутацией аминокислотного остатка W589 в WGR-домене [32], для которого ранее было показано, что он необходим для связывания с ДНК.

В экспериментах, проведенных J. Rudolph и др. [41] на эмбриональных фибробластах мыши,

сравнивали скорость и эффективность накопления PARP1 дикого типа и мутанта W589A в местах повреждения ДНК. В результате выявлено, что накопление мутанта W589A в местах повреждения ДНК в клетках снижено. В связи с тем, что аффинность связывания домена WGR с ДНК ниже, чем у “цинковых пальцев”, WGR легче диссоциирует от исходного сайта в комплексе с ДНК и присоединяется к другому сайту по механизму “Monkey bar”. Затем происходит перемещение остальной части PARP1 на новый сайт ДНК.

Может ли подобный механизм работать в хроматине, где геномная ДНК имеет плотную нуклеосомную упаковку? В этом отношении особого внимания заслуживают работы, в которых на мутантных формах PARP1, лишенных “цинковых пальцев”, показано, что PARP1 обладает способностью взаимодействовать с хроматином *in vivo* не только за счет взаимодействия с ДНК, а также за счет распознавания конца гистона H4 доменами WGR и CAT [39] и активирования гистона H2A [44]. Этот фрагмент PARP1 при взаимодействии с H4 проявлял способность к эффективно связыванию и последующему стабильному PARилированию. Эти и другие данные по исследованию распределения мутантов PARP1 с помощью флуоресцентной визуализации на хромосомах позволили авторам предположить, что PARP1 как бы “прогуливается” по геномной неповрежденной ДНК через слабые низкоаффинные взаимодействия, сканируя ее [39].

Недавно J. Rudolph и др. [45], используя криоэлектронную микроскопию, показали, что домен PARP1, содержащий С-концевой мотив белка BRCA1 (BRCT), способен связываться с нуклеосомным кором. Скорость высвобождения флуоресцентно меченного дуплекса из комплекса с мутантной формой PARP1, лишенного домена BRCT (Δ BRCT), значительно меньше зависит от концентрации интактной ДНК, чем в случае PARP1 дикого типа. Кроме того, в клеточной линии, экспрессирующей только мутантный Δ BRCT PARP1, наблюдалась его пониженная подвижность в сайтах повреждений ДНК, индуцированных лазерным излучением. Однако такой эффект не наблюдали (в отличие от W589A PARP1) для клеточной линии, несущей и Δ BRCT PARP1, и PARP1 дикого типа. На основании этих результатов можно сделать вывод о вкладе BRCT-домена, наряду с WGR, в перемещение PARP1 по механизму “Monkey bar” [45].

Механизм, в котором ключевую роль играют домены WGR и CAT, реализуется за счет связывания с концом гистона H4, который экспонирован в особых нуклеосомах, располагающихся в промоторных областях генов [39]. Этот механизм связан с участием PARP1 в транскрипции и не зависит от присутствия цинковых пальцев и связывания с ДНК. Показано, что роль PARP1 в ядер-

ных процессах может быть опосредована способностью PARP1 реорганизовать плотную упаковку нуклеосом и тем самым способствовать функционированию больших белковых комплексов (транскрипционной и репарационной машин в хроматине) [46, 47].

В исследовании, проведенном X. Li и др. [48], показано, что, влияя непосредственно на WGR, можно активировать каталитическую активность PARP1. Так, обнаружено, что антиоксидантное действие салидроза (растительного гликозида, используемого в фармакологии и косметологии) *in vitro* и *in vivo* обусловлено связыванием с WGR-доменом PARP1, что приводит к активации CAT.

Таким образом, домен WGR PARP1 играет ключевую роль в активации его ферментативной активности за счет формирования интерфейса с CAT в ходе последовательных конформационных перестроек в PARP1, происходящих при взаимодействии белка с поврежденной ДНК. Кроме того, WGR PARP1 совместно с доменом BRCT участвует в обеспечении перемещения PARP1 по хроматину посредством механизма “Monkey bar”.

РОЛЬ ДОМЕНА WGR В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ PARP2

WGR PARP2 играет ключевую роль в связывании белка с ДНК и последующей ДНК-зависимой активации каталитической активности PARP2 [5, 49]. Реализуется сценарий активации PARP2, сходный с аллостерическим механизмом, описанным выше для PARP1 (рис. 3). A. Riccio и др. [50] установили, что, связываясь с ДНК, WGR-домен запускает механизм передачи сигнала домену CAT следующим образом: связывание WGR с ДНК дестабилизирует регуляторный домен HD, тем самым высвобождая домен ART для связывания с NAD^+ и, как следствие, PARилирования белков-мишеней. M. Langelier и др. [2] показали, что в случае мутантов PARP2 по остатку R140 (аналог R591 PARP1 – ключевой аминокислоты в WGR-домене, обеспечивающей интерфейс Zn1 и CAT) исчезала ДНК-зависимая каталитическая активность. Интересно, что подобный аллостерический механизм есть у еще одного представителя этого семейства – PARP3, в молекуле которого ключевую роль играет остаток R103 WGR-домена [2]. В клетке присутствуют две изоформы PARP2. Изоформа-2 отличается отсутствием 13 аминокислотных остатков, начиная с G68. В связи с тем, что разные исследователи работают с различными изоформами PARP2, нумерация ключевых аминокислотных остатков в них может отличаться. Так, R591 PARP1 соответствует R153 изоформы-1 и R140 изоформы-2 PARP2.

Разрешенные рентгеноструктурным анализом структуры комплексов WGR-домена PARP2 с

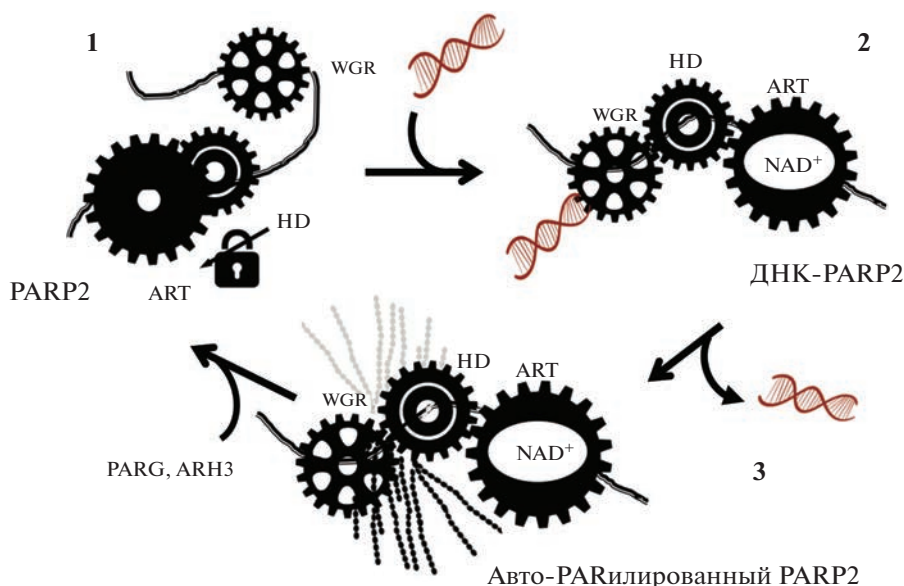


Рис. 3. Функционирование PARP2. 1 – Домены белка PARP2, не связанного с ДНК, разделены линкерными областями и располагаются подобно бусинам на нитке. HD стабилизирует каталитический домен ART в неактивной состоянии. 2 – Связываясь с ДНК, WGR-домен запускает аллостерический механизм передачи активирующего сигнала, аналогичный PARP1. В то же время в отсутствие “цинковых пальцев” перемещение PARP2 по ДНК по механизму “Monkey bar” невозможно. Такое отличие определяет различия в удержании (траппинга) белков PARP1 и PARP2 на хроматине под действием ингибиторов. 3 – При авто-PARилировании PARP2, как и в случае PARP1, происходит электростатическое отталкивание отрицательно заряженных полимеров PAR и ДНК, в результате чего происходит высвобождение PARP2 от ДНК и формирование исходной, более релаксированной, структуры PARP2.

различными олигомерами: с ДНК длиной 10 п.н. с тупыми концами, фосфорилированными по 5'-концу (2.8 Å); с ДНК длиной 20 п.н. с тупыми концами, фосфорилированными по 5'-концу (2.2 Å); с ДНК длиной 10 п.н. с выступающим одноцепочечным концом длиной 5 нуклеотидов – позволили авторам, Е. Обаји и др. [51], идентифицировать конкретные аминокислотные остатки WGR-домена, участвующие во взаимодействиях PARP2 с ДНК (2.98 Å) (табл. 2). Так, WGR PARP2 связывается по обеим сторонам от повреждения ДНК: K179, Y132 и K183 контактируют с сахарофосфатным остовом ДНК; W151, благодаря гидрофобному кольцу, вступает в стекинг-взаимодействия с рибозой на 5'-конце ДНК; R153 образует водородные связи с 3'-фосфатной группой $n - 1$ нуклеотида; Q159 образует водородную связь с рибозой $n - 1$ нуклеотида комплементарной цепи. Y201 напрямую взаимодействует с 5'-фосфатом, а замена тирозина на фенилаланин приводила к формированию неактивного PARP2, не обладающего способностью специфически связываться с 5'-фосфорилированной ДНК. Таким образом, аминокислотные остатки в домене WGR PARP2 играют ключевую роль во взаимодействии полноразмерного PARP2 с ДНК, а остаток N129 является ключевым элементом в передаче сигнала активации с WGR на CAT; при этом две молекулы PARP2 образуют мостик между двумя олигомерами ДНК [51].

Недавно опубликованы две работы по исследованию структуры комплекса PARP2 с нуклеосомами [52, 53], в формировании которого ключевая роль принадлежит домену WGR. S. Bilokapic и соавт. [53] в закристаллизованном комплексе HPF1–PARP2–нуклеосомы обнаружили, что между двумя нуклеосомами есть мостик, соединяющий свободные концы нуклеосомной ДНК. Этот мостик образован двумя комплексами PARP2–HPF1; причем домены WGR PARP2 связывают разрыв ДНК и тем самым удерживают вместе две нуклеосомы. Описаны ключевые остатки WGR PARP2, среди которых важен остаток R140, располагающийся в сигнальной петле WGR. Мутация этого остатка предотвращала связывание нуклеосом и образование мостиков, что объясняет наблюдаемую *in vivo* быструю диссоциацию мутантного по R140 PARP2 от хроматина [53].

С помощью количественной визуализации живых клеток, подвергнутых микрооблучению, обнаружено, что привлечение и необратимое связывание (траппинг) PARP2 с поврежденной ДНК может происходить двумя способами: PARP1-зависимым (преимущественно) и PARP1-независимым [54]. Первый механизм реализуется посредством распознавания повреждений белком PARP1, его активацией, в результате чего в месте дефекта ДНК происходит активный синтез PAR, который привлекает PARP2. Это было продемон-

Таблица 2. Ключевые аминокислотные остатки WGR-домена PARP2

Аминокислотный остаток PARP2 ^a	Функция	Источник
N127	Образование стабильного комплекса с ДНК; активация катализа при связывании SSBs и DSBs	[51]
N129	ДНК-зависимая активация катализа	[51]
Y132	Взаимодействие с сахарофосфатным остовом ДНК со стороны 5'-конца; влияние на активность в случае DSB	[51]
W151	Стекинг с рибозой на 5'-конце ДНК; образование стабильного комплекса с ДНК	[51]
R153 (R140 в изоформе-2)	Водородные связи с 3'-фосфатной группой нуклеотида $n - 1$; образование стабильного комплекса с ДНК; ДНК-зависимая активация катализа в случае SSBs и DSB	[2, 51]
Q159	Водородные связи с нуклеотидом $n - 1$ комплементарной цепи; необходим для активации PARP2 под действием ДНК с тупыми концами	[51]
K179	Взаимодействие с сахарофосфатным остовом ДНК; влияние на активность в случае DSB с или без выступающего конца ДНК	[51]
K183	Взаимодействие с сахарофосфатным остовом ДНК; образование стабильного комплекса с ДНК; влияние на активность в случае DSB с или без выступающего конца ДНК	[51]
Y201	Взаимодействие с концевым 5'-фосфатом или с фосфатом второго нуклеотида с 5'-конца в случае выступающих концов; образование стабильного комплекса с ДНК и активация ДНК-зависимого катализа	[51]

^aНумерация аминокислотных остатков соответствует изоформе-1 PARP2.

стрировано с использованием мутантов PARP2 по R140 в WGR-домене. Несмотря на то, что этот мутант PARP2 терял способность связывать ДНК, он накапливался в местах повреждения ДНК при микрооблучении клеток с активным PARP1. Интересно, что нирапариб почти полностью отменял привлечение мутантного белка PARP2-R140A в PARP1-продуцирующих клетках. Из этого следует, что PAR, синтезированный PARP1, а не сам белок PARP1, привлекает PARP2 к местам повреждения ДНК [54]. Хотя NTR-домен PARP2 может связывать PAR *in vitro* [34], мутанты, лишённые NTR ($\Delta 1-70$ и $\Delta 1-87$), формировали устойчивые кластеры, содержащие множество молекул PARP2 в области повреждения ДНК в клетках, содержащих PARP1. Это предполагает наличие другого механизма, опосредующего PAR-зависимое привлечение PARP2.

PARP2 может также привлекаться к местам повреждений ДНК независимо от каталитической активности PARP1 — за счет прямого ДНК-зависимого связывания. Такой способ продемонстрирован на клетках с дефицитом PARP1 и с применением ингибиторов PARP1/2. В этом случае ингибиторы переклечивали связывание PARP2 с хроматином с первого механизма (описанного выше) на второй. При PAR-независимом способе именно WGR-домен PARP2 играет ключевую роль в привлечении PARP2 к местам поврежде-

ния в хроматине [54]. Авторы предполагают, что противоопухолевые препараты нирапариб и талазопариб стерически запирают PARP2 в месте повреждения ДНК через домен WGR за счет механизма, который в значительной степени независим от авто-PARилирования.

При визуализации поведения живых клеток при микрооблучении и FRAP (метод восстановления флуоресценции после обесцвечивания) выявили, что механизм, лежащий в основе захвата PARP2, отличается от PARP1-зависимого. В случае PARP1 ингибиторы формируют стойкие очаги накопления PARP1 и обеспечивают его необратимое связывание в месте повреждения не за счет фиксации PARP1 в сайте связывания, а за счет постоянного обмена молекул PARP1 — из-за ослабленного привлечения комплекса XRCC1-LIG3 (основных ферментов репарации, привлекаемых PAR-зависимым способом к месту действия) [55]. Необратимое связывание PARP1 ведет к отсроченной репарации дефекта ДНК. Ключевым остатком, регулирующим обмен PARP1 в месте повреждений, служит H862 [55], мутации которого приводят к физическому блокированию молекул PARP1 на ДНК. В случае PARP2 ингибиторы меняют способ формирования его кластеров, индуцированных повреждением ДНК, из преимущественно PAR-зависимого к стабильному взаимодействию PARP2 с ДНК через домен WGR.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, WGR-домены белков PARP1 и PARP2 выполняют как схожие функции, так и различные. В частности, их сближает то, что этот домен играет ключевую роль в активации каталитической функции белков, поскольку именно WGR дестабилизирует регуляторный домен HD, что необходимо для проникновения молекулы NAD^+ в активный центр. Различие в механизмах действия заключается в том, что в случае PARP2 WGR-домен напрямую взаимодействует с ДНК и передает сигнал к активации фермента, а в случае PARP1 WGR-домен играет роль посредника между ДНК-связывающим цинковым пальцем Zn1 и CAT. Кроме того, для PARP1, обладающего высокоаффинными ДНК-связывающими структурами — цинковыми пальцами, — WGR-домен совместно с доменом BRCT служит дополнительной “слабой рукой”, необходимой для перемещения по ДНК с помощью механизма внутрицепочечного переноса (“Monkey bar”). Для продвижения таким способом необходимо иметь менее аффинную ДНК-связывающую структуру, которая позволяет свободно ассоциировать—реассоциировать с ДНК и таким образом “нащупывать” новое, отличное от исходного, место ДНК, а затем переносить оставшуюся часть молекулы PARP1 — подобно тому, как обезьяны “кочуют” с ветки на ветку. Видимо, такая специализация WGR-доменов PARP1 и PARP2 влияет на особенности необратимого связывания этих белков под действием ингибиторов и формирования стабильных очагов скопления молекул PARP1 и PARP2 в месте повреждения ДНК.

Понимание молекулярных механизмов действия PARP1 или PARP2 позволит ускорить разработку их селективных ингибиторов, которые получат применение в будущем [56] в лечении онкологических и ряда метаболических заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения № 075-15-2021-1354 от 07.10.2021 г.

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. Amé J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. (2004) The PARP superfamily. *BioEssays*. **26**, 882–893.
2. Langelier M.F., Riccio A.A., Pascal J.M. (2014) PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7762–7775.

3. Žaja R., Mikoč A., Barkauskaite E., Ahel I. (2013) Molecular insights into poly(ADP-ribose) recognition and processing. *Biomolecules*. **3**(1), 1–17.
4. Kraus W.L. (2020) PARPs and ADP-ribosylation: 60 years on. *Genes Dev.* **34**, 51–53.
5. Ali S.O., Khan F.A., Galindo-Campos M.A., Yelamos J. (2016) Understanding specific functions of PARP-2: new lessons for cancer therapy. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 1842–1863.
6. Dantzer F., Santoro R. (2013) The expanding role of PARPs in the establishment and maintenance of heterochromatin. *FEBS J.* **280**, 3508–3518.
7. Sutcu H.H., Matta E., Ishchenko A.A. (2019) Role of PARP-catalyzed ADP-ribosylation in the crosstalk between DNA strand breaks and epigenetic regulation. *J. Mol. Biol.* **432**, 1769–1771.
8. Azarm K., Smith S. (2020) Nuclear PARPs and genome integrity. *Genes Dev.* **34**, 285–301.
9. Eisemann T., Pascal J.M. (2020) Poly(ADP-ribose) polymerase enzymes and the maintenance of genome integrity. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 19–33.
10. Shieh W.M., Ame J.C., Wilson M.V., Wang Z.Q., Koh D.W., Jacobson M.K., Jacobson E.L. (1998) Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J. Biol. Chem.* **273**, 30069–30072.
11. Ame J.C., Rolli V., Schreiber V., Niedergang C., Apiou F., Decker P., Muller S., Hoger T., Menissier-de Murcia J., de Murcia G. (1999) PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.* **274**, 17860–17868.
12. Navarro J., Gozalbo-Lopez B., Mendez A.C., Dantzer F., Schreiber V., Martinez C., Arana D.M., Farres J., Revilla-Nuin B., Bueno M.F., Ampurdanes C., Galindo-Campos M.A., Knobel P.A., Segura-Bayona S., Martin-Caballero J., Stracker T.H., Aparicio P., Del Val M., Yelamos J. (2017) PARP-1/PARP-2 double deficiency in mouse T cells results in faulty immune responses and T lymphomas. *Sci. Rep.* **7**, 41962.
13. Menissier de Murcia J., Ricoul M., Tartier L., Niedergang C., Huber A., Dantzer F., Schreiber V., Ame J.C., Dierich A., LeMeur M., Sabatier L., Chambon P., de Murcia G. (2003) Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J.* **22**, 2255–2263.
14. Кутузов М.М., Ходырева С.Н., Schreiber V., Лаврик О.И. (2014) Роль PARP2 в репарации ДНК. *Молекуляр. биология*. **48**, 561–572.
15. Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Ame J.C., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Schreiber V., Lavrik O.I. (2013) Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins. *Biochimie*. **95**, 1208–1215.
16. Dantzer F., Mark M., Quenet D., Scherthan H., Huber A., Liebe B., Monaco L., Chicheportiche A., Sassone-Corsi P., de Murcia G., Menissier-de Murcia J. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 contributes to the fidelity of male meiosis I and spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 14854–14859.

17. Soni U.K., Chadchan S.B., Joshi A., Kumar V., Maurya V.K., Verma R.K., Jha R.K. (2020) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 is essential for endometrial receptivity and blastocyst implantation, and regulated by caspase-8. *Mol. Cell Endocrinol.* **518**, 110946–11061.
18. Verma R.K., Soni U.K., Chadchan S.B., Maurya V.K., Soni M., Sarkar S., Pratap J.V., Jha R.K. (2022) miR-149-PARP-2 signaling regulates E-cadherin and N-cadherin expression in the murine model of endometrium receptivity. *Reprod. Sci.* **29**, 975–992.
19. Janko L., Sari Z., Kovacs T., Kis G., Szanto M., Antal M., Juhasz G., Bai P. (2020) Silencing of PARP2 blocks autophagic degradation. *Cells.* **9**, 380–401.
20. Leger K., Bar D., Savic N., Santoro R., Hottiger M.O. (2014) ARTD2 activity is stimulated by RNA. *Nucleic Acids Res.* **42**, 5072–5082.
21. Wurtmann E.J., Wolin S.L. (2009) RNA under attack: cellular handling of RNA damage. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **44**, 34–49.
22. Li Z., Wu J., Deleo C.J. (2006) RNA damage and surveillance under oxidative stress. *IUBMB Life.* **58**, 581–588.
23. Bonfiglio J.J., Fontana P., Zhang Q., Colby T., Gibbs-Seymour I., Atanassov I., Bartlett E., Zaja R., Ahel I., Matic I. (2017) Serine ADP-ribosylation depends on HPF1. *Mol. Cell.* **65**, 932–940.e6.
24. Matkarimov B.T., Zharkov D.O., Saparbaev M.K. (2020) Mechanistic insight into the role of poly(ADP-ribosylation) in DNA topology modulation and response to DNA damage. *Mutagenesis.* **35**, 107–118.
25. van Beek L., McClay E., Patel S., Schimpl M., Spagnolo L., Maia de Oliveira T. (2021) PARP power: a structural perspective on PARP1, PARP2, and PARP3 in DNA damage repair and nucleosome remodelling. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 5112–5135.
26. Rudolph J., Jung K., Luger K. (2022) Inhibitors of PARP: number crunching and structure gazing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **119**, e2121979119.
27. D'Silva I., Pelletier J.D., Lagueux J., D'Amours D., Chaudhry M.A., Weinfeld M., Lees-Miller S.P., Poirier G.G. (1999) Relative affinities of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-dependent protein kinase for DNA strand interruptions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1430**, 119–126.
28. Pion E., Bombarda E., Stiegler P., Ullmann G.M., Mély Y., de Murcia G., Gérard D. (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dimerizes at a 5' recessed DNA end *in vitro*: a fluorescence study. *Biochemistry.* **42**, 12409–12417.
29. Lonskaya I., Potaman V.N., Shlyakhtenko L.S., Ousatcheva E.A., Lyubchenko Y.L., Soldatenkov V.A. (2005) Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *J. Biol. Chem.* **280**, 17076–17083.
30. Eustermann S., Videler H., Yang J.C., Cole P.T., Gruszka D., Veprintsev D., Neuhaus D. (2011) The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger. *J. Mol. Biol.* **407**, 149–170.
31. Langelier M.F., Planck J.L., Roy S., Pascal J.M. (2011) Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity. *J. Biol. Chem.* **286**, 10690–10701.
32. Langelier M.F., Planck J.L., Roy S., Pascal J.M. (2012) Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1. *Science.* **336**, 728–732.
33. Singatulina A.S., Hamon L., Sukhanova M.V., Desforges B., Joshi V., Bouhss A., Lavrik O.I., Pastre D. (2019) PARP-1 activation directs FUS to DNA damage sites to form PARG-reversible compartments enriched in damaged DNA. *Cell Rep.* **27**, 1809–1821.e5.
34. Chen Q., Kassab M.A., Dantzer F., Yu X. (2018) PARP2 mediates branched poly ADP-ribosylation in response to DNA damage. *Nat. Commun.* **9**, 3233–3246.
35. Steffen J.D., McCauley M.M., Pascal J.M. (2016) Fluorescent sensors of PARP-1 structural dynamics and allosteric regulation in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **44**, 9771–9783.
36. Langelier M.F., Pascal J.M. (2013) PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 134–143.
37. Steffen J.D., Tholey R.M., Langelier M.F., Planck J.L., Schiewer M.J., Lal S., Bildzukewicz N.A., Yeo C.J., Knudsen K.E., Brody J.R., Pascal J.M. (2014) Targeting PARP-1 allosteric regulation offers therapeutic potential against cancer. *Cancer Res.* **74**, 31–37.
38. Dawicki-McKenna J.M., Langelier M.F., DeNizio J.E., Riccio A.A., Cao C.D., Karch K.R., McCauley M., Steffen J.D., Black B.E., Pascal J.M. (2015) PARP-1 activation requires local unfolding of an autoinhibitory domain. *Mol. Cell.* **60**, 755–768.
39. Thomas C., Ji Y., Wu C., Datz H., Boyle C., MacLeod B., Patel S., Ampofo M., Currie M., Harbin J., Pechenkina K., Lodhi N., Johnson S.J., Tulin A.V. (2019) Hit and run versus long-term activation of PARP-1 by its different domains fine-tunes nuclear processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **116**, 9941–9946.
40. Mortusewicz O., Ame J.C., Schreiber V., Leonhardt H. (2007) Feedback-regulated poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7665–7675.
41. Rudolph J., Mahadevan J., Dyer P., Luger K. (2018) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 searches DNA via a 'monkey bar' mechanism. *Elife.* **7**, e37818–e37841.
42. Mirny L., Slutsky M., Wunderlich Z., Tafvizi A., Leith J., Kosmrlj A. (2009) How a protein searches for its site on DNA: the mechanism of facilitated diffusion. *J. Phys. A: Math. Theor.* **42**, 434013–434023.
43. Rudolph J., Mahadevan J., Luger K. (2020) Probing the conformational changes associated with DNA binding to PARP1. *Biochemistry.* **59**, 2003–2011.
44. Kotova E., Lodhi N., Jarnik M., Pinnola A.D., Ji Y., Tulin A.V. (2011) *Drosophila* histone H2A variant (H2Av) controls poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) activation in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 6205–6210.
45. Rudolph J., Muthurajan U.M., Palacio M., Mahadevan J., Roberts G., Erbse A.H., Dyer P.N., Luger K. (2021) The BRCT domain of PARP1 binds intact DNA and mediates intrastrand transfer. *Mol. Cell.* **81**, 4994–5006.e5.

46. Kotova E.Y., Hsieh F.K., Chang H.W., Maluchenko N.V., Langelier M.F., Pascal J.M., Luse D.S., Feofanov A.V., Studitsky V.M. (2022) Human PARP1 facilitates transcription through a nucleosome and histone displacement by Pol II *in vitro*. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 7107–7122.
47. Maluchenko N.V., Nilov D.K., Pushkarev S.V., Kotova E.Y., Gerasimova N.S., Kirpichnikov M.P., Langelier M.F., Pascal J.M., Akhtar M.S., Feofanov A.V., Studitsky V.M. (2021) Mechanisms of nucleosome reorganization by PARP1. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12127–12144.
48. Li X., Erden O., Li L., Ye Q., Wilson A., Du W. (2014) Binding to WGR domain by salidroside activates PARP1 and protects hematopoietic stem cells from oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 1853–1865.
49. Obaji E., Haikarainen T., Lehtio L. (2016) Characterization of the DNA dependent activation of human ARTD2/PARP2. *Sci. Rep.* **6**, 34487–34500.
50. Riccio A.A., Cingolani G., Pascal J.M. (2016) PARP-2 domain requirements for DNA damage-dependent activation and localization to sites of DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1691–1702.
51. Obaji E., Haikarainen T., Lehtio L. (2018) Structural basis for DNA break recognition by ARTD2/PARP2. *Nucleic Acids Res.* **46**, 12154–12165.
52. Gaullier G., Roberts G., Muthurajan U.M., Bowerman S., Rudolph J., Mahadevan J., Jha A., Rae P.S., Luger K. (2020) Bridging of nucleosome-proximal DNA double-strand breaks by PARP2 enhances its interaction with HPF1. *PLoS One*. **15**, e0240932–e0240961.
53. Bilokapic S., Suskiewicz M.J., Ahel I., Halic M. (2020) Bridging of DNA breaks activates PARP2-HPF1 to modify chromatin. *Nature*. **585**, 609–613.
54. Lin X., Jiang W., Rudolph J., Lee B.J., Luger K., Zha S. (2022) PARP inhibitors trap PARP2 and alter the mode of recruitment of PARP2 at DNA damage sites. *Nucleic Acids Res.* **50**, 3958–3973.
55. Shao Z., Lee B.J., Rouleau-Turcotte E., Langelier M.F., Lin X., Estes V.M., Pascal J.M., Zha S. (2020) Clinical PARP inhibitors do not abrogate PARP1 exchange at DNA damage sites *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* **48**, 9694–9709.
56. Galindo-Campos M.A., Lutfi N., Bonnin S., Martinez C., Velasco-Hernandez T., Garcia-Hernandez V., Martin-Caballero J., Ampurdanes C., Gimeno R., Colomo L., Roue G., Guilbaud G., Dantzer F., Navarro P., Murga M., Fernandez-Capetillo O., Bigas A., Menendez P., Sale J.E., Yelamos J. (2022) Distinct roles for PARP-1 and PARP-2 in c-Myc-driven B-cell lymphoma in mice. *Blood*. **139**, 228–239.

The Role of the WGR Domain in the Functions of PARP1 and PARP2

N. V. Maluchenko^{1, *, **}, A. N. Korovina¹, A. A. Saulina¹, V. M. Studitsky^{1, 2}, and A. V. Feofanov^{1, 3}

¹*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

²*Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA 19111-2497 USA*

³*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

*e-mail: mal_nat@mail.ru

**e-mail: malyuchenkov@my.msu.ru

PARP1 and PARP2 proteins are members of the poly(ADP-ribose) polymerase family involved in the regulation of DNA repair and replication, RNA processing, ribosome biogenesis, transcription, and cell division and death. PARP1 and PARP2 are promising targets for the development of anticancer and can be used in treatment of cardiovascular and neurodegenerative diseases, as well as other disorders. WGR domain was shown to play a central role in functioning of PARP1 and PARP2 proteins. This review considers the mechanisms of functioning of WGR domains in PARP1 and PARP2 proteins, which have a number of similar and specialized properties. Understanding these processes is of great interest for fundamental science and will contribute to the development of more effective and selective inhibitors of PARP1 and PARP2.

Keywords: PARP1, PARP2, WGR, PARP1 inhibitors, PARP2 inhibitors

**ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА**

УДК 575.174

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МУТАЦИОННЫХ СПЕКТРОВ
МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОМОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ ЧЕЛОВЕКА**

© 2023 г. Б. А. Малярчук*

*Институт биологических проблем Севера Дальневосточного отделения Российской академии наук,
Магадан, 685000 Россия***e-mail: malyarchuk@ibpn.ru*

Поступила в редакцию 09.03.2023 г.

После доработки 24.03.2023 г.

Принята к публикации 30.03.2023 г.

Проанализирована изменчивость нуклеотидных последовательностей целых митохондриальных геномов (мтДНК), реконструированы мутационные спектры (по L-цепи мтДНК) в четырех региональных группах коренного населения, представляющего Северо-Восточную и Южную Сибирь, Западную Азию и Америку. Обнаружено, что во всех группах преобладают пиримидиновые транзиции и среди них — замены Т→С. Вторыми по частоте во всех региональных группах (кроме Северо-Восточной Сибири) идут замены А→Г. Из трансверсий во всех исследованных группах населения преобладают замены С→А. Не обнаружены межрегиональные различия в распределении нуклеотидных замен в спектрах мутаций мтДНК. Однако у коренного населения Северо-Восточной Сибири выявлено существенное (4-кратное) снижение числа мутаций в митохондриальных генофондах в сравнении с остальными регионами. Это может быть связано с усилением в условиях Крайнего Севера действия отрицательного отбора на мтДНК, препятствующего накоплению новых мутаций, и дрейфа генов, более всего выраженного в изолированных и малочисленных популяциях Северо-Восточной Сибири. Из-за отсутствия межрегиональных различий в спектрах мутаций мтДНК полученные результаты не позволяют подтвердить гипотезу о том, что частота замены Т→С является молекулярным маркером уровня окислительного стресса в митохондриях (по меньшей мере, для генеративных мутаций).

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, мутационный спектр, естественный отбор, популяции человека

DOI: 10.31857/S0026898423050117, **EDN:** EJCRRFG

ВВЕДЕНИЕ

Митохондриальная ДНК (мтДНК) человека наследуется по материнской линии без рекомбинаций и обладает более высокой в сравнении с ядерным геномом скоростью накопления мутаций [1, 2]. Так, согласно современным данным, скорость накопления мутаций в митохондриальном геноме человека составляет 1.6×10^{-8} замен на нуклеотидную позицию в год [3], а в ядерном геноме человека — 0.6×10^{-9} замен на нуклеотидную позицию в год [4]. Мутационный спектр мтДНК (т.е. распределение нуклеотидных замен) характеризуется выраженным сдвигом в сторону транзиций. Преобладание транзиций над трансверсиями наблюдается также и в мутационных спектрах бактериальной и ядерной ДНК [5], однако в случае митохондриальных геномов оно выражено в более значительной степени (до 20 : 1, например, у человека [6–8]). Кроме того, анализ мутационных спектров, реконструированных по L-цепи мтДНК человека, позволил обнаружить

существенное преобладание пиримидиновых транзиций над пуриновыми, хотя максимальное мутационное давление с учетом гомоплазии мутаций испытывают G-нуклеотиды (с заменами G→A) [6–9].

Результаты исследований изменчивости мтДНК в популяциях человека свидетельствуют о достаточно высокой консервативности митохондриального генома, что обусловлено большой важностью этой генетической системы, обеспечивающей работу дыхательной цепи митохондрий. Тем не менее, в ряде работ отмечено, что между региональными группами населения могут существовать различия в распределении вариантов мтДНК, связанные с адаптацией популяций к различным условиям природной среды [10–13]. Особое внимание уделялось арктическим популяциям человека, поскольку у жителей высоких широт выше скорость метаболизма и работа системы окислительного фосфорилирования митохондрий направлена в большей степени на произ-

водство тепла, что может отразиться на структуре мутационных спектров мтДНК [11, 14, 15]. Однако результаты проведенных исследований довольно противоречивы, особенно в отношении распределения вариантов полиморфизма и связанных с ними гаплогрупп мтДНК у населения различных климатических зон [7, 10, 12, 16, 17]. Необходимо отметить, что выполненные ранее реконструкции мутационных спектров митохондриальных геномов проведены в выборках смешанного этногеографического происхождения [6–8] и поэтому до сих пор неизвестно, имеются ли различия между спектрами мутаций мтДНК в различных региональных группах населения. Целью настоящей работы является, таким образом, проведение сравнительного анализа мутационных спектров мтДНК у коренного населения Северо-Восточной и Южной Сибири, у населения Западной Азии и индейцев Америки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Проанализированы представленные в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) данные об изменчивости целых митохондриальных геномов у коренного населения северо-восточной части Сибири, представленного эскимосами, алеутами, чукчами, коряками и юкагирами ($N = 336$), южной части Сибири и прилегающих территорий Северо-Восточного Китая, представленного бурятами, баргутами и хамниганами ($N = 430$), населения Западной Азии, представленного персами, кашкайцами и ливанцами ($N = 340$), а также у представителей различных племен индейцев Америки ($N = 377$). Американские индейцы представлены населением Северной и Южной Америки (152 и 225 человек соответственно), однако в настоящей работе они рассматриваются как единая группа, поскольку имеют единое “берингийское” происхождение [18], а для целей исследования представлял интерес спектр мутаций, сформировавшийся в результате долговременного увеличения разнообразия мтДНК индейцев в процессе заселения американских континентов.

Мутационные спектры мтДНК реконструировали относительно L-цепей предковых последовательностей, выявленных с помощью филогенетического анализа данных об изменчивости митохондриальных геномов. Для этого использовали метод максимальной экономии, реализованный в пакете компьютерных программ mtPhyl v4.015 (<https://sites.google.com/site/mtphyl/home>). Нуклеотидный состав L-цепи мтДНК человека (согласно кембриджской референсной последовательности rCRS [19]) следующий: А – 30.9%, Т – 24.7%, С – 31.3%, G – 13.1%.

За основу в работе использована филогенетическая классификация вариантов полиморфизма мтДНК (гаплогрупп и их подгрупп), предложен-

ная разработчиками ресурса PhyloTree (www.phylo-tree.org). Это позволяет проследить мутационные изменения в направлении от предка к потомку и реконструировать тем самым спектры мутаций мтДНК для анализируемых наборов митогеномов. Построения филогенетических деревьев митогеномов проводили отдельно для каждой группы населения. Статистическую значимость различий между частотами нуклеотидных замен в популяциях оценивали с помощью точного теста Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа мутационных спектров митохондриальных геномов показали примерно одинаковую распространенность транзиций в различных региональных группах населения (табл. 1). Во всех группах преобладают пиримидиновые транзиции и среди них – замены Т→С. Следующими по частоте после Т→С во всех региональных группах, кроме Северо-Восточной Сибири, идут замены А→G. У коренного населения северо-востока Сибири вторыми по распространенности являются замены G→A. Соотношение транзиций к трансверсиям варьирует от 23.5 на юге Сибири до 28.6 у индейцев Америки. Из трансверсий во всех исследованных группах населения преобладают замены С→А (составляя, в среднем, примерно 32% от всех трансверсий), за ними следуют замены А→Т (примерно 17%). Частота трансверсий С→А несколько ниже на северо-востоке Сибири и у американских индейцев (27.3 и 23.1% соответственно), чем в популяциях Южной Сибири и Западной Азии (36.7 и 32.9% соответственно), однако эти различия статистически незначимы.

Важным представляется тот факт, что, несмотря на примерно одинаковые размеры исследованных выборок митогеномов, региональные группы различаются по количеству выявленных нуклеотидных замен. Число замен существенно (4-кратно) ниже на северо-востоке Сибири в сравнении с югом, хотя у индейцев Америки этот параметр вполне сопоставим по значению с величиной у населения Южной Сибири. Это может быть связано с особенностями истории формирования генофондов коренного населения Америки. Есть основания считать, что во время последнего ледникового максимума (примерно 15–20 тыс. лет назад) на крайнем Севере Азии и Америки (в Берингии) сохранялись группы населения, давшие начало американским индейцам [18]. Предполагается, что это были относительно небольшие группы людей (суммарно от нескольких сот до нескольких тысяч человек), хорошо адаптированных к условиям жизни в высоких широтах и в холодном климате [20]. Последующее на протяжении последних 15 тыс. лет расселение предков

Таблица 1. Мутационные спектры мтДНК у населения различных регионов мира

Нуклеотидные замены	Географический регион			
	Западная Азия (<i>N</i> = 340)	Южная Сибирь (<i>N</i> = 430)	Северо-Восточная Сибирь (<i>N</i> = 336)	Америка (индейцы) (<i>N</i> = 377)
C→T	20.3 (388)	20.2 (252)	19.0 (60)	20.1 (250)
T→C	33.8 (647)	32.3 (404)	33.5 (106)	30.1 (375)
G→A	20.4 (391)	21.1 (264)	24.4 (77)	22.5 (280)
A→G	21.5 (412)	22.3 (278)	19.6 (62)	23.9 (298)
Трансверсии	4.1 (78)	4.1 (51)	3.5 (11)	3.4 (42)
Всего замен (<i>m</i>)	1916	1249	316	1245
<i>m/N</i>	5.6	2.9	0.9	3.3

Примечание. Приведены частоты нуклеотидных замен в процентах, в скобках – число замен.

Таблица 2. Число нуклеотидных замен в стволах (с) и концевых ветвях (к) филогенетических деревьев мтДНК в различных региональных группах населения

Регион	Транзиции			Трансверсии			Соотношение к/с
	с	к	с + к	с	к	с + к	
Западная Азия (<i>N</i> = 340)	805	1033	1838	41	37	78	1.3
Южная Сибирь (<i>N</i> = 430)	571	627	1198	19	32	51	1.1
Северо-Восточная Сибирь (<i>N</i> = 336)	121	184	305	4	7	11	1.5
Америка (индейцы) (<i>N</i> = 377)	317	886	1203	9	33	42	2.9

индейцев по территориям Америки привело к увеличению разнообразия генетических линий, что и наблюдается при анализе изменчивости мтДНК.

Необходимо отметить, что независимое развитие митохондриальных генофондов популяций на американских континентах не привело к существенным изменениям структуры спектра мутаций мтДНК в сравнении со структурой в популяциях Евразии (табл. 1). Однако если рассмотреть распределение нуклеотидных замен на филогенетическом дереве, учитывая мутации отдельно в стволах и отдельно в концевых ветвях, то видно, что у американских индейцев восстановление генетического разнообразия произошло за счет возникновения множества ответвлений от относительно небольшого числа гаплогрупп-основательниц митохондриальных генофондов (табл. 2). Соотношение числа нуклеотидных замен в стволах и концевых ветвях филогенетического дерева у американских индейцев примерно в 2 раза выше, чем в остальных региональных группах населения.

Результаты анализа мутационных спектров L-цепи мтДНК показали, что в разных региональных группах населения наиболее распространены транзиции T→C. Частоты других типов замен также примерно одинаковы в разных популяционных группах. Ранее предполагалось, что

транзиции T→C (или A→G, если вести учет по H-цепи) более всего чувствительны к уровню аэробного метаболизма и всем его последствиям [21]. Это может быть связано с интенсивностью гидролитического дезаминирования аденина в одноцепочечных участках H-цепи на стадии репликации мтДНК [22]. И, таким образом, можно ожидать, что спектры мутаций мтДНК у представителей разных региональных групп населения будут различаться вследствие межрегиональных различий в процессах аэробного метаболизма и уровня окислительного стресса в митохондриях [11, 14, 15]. Однако сходство в распределении частот транзиций T→C в различных региональных группах (особенно на северо-востоке и юге Сибири) свидетельствует о том, что частота замены T→C не может быть маркером уровня окислительного стресса в митохондриях.

Низкая частота трансверсий в спектрах мтДНК, которые, однако, ожидаются с высокой частотой вследствие окислительно-восстановительных реакций в митохондриях, позволяет считать, что митохондриальная ДНК-полимераза γ не может “пройти” участки, содержащие окисленные основания, поэтому такие молекулы мтДНК просто выбраковываются в процессе репликации. Тем не менее, как показала настоящая работа, в спектрах трансверсий наиболее распространены замены

C → A (или G → T по H-цепи), которые составляют примерно 32% от всех трансверсий (или примерно 1.1% от всех выявленных нуклеотидных замен). Это именно тот тип замен, который ожидается в тех случаях, когда гуанин в C:G-парах окисляется до 8-оксигуанина [23]. Таким образом, частота трансверсий C → A (по L-цепи) теоретически может служить маркером интенсивности окислительного стресса, однако различия в частоте замен C → A между региональными группами населения также статистически незначимы. Все это заставляет усомниться в справедливости идеи о том, что в спектрах генеративных мутаций мтДНК могут отражаться адаптивные процессы, связанные с расселением популяций человека в различных климатических условиях. Возможно, такого рода гипотезы справедливы по отношению к соматическим мутациям мтДНК, особенно при исследовании биологических тканей с различным уровнем гипоксии или в процессе старения [21]. Аналогичным образом изменилось отношение к гипотезе о связи между популяционным распределением гаплогрупп мтДНК и климатом [10, 11]. Эта гипотеза первоначально была воспринята с энтузиазмом, поскольку митохондрии (и мтДНК) являются важнейшим элементом биоэнергетики и термогенеза и должны быть вовлечены в адаптивные процессы, однако подтверждений этой гипотезы довольно мало [7, 12, 16, 17, 24].

Интересным представляется выявленное в настоящей работе существенное снижение числа мутаций в митохондриальных геномах коренного населения Северо-Восточной Сибири (при том, что структура спектра мутаций сохраняется). Это может быть связано с усилением действия отрицательного отбора на мтДНК, препятствующего накоплению новых мутаций в условиях Крайнего Севера, а также с дрейфом генов, проявления которого более всего выражены в изолированных и малочисленных популяциях, таких как популяции коренных народов Северо-Восточной Сибири [25].

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00264, <https://rscf.ru/project/22-24-00264/>).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brown W.M., George M., Wilson A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**, 1967–1971.
2. Giles R.E., Blanc H., Cann H.M., Wallace D.C. (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **77**, 6715–6719. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6715>
3. Soares P., Ermini L., Thomson N., Mormina M., Rito T., Rohl A., Salas A., Oppenheimer S., Macaulay V., Richards M.B. (2009) Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 740–759. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.05.001>
4. Lipson M., Loh P.-R., Sankararaman S., Patterson N., Berger B., Reich D. (2015) Calibrating the human mutation rate via ancestral recombination density in diploid genomes. *PLoS Genet.* **11**, e1005550. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005550>
5. Jukes T.H. (1980) Silent nucleotide substitutions and the molecular evolutionary clock. *Science*. **210**, 973–978.
6. Мальярчук Б.А. (2005) Анализ распределения нуклеотидных замен в генах митохондриальной ДНК человека. *Генетика*. **41**, 93–99.
7. Kivisild T., Shen P., Wall D.P., Do B., Sung R., Davis K., Passarino G., Underhill P.A., Scharfe C., Torroni A., Scozzari R., Modiano D., Coppa A., de Knijff P., Feldman M., Cavalli-Sforza L.L., Oefner P.J. (2006) The role of selection in the evolution of human mitochondrial genomes. *Genetics*. **172**, 373–387. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.043901>
8. Pereira L., Freitas F., Fernandes V., Pereira J.B., Costa M.D., Costa S., Máximo V., Macaulay V., Rocha R., Samuels D.C. (2009) The diversity present in 5140 human mitochondrial genomes. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 628–640. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.04.013>
9. Samuels D.C., Boys R.J., Henderson D.A., Chinnery P.F. (2003) A compositional segmentation of the human mitochondrial genome is related to heterogeneities in the guanine mutation rate. *Nucl. Acids Res.* **31**, 6043–6052. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg784>
10. Mishmar D., Ruiz-Pesini E., Golik P., Macaulay V., Clark A.G., Hosseini S., Brandon M., Easley K., Chen E., Brown M.D., Sukernik R.I., Olckers A., Wallace D.C. (2003) Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 171–176. <https://doi.org/10.1073/pnas.0136972100>
11. Ruiz-Pesini E., Mishmar D., Brandon M., Procaccio V., Wallace D.C. (2004) Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science*. **303**, 223–226. <https://doi.org/10.1126/science.1088434>
12. Ingman M., Gyllenstein U. (2007) Rate variation between mitochondrial domains and adaptive evolution in humans. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2281–2287. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm180>
13. Balloux F., Lawson Handley L.-J., Jombart T., Liu H., Manica A. (2009) Climate shaped the worldwide distribution of human mitochondrial DNA sequence variation. *Proc. R. Soc. B*. **276**, 3447–3455. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0752>
14. Brand M.D. (2000) Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp. Gerontol.* **35**, 811–820. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(00\)00135-2](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(00)00135-2)

15. Leonard W.R., Snodgrass J.J., Sorensen M.V. (2005) Metabolic adaptation in indigenous Siberian populations. *Annu. Rev. Anthropol.* **34**, 451–471
<https://doi.org/10.1146/annurev.anthro.34.081804.120558>
16. Elson J.L., Turnbull D.M., Howell N. (2004) Comparative genomics and the evolution of human mitochondrial DNA: assessing the effects of selection. *Am. J. Hum. Genet.* **74**, 229–238.
<https://doi.org/10.1086/381505>
17. Sun C., Kong Q.-P., Zhang Y.-P. (2007) The role of climate in human mitochondrial DNA evolution: a reappraisal. *Genomics.* **89**, 338–342.
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.11.005>
18. Hoffecker J.F., Elias S.A., Scott G.R., O'Rourke D.H., Hlusko L.J., Potapova O., Pitulko V., Pavlova E., Bourgeon L., Vachula R.S. (2023) Beringia and the peopling of the Western Hemisphere. *Proc. R. Soc. B.* **290**, 20222246.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2022.2246>
19. Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F., Lightowlers R.N., Turnbull D.M., Howell N. (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* **23**, 147.
<https://doi.org/10.1038/13779>
20. Fagundes N.J.R., Tagliani-Ribeiro A., Rubicz R., Tarskaia L., Crawford M.H., Salzano F.M., Bonatto S.L. (2018) How strong was the bottleneck associated to the peopling of the Americas? New insights from multilocus sequence data. *Genet. Mol. Biol.* **41**(suppl. 1), 206–214.
<https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0087>
21. Mikhailova A.G., Mikhailova A.A., Ushakova K., Tretyakov E.O., Iliushchenko D., Shamansky V., Lobanova V., Kozenkov I., Efimenko B., Yurchenko A.A., Kozenkova E., Zdobnov E.M., Makeev V., Yurov V., Tanaka M., Gostimskaya I., Fleischmann Z., Annis S., Franco M., Wasko K., Denisov S., Kunz W.S., Knorre D., Mazunin I., Nikolaev S., Fellay J., Reymond A., Khrapko K., Gunbin K., Popadin K. (2022) A mitochondria-specific mutational signature of aging: increased rate of A > G substitutions on the heavy strand. *Nucl. Acids Res.* **50**, 10264–10277.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac779>
22. Корниенко И.В., Малярчук Б.А. (2005) Анализ механизмов возникновения мутаций в митохондриальной ДНК человека. *Молекуляр. биология.* **39**, 869–877.
23. Richter C., Park J.-W., Ames B.N. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 6465–6467.
24. Деренко М.В., Малярчук Б.А. (2010) *Молекулярная филогенетика населения Северной Евразии по данным об изменчивости митохондриальной ДНК*. Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 376 с.
25. Clemente F.J., Cardona A., Inchley C.E., Peter B.M., Jacobs G., Pagani L., Lawson D.J., Antão T., Vicente M., Mitt M., DeGiorgio M., Faltyskova Z., Xue Y., Ayub Q., Szpak M., Mägi R., Eriksson A., Manica A., Raghavan M., Rasmussen M., Rasmussen S., Willerslev E., Vidal-Puig A., Tyler-Smith C., Vilems R., Nielsen R., Metspalu M., Malyarchuk B., Derenko M., Kivisild T. (2014) A selective sweep on a deleterious mutation in CPT1A in Arctic populations. *Am. J. Hum. Genet.* **95**, 584–589.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.09.016>

Comparative Analysis of Mitochondrial Genome Mutation Spectra in Human Populations

B. A. Malyarchuk*

Institute of Biological Problems of the North, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Magadan, 685000 Russia

*e-mail: malyarchuk@ibpn.ru

Nucleotide sequence variability of whole mitochondrial genomes (mtDNA) was analyzed and mutation spectra were reconstructed (by L-chain of mtDNA) in four regional groups of indigenous populations representing Northeastern and Southern Siberia, Western Asia, and the Americas. The pyrimidine transitions were found to be predominant in all groups, and of these, the substitutions T→C were most frequent. The second most common in all regional groups (except Northeastern Siberia) are substitutions A→G. Of the transversions, in all the populations studied the substitutions C→A prevail. Between-regional differences in the distribution of nucleotide substitutions in mtDNA mutation spectra were not detected. However, a significant (4-fold) decrease in the number of mutations in mitochondrial gene pools was detected in the indigenous population of Northeastern Siberia compared to other regions. This may be due to the increased effect of negative selection on mtDNA in the Far North environment, which prevents the accumulation of new mutations, and gene drift, which is most pronounced in isolated and small populations of Northeastern Siberia. Because of the lack of between-regional differences in mtDNA mutation spectra, the results obtained do not allow us to confirm the hypothesis that the T→C substitution frequency appears to be a molecular marker of the level of oxidative stress in mitochondria (at least for generative mutations).

Keywords: mitochondrial DNA, mutation spectrum, natural selection, human populations

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 578.856.2

АНАЛИЗ ПОЛНЫХ ГЕНОМОВ ВИРУСА АСПЕРМИИ ТОМАТА
УКАЗЫВАЕТ НА РЕАССОРТАЦИЮ В РОССИЙСКИХ ИЗОЛЯТАХ
ВИРУСА ИЗ ХРИЗАНТЕМЫ

© 2023 г. А. А. Шевелева^а, Г. С. Краснов^б, А. В. Кудрявцева^б, А. В. Снежкина^б,
Е. В. Булавкина^б, С. Н. Чирков^{а, с, *}

^аБиологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119234 Россия

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

^сКурчатовский геномный центр — Никитский ботанический сад — Национальный научный центр
Российской академии наук, Ялта, 298648 Россия

*e-mail: s-chirkov1@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.02.2023 г.

После доработки 05.04.2023 г.

Принята к публикации 13.04.2023 г.

Вирус аспермии томата (tomato aspermy virus, TAV, род *Cuscutovirus*, семейство Bromoviridae) — один из самых распространенных и вредоносных вирусов хризантемы, вызывающий деформацию, измельчание и обесцвечивание соцветий. Метатранскриптомное секвенирование растений хризантемы сортов Ribonette и Golden Standard из коллекции Никитского ботанического сада (Ялта, Республика Крым) выявило присутствие нуклеотидных последовательностей вирусов, родственных TAV. На основе этих данных впервые собраны полные геномы двух российских изолятов этого вируса. Сегментированный геном этих вирусов представлен тремя молекулами одноцепочечной линейной РНК положительной полярности длиной 3412 (РНК1), 3097 (РНК2) и 2219 (РНК3) нуклеотидов, что типично для кукумовирусов. Идентифицированы пять открытых рамок считывания (ORF), которые кодируют репликазу (ORF1), РНК-зависимую РНК-полимеразу (ORF2a), белок-супрессор сайленсинга (ORF2b), транспортный белок (ORF3a) и белок оболочки вируса (ORF3b). Идентичность геномов TAV, выделенных из двух сортов хризантемы, составила 99.8% для всех трех вирусных РНК, а с другими изолятами TAV из Genbank — 97.5–99.7 (РНК1), 93.8–99.8 (РНК2) и 89.3–99.3% (РНК3). Филогенетический анализ показал, что РНК1 и РНК3 российских изолятов вируса входят в гетерогенные группы изолятов TAV, обнаруженных на различных видах растений в разных регионах мира. В то же время, РНК2 четко кластеризуется с томатными изолятами SKO20ST2 из Словении и PV-0220 из Болгарии и, в меньшей степени, с иранским изолятом Ker.Mah.P из растений петунии и китайским изолятом Непан из растений хризантемы. Различный порядок ветвления филогенетических деревьев, реконструированных по разным сегментам вирусного генома, указывает на псевдорекомбинацию (реассортацию) в российских изолятах TAV.

Ключевые слова: вирусы растений, вирус аспермии томата, хризантема, высокопроизводительное секвенирование, реассортация

DOI: 10.31857/S0026898423050166, **EDN:** EIBXVH

ВВЕДЕНИЕ

Хризантема (*Chrysanthemum* spp., семейство Asteraceae) — одно из самых популярных цветочно-декоративных растений во всем мире. Вирусные и виroidные болезни существенно снижают декоративные свойства растений и качество вегетативно размножаемого материала [1–3]. Из примерно трех десятков вирусов и виroidов, обнаруженных в растениях хризантемы, вирус аспермии томата является одним из самых распространенных и вредоносных, вызывая деформацию, измельчание и обесцвечивание соцветий [4, 5].

Вирус аспермии томата (tomato aspermy virus, TAV) принадлежит к роду *Cuscutovirus* из семейства Bromoviridae. Род *Cuscutovirus* включает четыре вида: собственно TAV, а также вирус огуречной мозаики (cucumber mosaic virus, CMV), вирус карликовости арахиса (peanut stunt virus, PSV) и вирус мягкой крапчатости лиатриса (gayfeather mild mottle virus, GfMMV) [6]. Как у всех представителей этого рода, геном TAV сегментирован и состоит из трех молекул одноцепочечной линейной РНК положительной полярности, каждая из которых упакована в отдельные вирусные части-

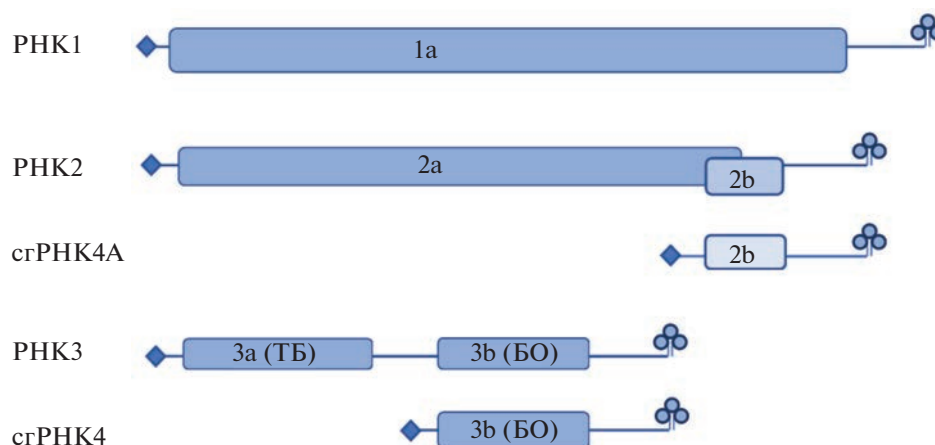


Рис. 1. Схема генома вируса аспермии томата. Прямоугольниками показаны открытые рамки считывания 1a, 2a, 2b, 3a и 3b, а тонкой линией — нетранслируемые участки генома. ТБ — транспортный белок. БО — белок оболочки. сгPHK — субгеномная PHK. — тРНК-подобная структура, — кеп.

цы диаметром 28 нм. 5'-концы PHK кепированы, а 3'-концевые последовательности организованы в тРНК-подобную структуру. Пять открытых рамок считывания (open reading frame, ORF) кодируют репликазу (ORF1), PHK-зависимую PHK-полимеразу (ORF2a), полифункциональный белок 2b (ORF2b), транспортный белок (ТБ) (ORF3a) и белок оболочки (БО) вируса (ORF3b) (рис. 1). Репликаза и PHK-зависимая PHK-полимераза обеспечивают репликацию вирусного генома. Белок 2b является репрессором сайленсинга, а также играет важную роль в системном транспорте вируса, индукции симптомов и патогенезе вирусной инфекции. ТБ обеспечивает межклеточный транспорт вируса, а БО — инкапсидацию вирусного генома, перенос вируса тлями и его распространение по растению. ORF1, ORF2a и ORF3a транслируются с геномной PHK, а ORF3b и ORF2b — с субгеномных PHK4 и PHK4A соответственно [7].

TAV распространен повсеместно. Основными природными хозяевами являются растения хризантемы и томата. Вирус встречается также в растениях петунии, гладиолуса, настурции, циннии, канны, лилии и перца [8, 9]. Круг экспериментальных хозяев этого вируса значительно шире, он включает более 100 видов двудольных и однодольных растений из 27 семейств. TAV распространяется при вегетативном размножении зараженных растений и непersistентным образом тлями [10].

В России TAV впервые был обнаружен на хризантеме *Ch. indicum* в Приморском крае [11]. Геном дальневосточного изолята вируса не изучен. Несколько новых российских изолятов TAV выявлены в Никитском ботаническом саду (НБС) на трех сортах хризантемы местной селекции [12]. Гены БО TAV из сортов Симфония, Юность и ги-

брида 7-15 оказались полностью идентичными между собой, а также БО венгерского изолята P-TAV (L15335) из перца [9] и австралийского изолята V-TAV (AJ277268) из хризантемы [13].

Кроме того, при метатранскриптомном анализе растений интродуцированных сортов Ribonette и Golden Standard хризантемы из коллекции НБС получены прочтения, родственные карлавирусам хризантемному вирусу В (chrysanthemum virus В) и хризантемному вирусу R (chrysanthemum virus R), а также TAV. Полноразмерные геномы обоих карлавирусов собраны и охарактеризованы ранее [14]. Целью данной работы была сборка и анализ полных геномов двух изолятов TAV.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования. Листья хризантемы (*Ch. morifolium* Ramat.) сортов Ribonette и Golden Standard с симптомами предполагаемой вирусной инфекции собирали в генофондовой коллекции хризантемы Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН (НБС), Ялта, Республика Крым, в 2018–2019 годах.

ОТ-ПЦР. Суммарную PHK выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (“Qiagen”, Германия). Первую нить кДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы MMLV и рассеянной затравки в виде случайных гексамеров (“Евроген”, Россия). Для выявления TAV в растительном материале использовали ОТ-ПЦР. Ген БО TAV амплифицировали с помощью прямых и обратного вирусспецифических праймеров (5'-ATGGCCCAAAACGGTACGGGAGGAG-3' и 5'-TCACACCGGGAGCGTTGAAGCGGAA-3' соответственно) [15], используя ДНК-полимеразу Epcyclo (“Евроген”) и 35 циклов ПЦР (денатура-

ция — 94°C, 30 с; отжиг — 52°C, 30 с; элонгация — 72°C, 1 мин) с окончательной достройкой при 72°C в течение 10 мин. В качестве положительно-го контроля использовали изолят TAV из растений хризантемы сорта Юность. Отрицательным контролем служил образец хризантемы сорта Сказка, не зараженный этим вирусом [12]. Ампликоны разделяли электрофорезом в 1× TAE-буфере (“Thermo Scientific”, США) в присутствии бромистого этидия и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью гель-документирующей системы Multi-Doc-It (UVP, Великобритания). В качестве маркера размера продуктов ПЦР использовали препарат 100+ bp DNA ladder (“Евроген”). Продукты ПЦР секвенировали с прямого и обратного праймеров в фирме “Евроген”.

Высокопроизводительное секвенирование (HTS). Библиотеки кДНК для секвенирования геномов TAV получали на матрице полиаденилированной РНК, выделенной из листьев хризантемы сортов Ribonette и Golden Standard с помощью набора K0600 (“Силекс”, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Библиотеки синтезировали с помощью набора TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (“Illumina”, США) и секвенировали на платформе Illumina MiSeq в Центре коллективного пользования “Геном” Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН. Полученные парноконцевые прочтения длиной 150 нуклеотидов обрезали и фильтровали с помощью Trimmomatic v.0.39 [16]. Контиги собирали *de novo* с помощью программы Trinity 2.11, используя настройки по умолчанию [17]. Вирусные контиги идентифицировали путем картирования всех собранных контигов на базу полноразмерных вирусных геномов из GenBank (https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genbank/viral/assembly_summary.txt, всего около 50000 геномов) при помощи локальной версии BLASTn 2.13. Полученные прочтения картировали на контиги TAV, собранные в образце Rib, с помощью программы BWA [18]. Поиск точечных замен и коротких инделей в прочтениях осуществляли при помощи программы freeBayes [19]. Прочтения ряда близкородственных изолятов TAV, доступных в GenBank, моделировали путем многократной случайной “нарезки” их геномов на фрагменты длиной 150 нуклеотидов с помощью программы wgsim [20]. С этой целью были выбраны изоляты PV-0220 и SKO20ST2, которые имели высокую гомологию с российскими изолятами Rib и GS по всем геномным РНК (99.5–99.8% идентичности), и PV-0068, идентичный на 99.5–99.8% по РНК1 и РНК3 и на 95.6% по РНК2.

Анализ последовательностей. Последовательности, наиболее близкие к собранным геномам TAV, выявляли с помощью веб-версии BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) на нуклеотидной коллекции NCBI. Множественные вы-

равнивания нуклеотидных и аминокислотных (aa) последовательностей, определение степени их идентичности и филогенетический анализ выполняли в MEGA7 [21]. Филогенетические деревья реконструировали методом присоединения соседей (neighbor joining). ORF в вирусных геномах идентифицировали с помощью программы ORF finder (<https://ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>). Консервативные домены в вирусных белках локализовали посредством поиска по базе Conserved Domain Database (CDD, <https://ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Для поиска событий рекомбинации использовали программу RDP4.46 [22] с настройками по умолчанию, за тем исключением, что была выбрана опция “sequences are linear”.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диагностика TAV с помощью ОТ-ПЦР

При метатранскриптомном секвенировании образцов хризантемы сортов Ribonette и Golden Standard были выявлены прочтения, родственные TAV [14]. Присутствие вируса в этих образцах подтверждали независимым методом, используя с этой целью ОТ-ПЦР с вирусспецифическими праймерами. В обоих случаях получили продукты ПЦР ожидаемого размера 657 п.н. (результаты не представлены). Последовательность гена БО изолята из сорта Golden Standard оказалась полностью идентичной БО изолятов V-TAV (AJ277268), ChJ (LC634033), PV-0312 (OL311687), Yunost (MH678705) из растений хризантемы и P-TAV (L15335) из растений перца. Ближайшими родственниками гена БО изолята TAV из сорта Ribonette (99.7% идентичности) были японские изоляты H9 (LC380674) из растений хризантемы и G1 (LC380671) из томата [23]. Таким образом, результаты ОТ-ПЦР подтвердили присутствие TAV в растениях сортов Ribonette и Golden Standard и показали высокую консервативность гена БО у изолятов TAV из различных источников.

Сборка и характеристика полноразмерных геномов TAV

В результате секвенирования образцов кДНК хризантемы сортов Ribonette и Golden Standard получено, соответственно, 12.4 и 26.6 млн парноконцевых прочтений длиной 150 п.н., из которых 0.8% (Ribonette) и 7.9% (Golden Standard) картировались на геном TAV. Из этих прочтений собраны полные геномы двух изолятов вируса, обозначенных Rib и GS сообразно названиям сортов хризантемы, в которых они были обнаружены. Длина РНК1 обоих изолятов составила 3412 нуклеотидов, РНК2 — 3097 нуклеотидов, а РНК3 — 2219 нуклеотидов, что в целом соответствует длине геномных РНК изолятов TAV, депонированных в GenBank (табл. 1). Изоляты Rib и GS оказа-

Таблица 1. Изоляты вируса аспермии томата, полногеномные последовательности которых представлены в GenBank и определены в данной работе

Изолят/ штамм	Культура/ Вид растения	Страна	Номер РНК	Длина РНК, нуклеотиды	Номер в GenBank
H9	Хризантема	Япония	РНК1	3415	LC380672
			РНК2	3097	LC380673
			РНК3	2224	LC380674
G1	Томат	Япония	РНК1	3414	LC380669
			РНК2	3070	LC380670
			РНК3	2224	LC380671
PV-0068	Томат	Нет данных	РНК1	3414	MW582782
			РНК2	3077	MW582783
			РНК3	2225	MW582784
Go34	Томат	Япония	РНК1	3413	LC380675
			РНК2	3097	LC380676
			РНК3	2222	LC380677
PV-0312	Хризантема	Германия	РНК1	3413	OL311685
			РНК2	3104	OL311686
			РНК3	2224	OL311687
KC-TAV	Хризантема	Южная Корея	РНК1	3412	AJ320273
			РНК2	3074	AJ320274
			РНК3	2222	AJ237849
ChJ	Хризантема	Япония	РНК1	3412	LC634031
			РНК2	3099	LC634032
			РНК3	2224	LC634033
pt058	Хризантема	Китай	РНК1	3412	MN841291
			РНК2	3068	MN841292
			РНК3	2416	MN841293
V-TAV	Хризантема	Австралия	РНК1	3410	D10044
			РНК2	3074	D10663
			РНК3	2389	L79972
BJ	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Китай	РНК1	3409	HQ424163
			РНК2	3023	HQ424164
			РНК3	2216	HQ424165
Henan	Хризантема	Китай	РНК1	3409	KF432413
			РНК2	3096	KF432414
			РНК3	2222	KF432415

Таблица 1. Окончание

Изолят/ штамм	Культура/ Вид растения	Страна	Номер РНК	Длина РНК, нуклеотиды	Номер в GenBank
PV-0220	Томат	Болгария	РНК1	3409	MW080947
			РНК2	3097	MW080948
			РНК3	2224	MW080949
SKO20ST2	Томат	Словения	РНК1	3409	OL472069
			РНК2	3097	OL472070
			РНК3	2332	OL472071
VRS 321	Нет данных	Канада	РНК1	3407	OK558774
			РНК2	3073	OK558776
			РНК3	2374	OK558778
Till	Нет данных	США	РНК1	3407	OK558775
			РНК2	3072	OK558777
			РНК3	2377	OK558779
Ker.Mah.P	Петуния	Иран	РНК1	3351	KT757538
			РНК2	3035	KT757537
			РНК3	2192	KT757536
GS	Хризантема	Россия	РНК1	3412	OP924357
			РНК2	3097	OP924358
			РНК3	2219	OP924359
Rib	Хризантема	Россия	РНК1	3412	OP924360
			РНК2	3097	OP924361
			РНК3	2219	OP924362

лись очень близки между собой: их РНК1, РНК2 и РНК3 идентичны на 99.8, 99.7 и 99.8% соответственно. Идентичность TAV Rib и GS с другими известными изолятами составила 97.5–99.7 (РНК1), 93.8–99.8 (РНК2) и 89.3–99.3% (РНК3). Согласно результатам BLASTn, самыми близкими к Rib и GS являются изоляты PV-0068 из растений томата и ChJ из хризантемы (РНК1), SKO20ST2 из растений томата (РНК2), а также PV-0068 из томата и ChJ из хризантемы (РНК3). Полноразмерные геномы изолятов Rib и GS депонированы в GenBank под номерами OP924357–OP924362. Следует отметить, что последовательности гена БО изолятов Rib и GS, определенные методом Сэнгера и с помощью метатранскриптомного секвенирования, оказались идентичными.

В геномах Rib и GS идентифицированы пять ORF. ORF1 расположена в РНК1 и кодирует бе-

лок 1a (вирусную репликазу) длиной 993 aa. Размер ORF1 (2982 нуклеотида) в точности соответствует длине этой ORF у других изолятов TAV, депонированных в GenBank. Домены метилтрансферазы и хеликазы находятся в позициях 49–406 и 711–975 белка 1a соответственно. ORF2a локализована в РНК2, состоит из 2487 нуклеотидов (как у всех других известных изолятов TAV) и кодирует белок 2a (РНК-зависимую РНК-полимеразу) из 828 aa. ORF1 и ORF2a изолятов Rib и GS идентичны соответствующим рамкам считывания других изолятов TAV на 98.3–99.9 и 95.6–99.8%.

ORF2b изолятов Rib и GS длиной 315 нуклеотидов также локализована в РНК2, частично перекрывается с ORF2a, находясь в другой рамке считывания, и кодирует полифункциональный белок 2b размером 104 aa. Такие размеры характерны примерно для двух третей изолятов TAV,

депонированных в GenBank. Однако у многих изолятов вируса ген этого белка значительно короче за счет протяженных (24–27 нуклеотидов) делеций в 3'-концевом участке ORF2b (MW841292, LC380670, AJ320274, D10663) или вследствие более проксимальной локализации терминирующего TGA-кодона (MW582783), или по обоим причинам (HQ424164). В целом, ORF2b TAV идентичны на 88.2–100% на нуклеотидном и 79.4–100% на аминокислотном уровнях. ORF2b изолятов Rib и GS идентичны их аналогу у других изолятов TAV на 88.9–100 и 88.2–99.1% на нуклеотидном и на 79.4–100% на аминокислотном уровнях соответственно.

ORF3a и ORF3b находятся в РНК3 и разделены нетранслируемой последовательностью длиной 295 нуклеотидов. ORF3a изолятов Rib и GS (843 нуклеотида) кодирует ТБ из 280 аа, как у большинства известных изолятов TAV. У нескольких изолятов (EU163410, EU163411, KT757536, L79972, MW582784, OL311687), выделенных из растений хризантемы, петунии и томата, ORF3a короче (741 нуклеотид) в силу того, что трансляция начинается со второго инициаторного ATG-кодона, который расположен дистальней на 102 нуклеотида от 5'-конца РНК3, чем у большинства изолятов вируса [13, 23, 24]. ORF3a TAV идентичны на 95.9–100% на нуклеотидном и 89.7–100% на аминокислотном уровнях. ORF3a изолятов Rib и GS идентичны гену ТБ других TAV на 96.5–99.9 и 96.8–100% на нуклеотидном и на 92.8–99.6 и 92.8–100% на аминокислотном уровнях соответственно.

ORF3b изолятов Rib и GS длиной 657 нуклеотидов кодирует БО размером 218 аа. Такие размеры имеют практически всех известные изоляты TAV. У изолятов BJ (HQ424165) и TAV-C (D01015) из растений хризантемы ORF3b длиннее (690 нуклеотидов) из-за того, что делеция одного нуклеотида приводит к сдвигу рамки считывания, и терминирующий TGA кодон оказывается ближе к 3'-концу РНК3, чем у других изолятов вируса. ORF3b TAV идентичны на 95.1–100% на нуклеотидном и 94.0–100% на аминокислотном уровнях. ORF3b изолятов Rib и GS идентичны гомологичному участку генома других TAV на 95.9–99.7 и 96.3–99.5% на нуклеотидном и на 96.4–100 и 96.8–100% на аминокислотном уровнях соответственно.

ORF фланкированы нетранслируемыми участками (UTR) длиной 94, 87 и 85 нуклеотидов на 5'-конце и 336, 336 и 339 нуклеотидов на 3'-конце РНК1, РНК2 и РНК3 соответственно. 3'-UTR РНК1, РНК2 и РНК3 у обоих изолятов TAV весьма консервативны: они идентичны на 96.2–98.3%, а последние 104 нуклеотида трех геномных РНК полностью идентичны. 5'-UTR РНК3 длиной 32–75 нуклеотидов состоит из повторяющихся TG-динуклеотидов. Этот участок из 42 нуклео-

тидов характерен для всех известных РНК3 TAV [13, 23].

Таким образом, по организации генома и размерам ORF российские изоляты TAV из растений хризантемы близки к большинству изолятов вируса независимо от их географической локализации и вида растения-хозяина.

Филогенетический анализ полных геномов TAV

В филогенетическом анализе (рис. 2) были использованы все изоляты TAV, полногеномные последовательности которых депонированы в GenBank и определены в данной работе (табл. 1). Показано, что РНК1 Rib и GS входит в гетерогенную группу изолятов, найденных в растениях томата и хризантемы в Японии, Южной Корее, Болгарии, Германии, США, Канаде и Австралии (рис. 2a). РНК2 изолятов Rib и GS четко кластеризуется с томатными изолятами SKO20ST2 из Словении и PV-0220 из Болгарии и, в меньшей степени, с иранским изолятом Ker.Mah.P из петунии и китайским изолятом Henaп из хризантемы (рис. 2б). Подобно РНК1, РНК3 российских изолятов TAV также входит в состав обширной группы изолятов этого вируса, обнаруженных на различных видах растений в разных регионах мира (рис. 2в).

Очевидно, что три дерева, реконструированные по последовательностям РНК1, РНК2 и РНК3, имеют разную топологию. Российские изоляты Rib и GS кластеризуются по-разному в зависимости от анализируемого сегмента генома. Различный порядок ветвления филогенетических деревьев, построенных по разным участкам вирусного генома, может указывать как на факт реассортации сегментов генома, так и на наличие рекомбинации внутри сегментов [25]. Однако анализ выравниваний РНК1, РНК2 и РНК3 изолятов TAV с помощью программы RDP4 не выявил рекомбинации в изолятах Rib и GS (данные не представлены). Не обнаружено рекомбинации и при анализе более широкого набора последовательностей, включающего, помимо TAV, полные геномы ряда изолятов других кукумовирусов: CMV, PSV и GfMMV.

Следует отметить, что деревья, построенные по РНК2 и отдельно по ORF2a и ORF2b, практически не различались между собой и были полностью идентичными по набору изолятов TAV в том кластере, в который входят Rib и GS (данные не представлены). Полученные результаты можно, вероятно, объяснить тем, что российские изоляты TAV являются псевдорекомбинантами (реассортантами), в которых РНК2, с одной стороны, и РНК1 и РНК3, с другой, происходят от разных изолятов вируса.

Таким образом, в российских изолятах TAV выявлены признаки реассортации без признаков

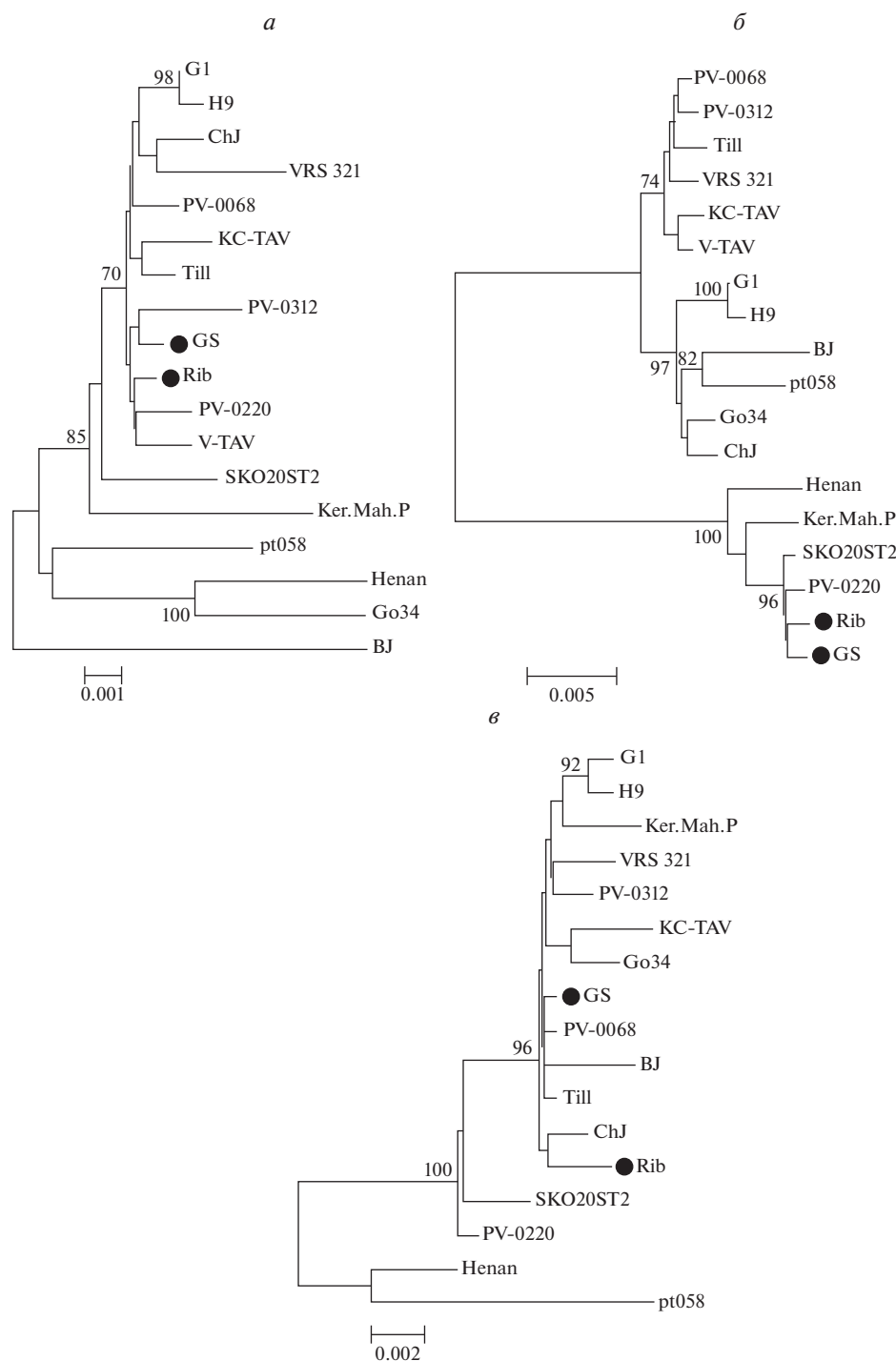


Рис. 2. Филогенетический анализ полногеномных последовательностей изолятов вируса аспермии томата (TAV). *a* – РНК1, *б* – РНК2, *в* – РНК3. Дерево реконструировано методом присоединения соседей, встроенным в MEGA7. Приведены значения бутстрэпа >70%. Названия изолятов указаны на концах ветвей. Российские изоляты Rib и GS выделены черным кружком (●).

внутригеномной рекомбинации. Кластеризации изолятов TAV по географическому принципу или по виду растения-хозяина не обнаружено.

Другое возможное объяснение могло состоять в том, что растения хризантемы были заражены двумя разными изолятами TAV, для одного из ко-

торых собраны РНК1 и РНК3, а для другого – РНК2. Для проверки этого предположения прочтения, полученные при HTS обоих образцов, картировали на собранный геном Rib, а затем проводили в них поиск точечных замен и коротких инделей. В анализ также были включены пар-

ноконцевые прочтения аналогичной длины (150 нуклеотидов), смоделированные для изолятов PV-0068, PV-0220 и SKO20ST2.

Показано, что полученные в результате HTS прочтения изолятов GS и Rib и смоделированные прочтения изолятов PV-0068, PV-0220 и SKO20ST2 одинаково успешно картировались на референсный геном Rib. Таким образом, при наличии в образцах GS и Rib контаминирующего изолята TAV со сравнимой идентичностью, его прочтения также должны были картироваться на референсный геном.

Установлено, что подавляющее число замен в прочтениях изолята GS, картирующихся на три геномных РНК Rib, имели аллельную частоту 100%, т.е. не выявлено гетерогенности ни по одной нуклеотидной позиции. Практически не было замен в прочтениях изолята Rib, картируемых на геном Rib. При смешанной инфекции двумя изолятами число замен с невысокой аллельной частотой было бы больше.

Следует отметить, что в случае более значительных различий между изолятами GS и Rib и контаминирующим вирусом при сборке *de novo* собрались бы два контига, по одному для каждого из изолятов. Однако в обоих образцах для каждой из трех РНК TAV собрался только один контиг, соответствующий геномной РНК вируса.

Таким образом, смешанная инфекция образцов GS и Rib двумя разными изолятами TAV не выявлена.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С помощью метатранскриптомного анализа и ОТ-ПЦР TAV впервые обнаружен на растениях хризантемы сортов Golden Standard и Ribonette, интродуцированных в НБС в 1976 и в 2013 гг., соответственно, из цветоводческих хозяйств, расположенных в Симферопольском районе Республики Крым. До этого TAV выявляли только на местных сортах и гибридах хризантемы [11, 12]. Обнаружение вируса на интродуцированных сортах позволяет предположить, что вирус мог проникнуть в НБС с зараженным посадочным материалом хризантемы упомянутых сортов. Однако на сегодняшний день происхождение TAV в насаждениях НБС не установлено.

К началу нашей работы в GenBank было депонировано 16 полногеномных последовательностей изолятов TAV, обнаруженных в растениях томата, хризантемы и петунии в различных регионах мира (табл. 1). В данной работе впервые секвенированы полные геномы двух российских изолятов TAV. Установлено, что по организации генома и размерам ORF российские изоляты TAV из хризантемы близки к большинству изолятов вируса

независимо от их географической локализации и вида растения-хозяина.

Анализ полногеномных последовательностей российских изолятов TAV выявил признаки реассортации. Поскольку представители рода *Cuscutovirus* и, в частности, TAV имеют сегментированный геном, и каждая из трех геномных РНК инкапсидирована в отдельную вирусную частицу, совместное заражение растения разными изолятами вируса или разными кукумовирусами может приводить к обмену сегментами генома между ними и возникновению реассортантов в потомстве [7]. Возможность образования жизнеспособных реассортантов у кукумовирусов подтверждена экспериментально. Так, получены реассортанты между изолятами CMV, которые относятся к дивергентным подгруппам IA и II. Некоторые из них накапливались в зараженных растениях в большем количестве, чем родительские штаммы, и в силу этого могли успешно закрепляться в популяции [26]. Также получены псевдорекомбинанты, у которых РНК1 и РНК2 происходят от CMV, а РНК3 от TAV (или состоящие из РНК1 и РНК2 TAV и РНК3 CMV) [27]. Помимо экспериментальных реассортантов, выявлено и несколько природных реассортантов кукумовирусов. В Китае на растениях томата обнаружен изолят CMV, который представлял собой реассортант между подгруппами IA (РНК2) и II (РНК1 и РНК3) [28]. Известны природные реассортанты между двумя подгруппами PSV [29], а также между CMV и PSV [30]. Таким образом, разные сегменты генома кукумовирусов потенциально могут иметь разную эволюционную историю. Однако в природных условиях реассортация у кукумовирусов является, по-видимому, достаточно редким событием в силу нежизнеспособности большинства геномных комбинаций, возникающих при смешанных инфекциях [26, 31, 32].

В нашей работе впервые показана возможность внутривидовой реассортации в природных изолятах TAV. Согласно результатам филогенетического анализа, РНК2 изолятов Rib и GS происходит от другого изолята, чем РНК1 и РНК3. Поскольку РНК2 Rib и GS группируется с томатными изолятами TAV, возможно, реассортация у предка (предков) российских изолятов произошла в растениях томата. Известно, что хризантема может быть резерватом TAV, откуда он с высокой эффективностью распространяется тлями на овощные и бахчевые культуры и наоборот [33].

Наряду с мутационной изменчивостью и рекомбинацией, реассортация может играть важную роль в эволюции вирусов с сегментированным геномом, повышая их приспособленность к новому хозяину и приводя к появлению новых видов вирусов [26, 32]. Например, анализ филогенетических деревьев, реконструированных по

разным сегментам генома TAV (рис. 2), показывает, что иранский изолят Ker.Mah.P из петунии [8] также, по-видимому, является реассортантом, и именно генетический сдвиг мог способствовать успешной адаптации TAV к новому виду растения-хозяина.

Авторы благодарят Н.В. Смыкову и И.В. Митрофанову за помощь в обследовании коллекции хризантем Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН.

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-1670. Высокопроизводительное секвенирование выполнено с использованием оборудования ЦКП “Геном” ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/ru1/ckp/ccu_genome_c.php).

Настоящая статья не содержит исследований с привлечением людей или животных.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Trolinger J.C., McGovern R.J., Elmer W.H., Rechcigl N.A., Shoemaker C.M. (2018) Diseases of chrysanthemum. In: *Handbook of Florists' Crop Disease*. Eds McGovern R.J., Elmer W.H. Springer International Publ. AG, 439–502.
2. Ram R., Verma N., Singh A.K., Singh L., Hallan V., Zaidi A.A. (2005) Indexing and production of virus-free chrysanthemums. *Biologia Plantarum*. **49**, 149–152.
3. Mitrofanova I.V., Zakubanskiy A.V., Mitrofanova O.V. (2018) Viruses infecting main ornamental plants: an overview. *Ornam. Hortic*. **24**, 95–102.
4. Hollings M. (1955) Investigation of chrysanthemum viruses. I. Aspermy flower distortion. *Ann. Appl. Biol.* **43**, 86–102.
5. Закубанский А.В., Чирков С.Н., Митрофанова О.В., Митрофанова И.В. (2016) Вирусы некоторых ценных плодовых, эфиромасличных и декоративных культур. *Бюлл. Гос. Никитского бот. сада*. **121**, 7–18.
6. <https://ictv.global/report/chapter/bromoviridae/bromoviridae/cucumovirus>
7. Palukaitis P., Garcia-Arenal F. (2003) Cucumoviruses. *Adv. Vir. Res.* **62**, 241–323.
8. Maddahian M., Massumi H., Heydarnejad J., Pour A.H., Varsani A. (2017) Characterization of Iranian tomato aspermy virus isolates with a variant 2b gene sequence. *Trop. Plant Pathol.* **42**, 475–484.
9. Salanki K., Balazs E., Burgyan J. (1994) Nucleotide sequence and infectious *in vitro* transcripts of RNA3 of tomato aspermy virus pepper isolate. *Virus Res.* **33**, 281–289.
10. Hollings M., Stone O.M. (1971) Tomato aspermy virus. *CMI/AAB Description of Plant Viruses*. **79**, 1–7.
11. Чуян А.Х., Крылов А.В. (1979) Свойства вируса аспермии томатов из хризантемы и круг его хозяев в Приморском крае. *Бюлл. Гл. Ботан. Сада АН СССР*. **114**, 84–92.
12. Zakubanskiy A., Mitrofanova I., Smykova N., Mitrofanova O., Chirkov S. (2021) Detection and partial molecular characterization of viruses infecting chrysanthemum in Russia. *Acta Hortic*. **1324**, 321–327.
13. Moreno I.M., Bernal J.J., García de Blas B., Rodriguez-Cerezo E., García-Arenal F. (1997) The expression level of the 3a movement protein determines differences in severity of symptoms between two strains of tomato aspermy cucumovirus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **10**, 171–179.
14. Chirkov S.N., Sheveleva A., Snezhkina A., Kudryavtseva A., Krasnov G., Zakubanskiy A., Mitrofanova I. (2022) Highly divergent isolates of chrysanthemum virus B and chrysanthemum virus R infecting chrysanthemum in Russia. *Peer J.* **10**, e12607.
15. Raj S.K., Kumar S., Choudhari S. (2007) Identification of tomato aspermy virus as the cause of yellow mosaic and flower deformation of chrysanthemums in India. *Australas. Plant Dis. Notes*. **2**, 1–2.
16. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. **30**, 2114–2120.
17. Grabherr M.G., Haas B.J., Yassour M., Levin J.Z., Thompson D.A., Amit I., Adiconis X., Fan L., Raychowdhury R., Zeng Q., Chen Z., Mauceli E., Hacohen N., Gnirke A., Rhind N., di Palma F., Birren B.W., Nusbaum C., Lindblad-Toh K., Friedman N., Regev A. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* **29**, 644–652.
18. Li H., Durbin R. (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. **26**, 589–595.
19. <https://arxiv.org/abs/1207.3907>
20. <https://github.com/lh3/wgsm>
21. Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874.
22. Martin D.P., Murrell B., Golden M., Khoosal A., Muhire B. (2015) RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* **1**, vev003.
23. Inoue S., Tamura M., Ugaki M., Suzuki M. (2018) Complete genome sequences of three tomato aspermy virus isolates in Japan. *Genome Announc.* **6**, e00474–18.
24. Raj S.K., Kumar S., Choudhari S., Verma D.K. (2009) Biological and molecular characterization of three isolates of tomato aspermy virus infecting chrysanthemums in India. *J. Phytopathol.* **157**, 117–125.
25. Chare E., Holmes E. (2006) A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Arch. Virol.* **151**, 933–946.
26. Pita J.S., Roossink M.J. (2013) Fixation of emerging interval recombination in cucumber mosaic virus populations. *J. Virol.* **87**, 1264–1269.
27. Salanki K., Carrere I., Jacquemond M., Balazs E., Tepfer M. (1997) Biological properties of pseudorecombinant and recombinant strains created with cucumber mosaic virus and tomato aspermy virus. *J. Virol.* **71**, 3597–3602.
28. Chen Y., Chen J., Zhang H., Tang X., Du Z. (2007) Molecular evidence and sequence analysis of a natural reassortant between cucumber mosaic virus subgroup IA and II strains. *Virus Genes*. **35**, 405–413.

29. Hu C.-C., Ghabrial S.A. (1998) Molecular evidence that strain BV-15 of peanut stunt cucumovirus is a reassortant between subgroup I and II strains. *Phytopathology*. **88**, 92–97.
30. White P.S., Morales F., Roossink M.J. (1995) Interspecific reassortment of genomic segments in the evolution of cucumoviruses. *Virology*. **207**, 334–337.
31. Thompson J.R., Tepfer M. (2009) The 3'-untranslated region of cucumber mosaic virus (CMV) subgroup II RNA3 arose by interspecific recombination between CMV and tomato aspermy virus. *J. Gen. Virol.* **90**, 2293–2298.
32. Jacquemond M. (2012) Cucumber mosaic virus. *Adv. Vir. Res.* **84**, 439–504.
33. Haack I., Karl E. (1986) Transmission of isolates of tomato aspermy (tomato aspermy virus) and cucumber mosaic virus (cucumber mosaic virus) by aphid species. *Arch. Phytopath. Plant Protect.* **22**, 451–458.

Analysis of the Tomato Aspermy Virus Complete Genomes Suggests Reassortment in Russian Isolates from Chrysanthemum

A. A. Sheveleva^a, G. S. Krasnov^b, A. V. Kudravytseva^b, A. V. Snezhkina^b,
E. V. Bulavkina^b, and S. N. Chirkov^{a, c, *}

^aFaculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^bEngelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^cKurchatov Genomic Centre of the Nikita Botanical Garden — National Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Yalta, 298648 Russia

*e-mail: s-chirkov1@yandex.ru

Tomato aspermy virus (TAV, genus *Cucumovirus* from the family Bromoviridae) is one of the most common and harmful chrysanthemum viruses, causing severe flower distortion, size reduction and color breaking. Metatranscriptome sequencing of chrysanthemum plants of the Ribonette and Golden Standard cultivars from the collection of the Nikita Botanical Garden (Yalta, Republic of Crimea) generated TAV-related reads. The complete genomes of two Russian isolates of the virus were assembled from the reads obtained. This is the first report of full-length TAV genomes from Russia. Typically of cucumoviruses, the segmented TAV genome is represented by three single-stranded positive-sense linear RNA molecules with a length of 3412 (RNA1), 3097 (RNA2) and 2219 (RNA3) nucleotides. Five open reading frames (ORF) have been identified that encode replicase (ORF1), RNA-dependent RNA polymerase (ORF2a), silencing suppressor protein (ORF2b), movement protein (ORF3a) and the virus coat protein (ORF3b). The identity of the TAV genomes from the two chrysanthemum cultivars was 99.8% for all three viral RNAs, and with other TAV isolates from Genbank — 97.5–99.7 (RNA1), 93.8–99.8 (RNA2), and 89.3–99.3% (RNA3). Phylogenetic analysis showed that RNA1 and RNA3 of the Russian isolates were assigned to heterogeneous groups of TAV isolates found on various plant species in different regions of the world. At the same time, RNA2 clearly clustered with tomato isolates SKO20ST2 from Slovenia and PV-0220 from Bulgaria and, to a lesser extent, with the Iranian isolate Ker.Mah.P from petunia and the Chinese isolate Henan from chrysanthemum. The incongruence of phylogenetic trees reconstructed from different segments of the viral genome suggests pseudo-recombination (reassortment) in the Russian TAV isolates.

Keywords: plant viruses, tomato aspermy virus, chrysanthemum, high-throughput sequencing, reassortment

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭКСПРЕССИОННЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ *Escherichia coli* И *Bacillus subtilis* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МУТАНТОВ РИБОНУКЛЕАЗЫ БИНАЗЫ

© 2023 г. А. И. Надырова^а, *, А. С. Коснырев^а, В. В. Ульянова^а, Е. В. Дудкина^а,
В. И. Вершинина^а, О. Н. Ильинская^а

^аИнститут фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет,
Казань, 420008 Россия

*e-mail: alsu.nadyrova@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.04.2023 г.

После доработки 24.04.2023 г.

Принята к публикации 24.04.2023 г.

Рибонуклеаза *Bacillus pumilus* (биназа) обладает выраженными цитотоксическими и онколитическими свойствами, а в высоких концентрациях может оказывать генотоксическое действие. Добиться снижения токсического действия фермента на организм позволит использование мутантов, обладающих пониженной каталитической активностью с сохранением противоопухолевых свойств нативного фермента. В представленной работе методом сайт-направленного мутагенеза получены мутантные формы биназы с единичными заменами: Lys26Ala и His101Glu. В результате проведенного сравнительного анализа систем экспрессии на основе *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* показана целесообразность использования гетерологичной системы на основе бацилл для продукции мутантов биназы. Методом ионообменной хроматографии выделены и очищены мутанты биназы со сниженной каталитической активностью в гомогенном состоянии с максимальным выходом 25 мг/л. Каталитическая активность мутанта Lys26Ala составила 11, а His101Glu – 0.02%. Установлено, что мутант Lys26Ala, как и нативная биназа, обладает цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам линий A549, BT-20 и HuTu 80, не оказывая при этом существенного влияния на популяцию нормальных клеток WI-38. Для мутанта His101Glu не выявлено цитотоксической активности.

Ключевые слова: рибонуклеаза, биназа, экспрессионная система, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, каталитическая активность, цитотоксичность

DOI: 10.31857/S0026898423050154, EDN: YXONYN

Рибонуклеаза (РНКаза) биназа – гидролитический фермент нуклеинового обмена, секретруемый *Bacillus pumilus* 7р. Зрелый белок с молекулярной массой 12 кДа состоит из 109 аминокислот и расщепляет РНК с образованием нуклеозид-3'-фосфатов через стадию 2',3'-циклопроизводных. Изучена структура, молекулярная организация, противовирусный и противоопухолевый потенциал биназы [1, 2]. Особое внимание привлекает противоопухолевая активность фермента – свойство, широко распространенное среди РНКаз различного происхождения [3–6]. Цитотоксичность РНКаз обуславливает ряд детерминант, среди которых особую роль играют положительный заряд фермента, некаталитическое взаимодействие с молекулярными мишенями, а также каталитическое связывание с природным субстратом. Гидролиз клеточной РНК не относится к определяющим факторам, так как некоторые РНКазы проявляют цитотоксические свойства независимо от ферментативной активности.

Так, денатурированные или мутантные формы РНКазы Т2 подавляют развитие опухолей за счет нарушения внутриклеточной организации активных структур [7]. Другим РНКазам для проявления цитотоксичности достаточно лишь минимального уровня каталитической активности, пороговое значение которой варьирует в зависимости от фермента [8].

Тем не менее способность гидролизовать внутриклеточную РНК вносит определенный вклад в токсичность РНКаз. Нативная биназа, в отличие от ее мутантной формы с остаточной активностью 0.07%, проявляла нефротоксичность по отношению к клеткам почечных канальцев [9]. В связи с этим для разработки противоопухолевого препарата на основе биназы актуально получение мутантов с пониженной каталитической активностью, но сохранным противоопухолевым действием. Ранее Г. Яковлев (Yakovlev) и др. [10] сообщали о выделении и очистке мутантов бина-

зы со сниженной каталитической активностью из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* JM107, несущего плазмиду pML164, но противоопухолевый потенциал этих мутантов авторы не исследовали. Штаммы *E. coli* считаются наиболее подходящими продуцентами рекомбинантных белков. Это обусловлено изученностью их генетики и физиологии, простоты культивирования, высокой скоростью роста, наличием большого числа генно-инженерных штаммов и экспрессионных векторов [11]. Вместе с тем существуют определенные ограничения, связанные с неполным отщеплением сигнальной последовательности у секретируемых белков, неправильным фолдингом внутриклеточных белков и контаминацией целевого продукта эндотоксинами [12].

Целью работы был подбор эффективной экспрессионной системы для получения препаративных количеств мутантов биназы с пониженной каталитической активностью, достаточной для проявления противоопухолевых свойств фермента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы, плазмиды и условия культивирования. Характеристика бактериальных штаммов и плазмид, использованных в работе, представлена в табл. 1.

Бактерии растили на стандартной среде LB (пептон — 1.5%, NaCl — 0.5%, дрожжевой экстракт — 0.5%) при 37°C и режиме качания 160 об./мин. Для

трансформации бацилл использовали минимальные среды Спайзена ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 1.8%, KH_2PO_4 — 0.6%, $(NH_4)_2SO_4$ — 0.2%, цитрат натрия — 0.12%; глюкоза — 0.8%, казаминовые кислоты — 0.04%, $MgSO_4 \cdot 2H_2O$ — 0.02%, дрожжевой экстракт — 0.01%). Для наработки рекомбинантной биназы в клетках *E. coli* и *Bacillus subtilis* использовали среду LB и низкофосфатную пептонную среду (НФПС; “Семипалатинский мясокомбинат”, Россия) следующего состава: пептон с низким содержанием неорганического фосфата (1.5%), $CaCl_2 \cdot H_2O$ — 0.01%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.03%, $MnSO_4$ — 0.01%, NaCl — 0.3%, глюкоза — 2%. В качестве селективных агентов в среды добавляли антибиотики ампициллин, канамицин или эритромицин в концентрации 100, 25 и 10 мкг/мл соответственно.

Клонирование гена биназы и сайт-направленный мутагенез. Геномную ДНК бацилл выделяли с использованием набора diaGene (“Диа-М”, Россия). Полноразмерный ген биназы амплифицировали с геномной ДНК *B. pumilus* 7p с использованием праймеров Bin_F (5'-catcgagaattcggtatttattcatcagaaggttatcag-3') и Bin_R (5'-cagattggaccggactctagagctctagag-3'). Ген ингибитора барстара вместе с промотором амплифицировали с геномной ДНК *B. amyloliquefaciens* с помощью праймеров Brst_F (5'-ctagagtccgggtccaatctgcagccgtcc-3') и Brst_R (5'-tagatcaagcttgccgggtgtgtgttccatttg-3'). Фрагменты нарабатывали с использованием PfuSE ДНК-полимеразы (“СибЭнзим”, Россия), а затем объединяли методом ПЦР с помощью праймеров Bin_F и Brst_R и набора Encyclo Plus PCR kit (“Евроген”,

Таблица 1. Бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе

Штамм или плаزمид	Характеристики	Источник
<i>E. coli</i> NEB5α	<i>fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1</i>	“New England Biolabs”, США
<i>E. coli</i> BL21 (λDE3)	(F [−]) <i>ompT gal dcm lon hsdSB (r_B[−]m_B[−]) λDE3(lacI lacUV5-T7 ind1sam7 nin5)</i>	“Novagen”, Германия
<i>B. subtilis</i> BRB08	<i>ΔtrpC2, ΔnprB, ΔaprE, Δepr, Δbpr, ΔnprE, Δmpr, Δvpr, ΔwprA</i>	[13]
<i>B. pumilus</i> 7p	Природный изолят	“ВКМ”, Россия
<i>B. amyloliquefaciens</i> H2	Природный изолят	[14]
pAL2T	Вектор для клонирования по 3'-концевым нуклеотидам А/Т; [Ap ^R]	“Евроген”, Россия
pET26b	Вектор для экспрессии рекомбинантных белков в <i>E. coli</i> , содержащий ИПТГ ^a -индуцибельный промотор T7; <i>pelB</i> ; [Km ^R]	“Novagen”, Германия
pET15b	Вектор для экспрессии рекомбинантных белков в клетках <i>E. coli</i> , содержащий ИПТГ-индуцибельный T7 промотор; [Ap ^R]	“Novagen”, Германия
pGP380	Шаттл-вектор на основе pBQ200, содержащий конститутивный промотор P _{degQ36} ; [Ap ^R , Erm ^R]	[15]

^aИПТГ — изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид.

Россия). Полученный продукт клонировали в вектор pAL-2T по выступающим нуклеотидам Т/А (рис. 1а). Методом сайт-направленного мутагенеза вносили замены ключевых аминокислот, входящих в активный центр фермента: His101→Glu, Lys26→Ala. Сайт-направленный мутагенез проводили с использованием смеси Q5 Hot Start High Fidelity 2X Master Mix (“New England Biolabs”, США). Замену His101Glu вносили с помощью прямого праймера H101E_F (5'-аасаа-сагасгagtatgсаactttc-3'), содержащего замену триплета CAT на GAG, и обратного праймера H101E_R (5'-ttgtaaatgagccagtcac-3') (рис. 1а). Для замены Lys26Ala использовали праймеры K26A_F (5'-сacacacgcatcсасааgсаagtг-3') с заменой триплета AAA на GCA и K262_R (5'-ttatcaggcaatcgtttgtagc-3') (рис. 1а). Наличие мутаций подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

Создание экспрессионных конструкций. Для экспрессии белков в клетках *E. coli* ген биназы с мутацией His101Glu амплифицировали с вектора pAL-2T с использованием праймеров pETbin_F (5'-cagtcgccatgggссgсgtcattaatacgtttg-3') и pETbin_R (5'-tagattgctcagcttatcgaatacgtgtgaaag-3') и клонировали в векторы pET26b (рис. 1б) и pET15b (рис. 1в) под контроль ИПТГ-индуцируемого T7-промотора, по сайтам рестрикции NcoI и BspI, исключаяющим добавление гистидиновых повторов в состав рекомбинантного белка. Для экспрессии белков в клетках *B. subtilis* генетическую кассету, содержащую ген биназы с мутациями и без, а также ген ингибитора барстара переклонировали с вектора pAL-2T в плазмиду pGP380 по сайтам рестрикции EcoRI и HindIII. Химически компетентные клетки *E. coli* NEB5α трансформировали методом теплового шока полученными конструкциями [16] и отбирали клоны, несущие искомые плазмиды. Правильность сборки плазмид подтверждали рестрикционным анализом и секвенированием.

Экспрессия гена биназы в гетерологичных системах. Генетическими конструкциями трансформировали химически компетентные клетки

E. coli BL21 (λDE3) методом теплового шока [16]. Клетки растили на среде LB до достижения культурой экспоненциальной фазы роста (OD₅₉₀ 0.4–0.8) и добавляли ИПТГ в качестве индуктора. Подбор условий индукции экспрессии гена проводили, варьируя концентрацию ИПТГ (0.1–0.5 мМ), время (3–5 ч) и температуру (25, 37°C) инкубации (табл. 2).

Трансформацию *B. subtilis* BRB08 проводили модифицированным методом Спицайзена [17]. Для наработки биназы бактерии растили на НФПС в течение 20 ч до максимального накопления фермента в среде.

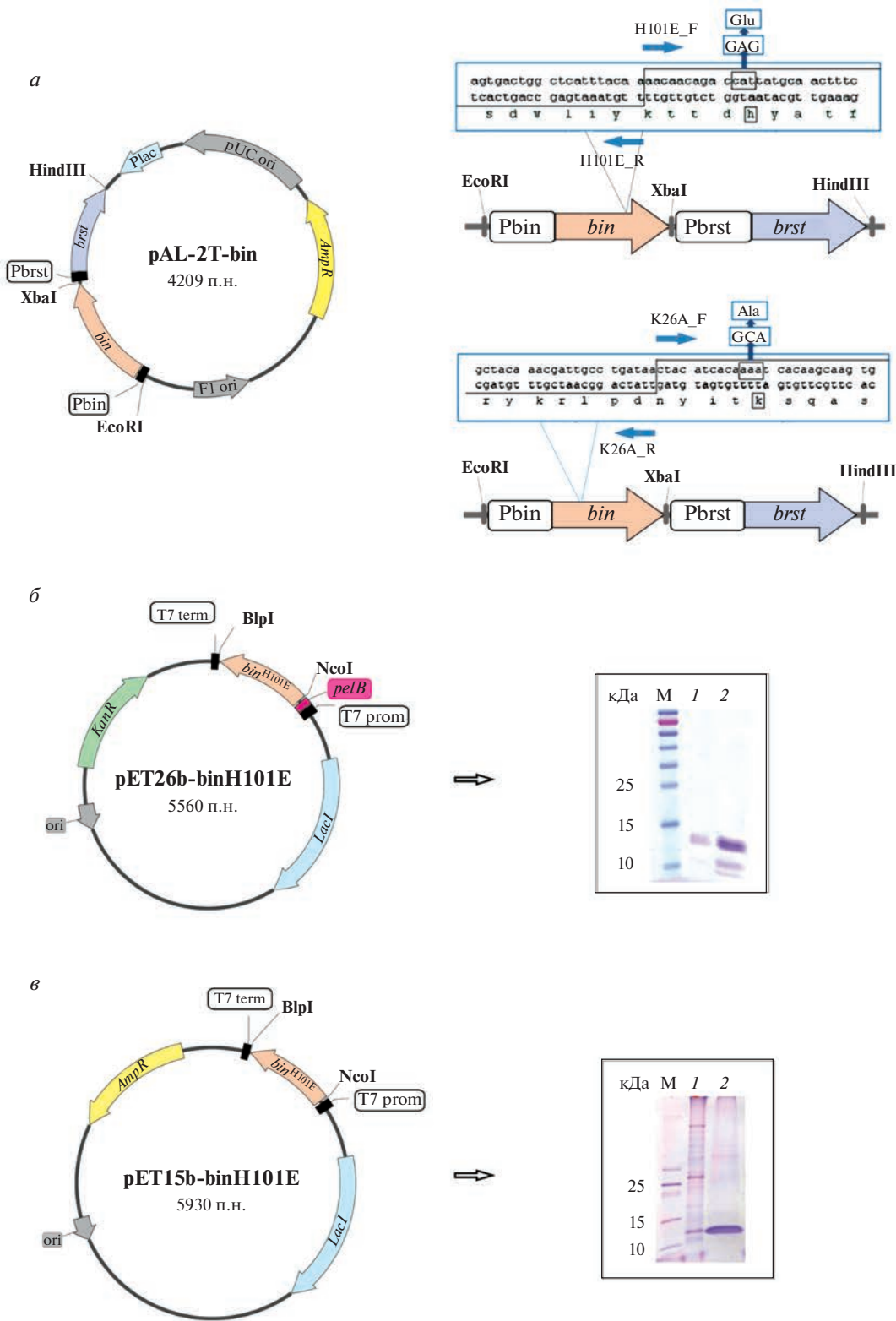
Получение периплазматической фракции *E. coli*. Клетки осаждали центрифугированием (10 мин при 8000 g) и ресуспендировали в буфере, содержащем 30 мМ Трис-НСl (pH 8.0), 20% сахарозы, 1 мМ ЭДТА. К суспензии добавляли лизоцим в концентрации 300 мкг/мл и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Периплазматическую фракцию отделяли центрифугированием при 12000 g в течение 30 мин.

Разрушение клеток *E. coli* ультразвуком. Осадок клеток ресуспендировали в 20 мМ Трис-НСl (pH 7.5) с добавлением 1 мМ PMSF. Суспензию обрабатывали ультразвуком при мощности 50% по схеме: 20 с озвучивание, 40 с пауза, — цикл повторяли 10 раз. Растворимую фракцию белков отделяли центрифугированием при 12000 g в течение 10 мин.

Очистка биназы из тельц включения. Клеточный осадок ресуспендировали в 10-кратном объеме буфера для промывки (WB), содержащего 20 мМ Трис-НСl (pH 7.5), 10 мМ ЭДТА, 1% Три-тон X-100, 1 мМ PMSF. Клетки разрушали ультразвуком с добавлением лизоцима в концентрации 100 мкг/мл, осаждали центрифугированием (10 мин при 10000 g). Осадок дважды промывали WB, тельца включения собирали центрифугированием. Отмытые тельца включения растворяли в 10-кратном объеме 10 мМ Na-фосфатного буфера (pH 7.0), содержащего 6 М гуанидин гидрохлорид. Рефолдинг проводили с использованием системы

Таблица 2. Схема многофакторного эксперимента по оптимизации экспрессии гена биназы в рекомбинантном штамме *E. coli* BL21 (λDE3)

Температура, °C	ИПТГ, мМ	Время, ч	Содержание белка, мкг
25	0.1	1	2.244
37	0.1	1	1.846
25	0.1	3	4.716
37	0.1	3	3.562
25	0.5	1	3.882
37	0.5	1	2.583
25	0.5	3	1.958
37	0.5	3	2.612



Biologic DuoFlow FPLC (“Bio-Rad”, США) на колонке UNOS6 (“Bio-Rad”), уравновешенной буфером I (10 mM Na-фосфатный буфер, pH 7.0, 2 M гуанидин гидрохлорид). Элюцию проводили буфером II (10 mM Na-фосфатный буфер, pH 7.0, 1 M NaCl, 0.75 M гуанидин гидрохлорид). Пиковые фракции обессоливали в центрифужных фильтрах Amicon Ultra-3K (“Merck Millipore”, США).

Электрофорез в денатурирующих условиях и иммуноблоттинг. Электрофоретическое разделение белков проводили в денатурирующем 16%-ном ПААГ (SDS-PAGE). После разделения белки переносили на PVDF-мембрану с использованием системы Mini Trans-Blot cell (“Bio-Rad”) при напряжении 100 В, в течение 1.5 ч. Свободные участки связывания на мембране блокировали в течение 1 ч с добавлением 5% обезжиренного молока, растворенного в буфере, содержащем 50 mM Трис-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20. Мембрану инкубировали с поликлональными кроличьими антителами против биназы в течение 24 ч при 4°C, затем с мечеными пероксидазой хрена мышиными антителами против IgG кролика (“Invitrogen”, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Белки детектировали с использованием хемилюминесцентного субстрата Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (“Thermo Fisher Scientific”, США) на гель-документаторе Chemi-Doc XRS + System (“Bio-Rad”).

Электрофорез в нативных условиях. Электрофорез белков проводили в 0.8%-ном агарозном геле в трис-глициновом буфере, pH 8.5, по методике R. Kim [18]. Лунки располагали по центру агарозного геля и детектировали разделение белков по заряду: белок с $pI > 8.5$ движется к катоду, а с $pI < 8.5$ — к аноду.

Ионообменная хроматография. Выделение рекомбинантного белка проводили из культуральной жидкости *B. subtilis* методом ионообменной хроматографии по методике, описанной ранее [19]. Полученные пиковые фракции обессоливали с помощью центрифужных фильтров Amicon Ultra-3K (“Merck Millipore”). Концентрацию очищенных белков определяли по Брэдфорду с помощью набора Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Reagent (“Thermo Fisher Scientific”).

Рибонуклеазная активность. РНКазную активность определяли по количеству кислоторастворимых продуктов гидролиза РНК-субстратов: высокополимерной дрожжевой РНК (впРНК), тРНК и дцРНК, — используя описанную ранее модифицированную методику Анфинсена [1]. За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывает увеличение оптической плотности раствора на единицу при 260 нм в опытных пробах по сравнению с контрольными за 1 ч инкубации в пересчете на 1 мл фермента. Удельную рибонуклеазную активность рассчитывали на 1 мг белка. Удельную рибонуклеазную активность нативного фермента принимали за 100%.

Клеточные линии. Исследование цитотоксичности полученных препаратов мутантной биназы проводили на клетках эпителия легких эмбриона человека WI38 и линиях опухолевых клеток: аденокарциномы легких A549, рака молочной железы BT-20, аденокарциномы двенадцатиперстной кишки HuTu 80. Клетки растили на среде DMEM (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), пенициллина/стрептомицина (по 100 ед/мл) и 2 mM L-глутамина при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

МТТ-тест. Цитотоксичность препаратов биназы оценивали в МТТ-тесте. Культуры клеток засевали в 96-луночные плоскодонные планшеты плотностью 7×10^3 клеток на лунку для A549 и HuTu 80, 15×10^3 для BT-20 и 20×10^3 для WI-38. Клетки растили до образования 50–60%-ного монослоя, среду заменяли на свежую с добавлением исследуемого препарата биназы в концентрации 300 мкг/мл. Клетки растили 48 ч, среду заменяли на содержащую МТТ (5 мг/мл) и инкубировали до образования кристаллов формазана. Оптическую плотность раствора измеряли по разности поглощения на длинах волн $\Delta(A_{570}-A_{630})$ на спектрофотометре xMark (“Bio-Rad”). Жизнеспособность необработанных клеток принимали за 100%.

Статистический анализ. Содержание целевого белка в пробах при оптимизации условий экспрессии гена биназы в *E. coli* определяли в программе GelAnalyzer 19.1 (www.gelanalyzer.com). Основные физико-химические свойства белков

Рис. 1. Получение биназы со сниженной каталитической активностью с использованием *E. coli*. *a* — Схема плазмиды pAL-2T-bin, внесение мутаций His101Glu и Lys26Ala в ген биназы. *б* — Схема плазмиды pET26b-binH101E и электрофоретический анализ содержания биназы в периплазматической фракции *E. coli* BL21 (ΔDE3): 1 — неиндуцированная проба, 2 — индуцированная проба. *в* — Схема плазмиды pET15b-binH101E и электрофоретический анализ содержания биназы в различных клеточных фракциях *E. coli* BL21 (ΔDE3): 1 — фракция растворимых белков, 2 — фракция нерастворимых белков. Здесь и далее: M — маркер молекулярной массы белков PageRuler Prestained Protein Ladder (“Thermo Fisher Scientific”, США); bin — условное обозначение гена, кодирующего биназу; brst — условное обозначение гена, кодирующего барстар; Pbin — промотор гена биназы; Pbrst — промотор гена барстара; T7 term — терминатор T7; T7 prom — промотор T7; ori — точка начала репликации; Plac — промотор лактозного оперона; LacI — репрессор лактозного оперона; AmpR — ген устойчивости к ампициллину; KanR — ген устойчивости к канамицину; ErmR — ген устойчивости к эритромицину; RepA — инициатор репликации плазмиды; pelB — ген сигнальной последовательности pelB.

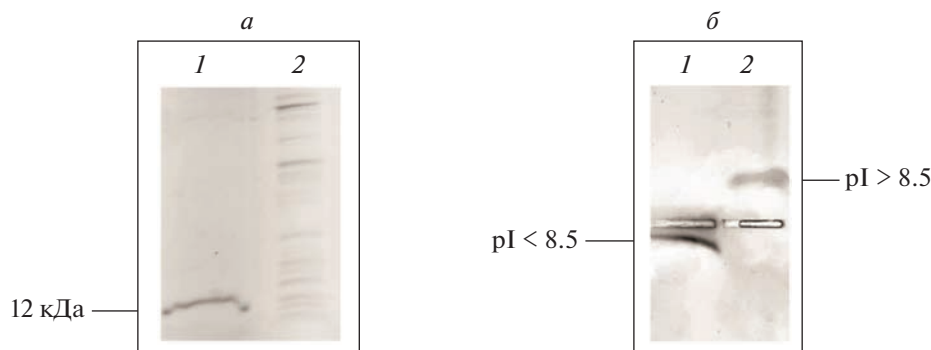


Рис. 2. Электрофоретический анализ биназы, полученной из телец включений. *a* — Электрофорез в денатурирующих условиях: 1 — мутант биназы после очистки из телец включения с помощью гуанидин гидрохлорида, 2 — растворимая клеточная фракция. *б* — Электрофорез в нативных условиях: 1 — мутант биназы после очистки из телец включения с помощью гуанидин гидрохлорида, 2 — нативная биназа.

рассчитывали при помощи программы ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>).

Эксперименты проводили в трех биологических повторах. Для статистической обработки результатов использовали программный пакет MS Excel 2020. Данные представляли в виде средних значений со стандартным отклонением (SD). Достоверность различий между двумя группами данных рассчитывали с помощью *t*-критерия Стьюдента ($p \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение мутантов биназы в *E. coli*

С целью получения мутантов биназы со сниженной каталитической активностью в ген биназы, клонированный в плазмиде pAL-2T, методом сайт-направленного мутагенеза внесли замены ключевых аминокислот, входящих в активный центр фермента: гистидин в позиции 101 заменили на глутаминовую кислоту (His101→Glu), а лизин в позиции 26 — на аланин (Lys26→Ala). Мутации вносили с помощью неперекрывающихся праймеров, позволяющих амплифицировать плазмиду целиком. В результате были получены плазмиды pAL-2T-BinH101E и pAL-2T-BinK26A, несущие ген биназы с соответствующими заменами (рис. 1а).

Подбор эффективной системы экспрессии для наработки биназы со сниженной каталитической активностью в клетках *E. coli* проводили на основе вектора pET26b (рис. 1б), обеспечивающего секрецию целевого белка в периплазматическое пространство, и вектора pET15b (рис. 1в) — с конечной локализацией белка в цитоплазме. Плазмидой pET26b-BinH101E трансформировали химически компетентные клетки *E. coli* BL21 (λDE3) и проводили оптимизацию условий экспрессии мутантной биназы в T7/lac-системе с использованием многофакторного эксперимента.

Максимальный выход рекомбинантного белка регистрировали при индукции экспрессии 0.1 mM ИПТГ в течение 3 ч при температуре 25°C (табл. 2). При оценке содержания биназы в периплазме обнаружили белки различной молекулярной массы: 8, 10 и 12 кДа (рис. 1б).

Для анализа эффективности продукции биназы клетки *E. coli* BL21 (λDE3) трансформировали плазмидой pET15b-BinH101E. В результате анализа содержания внутриклеточных белков в растворимой и нерастворимой фракциях выявлено, что большое количество биназы агрегирует внутри клеток в виде нерастворимых телец включения (рис. 1в). Снижение экспрессии целевого гена за счет варьирования условий индукции не привело к увеличению количества растворимого белка. Несмотря на то, что в результате очистки целевого белка из телец включения с использованием гуанидин гидрохлорида была получена высокоочищенная фракция мутанта биназы в растворимой форме, проведенный рефолдинг не привел к восстановлению физико-химических свойств. Скорее всего, это связано с тем, что заряд молекулы биназы с мутацией H101E отличается от нативного фермента (рис. 2а, 2б). Для изучения каталитических и биологических свойств мутантов биназы необходимо их получение с нативными физико-химическими характеристиками, поэтому использование *E. coli* в качестве штамма-продуцента оказалось нецелесообразным.

Получение мутантов биназы в *B. subtilis*

Для получения биназы со сниженной каталитической активностью из культуральной жидкости *B. subtilis* ген биназы с внесенными мутациями клонировали в шаттл-вектор pGP380 совместно с геном внутриклеточного ингибитора барстара (рис. 3а). В связи с тем, что для бацилл характерен высокий уровень протеолитической активности во внеклеточной среде [20], мы использовали бес-

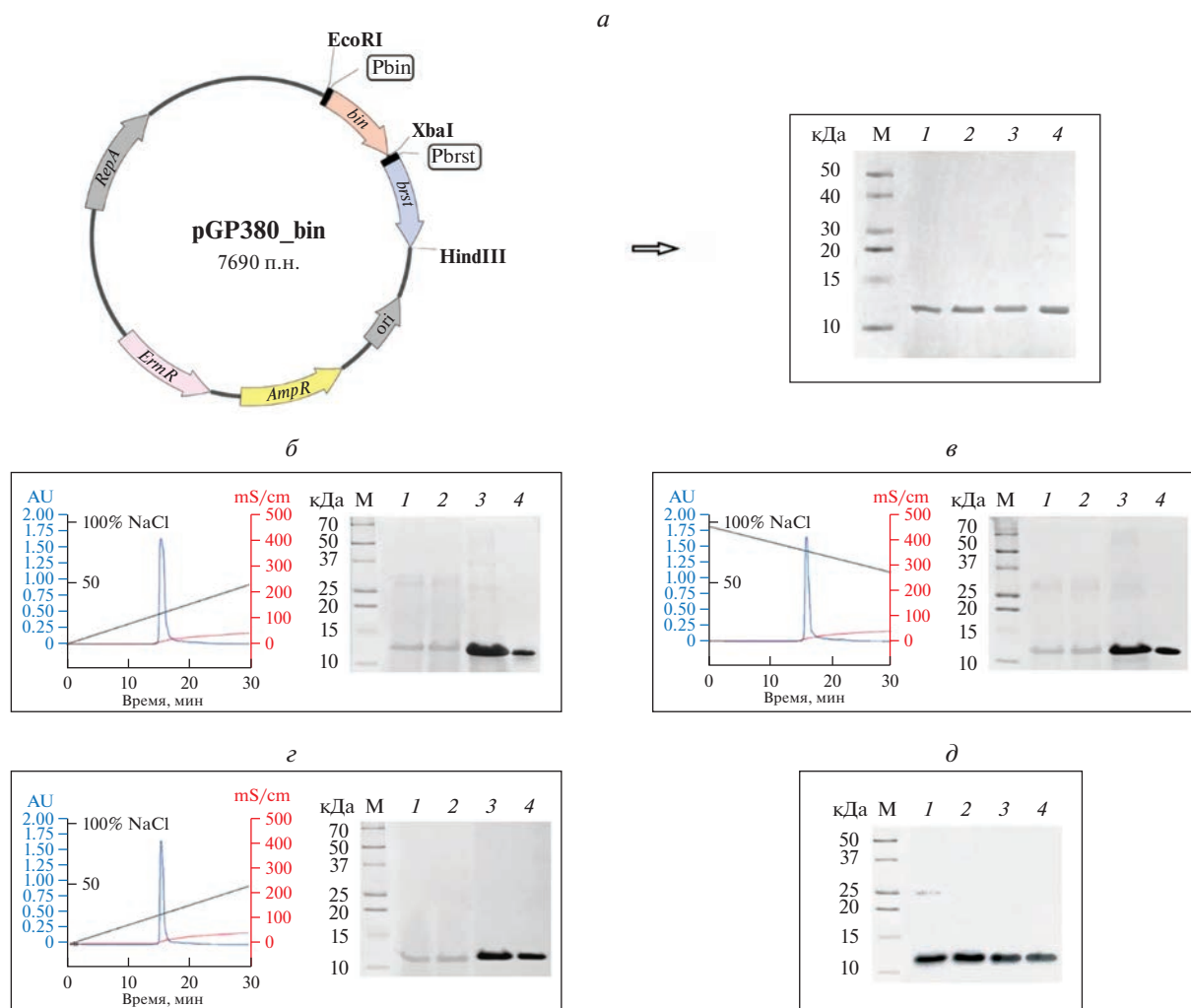


Рис. 3. Выделение и очистка мутантов биназы со сниженной каталитической активностью, синтезированных в клетках *B. subtilis*. *a* – Схема плазмиды pGP380-bin и анализ белков культуральной жидкости *B. subtilis* BRB08, несущих плазмиды с геном биназы или ее мутантов: 1 – pGP380-bin, 2 – pGP380_binH101E, 3 – pGP380-binK26A, 4 – биназа, М – маркер молекулярной массы белков. *б* – Профиль элюции биназы в градиенте 0–1 М NaCl с использованием системы FPLC BioLogic Duo Flow (“Bio-Rad”, США) и электрофоретический анализ фракций мутантов биназы на различных этапах очистки: 1 – культуральная жидкость до очистки, 2 – после сорбции на ДЭАЭ-целлюлозе, 3 – пиковая фракция после элюции на фосфоцеллюлозе, 4 – после ВЭЖХ (3 мкг/лунка). *в* – Мутант биназы His101Glu; *г* – мутант биназы Lys26Ala. AU – единицы оптического поглощения; мS/cm – проводимость. *д* – Иммуноблотинг пиковых фракций биназы и ее мутантов после ВЭЖХ: 1 – нативная биназа, 2 – рекомбинантная биназа, 3 – мутант Lys26Ala, 4 – мутант His101Glu. Расшифровку аббревиатур см. на рис. 1.

протеазный штамм *B. subtilis* BRB08 (с делециями генов 8 основных внеклеточных протеаз) в качестве продуцента рекомбинантной биназы. Известно, что синтез биназы регулируется двухкомпонентной системой PhoP-PhoR и индуцируется при недостатке неорганического фосфата [21], поэтому индукцию экспрессии гена биназы проводили на среде с низким содержанием неорганического фосфата. В результате анализа уровней экспрессии мутантов биназы выявлено высокое содержание целевых белков в культуральной жидкости *B. subtilis* (рис. 3а). Основные физико-химические параметры мутантов биназы, расчи-

танные с помощью сервиса ProtParam, оказались схожими по значениям с таковыми для аутентичного белка (табл. 3). Учитывая эти результаты, для выделения мутантов биназы мы использовали метод ионообменной хроматографии, разработанный нами ранее для очистки бациллярных РНКаз [19]. Хроматографический профиль полученных препаратов биназы был представлен в виде единичных симметричных пиков, гомогенность которых была подтверждена электрофорезом в денатурирующих условиях (рис 3б–3г). Как видно из результатов иммуноблотинга, представленных на рис. 3д, полученные белки с молеку-

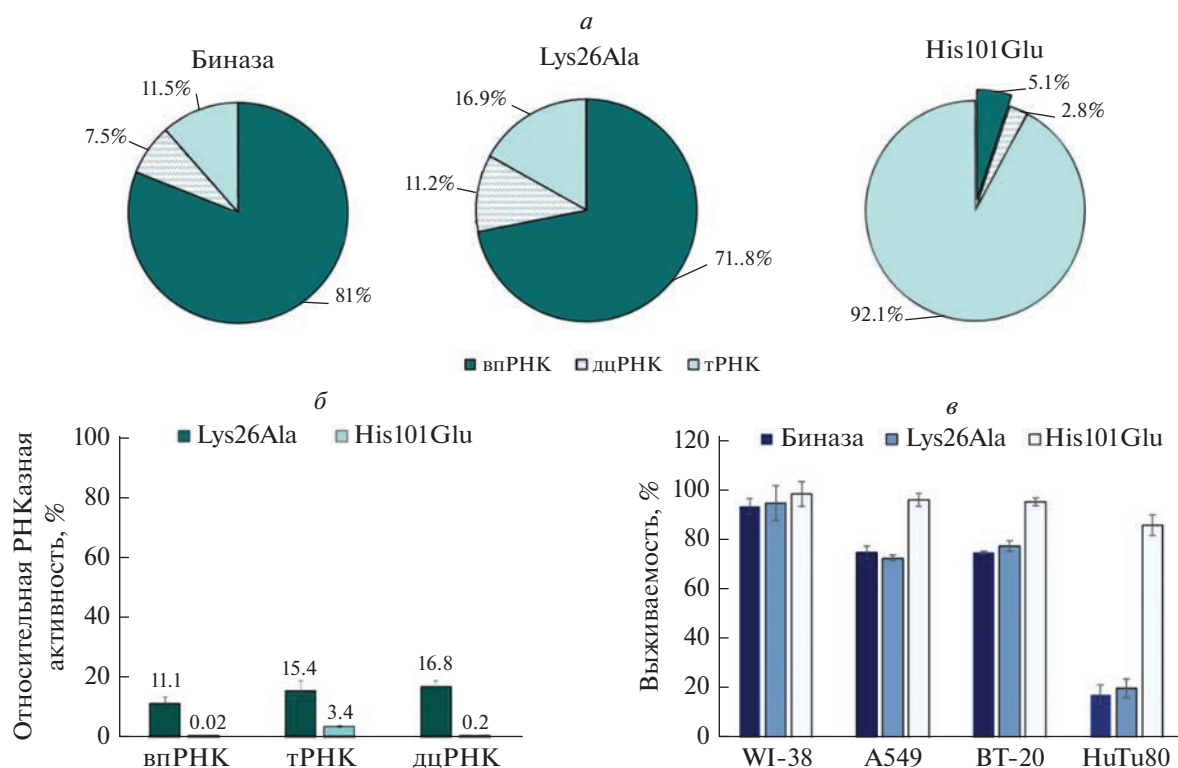


Рис. 4. Каталитические и цитотоксические свойства биназы и ее мутантов. *а* – Эффективность гидролиза природных РНК-субстратов. За 100% принята суммарная удельная активность каждого фермента на трех РНК-субстратах. *б* – Каталитическая активность мутантов биназы в отношении различных РНК-субстратов в сравнении с нативным ферментом. За 100% принята каталитическая активность нативной РНКазы. *в* – Жизнеспособность опухолевых клеток А549, BT-20, HuTu 80 и нормальных клеток WI-38 через 48 ч инкубации с биназой или ее мутантами. За 100% принята жизнеспособность клеток без обработки ферментом.

лярной массой 12 кДа связывались с антителами к биназе. Максимальный выход очищенных целевых белков составлял 25 мг/л.

Как видно из данных, представленных на рис. 4а, предпочтительным субстратом для мутанта Lys26Ala, как и для биназы, является vpRNA, а для мутанта His101Glu – trRNA. Каталитическая активность мутанта Lys26Ala в сравнении с биназой на vpRNA составила 11, на trRNA – 15.4, на dcRNA – 17%. Мутант His101Glu гидролизировал vpRNA на 0.02, trRNA – на 3.4, dcRNA – на 0.2% (рис. 4б).

В результате использования экспрессионной системы *B. subtilis* получены гомогенные препараты мутантов Lys26Ala и His101Glu биназы и исследованы их каталитические характеристики на природных субстратах.

Сравнительная характеристика цитотоксического потенциала мутантов биназы

Исследование цитотоксичности полученных мутантов биназы проведено на нормальных (WI-38) и опухолевых (A549, BT-20, Hutu 80) клетках чело-

Таблица 3. Основные физико-химические свойства нативной биназы, мутантов His101Glu и Lys26Ala

Параметр	Нативная биназа	Мутант His101Glu	Мутант Lys26Ala
Число аминокислот	109	109	109
Молекулярная масса, Да	12211.7	12203.6	12239.66
pI	9.52	9.3	9.57
Коэффициент экстинкции, М ⁻¹ см ⁻¹	2.2	2.2	2.2
Алифатический индекс	78.80	78.80	78.81
Индекс нестабильности	27.25	23.22	31.28

века. Показано, что мутант Lys26Ala с остаточной каталитической активностью 11% обладает избыточной цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам, уровень которой сходен с нативным ферментом. Так, мутант Lys26Ala и нативная биназа в концентрации 300 мкг/мл снижали жизнеспособность клеток A549 и BT-20 на 25, NuTu 80 — на 75% (рис. 4б). Мутант His101Glu биназы с остаточной активностью 0.02% не оказывал влияния на жизнеспособность клеток. Таким образом, каталитическая активность биназы — один из факторов, определяющих ее цитотоксичность.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эффективность гетерологичных систем экспрессии для продукции рекомбинантной биназы

Детальное изучение структуры и функциональных характеристик мутантов биназы требует их наработки в препаративных количествах. Продуктивность природных штаммов, как правило, невысока. Так, выход биназы, полученной из нативного штамма-продуцента *B. pumilus* 7p, составляет не более 2 мг/л [22, 23]. Кроме того, внесение мутаций в геном природных изолятов часто сопряжено с методологическими трудностями. Эффективной наработки мутантного белка можно добиться при использовании гетерологичной системы экспрессии. Ранее препарат рекомбинантной биназы и мутантов со сниженной каталитической активностью был получен из культуральной жидкости *E. coli* [10, 24]. Однако такой способ имеет ряд недостатков, связанных с отсутствием специфической системы секреции, обеспечивающей транспорт целевого белка через цитоплазматическую и наружную мембраны в культуральную жидкость [25]. Бактерии рода *Bacillus* ранее не использовали в качестве продуцента рекомбинантной биназы.

Мы сравнили эффективность двух гетерологичных систем экспрессии: на основе *E. coli* и *B. subtilis* — для наработки мутантных форм биназы со сниженной каталитической активностью.

Бактерии *E. coli* широко используют при проведении генно-инженерных манипуляций и продуцирования гетерологичных белков. Для наработки биназы в клетках *E. coli* была получена экспрессионная плаزمид на основе вектора pET26b (рис. 1б), обеспечивающая секрецию целевого белка в периплазматическое пространство. К преимуществам получения рекомбинантных белков из периплазматического пространства относится низкое содержание протеаз и примесных белков, что повышает стабильность целевого продукта и облегчает его последующую очистку. Кроме того, наличие дисульфидизомераз благоприятно сказывается на формировании корректной трехмерной структуры белков, требующей

образования дисульфидных связей. При анализе накопления биназы в периплазме мы обнаружили нарушения в процессинге рекомбинантного белка. Именно этим можно объяснить наличие множественных форм биназы с различной молекулярной массой (рис. 1б). По-видимому, это связано с неполным отщеплением сигнальной последовательности при перегрузке системы секреции *E. coli*, вызванной наработкой чужеродного белка [26]. В связи с этим более целесообразным представлялось получение рекомбинантной биназы из цитоплазмы *E. coli*. Для этого ген биназы переклонировали в вектор pET15b (рис. 1в). При анализе полученных образцов оказалось, что рекомбинантная биназа находится внутри клетки в виде нерастворимых агрегатов — телец включения (рис. 1в, 2а). Для перевода фермента из телец включения в биологически активную форму необходимо проведение дополнительных трудоемких процедур, что существенно снижает суммарный выход целевого белка и может сказаться на его физико-химических свойствах. Так, обработка биназы денатурирующим агентом гуанидин гидрохлоридом с последующим рефолдингом не привела к корректному восстановлению нативного заряда белка (рис. 2б). Учитывая эти проблемы, в дальнейшем в качестве продуцента рекомбинантной биназы мы использовали *B. subtilis*.

Основное преимущество систем экспрессии на основе бацилл состоит в отсутствии эндотоксинов и секреции рекомбинантных белков непосредственно в среду, что облегчает получение целевого белка, пригодного для возможного применения в терапевтических целях. *B. subtilis* содержат шапероны, которые обеспечивают правильный фолдинг и препятствуют агрегации зрелого белка в клетке [27]. Использование эффективного штамма-продуцента и оптимизированных условий выделения и очистки фермента позволили получить гомогенные препараты мутантов биназы в количествах, соизмеримых с опубликованными показателями [24, 28, 29].

Таким образом, установлено, что для получения мутантов биназы со сниженной каталитической активностью подходит гетерологичная система на основе *B. subtilis*. По-видимому, для биназы крайне важны условия секреции, которые обеспечивают правильный процессинг и фолдинг белка, что возможно при использовании близкородственных видов бактерий в качестве продуцентов.

Мутационный анализ активного центра биназы

Изучению функциональной роли аминокислотных остатков каталитического домена биназы в кинетике гидролиза РНК посвящен ряд исследований [10, 29]. Так, Г. Яковлев (Yakovlev) и соавт. [10] рассчитали кинетические параметры гидро-

лиза синтетических субстратов GpC, poly(I) и poly(A) мутантами His101Glu и Lys26Ala: каталитическая активность ферментов составила 2.7 и 33% соответственно, для мутанта His101Glu зарегистрировано значительное снижение константы скорости реакции.

Природные РНК-субстраты, а именно вРНК, дцРНК, тРНК, представляют большой интерес в качестве возможных внутриклеточных мишеней цитотоксических рибонуклеаз. Нами показано, что каталитическая активность мутантов Lys26Ala и His101Glu в сравнении с нативным ферментом на высокополимерном субстрате составляет 11 и 0.02% соответственно (рис. 4б). При оценке эффективности гидролиза природных субстратов обнаружено, что мутант Lys26Ala, как и биназа, эффективнее расщепляет вРНК, при этом каталитическая активность мутанта His101Glu, напротив, характеризуется явным предпочтением к низкомолекулярному субстрату — тРНК (рис. 4а).

Оценивая функциональные различия мутантов биназы, необходимо учитывать роль и природу заменяемых аминокислот. Положительно заряженные остатки His101 и Lys26 вместе с Glu72, Arg82, Arg86 формируют активный центр биназы. His101 выступает в качестве донора протонов [30], а Lys26 отвечает за связывание с фосфатными группами РНК. Характер аминокислотных замен определяется консервативностью или радикальностью. Консервативные замены, в отличие от радикальных, не оказывают значительного влияния на функциональные свойства белков. Мы оценили взаимозаменяемость аминокислот в позициях 26 и 101 молекулы биназы, основываясь на коэффициенте функциональной близости (кФБА) Бачинского [31]. Замена считается консервативной при значении кФБА > 12.4, в обратном случае — радикальной. Так, кФБА для замен His→Glu и Lys→Ala составляет 4 и 13 соответственно. Анализируя характер замен методом Бачинского, можно заключить, что замена гистидина на глутаминовую кислоту относится к радикальным, а лизина на аланин — к консервативным. Анализ характера замен методом П. Снита (Sneath) [32] подтвердил консервативность замены Lys→Ala и радикальность замены His→Glu.

Цитотоксический эффект мутантов биназы

Противоопухолевые эффекты РНКаз обусловлены рядом детерминант, включающих катионные свойства белка, взаимодействия с клеточными компонентами, надмолекулярную структуру и каталитические свойства фермента [33–35]. Известно, что биназа дикого типа взаимодействует непосредственно с мутантным белком KRAS, что приводит к блокировке сигнального пути MAPK/ERK и индукции апоптоза [36]. Анализ профиля активированных онкогенов и протоон-

когенов, экспрессируемых эпителиоподобными опухолями, показал, что цитотоксическое действие биназы и мутанта Lys26Ala не всегда сопряжено с экспрессией мутантных вариантов белка RAS. Так, в клетках BT-20 и Hutu 80 содержится RAS дикого типа, а клетки A549 экспрессируют KRAS с мутацией G12S [37–39]. Вероятно, в клетках BT-20 и Hutu 80 биназа активирует иные механизмы цитотоксичности. Ранее показано, что снижение жизнеспособности клеток BT-20 под действием биназа-производного пептида B74-94 может быть обусловлено его прямым взаимодействием с рецептором эпидермального фактора роста человека (EGFR) [40]. Выраженное цитотоксическое действие биназы по отношению к клеткам Hutu 80, вероятно, опосредовано снижением способности опухолевых клеток к миграции [41].

Каталитическая активность считается одной из основных детерминант цитотоксичности РНКаз. Однако известны РНКазы, проявляющие противоопухолевую активность, но не обладающие способностью гидролизовать РНК. Например, мутант РНКазы *Aspergillus giganteus* (α -сарцин) без каталитической активности подавлял жизнеспособность клеток рака шейки матки HeLa [42]. Не обладающий РНКазной активностью мутант катионного белка эозинофилов человека проявлял цитотоксичность путем изменения проницаемости клеточной мембраны без интернализации [43]. Для некоторых РНКаз определен минимальный уровень каталитической активности, при котором сохраняются цитотоксические свойства фермента. Нами показано, что мутант биназы с остаточной активностью 11% обладает таким же уровнем противоопухолевой активности, что и нативный фермент. Мутагенная активность биназы и ее способность вызывать SOS-ответ напрямую зависят от уровня ее каталитической активности [44, 45]. Низкий уровень РНКазной активности позволит снизить токсическое воздействие биназы на организм.

Таким образом, в результате проведенного исследования нами подобрана экспрессионная система на основе *B. subtilis*, позволяющая получать высокоочищенные препараты мутантов биназы в препаративных количествах (25 мг/л). Экспериментально обоснована важность использования близкородственной системы экспрессии для получения рекомбинантной биназы с нативными физико-химическими свойствами. Оценен вклад РНКазной активности в цитотоксичность биназы и установлено, что остаточной активности 11% достаточно для цитотоксического действия биназы на опухолевые клетки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-10036) и Министерства науки и высшего образования

Российской Федерации в рамках программы “Приоритет-2030”.

В настоящем исследовании не использовали биологические материалы, полученные от людей и животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ulyanova V., Nadyrova A., Dudkina E., Kuznetsova A., Ahmetgalieva A., Faizullin D., Surchenko Y., Novopashina D., Zuev Y., Kuznetsov N., Ilinskaya O. (2022) Structural and functional differences between homologous bacterial ribonucleases. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1867.
2. Ильинская О.Н., Шах М.Р. (2014) Рибонуклеазы как противовирусные агенты. *Молекуляр. биология.* **48**, 707–717.
3. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. (2003) Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. *FEBS Lett.* **540**, 15–20.
4. Ardel T., Ardel W., Pozarowski P., Kunicki J., Shogen K., Darzynkiewicz Z. (2007) Cytostatic and cytotoxic properties of Amphinase: a novel cytotoxic ribonuclease from *Rana pipiens* oocytes. *Cell Cycle*. **6**, 3097–3102.
5. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. (2008) Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents. *BioEssays*. **30**, 781–790.
6. Митькевич В.А., Макаров А.А., Ильинская О.Н. (2014) Клеточные мишени противоопухолевых рибонуклеаз. *Молекуляр. биология.* **48**, 214–222.
7. Roiz L., Smirnov P., Bar-Eli M., Schwartz B., Shoseyov O. (2006) ACTIBIND, an actin-binding fungal T2-RNase with antiangiogenic and anticarcinogenic characteristics. *Cancer*. **106**, 2295–2308.
8. Leland P.A., Schultz L.W., Kim B.M., Raines R.T. (1998) Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 10407–10412.
9. Ilinskaya O.N., Vamvakas S. (1997) Nephrotoxic effects of bacterial ribonucleases in the isolated perfused rat kidney. *Toxicology*. **120**, 55–63.
10. Yakovlev G.I., Moiseyev G.P., Struminskaya N.K., Borzykh O.A., Kipenskaya L.V., Znamenskaya L.V., Leshchinskaya I.B., Chernokalskaya E.B., Hartley R.W. (1994) Mutational analysis of the active site of RNase of *Bacillus intermedius* (BINASE). *FEBS Lett.* **354**, 305–306.
11. Rosano, G.L., Ceccarelli E.A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5**, 172.
12. Yoon S.H., Kim S.K., Kim J.F. (2010) Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Recent Pat. Biotechnol.* **4**, 23–29.
13. Pohl S., Bhavsar G., Hulme J., Bloor A.E., Misirli G., Leckenby M.W., Radford D.S., Smith W., Wipat A., Williamson E.D., Harwood C.R., Cranenburgh R.M. (2013) Proteomic analysis of *Bacillus subtilis* strains engineered for improved production of heterologous proteins. *Proteomics*. **13**, 3298–3308.
14. Hartley R.W., Rogerson D.L. Jr., Smeaton J.R. (1972) Production and purification of the extracellular ribonuclease of *Bacillus amyloliquefaciens* (barnase) and its intracellular inhibitor (barstar). II. Barstar. *Prep. Biochem.* **2**, 243–250.
15. Herzberg C., Weidinger L.A.F., Dörrbecker B., Hübner S., Stülke J., Commichau F.M. (2007) SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein–protein interactions *in vivo*. *Proteomics*. **7**, 4032–4035.
16. Sambrook J., Russell D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Third Edition*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press.
17. Harwood C.R., Cutting S.M. (1991) *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Chichester: Wiley.
18. Kim R. (2011) Native agarose gel electrophoresis of multiprotein complexes. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2011**, 884–887.
19. Dudkina E., Ulyanova V., Shah Mahmud R., Khodzhaeva V., Dao L., Vershinina V., Kolpakov A., Ilinskaya O. (2016) Three-step procedure for preparation of pure *Bacillus altitudinis* ribonuclease. *FEBS Open Bio*. **6**, 24–32.
20. Li W., Zhou X., Lu P. (2004) Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Res. Microbiol.* **155**, 605–610.
21. Ульянова В.В., Ходжаева В.С., Дудкина Е.В., Лайков А.В., Вершинина В.И., Ильинская О.Н. (2015) Препараты секретируемой РНКазы *Bacillus pumilus*: один фермент или два? *Микробиология.* **84**, 425–425.
22. Makarov A.A., Protasevich I.I., Kuznetsova N.V., Fedorov B.B., Korolev S.V., Struminskaya N.K., Bazhulina N.P., Leshchinskaya I.B., Hartley R.W., Kirpichnikov M.P., Yakovlev G.I., Esipova N.G. (1993) Comparative study of thermostability and structure of close homologues – barnase and binase. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **10**, 1047–1065.
23. Голубенко И., Балабан Н., Лещинская И., Волкова Т., Клейнер Г., Чепурнова Н., Афанасенко Г., Дудкин С. (1979) Рибонуклеаза *Bacillus intermedius* 7P. Очистка хроматографией на фосфоцеллюлозе и некоторые характеристики гомогенного фермента. *Биохимия.* **44**(4), 640–648.
24. Шульга А.А., Окозов А.Л., Панов К.И., Курбанов Ф.Т., Чернов Б.К., Скрябин К.Г., Кирпичников М.П. (1994) Суперпродукция рибонуклеазы *Bacillus intermedius* 7P (биназы) в *E. coli*. *Молекуляр. биология.* **28**(2), 453–463.
25. Kaur J., Kumar A., Kaur J. (2018) Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: roadblocks and reinforcements. *Int. J. Biol. Macromol.* **106**, 803–822.
26. Bhatwa A., Wang W., Hassan Y.I., Abraham N., Li X.Z., Zhou T. (2021) Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **9**, 630551.
27. Zhang K., Su L., Wu J. (2020) Recent advances in recombinant protein production by *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **11**, 295–318.
28. Okorokov A.L., Panov K.I., Kolbanovskaya E.Y., Karpeisky M.Y., Polyakov K.M., Wilkinson A.J., Dodson G.G. (1996) Site-directed mutagenesis of the base recognition

- tion loop of ribonuclease from *Bacillus intermedius* (binase). *FEBS Lett.* **384**, 143–146.
29. Okorokov A.L., Panov K.I., Offen W.A., Mukhortov V.G., Antson A.A., Karpeisky M.Ya., Wilkinson A.J., Dodson G.G. (1997) RNA cleavage without hydrolysis. Splitting the catalytic activities of binase with Asn101 and Thr101 mutations. *Protein Eng.* **10**, 273–278.
 30. Yoshida H. (2001) The ribonuclease T1 family. *Methods Enzymol.* **341**, 28–41.
 31. Бачинский А.Г. (1976) Структура и помехоустойчивость генетического кода. *Журнал общей биологии.* **37**, 163–173.
 32. Sneath P.H. (1966) Relations between chemical structure and biological activity in peptides. *J. Theor. Biol.* **12**, 157–195.
 33. Castro J., Ribó M., Vilanova M., Benito A. (2021) Strengths and challenges of secretory ribonucleases as antitumor agents. *Pharmaceutics.* **13**, 82.
 34. Gotte G., Menegazzi M. (2019) Biological activities of secretory RNases: focus on their oligomerization to design antitumor drugs. *Front. Immunol.* **10**, 2626.
 35. Dudkina E.V., Ulyanova V.V., Ilinskaya O.N. (2020) Supramolecular organization as a factor of ribonuclease cytotoxicity. *Acta Naturae.* **12**, 24–33.
 36. Ilinskaya O., Singh I., Dudkina E., Ulyanova V., Kayumov A., Barreto G. (2016) Direct inhibition of oncogenic KRAS by *Bacillus pumilus* ribonuclease (binase). *Biochim. Biophys. Acta Mol.* **1863**, 1559–1567.
 37. Hollestelle A., Elstrodt F., Nagel J., Kallemeijn W., Schutte M. (2007) Phosphatidylinositol-3-OH kinase or RAS pathway mutations in human breast cancer cell lines. *Mol. Cancer Res.* **5**, 195–201.
 38. Medico E., Russo M., Picco G., Cancelliere C., Valtorta E., Corti G., Buscarino M., Isella M., Lamba S., Martinoglio B., Veronese S., Siena S., Sartore-Bianchi A., Beccuti M., Mottotese M., Linnebacher M., Cordero F., Di Nicolantonio F., Bardelli A. (2015) The molecular landscape of colorectal cancer cell lines unveils clinically actionable kinase targets. *Nat. Commun.* **6**, 7002.
 39. Chen Y. H., Lv H., Shen N., Wang X. M., Tang S., Xiong B., Ding J., Geng M., Huang, M. (2020) EPHA2 feedback activation limits the response to PDEδ inhibition in KRAS-dependent cancer cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **41**, 270–277.
 40. Ulyanova V., Dudkina E., Nadyrova A., Kalashnikov V., Surchenko Y., Ilinskaya O. (2020) The cytotoxicity of RNase-derived peptides. *Biomolecules.* **11**, 16.
 41. Зеленихин П.В., Еад Мохамед И.С., Надырова А.И., Сироткина А.А., Ульянова В.В., Миронова Н.Л., Митькевич В.А., Макаров А.А., Зенкова М.А., Ильинская О.Н. (2020) Рибонуклеаза *Bacillus pumilus* ингибирует миграцию клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80. *Молекуляр. биология.* **54**, 146–152.
 42. Alford S.C., Pearson J.D., Carette A., Ingham R.J., Howard P.L. (2009) Alpha-sarcin catalytic activity is not required for cytotoxicity. *BMC Biochem.* **10**, 9.
 43. Navarro S., Aleu J., Jiménez M., Boix E., Cuchillo C.M., Nogués M.V. (2008) The cytotoxicity of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3 on eukaryotic cell lines takes place through its aggregation on the cell membrane. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 324–337.
 44. Ilinskaya O., Ivanchenko O.B., Karamova N.S. (1995) Bacterial ribonuclease: mutagenic effect in microbial test-systems. *Mutagenesis.* **10**, 165–170.
 45. Ilinskaya O.N., Karamova N.S., Ivanchenko O.B., Kipenskaya L.V. (1996) SOS-inducing ability of native and mutant microbial ribonucleases. *Mutat. Res.* **354**, 203–209.

Efficiency of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* Expression Systems for Production of Binase Mutants

A. I. Nadyrova^{1, *}, A. S. Kosnyrev¹, V. V. Ulyanova¹, E. V. Dudkina¹,
V. I. Vershinina¹, and O. N. Ilinskaya¹

¹*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia*

^{*}*e-mail: alsu.nadyrova@yandex.ru*

Bacillus pumilus ribonuclease (binase) exhibits cytotoxic and oncolytic properties, while at high concentrations it causes genotoxic effects. The use of mutants with reduced catalytic activity preserving the antitumor properties of the native enzyme could reduce the toxic side effects of the enzyme. Here, mutant forms of binase with Lys26Ala and His101Glu single substitutions were obtained by site-directed mutagenesis. A comparative analysis of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*-based expression systems demonstrated the feasibility of using a bacilli-based heterologous system for production binase mutants. Binase mutants with reduced catalytic activity were isolated and purified with ion exchange chromatography in a homogeneous state with 25 mg/L yield. The catalytic properties of obtained mutants toward natural RNA-substrates in comparison with those for native binase were analyzed. The catalytic activity of the Lys26Ala and His101Glu mutants was 11 and 0.02%, respectively. It was found that the Lys26Ala mutant as well as the native binase exhibits selective cytotoxicity toward A549, BT-20 and HuTu 80 tumor cell lines, without causing toxic effects toward normal WI-38 cells. The mutant His101Glu did not exhibit cytotoxicity.

Keywords: ribonuclease, binase, expression system, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, catalytic activity, cytotoxicity

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК CD14+ МОНОЦИТОВ
ПРИ ПЕРВИЧНО-ПРОГРЕССИРУЮЩЕМ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

© 2023 г. И. С. Киселев^{а, *}, О. Г. Кулакова^а, О. А. Батурина^б, М. Р. Кабилов^б,
А. Н. Бойко^{а, с}, О. О. Фаворова^а

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

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

^сФедеральный центр мозга и нейротехнологий Федерального медико-биологического агентства России,
Москва, 117997 Россия

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

Поступила в редакцию 27.04.2023 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 02.05.2023 г.

Рассеянный склероз (РС) — хроническое аутоиммунно-воспалительное, нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы, характеризующееся значительной клинической гетерогенностью. У 10–15% пациентов развивается первично-прогрессирующий РС (ППРС), при котором, в отличие от наиболее частой ремиттирующей формы РС, происходит неуклонное развитие нейродегенерации и, как следствие, стойкое постепенное увеличение неврологической симптоматики. Одной из причин отличий в патогенезе двух форм РС могут быть особенности эпигенетической регуляции генной экспрессии. Метилирование ДНК — один из ключевых эпигенетических механизмов, обычно носит тканеспецифический характер и остается практически неизученным в различных клеточных популяциях больных ППРС. Целью настоящей работы стало выявление профилей дифференциального метилирования CpG-сайтов генома CD14+ моноцитов, характеризующих ППРС. При полногеномном анализе метилирования ДНК у больных ППРС и индивидов контрольной группы выявлено 169 дифференциально метилированных позиций, 90.5% которых гиперметилированы у больных ППРС. Более половины всех дифференциально метилированных позиций находятся в области известных генов и входят в состав CpG-островков и соседних с ними областей, что говорит об их высокой функциональной значимости. Нами идентифицированы шесть протяженных дифференциально метилированных регионов в области генов *OR2L13*, *CAT*, *LCLAT1*, *HOXA5*, *RNF39* и *CRTAC1*, связанных с воспалением и нейродегенерацией, что свидетельствует об активной эпигенетической регуляции экспрессии упомянутых генов.

Ключевые слова: первично-прогрессирующий рассеянный склероз, воспаление, нейродегенерация, метилирование ДНК, эпигенетическая регуляция

DOI: 10.31857/S002689842305004X, **EDN:** GVHYAT

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) — тяжелое хроническое аутоиммунно-воспалительное и нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), является основной причиной прогрессирующей инвалидизации молодых людей [1]. Развитие аутоиммунного процесса при

РС приводит к нарушению гематоэнцефалического барьера, инфильтрации иммунных клеток в ЦНС и последующему развитию демиелинизирующих поражений как головного, так и спинного мозга [2]. РС относят к числу комплексных заболеваний, которые развиваются под воздействием факторов внешней среды у генетически предрасположенных лиц. И генетические, и внешние факторы порознь умеренно влияют на риск развития РС, однако их совместное воздействие может приводить к резкому возрастанию риска, что предполагает их взаимодействие на молекулярном уровне [3]. Показано, что влияние многих факторов внешней среды опосредовано различ-

Сокращения: ДМП — дифференциально метилированная позиция; ДМР — дифференциально метилированный регион; МНК — моноклеонарные клетки; ППРС — первично-прогрессирующий рассеянный склероз; РС — рассеянный склероз, РРС — ремиттирующий рассеянный склероз; ЦНС — центральная нервная система; ЦСЖ — цереброспинальная жидкость; EDSS (Expanded Disability Status Scale) — расширенная шкала инвалидизации.

ными эпигенетическими механизмами [4], которые обеспечивают стабильное изменение экспрессии генов без изменения их нуклеотидной последовательности [5].

РС — гетерогенное заболевание. У большинства больных первоначально диагностируют ремиттирующую форму РС (РРС), при которой повторяющиеся эпизоды острой неврологической симптоматики (обострения) чередуются с полным или частичным восстановлением (ремиссией). Однако у 10–15% больных РС с самого начала развивается тяжелая первично-прогрессирующая форма РС (ППРС), при которой происходит стойкое постепенное накопление повреждений аксонов, гибель нейронов и, как следствие, увеличение неврологической симптоматики [6]. Кроме клинического течения, ППРС отличается от РРС и по механизмам развития патологического процесса [7]. Нейровоспаление выступает в качестве одного из основных факторов, связанных с развитием целого ряда нейродегенеративных заболеваний, включая РС, и характеризуется резкими изменениями эпигенетической регуляции [5]. К числу основных эпигенетических механизмов относится метилирование ДНК. В подавляющем большинстве случаев ДНК метилируется в положении C5 остатка цитозина в составе CpG-динуклеотидов (CpG-сайтов).

Полногеномный анализ метилирования ДНК позволил выявить отличия в профилях метилирования ДНК при РРС и у здоровых индивидов, причем характер отличий зависел от типа сравниваемых клеток и тканей больных [8–10].

Ранее нами впервые были обнаружены различия в профилях метилирования ДНК в мононуклеарных клетках периферической крови (МНК), которые позволяют отличить больных РРС, ППРС друг от друга и от здоровых индивидов [11]. Поскольку МНК представляют собой гетерогенную клеточную популяцию, выявление различий в профилях метилирования ДНК в отдельных субпопуляциях клеток крови может способствовать лучшему пониманию механизмов патогенеза ППРС. Впервые значительные отличия профилей метилирования ДНК в CD4⁺ Т-лимфоцитах больных ППРС и здоровых доноров были обнаружены в работе [12].

В настоящем исследовании мы сосредоточились на другой популяции МНК — CD14⁺ моноцитах, патогенный вклад которых в развитие РС реализуется через дифференцировку в макрофаги или дендритные клетки в ЦНС и выполнение эффекторных функций, связанных с модуляцией воспалительных реакций [13]. Профили метилирования ДНК CD14⁺ моноцитов в выборках больных ППРС и здоровых индивидов анализировали с использованием ДНК-микрочипов высокой плотности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Участники исследования. В состав исследуемых групп вошли восемь больных ППРС в возрасте 43 ± 9 лет (из них шесть женщин) и восемь здоровых добровольцев в возрасте 34 ± 9 лет (из них шесть женщин). До начала исследования больные не получали иммуномодулирующей терапии. Критерием исключения пациентов из исследования было наличие системного воспаления, других аутоиммунных или инфекционных заболеваний. Диагноз ППРС ставили в соответствии с критериями МакДональда [14]; средний балл пациентов по расширенной шкале инвалидизации (Expanded Disability Status Scale, EDSS) составил 4.29 ± 0.39 . Все участники исследования были, по данным анкетирования, этническими русскими. Проведение исследования одобрено этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ.

Выделение ДНК и анализ метилирования. Периферическую кровь индивидов собирали в пробирки с EDTA в качестве антикоагулянта; МНК получали центрифугированием на градиенте Фиколл-1077 Диаколл (“Диаэм”, Россия). CD14⁺ моноциты выделяли из МНК методом положительной селекции на иммуномагнитных микробусах, конъюгированных с анти-CD14-антителами (“Miltenyi Biotec”, Германия). Геномную ДНК из CD14⁺ моноцитов выделяли с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (“QIAGEN”, Германия), а затем подвергали бисульфитной конверсии с помощью набора EZ DNA Methylation-Gold Kit (“Zymo Research”, США). Уровни метилирования ДНК анализировали с использованием ДНК-микрочипов высокой плотности Infinium HumanMethylation450 BeadChip на сканере iScan (“Illumina”, США).

Анализ данных. Данные об уровнях метилирования анализировали с помощью пакета ChAMP v. 3.14 [15] и стандартных средств среды R. Из анализа исключали пробы, значение p обнаружения сигнала (detection p -value) в которых превышало 0.01; пробы, комплементарные нескольким участкам генома (multi-hit); SNP-содержащие пробы и пробы, расположенные в хромосомах X и Y. Данные метилирования нормализовали с использованием метода квантильной нормализации (beta-mixture quantile normalization method, BMIQ) [16], интегрированного в пакет ChAMP в виде функции champ.norm(). Наличие ковариат (пол и возраст) и пакетного эффекта (batch-эффекта) от разных “слайдов” проверяли путем анализа результатов сингулярного разложения (singular value decomposition analysis, SVD), реализованного в функции champ.SVD(). Для оценки уровня метилирования конкретного CpG-сайта вычисляли значение β , которое представляет собой отношение интенсивности сигнала метилирования от соответствующей пробы к сумме ин-

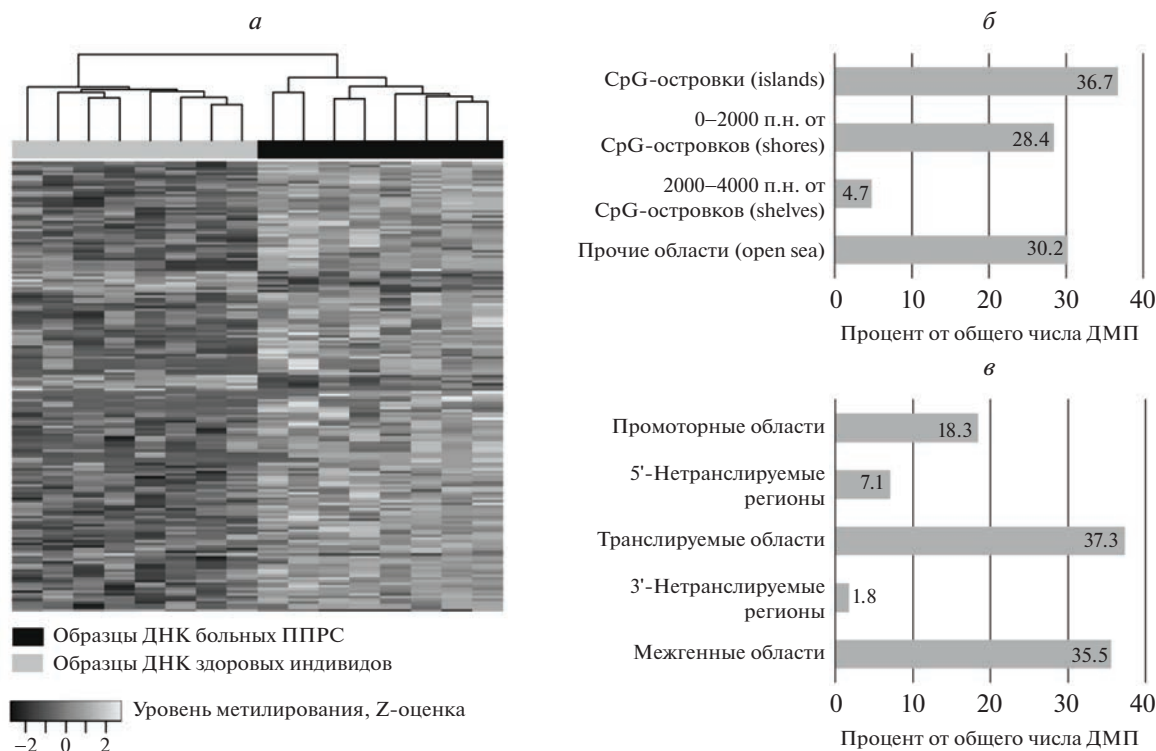


Рис. 1. Характеристика ДМП, идентифицированных в CD14+ моноцитах больных ППРС. *а* – Карта интенсивности сигналов ДМП у больных ППРС и здоровых индивидов. Градиент от черного к светло-серому отражает повышение уровня метилирования ДНК в исследуемых образцах. Дендрограмма сверху показывает иерархическую кластеризацию образцов: черным обозначены больные ППРС, светло-серым – здоровые индивиды. *б* – Локализация ДМП по отношению к функционально значимым скоплениям СрG-сайтов. *в* – Локализация ДМП по отношению к структурным элементам генов.

тенсивностей двух сигналов (метилированного и неметилированного) этой же пробы. Значения β варьировали в пределах от 0 (неметилированные пробы) до 1 (полностью метилированные пробы).

СрG-сайт рассматривали как дифференциально метилированную позицию (ДМП), если значение $|\Delta\beta|$ для него в сравниваемых группах было больше 0.1 (т.е. уровень метилирования отличался более чем на 10%) и определенная с помощью *t*-теста Стьюдента величина *p* была <0.01 . Локализацию СрG-сайтов по отношению к функционально значимым скоплениям СрG-сайтов и структурным элементам генов определяли с помощью стандартной аннотации UCSC genes в hg19.

Поиск дифференциально метилированных регионов (ДМР) осуществляли с использованием пакета Bumphunter v. 3.16 [17], интегрированного в алгоритм ChAMP в виде функции champ.DMR(). Регион считали ДМР, если он содержал не менее семи СрG-сайтов с уровнями метилирования, одинаково измененными у больных ППРС, а соответствующая величина *p* в пермутационном тесте была меньше 0.01.

Данные визуализировали, используя пакеты gplots v. 3.1.1, ggplot2 v. 3.3.5 и стандартные средства среды R. Для построения карт интенсивно-

сти сигналов ДМП применяли стандартизованную Z-оценку уровней метилирования – безразмерный статистический показатель, удобный для сравнения значений разной размерности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полногеномное профилирование метилирования ДНК выполнено в CD14+ моноцитах восьми больных ППРС и восьми здоровых индивидов контрольной группы. Первичную фильтрацию и контроль качества прошли 408875 СрG-сайтов. SVD-анализ показал, что batch-эффект, а также пол и возраст включенных в исследование индивидов не являются значимыми ковариантами, поэтому мы не включали их в дальнейший анализ.

При сравнении уровней метилирования ДНК в исследуемых группах идентифицировано 169 ДМП; их характеристика представлена на рис. 1. Как видно из рис. 1а, выявленный набор ДМП хорошо отличает больных ППРС от здоровых добровольцев, при этом у больных гиперметилировано подавляющее большинство ДМП (153, 90.5%).

Большинство ДМП расположено в СрG-островках или в пределах 2000 п.н. от них (36.7 и 28.4% соответственно). Вне известных скоплений

Таблица 1. Характеристика ДМП-содержащих генов, выявленных при анализе метилирования ДНК CD14+ моноцитов больных ППРС и здоровых индивидов

Уровень метилирования ДМП у больных ППРС	Категория генов		
	гены, кодирующие белки	РНК-гены	псевдогены
Повышен	<i>ABI2</i> , <i>AGAP2</i> (2), <i>ANKMY1</i> (2), <i>AP2S1</i> , <i>BANP</i> , <i>C19orf77</i> , <i>C6orf27</i> , <i>C8orf73</i> (2), <i>CACNB2</i> , <i>CARS</i> , <i>CAT</i> , <i>CCDC81</i> , <i>CHL1</i> (2), <i>CLDN12</i> , <i>CLIP2</i> , <i>CPXM1</i> , <i>CRTAC1</i> (3), <i>CYP2D6</i> , <i>DDO</i> (2), <i>DYRK1B</i> , <i>EDN3</i> , <i>ENOSF1</i> , <i>ERICH1</i> (3), <i>GALNT9</i> (3), <i>GGA2</i> , <i>GPR124</i> , <i>HHLA2</i> , <i>HKR1</i> (2), <i>IGF2BP1</i> (5), <i>IGSF9B</i> (2), <i>IMMT</i> , <i>KDM4B</i> , <i>KIAA1161</i> (2), <i>KIAA1274</i> , <i>KLHL8</i> (2), <i>LCLAT1</i> (3), <i>LSP1</i> , <i>MATN4</i> , <i>NCKAP5</i> , <i>NPAS3</i> , <i>NR4A2</i> , <i>OR2L13</i> (8), <i>PCDH12</i> , <i>PRKCZ</i> , <i>PRKD3</i> , <i>QDPR</i> , <i>RAB17</i> , <i>RAPGEF4</i> , <i>RCCD1</i> , <i>RHOJ</i> (2), <i>SLC12A7</i> , <i>SLC25A2</i> , <i>SLC46A2</i> , <i>SPAG1</i> , <i>SRGAP1</i> , <i>STK32C</i> (2), <i>TACR1</i> , <i>TAGLN</i> , <i>TBX21</i> , <i>TECR</i> , <i>TGFBI</i> , <i>TLE2</i> , <i>TNR</i> (2), <i>TULP1</i> , <i>WRNIP1</i> , <i>ZDNHC4</i> , <i>ZNF83</i> , <i>ZP2</i>	<i>HCG4P6</i>	<i>HLA-H</i>
Снижен	<i>BARX2</i> , <i>DTX1</i> , <i>HOPX</i> , <i>LPCAT1</i> , <i>PPP5C</i> , <i>PTPRN2</i> , <i>RGS6</i> , <i>SEC14L1</i>	—	—

Примечание. Если ген содержит более одного ДМП, то их число указано в скобках при названии гена. Жирным шрифтом отмечены гены, содержащие ДМП, уровни метилирования которых различаются между сравниваемыми группами более чем на 20%.

СрG-сайтов локализовано только 30.2% ДМП (рис. 1б). Сто девять ДМП (64.5% от общего числа) располагаются в области 78 известных генов, преимущественно в их транскрибируемых регионах (37.3%); в промоторных областях генов лежат 18.3% ДМП, в 5'- и 3'-нетранскрибируемых областях — 7.1 и 1.8% ДМП соотв. (рис. 1в). Абсолютное большинство выявленных генов (97.4%) относятся к белоккодирующим (табл. 1). Повышение уровня метилирования при ППРС более чем на 20% наблюдали в 13 ДМП в семи генах: *ERICH1* (cg01053087 и cg05875700), *HCG4P6* (cg18786623), *IGF2BP1* (cg18128536), *LCLAT1* (cg12454169, cg17749961 и cg15652532), *NPAS3* (cg11787167), *OR2L13* (cg20433858, cg08260406, cg08944170 и cg20507276), *RHOJ* (cg07157030).

Нами проведен поиск ДМП, располагающихся в непосредственной близости от известных генов, с целью идентификации генов, подвергающихся выраженной регуляции экспрессии путем метилирования ДНК. В результате были идентифицированы шесть кандидатных ДМП в области генов *OR2L13*, *CAT*, *LCLAT1*, *HOXA5*, *RNF39* и *CRTAC1* (табл. 2). Дифференциальное метилирование четырех из этих генов: *OR2L13*, *CAT*, *LCLAT1* и *CRTAC1* выявлено и на уровне отдельных ДМС (см. табл. 1).

Анализ карт выявленных ДМП (рис. 2) показывает, что все они, как и можно ожидать, гиперметилированы у больных ППРС и в большинстве случаев располагаются в СрG-островках и соседних с ними областях. ДМП *OR2L13*, *CAT*, *LCLAT1* и *HOXA5* затрагивают промоторные регионы генов, а ДМП *RNF39* располагается в транскрибируемой области. ДМП *CRTAC1* не только находится в

теле гена, но и лежит за пределами известных скоплений СрG-сайтов. ДМП *LCLAT1* — самый короткий, он характеризуется наибольшими различиями уровней метилирования между сравниваемыми группами. К сожалению, технические ограничения HumanMethylation450 BeadChip не позволяют расширить его анализ дальше в 5'-область для более подробного изучения ландшафта метилирования промотора гена *LCLAT1* (ближайший детектируемый СрG-сайт лежит на расстоянии около 20 т.п.н.). ДМП в области генов *HOXA5* и *RNF39*, достаточно протяженные по сравнению с другими, но характеризуются большой дисперсией индивидуальных значений и невыраженными различиями уровней метилирования между группами, не превышающими 10%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе настоящего исследования нами впервые выявлены значительные изменения профилей метилирования ДНК в CD14+ клетках больных ППРС при сравнении со здоровыми индивидами, позволяющие уверенно дискриминировать эти две группы (см. рис. 1). Показано, что у пациентов с ППРС гиперметилировано 90.5% ДМП. Эти данные хорошо согласуются с полученными нами ранее результатами анализа ДНК из CD4+ лимфоцитов и МНК больных ППРС, где гиперметилированными оказались 81 и 86% выявленных ДМП соответственно [11, 12].

Настоящее исследование является единственным, выполненным на CD14+ моноцитах больных ППРС, поэтому сопоставлять данные о глобальных уровнях метилирования ДНК в этой популяции

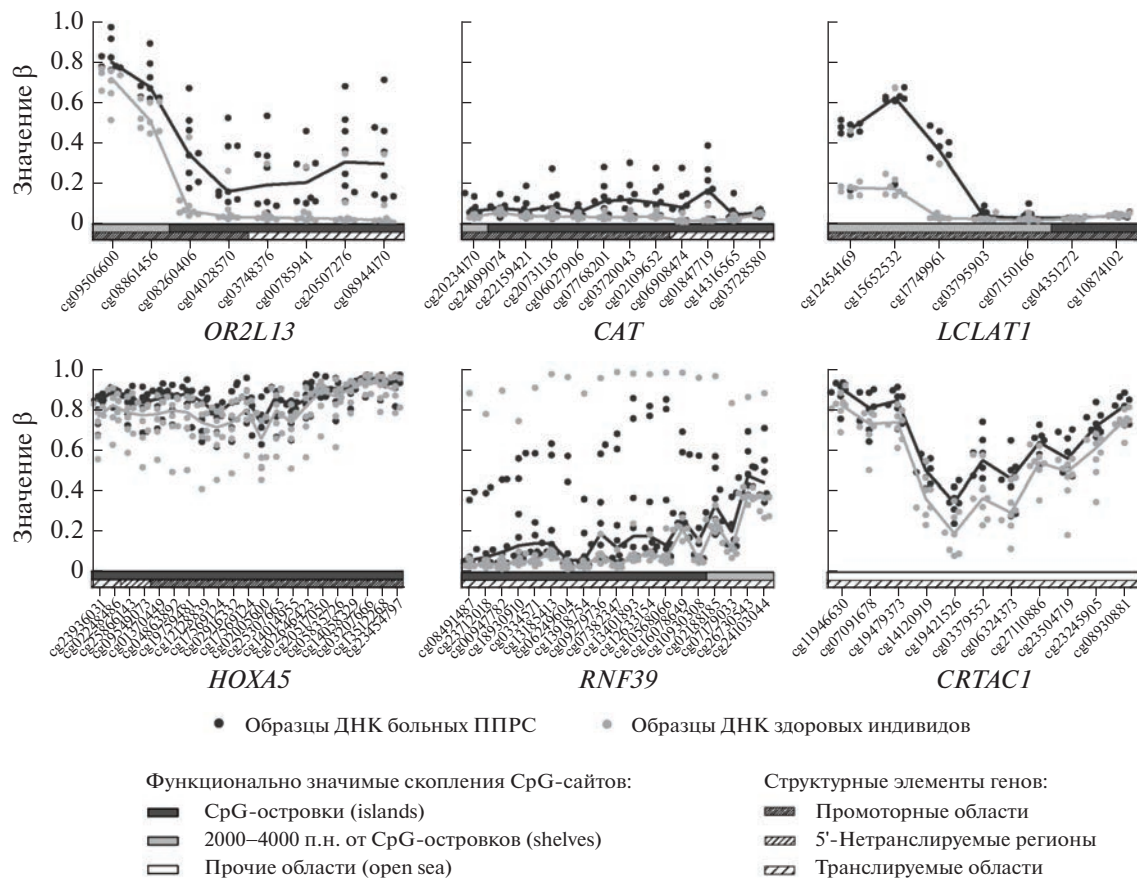


Рис. 2. Карты ДМР, выявленных при анализе метилирования ДНК CD14⁺ моноцитов больных ППРС и здоровых индивидов. Идентификаторы CpG-сайтов, образующих ДМР, даны согласно стандартной аннотации Illumina в подписи к оси абсцисс; их локализация на оси схематически представлена по отношению к функционально значимым скоплениям CpG-сайтов и к структурным элементам генов (изображены на верхней и нижней полосках соответственно). Точками показаны уровни метилирования CpG-сайтов, образующих ДМР, у каждого отдельного больного ППРС (черный цвет) или здорового индивида (светло-серый цвет). Результирующие кривые тех же цветов проведены через медианные значения уровней метилирования CpG-сайтов внутри каждой группы.

лейкоцитов мы можем только с результатами, полученными для РРС. У больных РРС также выявлено гиперметилирование ДНК, однако его уровень существенно ниже (61.1%), чем при ППРС [18]. Эти данные подтверждают высказанное нами ранее предположение [12], что более высокие уровни метилирования ДНК иммунных клеток позволяют отличить ППРС от РРС.

Общепризнанно, что воспаление, наряду с нейродегенерацией, является одним из основных патогенетических механизмов РС. Причем эти процессы вносят разный вклад при разных формах РС: так, при РРС лидирующую роль играет аутоиммунное воспаление, а при ППРС – нейродегенерация. Полученные нами результаты согласуются с этими представлениями. Сравнение

Таблица 2. Характеристика ДМР в области известных генов, идентифицированных в CD14⁺ моноцитах больных ППРС

Ген, содержащий ДМР	Координаты ДМР	Длина ДМР, п.н.	Количество CpG-сайтов, образующих ДМР	Значение p
OR2L13	chr1: 248100228–248100614	386	8	9.7×10^{-6}
CAT	chr11: 34460107–34460856	749	12	0.0010
LCLAT1	chr2: 30669597–30670025	428	7	0.0029
HOXA5	chr7: 27183133–27183990	857	21	0.0020
RNF39	chr6: 30039130–30039801	671	19	0.0037
CRTAC1	chr10: 99734081–99735202	1121	11	0.0051

профилей метилирования, выявленных в настоящей работе, при ППРС и в контрольной группе, показывают существенные отличия от результатов аналогичного сравнения, проведенного нами ранее для РРС [18]. Действительно, только восемь из 169 ДМП, обнаруженных в настоящей работе, оказались общими в двух формах РС. Это гиперметилированные *cg07400503* (ген *STK32C*), *cg08754268* (*RAPGEF4*), *cg14809332* и *cg19878482* (*C8orf73*), *cg07581775*, *cg16039660* и *cg27462975* (межгенные области), а также гипометилированный *cg11575295* (*PTPRN2*). Эти данные дают основание предполагать, что большинство выявленных ДМП специфичны для ППРС, а не обусловлены системным воспалением.

Анализ локализации ДМП, выявленных нами при ППРС, показал, что более 60% из них расположены в CpG-островках или в соседних с ними областях (в пределах 2000 п.н. от CpG-островка), и около 70% ДМП расположены в области генов, включая промоторную область и 5'- и 3'-районы (см. рис. 1). Эти данные указывают на функциональное значение выявленного профиля метилирования.

К сожалению, отдельные ДМП, если они не подтверждены на обширных независимых выборках больных, сложно рассматривать в качестве надежных маркеров нарушений эпигенетической регуляции экспрессии близлежащих генов, так как изменения метилирования этих ДМП могут быть связаны не только с патологическим состоянием, но и, например, с генетическими особенностями пациентов [19]. Поэтому далее мы сосредоточились на поиске протяженных дифференциально метилированных регионов (ДМР), каждый из которых включает несколько CpG-сайтов с однонаправленными изменениями метилирования.

Нами идентифицированы ДМР в области шести генов: *OR2L13*, *CAT*, *LCLAT1*, *HOXA5*, *RNF39* и *CRTAC1* (см. табл. 2 и рис. 2). Присутствие этих регионов с протяженными изменениями уровней метилирования свидетельствует с высокой вероятностью об активной эпигенетической регуляции экспрессии упомянутых генов. Здесь следует отметить, что, хотя все выявленные ДМР характеризуются повышенным уровнем метилирования при ППРС, опрометчиво предполагать, что во всех случаях происходит подавление экспрессии содержащих их генов. В соответствии с современными представлениями, даже гиперметилирование промоторов генов, которое традиционно связывают с репрессорными эффектами, может приводить не только к снижению, но и к повышению экспрессии, а в некоторых случаях и вовсе не влиять на нее [20]. К сожалению, пока мы не можем дать ответ на вопрос, к каким изменениям в профиле экспрессии приводит дифференциальное метилирование выявленных ДМР-содержащих

генов в моноцитах. Мы надеемся, что этот вопрос станет темой наших будущих исследований.

Наши результаты говорят в пользу нарушения эпигенетической регуляции экспрессии ДМР-содержащего гена *CAT* у больных с ППРС. Его экспрессия обнаруживается во многих клетках и тканях организма, в том числе в различных популяциях лейкоцитов. Каталаза, кодируемая геном *CAT*, является важнейшим антиоксидантным ферментом пероксисом, расщепляющим пероксид водорода до воды и молекулярного кислорода, и потому играет ключевую роль в функционировании клеток врожденного иммунитета, к которым относятся и CD14⁺ моноциты. Гиперметилирование этого гена у больных ППРС обнаружено нами только в CD14⁺ моноцитах, но не в CD4⁺ лимфоцитах [12]. Можно представить, что сниженная антиоксидантная модальность моноцитов может иметь некоторую патологическую значимость при ППРС. Также показано, что активность каталазы в плазме и ЦСЖ больных РС повышена по сравнению со здоровыми индивидами [21], а ее сверхэкспрессия уменьшает повреждение зрительного нерва в мышинной модели РС [22]. Оба этих явления могут быть связаны с активацией механизмов защиты клеток от окислительного стресса при развитии заболевания.

Еще два ДМР-содержащих гена, *HOXA5* и *RNF39*, в норме экспрессируются в лейкоцитах на низких уровнях. *HOXA5* кодирует транскрипционный фактор, участвующий в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и инвазии опухолей [23]; его возможная роль в патогенезе ППРС остается неясной, но может быть связана с регуляцией p53-опосредованного апоптоза.

Пока малоизученный ген *RNF39*, кодирующий убиквитин-лигазу, успел привлечь внимание исследователей в связи с его возможной ролью в процессах, связанных с регуляцией экспрессии интерферонов первого типа в клетках врожденного иммунитета [24]. Дифференциальное метилирование *RNF39* выявлено при различных аутоиммунных и воспалительных заболеваниях, таких как болезнь Бехчета, системная красная волчанка, аллергический ринит [25–27], что указывает на важную роль этого гена в патогенезе заболеваний, связанных с нарушениями функций иммунной системы. Важно отметить повышенный уровень метилирования *RNF39* также при другой, ремиттирующей, форме РС [9]. Более того, все 11 дифференциально метилированных CpG-сайтов, выявленных при РРС [9], обнаружены и нами в составе ДМР, причем все они были гиперметилированы при обеих формах РС.

Функции трех остальных ДМР-содержащих генов — *OR2L13*, *LCLAT1* и *CRTAC1* — активно изучаются в клетках ЦНС, и причины изменения их метилирования в моноцитах крови пока оста-

ются неясными. Гиперметилирование этих же генов выявлено нами и в CD4⁺ лимфоцитах больных ППРС при сравнении со здоровыми индивидами [12]. Изменения в метилировании генов, вовлеченных в функционирование нервной системы, наблюдали в клетках крови и при вторично прогрессирующем РС [28, 29]. В совокупности объем накапливающихся данных может указывать на перспективность оценки уровней метилирования подобных генов в легкодоступном биоматериале — клетках крови — как маркеров изменений, происходящих в ЦНС больных РС.

Проведенный нами анализ впервые позволил идентифицировать профиль метилирования ДНК в CD14⁺ моноцитах, характерный для ППРС и согласующийся с результатами предыдущих исследований, что свидетельствует об универсальности некоторых эпигенетических механизмов при разных формах РС. Новые данные, полученные в ходе настоящего исследования, указывают на значительные изменения метилирования генов *OR2L13*, *CAT*, *LCLAT1*, *HOXA5*, *RNF39* и *CRTAC1*. Мы надеемся, что эти результаты (после их подтверждения на независимых выборках) будут способствовать выявлению новых мишеней для терапии ППРС и углублению знаний об особенностях патогенеза этой формы РС.

Анализ уровней метилирования ДНК проводили в Центре коллективного пользования “Геномика” (ИХБФМ СО РАН)

Исследование выполнено в рамках Государственного задания РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России № 121040600400–8.

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 из включенных в исследование участников получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Filippi M., Bar-Or A., Piehl F., Preziosa P., Solari A., Vukusic S., Rocca M.A. (2018) Multiple sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primers*. **4**, 43.
- Dendrou C.A., Fugger L., Friese M.A. (2015) Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 545–558.
- Olsson T., Barcellos L.F., Alfredsson L. (2017) Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **13**, 25–36.
- Waubant E., Lucas R., Mowry E., Graves J., Olsson T., Alfredsson L., Langer-Gould A. (2019) Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **6**, 1905–1922.
- Giallongo S., Longhitano L., Denaro S., D’Aprile S., Torrisi F., La Spina E., Giallongo C., Mannino G., Lo Furno D., Zappalà A., Giuffrida R., Parenti R., Li Volti G., Tibullo D., Vicario N. (2022) The role of epigenetics in neuroinflammatory-driven diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 15218.
- Koch M., Kingwell E., Rieckmann P., Tremlett H. (2009) The natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Neurology*. **73**, 1996–2002.
- Correale J., Gaitán M.I., Ysraelit M.C., Fiol M.P. (2017) Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment. *Brain*. **140**, 527–546.
- Huynh J.L., Garg P., Thin T.H., Yoo S., Dutta R., Trapp B.D., Haroutunian V., Zhu J., Donovan M.J., Sharp A.J., Casaccia P. (2014) Epigenome-wide differences in pathology-free regions of multiple sclerosis-affected brains. *Nat. Neurosci.* **17**, 121–130.
- Maltby V.E., Lea R.A., Sanders K.A., White N., Benton M.C., Scott R.J., Lechner-Scott J. (2017) Differential methylation at MHC in CD4⁺ T cells is associated with multiple sclerosis independently of HLA-DRB1. *Clin. Epigenetics*. **9**, 71.
- Maltby V.E., Graves M.C., Lea R.A., Benton M.C., Sanders K.A., Tajouri L., Scott R.J., Lechner-Scott J. (2015) Genome-wide DNA methylation profiling of CD8⁺ T cells shows a distinct epigenetic signature to CD4⁺ T cells in multiple sclerosis patients. *Clin. Epigenetics*. **7**, 118.
- Кулакова О.Г., Кабилов М.Р., Данилова Л.В., Попова Е.В., Батурина О.А., Царева Е.Ю., Баулина Н.М., Киселев И.С., Бойко А.Н., Фаворов А.В., Фаворова О.О., Власов В.В. (2016) Полногеномный анализ метилирования ДНК мононуклеарных клеток крови больных различными формами рассеянного склероза. *Acta Naturae*. **8**, 39–47.
- Киселев И.С., Кулакова О.Г., Данилова Л.В., Батурина О.А., Кабилов М.Р., Попова Е.В., Бойко А.Н., Фаворова О.О. (2022) Полногеномный анализ метилирования ДНК CD4⁺ Т-лимфоцитов больных первично-прогрессирующим рассеянным склерозом свидетельствует о вовлеченности этого эпигенетического процесса в иммунопатогенез заболевания. *Молекуляр. биология*. **56**, 468–475.
- Ashhurst T.M., van Vreden C., Niewold P., King N.J.C. (2014) The plasticity of inflammatory monocyte responses to the inflamed central nervous system. *Cell. Immunol.* **291**, 49–57.
- Thompson A.J., Banwell B.L., Barkhof F., Carroll W.M., Coetzee T., Comi G., Correale J., Fazekas F., Filippi M., Freedman M.S., Fujihara K., Galetta S.L., Hartung H.P., Kappos L., Lublin F.D., Marrie R.A., Miller A.E., Miller D.H., Montalban X., Mowry E.M., Sorensen P.S., Tintoré M., Traboulsee A.L., Trojano M., Uitendhaag B.M.J., Vukusic S., Waubant E., Weinshenker B.G., Reingold S.C., Cohen J.A. (2018) Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* **17**, 162–173.
- Tian Y., Morris T.J., Webster A.P., Yang Z., Beck S., Feber A., Teschendorff A.E. (2017) ChAMP: updated methylation analysis pipeline for Illumina BeadChips. *Bioinformatics*. **33**, 3982–3984.
- Teschendorff A.E., Marabita F., Lechner M., Bartlett T., Tegner J., Gomez-Cabrero D., Beck S. (2013) A beta-

- mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. *Bioinformatics*. **29**, 189–196.
17. Jaffe A.E., Murakami P., Lee H., Leek J.T., Fallin M.D., Feinberg A.P., Irizarry R.A. (2012) Bump hunting to identify differentially methylated regions in epigenetic epidemiology studies. *Int. J. Epidemiol.* **41**, 200–209.
 18. Kiselev I., Danilova L., Baulina N., Baturina O., Kabilov M., Boyko A., Kulakova O., Favorova O. (2022) Genome-wide DNA methylation profiling identifies epigenetic changes in CD4⁺ and CD14⁺ cells of multiple sclerosis patients. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **60**, 103714.
 19. Philibert R.A., Terry N., Erwin C., Philibert W.J., Beach S.R., Brody G.H. (2014) Methylation array data can simultaneously identify individuals and convey protected health information: an unrecognized ethical concern. *Clin. Epigenetics*. **6**, 28.
 20. de Mendoza A., Nguyen T.V., Ford E., Poppe D., Buckberry S., Pflueger J., Grimmer M.R., Stolzenburg S., Bogdanovic O., Oshlack A., Farnham P.J., Blancafort P., Lister R. (2022) Large-scale manipulation of promoter DNA methylation reveals context-specific transcriptional responses and stability. *Genome Biol.* **23**, 163.
 21. Ibitoye R., Kemp K., Rice C., Hares K., Scolding N., Wilkins A. (2016) Oxidative stress-related biomarkers in multiple sclerosis: a review. *Biomark. Med.* **10**, 889–902.
 22. Guy J., Qi X., Hauswirth W.W. (1998) Adeno-associated viral-mediated catalase expression suppresses optic neuritis in experimental allergic encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 13847–13852.
 23. Fan F., Mo H., Zhang H., Dai Z., Wang Z., Qu C., Liu F., Zhang L., Luo P., Zhang J., Liu Z., Cheng Q., Ding F. (2022) HOXA5: A crucial transcriptional factor in cancer and a potential therapeutic target. *Biomed. Pharmacother.* **155**, 113800.
 24. Jia X., Zhao C., Zhao W. (2021) Emerging roles of MHC class I region-encoded E3 ubiquitin ligases in innate immunity. *Front. Immunol.* **12**, 687102.
 25. Kurata R., Nakaoka H., Tajima A., Hosomichi K., Shiina T., Meguro A., Mizuki N., Ohono S., Inoue I., Inoko H. (2010) TRIM39 and RNF39 are associated with Behçet's disease independently of HLA-B*51 and -A*26. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **401**, 533–537.
 26. Renauer P., Coit P., Jeffries M.A., Merrill J.T., McCune W.J., Maksimowicz-McKinnon K., Sawalha A.H. (2015) DNA methylation patterns in naïve CD4⁺ T cells identify epigenetic susceptibility loci for malar rash and discoid rash in systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci. Med.* **2**, e000101.
 27. Morin A., Laviolette M., Pastinen T., Boulet L.-P., Laprise C. (2017) Combining omics data to identify genes associated with allergic rhinitis. *Clin. Epigenetics*. **9**, 3.
 28. Campagna M.P., Xavier A., Lea R.A., Stankovich J., Maltby V.E., Butzkueven H., Lechner-Scott J., Scott R.J., Jokubaitis V.G. (2022) Whole-blood methylation signatures are associated with and accurately classify multiple sclerosis disease severity. *Clin. Epigenetics*. **14**, 194.
 29. Ewing E., Kular L., Fernandes S.J., Karathanasis N., Lagani V., Ruhmann S., Tsamardinos I., Tegner J., Piehl F., Gomez-Cabrero D., Jagodic M. (2019) Combining evidence from four immune cell types identifies DNA methylation patterns that implicate functionally distinct pathways during multiple sclerosis progression. *EBioMedicine*. **43**, 411–423.

DNA Methylation Profile of CD14⁺ Monocytes Changes in Primary Progressive Multiple Sclerosis

I. S. Kiselev^{1,*}, O. G. Kulakova¹, O. A. Baturina², M. R. Kabilov²,
A. N. Boyko^{1,3}, and O. O. Favorova¹

¹Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 117997 Russia

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

³Federal Center for Brain and Neurotechnology, Federal Medical-Biological Agency, Moscow, 117997 Russia

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

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune inflammatory and neurodegenerative disease of the central nervous system, characterized by significant clinical heterogeneity. In 10–15% of patients, primary progressive MS (PPMS) develops, in which, unlike the most common relapsing-remitting form of MS, neurodegeneration steadily progresses and, as a consequence, neurological symptoms continuously increase. Peculiarities of epigenetic regulation of gene expression may be one of the reasons for the differences in the pathogenesis of two MS forms. DNA methylation is one of the key epigenetic mechanisms that remains almost unexplored in different cell populations of PPMS patients. The aim of this work was to identify differential methylation profiles of CpG sites in the CD14⁺ monocyte DNA that characterize PPMS. Genome-wide analysis of DNA methylation in PRMS patients and healthy individuals identified 169 differentially methylated positions (DMPs), 90.5% of which were hypermethylated in PRMS patients. More than half of all DMPs are located in/near known genes and within CpG islands and their neighboring regions, which indicates their high functional significance. We found six differentially methylated regions (DMRs) in genes *OR2L13*, *CAT*, *LCLAT1*, *HOXA5*, *RNF39*, and *CRTAC1* involved in inflammation and neurodegeneration, which indicates active epigenetic regulation of their expression.

Keywords: primary progressive multiple sclerosis, inflammation, neurodegeneration, DNA methylation, epigenetic regulation

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОМА В ОБЛАСТИ
2q32.1 С РАЗВИТИЕМ ВАЗОВАГАЛЬНЫХ ОБМОРОКОВ

© 2023 г. Н. А. Матвеева^{a, b, *}, Б. В. Титов^{a, b}, Е. А. Базылева^a, Е. А. Кучинская^a, М. С. Козин^{a, b},
А. В. Фаворов^c, А. В. Певзнер^a, О. О. Фаворова^{a, b}

^aНациональный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 121552 Россия

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

^cJohns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD, 21205 USA

*e-mail: natalijamat@rambler.ru

Поступила в редакцию 28.04.2023 г.

После доработки 10.05.2023 г.

Принята к публикации 10.05.2023 г.

Вазовагальные обмороки (ВВО) — самая распространенная форма синкопальных состояний. Механизмы развития ВВО до конца не выяснены. Известно, что к этому заболеванию существует генетическая предрасположенность, однако данные о роли отдельных генов довольно противоречивы. Недавно на хромосоме 2 с помощью полногеномного поиска был идентифицирован локус 2q32.1, ассоциированный с объединенной группой заболеваний — обмороками и коллапсом. Среди однонуклеотидных полиморфизмов этого локуса самая значимая ассоциация наблюдалась для rs12465214. На однородной по диагнозу ВВО выборке пациентов мы проанализировали связь rs12465214, rs12621296, rs17582219 и rs1344706 из области 2q32.1 с этой формой обмороков и показали, что по отдельности с ВВО ассоциирован только rs12621296, тогда как ассоциация других однонуклеотидных полиморфизмов с заболеванием наблюдалась только в составе биаллельных сочетаний. Выявлено эпистатическое взаимодействие между компонентами сочетания rs12621296*А + rs17582219*А. Обсуждается возможная вовлеченность отдельных генов, локализованных в области 2q32.1, в формирование генетической архитектуры ВВО.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, генетическая предрасположенность, синкопальные состояния, вазовагальные обмороки

DOI: 10.31857/S0026898423050130, **EDN:** RLLOAN

ВВЕДЕНИЕ

Обмороки, или синкопе, представляют собой состояния, характеризующиеся транзиторной потерей сознания; их испытывает каждый третий человек хотя бы раз в жизни. Этиология обмороков весьма гетерогенна и до конца не ясна. К наиболее часто встречающимся синкопальным состояниям относятся вазовагальные обмороки (ВВО). Для этого многофакторного заболевания выявлена генетическая предрасположенность. Хотя выявление генетической составляющей ВВО затруднено из-за ряда факторов, таких как высокая распространенность, трудности дифференциальной диагностики различных видов обмороков и наличие

коморбидности, обнаружены полиморфные варианты генов, ассоциированные с этим заболеванием [1, 2]. Подавляющее большинство этих исследований проведено с применением подхода “ген-кандидат” на небольших выборках. Исключение составляют два исследования [3, 4]. В работе К. Hadji-Turdeghal и соавт. [3] с помощью полногеномного поиска ассоциаций (Genome-Wide Association Studies, GWAS) на обширной выборке пациентов из ресурса Британского биобанка (The UK Biobank resource), страдающих, согласно Международной классификации заболеваний, обмороками или коллапсом (код 780.2 по МКБ-9 и код R55 по МКБ-10), была показана значимая на полногеномном уровне ($P < 5 \times 10^{-8}$) ассоциация этих состояний с однонуклеотидными полиморфизмами (SNP) в области 2q32.1. Самой значимой оказалась ассоциация с rs12465214 ($P = 5.8 \times 10^{-15}$), что позже подтвердили в мета-анализе [4]. К. Hadji-Turdeghal и соавт. [3] предположили, что ассоци-

Сокращения: ВВО — вазовагальный обморок; FLINT (Fisher-like interaction numeric test) — точный трехфакторный тест, подобный критерию Фишера; GWAS (Genome-Wide Association Studies) — полногеномный поиск ассоциаций; SF (synergy factor) — фактор синергии; SNP (single nucleotide polymorphism) — однонуклеотидный(е) полиморфизм(ы).

ация rs12465214 с ВВО определяется непосредственной близостью этого SNP к гену *ZNF804A*. Кодированный этим геном транскрипционный фактор C2H2-типа, содержащий цинковый палец 804A (*ZNF804A*), может играть центральную роль в сети белок-белковых взаимодействий, участвуя в различных регуляторных и сигнальных путях, вовлеченных в процессы развития обмороков и коллапса. Однако прямых данных, свидетельствующих о роли гена *ZNF804* в патогенезе обмороков и коллапса, нет.

Представляет несомненный интерес провести анализ ассоциации исследованных в работе [3] SNP в области 2q32.1 в подгруппах индивидов, страдающих различными типами синкопе. Мы провели анализ ассоциации rs12465214 с риском возникновения ВВО — самой распространенной формой обмороков — на однородной выборке таких больных и включили в анализ еще два SNP: rs12621296 и rs17582219, — которые расположены в области 2q32.1 рядом с rs12465214. Эти SNP также были исследованы К. Hadji-Turdeghal и соавт. [3] на объединенной группе пациентов с обмороками и коллапсом. Исходя из предположения авторов о роли гена *ZNF804* в патогенезе этой группы заболеваний, мы добавили в панель также SNP rs1344706, локализованный в интроне 2 гена *ZNF804A*. Ассоциацию этих SNP с ВВО анализировали по отдельности и в составе биаллельных сочетаний друг с другом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования. Исследование генетической предрасположенности к ВВО проводили методом “случай—контроль”. В исследование были включены пациенты Института клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова ФГБУ “НМИЦК им. акад. Е.И. Чазова” Минздрава России: 175 неродственных больных ВВО (средний возраст 34.5 ± 15.7 лет), из них 63 мужчины (средний возраст 34.5 ± 15.5 лет) и 117 женщин (средний возраст 36 ± 15.9 лет). Диагноз ВВО ставили на основе комплексного исследования, включающего анализ клинических данных и результаты инструментального обследования. Во всех случаях были исключены иные (кардиальные, неврологические и метаболические) причины приступов потери сознания.

Контрольная группа включала 200 индивидов (средний возраст 36.7 ± 13.7 лет) без обмороков в анамнезе, из них 108 мужчин (средний возраст 36.1 ± 12.9 лет) и 92 женщины (средний возраст 37.4 ± 14.6 лет). Эту группу составили 72 человека, у которых при проведении обследования не было выявлено каких-либо заболеваний, и 128 пациентов, проходивших стационарное обследование и лечение либо в связи с различными нарушениями ритма сердца (редкие пароксизмы атриовентрику-

лярной узловой реципрокной тахикардии, трепетания или фибрилляции предсердий), либо по поводу транзиторной артериальной гипертензии. При их обследовании ни в одном случае не было обнаружено признаков органического поражения миокарда, а также других соматических или неврологических заболеваний. От всех участников исследования было получено информированное согласие.

Генотипирование. Выделение геномной ДНК из периферической крови проводили с использованием коммерческого набора QIAamp DNA Blood Mini Kit (“QIAGEN”, Германия). Геномное типирование полиморфных участков rs12465214, rs12621296, rs17582219 и rs1344706 в области 2q32.1 проводили методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени с применением соответствующих коммерческих наборов TaqMan® SNP Genotyping Assay (“Applied Biosystems”, США) по инструкциям производителя на приборе StepOnePlus™. Для подтверждения правильности анализа проводили повторное генотипирование случайно выбранных проб в количестве 10% от исходной выборки.

Статистический анализ. Оценку отклонения наблюдаемых частот генотипов от равновесия Харди—Вайнберга по критерию χ^2 и анализ неравновесия по сцеплению (LD) проводили с помощью алгоритма максимизации математического ожидания (expectation maximization, EM) с использованием программного обеспечения (ПО) Haploview 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/index.php>). Значению $D' = 1$ и $LOD \geq 2$ соответствует сильное сцепление между локусами, $D' < 1$ и $LOD > 2$ — значительное сцепление, $D' < 1$ и $LOD < 2$ — слабое сцепление (где D' — стандартизованная мера неравновесия по сцеплению, LOD — логарифм отношения шансов за и против наличия сцепления). Ассоциацию носительства выбранных SNP и их биаллельных сочетаний с ВВО оценивали с помощью ПО APSampler (<http://apsampler.sourceforge.net/>) [5]. APSampler выявляет ассоциации, используя метод Монте-Карло марковскими цепями и байесовскую непараметрическую статистику, а затем для оценки значимости найденных ассоциаций использует значения p_f , определяемые согласно точному критерию Фишера, и значения отношения шансов (ОШ) и его 95%-го доверительного интервала (95% ДИ). Сочетание отнесли к позитивному или негативному фактору генетического риска, если оба входящих в его состав аллеля/генотипа характеризуются меньшей значимостью ассоциации, чем само сочетание. Отдельные SNP и их сочетания считали значимо ассоциированными с ВВО, если различия сравнимых частот характеризовались значением $p_f < 0.05$, при условии, что 95% ДИ для ОШ не пересекает 1.

Природу взаимодействия между компонентами сочетаний оценивали с помощью точного

трехфакторного теста, подобного критерию Фишера (the exact three-way Fisher-like interaction numeric test, FLINT), и фактора синергии (synergy factor, SF) [6], входящих в состав инструментов APSampler. Взаимодействие считали эпистатическим, если величина p_{FLINT} была менее 0.05, а значение 95% ДИ для SF не пересекало 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У 175 неродственных больных ВВО и 200 индивидов контрольной группы проведено генотипирование следующих SNP: rs17582219, rs12621296, rs12465214 и rs1344706, — расположенных на хромосоме 2 в области 2q32.1.

Проведенный с использованием ПО Haploview 4.2 анализ не выявил отклонений от равновесия Харди–Вайнберга ($p > 0.01$) для всех исследуемых SNP ни у пациентов с ВВО, ни в контрольной группе.

Анализ возможного сцепления полиморфных участков, которые расположены в области 2q32.1 (табл. 1), обнаружил значительное сцепление ($D' < 1$, $\text{LOD} > 2$) между участками rs17582219, rs12621296 и rs12465214. Для участка rs1344706 выявлено очень слабое сцепление с rs12465214 ($D' < 1$, $\text{LOD} < 2$) и не наблюдалось сцепления с rs17582219 и rs12621296.

Мы сравнили частоты носительства аллелей и генотипов полиморфных участков rs17582219, rs12621296, rs12465214 и rs1344706 в области 2q32.1 у неродственных больных ВВО и индивидов контрольной группы как по отдельности, так и в составе биаллельных сочетаний друг с другом для оценки их возможного кумулятивного эффекта (табл. 2). Ассоциация с предрасположенностью к ВВО наблюдалась по отдельности для единственного SNP — rs12621296: носительство генотипа G/G оказалось фактором риска ($\text{ОШ} = 1.80$). С помощью мультилокусного анализа обнаружено четыре биаллельных сочетания, ассоциация каждого из которых с ВВО характеризуется большим уровнем значимости, чем любого входящего в это сочетание аллеля/генотипа; причем каждое из этих сочетаний включает по меньшей мере один SNP, не ассоциированный с ВВО сам по себе. Три из выявленных сочетаний: rs12621296*A + rs17582219*A, rs12621296*G/G + rs12465214*A и rs12621296*G/G + rs1344706*A — содержат SNP rs12621296, сам по себе значимо ассоциированный с ВВО, и по одному из трех остальных SNP. Эти биаллельные сочетания характеризуются значениями p_f , равными 0.00017, 0.0011 и 0.0011 соответственно, то есть имеют ассоциацию с ВВО с большим уровнем значимости, чем rs12621296 сам по себе ($p_f = 0.0078$). В зависимости от того, какой вариант rs12621296 входит в состав сочетания, эффект может быть протективным (для

Таблица 1. Анализ неравновесия по сцеплению исследованных SNP в области 2q32.1

Анализируемые SNP		D'	LOD
Значительное сцепление			
rs17582219	rs12621296	0.44	9.5
rs17582219	rs12465214	0.65	14.23
rs12621296	rs12465214	0.33	5.18
Слабое сцепление			
rs12465214	rs1344706	0.072	0.27

rs12621296*A + rs17582219*A, $\text{ОШ} = 0.45$) или предрасполагающим (для rs12621296*G/G + rs12465214*A, $\text{ОШ} = 2.22$, и rs12621296*G/G + rs1344706*A, $\text{ОШ} = 2.24$). Оба компонента четвертого обнаруженного сочетания, rs17582219*A + rs1344706*C ($p_f = 0.025$, $\text{ОШ} = 0.64$), по отдельности были незначимыми.

В табл. 2 представлены также результаты оценки природы кумулятивного эффекта между генетическими вариантами в составе ассоциированных с ВВО биаллельных сочетаний. Выявлено нелинейное (эпистатическое) взаимодействие между компонентами в сочетании rs12621296*A + rs17582219*A ($\text{SF} = 0.039$, 95% ДИ (0.00182–0.841), $p_{\text{FLINT}} = 0.016$), приводящее к усилению протективного эффекта. Для других ассоциированных с ВВО сочетаний взаимодействие между аллелями, скорее всего, носит аддитивный характер, то есть определяется суммой их независимых вкладов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ассоциация SNP rs17582219, rs12621296 и rs12465214 с обмороками или коллапсом (группой заболеваний с кодом R55 по МКБ-10) была первоначально показана на обширной выборке пациентов из ресурса Британского биобанка [3]. Эти результаты подтверждены нами на значительно меньшей, но однородной выборке пациентов, страдающих ВВО — самой распространенной формой обмороков. Контрольную группу в двух сопоставляемых работах формировали по принципу отсутствия у них исследуемого заболевания: у К. Hadji-Turdeghal и соавт. [3] в нее были включены пациенты Британского биобанка без диагноза “обмороки или коллапс”, у нас — индивиды без ВВО. Однако мы сочли нужным повысить однородность контрольной группы и включили в нее индивидов не только без ВВО, но и без органического поражения миокарда и других соматических или неврологических заболеваний в анамнезе.

rs12621296 — единственный из исследованных нами SNP, для которого выявлена ассоциация с ВВО по отдельности. С помощью мультилокус-

Таблица 2. Выявленные ассоциации с ВВО носительства отдельных аллелей и генотипов SNP в области 2q32.1 хромосомы 2, а также их биаллельных сочетаний

SNP	Частота носительства генетических вариантов		Значение p_f	ОШ (95% ДИ)	Анализ эпистатического взаимодействия между SNP в составе сочетаний	
	пациенты, $N = 175$ n (%)	контроль, $N = 200$ n (%)			значение p_{FLINT}	SF (95% ДИ)
Носительство отдельных аллелей и генотипов						
rs12621296*A ^a	116 (66)	156 (78)	0.0078	0.55 (0.35–0.88)	—	—
rs12621296*G/G	59 (34)	44 (22)	0.0078	1.80 (1.14–2.85)	—	—
Носительство биаллельных сочетаний аллелей и генотипов						
rs12621296*A + rs17582219*A	91 (52)	141 (70)	0.00017	0.45 (0.30–0.69)	0.016	0.039 (0.00182–0.841)
rs12621296*G/G + rs12465214*A	52 (30)	32 (16)	0.0011	2.22 (1.35–3.65)	0.24	6.12 (2.01–18.6)
rs12621296*G/G + rs1344706*A	51 (29)	31 (15)	0.0011	2.24 (1.35–3.71)	0.11	5.32 (0.74–38.4)
rs17582219*A + rs1344706*C	74 (42)	107 (53)	0.025	0.64 (0.43–0.97)	1.00	1.36 (0.28–6.60)

^aЗдесь и далее: носительство аллеля соответствует сумме его носительства в составе гомо- и гетерозиготного генотипов.

ного анализа, повышающего статистическую мощность исследования [7], нами выявлена связь с ВВО носительства аллелей rs17582219 и rs12465214 в составе биаллельных сочетаний с rs12621296. Кроме того, мы обнаружили биаллельные сочетания rs12621296*G/G + rs1344706*A и rs17582219*A + rs1344706*C, второй SNP в составе которых локализован в интроне-2 гена *ZNF804A* и не входил в панель SNP, исследованных авторами работы [3]. Таким образом, хотя мы и подтвердили ассоциацию SNP rs17582219, rs12621296 и rs12465214, находящихся на хромосоме 2 в значительном сцеплении между собой (см. табл. 1), с развитием обмороков, лидирующим SNP среди них в выборке пациентов, страдающих ВВО, оказался rs12621296. Для сравнения, в упоминаемых выше работах [3, 4] у пациентов с обмороками и коллапсом наиболее значимой была ассоциация с rs12465214. Показательно, что два сочетания: rs12621296*G/G + rs12465214*A и rs12621296*G/G + rs1344706*A — характеризуются практически одинаковыми значениями p_f и ОШ (см. табл. 2), при этом rs1344706 непосредственно локализован в гене *ZNF804A*.

На рис. 1 представлено схематичное изображение области 2q32.1 хромосомы 2 человека и известных транскриптов в этой области; указана локализация исследованных SNP, которая совмещена с полученными нами данными по ассоциации с ВВО носительства аллелей/генотипов rs12621296 (по отдельности), а также аллелей rs17582219, rs12465214 и rs1344706 (входящих в состав биаллельных сочетаний с rs12621296).

Как видно из рис. 1, полиморфизм rs12621296 находится внутри гена некодирующей РНК *LOC102724340* и расположен примерно на 30 т.п.н. выше старта транскрипции гена некодирующей

РНК *LOC105373777*, возможно, в участке, регулирующем его экспрессию. Два других полиморфизма, ассоциированных с ВВО в сочетании с rs12621296, а именно rs12465214 и rs17582219, также колокализованы с *LOC102724340* и *LOC105373777*: rs12465214 (как и rs12621296) лежит внутри *LOC102724340*, а rs17582219 примерно на 80 т.п.н. выше старта транскрипции *LOC102724340* и примерно на 30 т.п.н. ниже 3'-конца *LOC105373777* (лежащего на цепи, обратной референсной). Расположенный в *LOC105373777* rs7602025 ассоциирован с систолическим артериальным давлением [8], а расположенный в *LOC102724340* rs41434646 — с показателем максимальной вентиляции легких [9]. Кроме того, rs12465214 локализован в гене микроРНК *MIR548AE*; множество вариантов этого гена ассоциировано с самыми разными фенотипическими признаками (GWAS Catalog для гена *MIR548AE1*: <https://www.ebi.ac.uk/gwas/genes/MIR548AE1>).

В целом, полученные нами результаты в большей степени соответствуют представлению, что установленные ассоциации определяются колокализацией этих SNP с генами некодирующих РНК, чем с геном *ZNF804A*, в отличие от более раннего предположения авторов работы [3]. Действительно, ген *ZNF804A* расположен намного дальше от рассматриваемых SNP (на расстоянии 260 т.п.н. до ближайшего из них — rs12465214), чем гены некодирующих РНК. Только один из исследованных нами SNP — rs1344706 — лежит внутри белоккодирующего гена *ZNF804A*, однако более значимой ассоциации с ВВО в сравнении с другими SNP локуса для rs1344706 не выявлено.

Обнаруженное нами эпистатическое взаимодействие вариантов локусов rs17582219 и rs12621296 может быть связано с тем, что один из

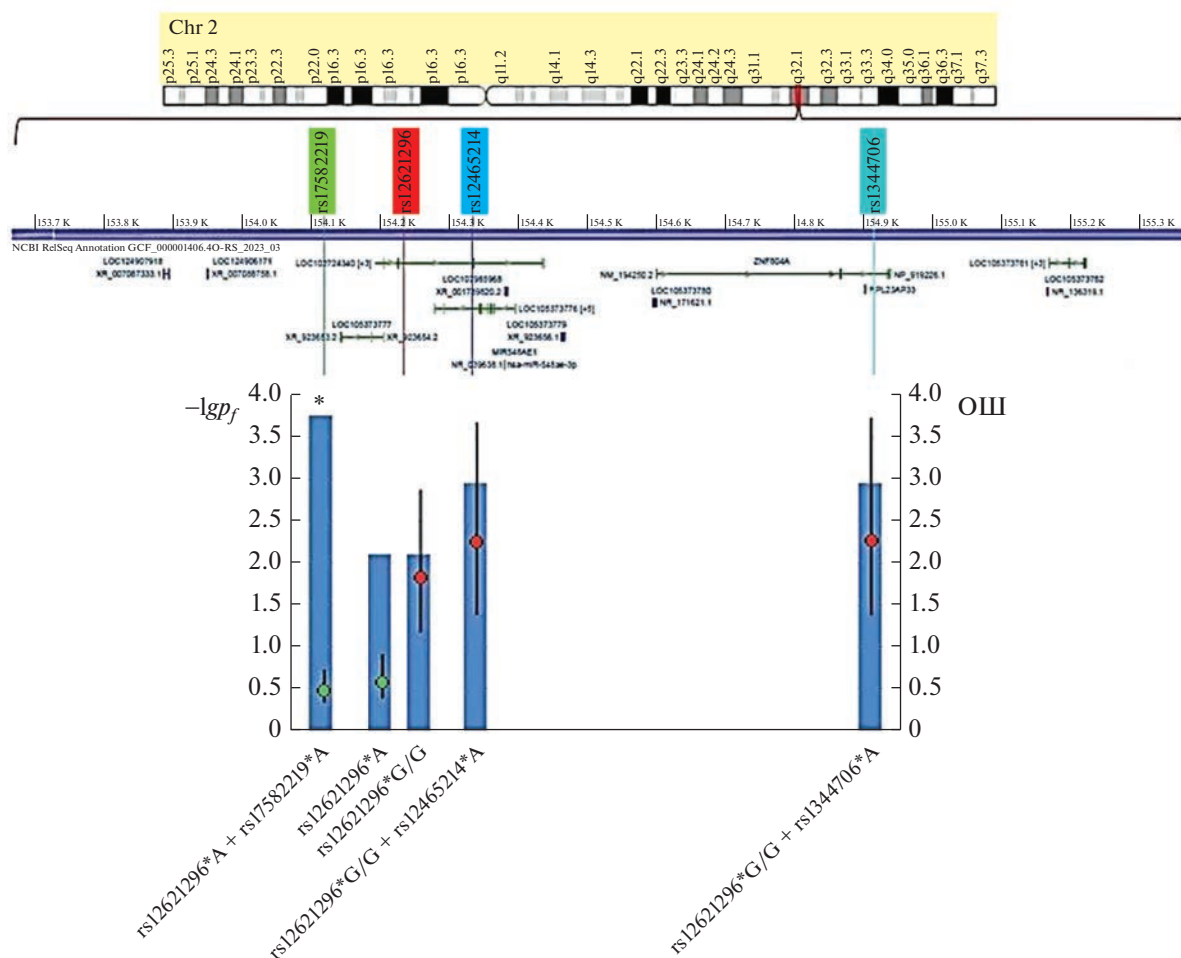


Рис. 1. Схематическое изображение области 2q32.1 хромосомы 2 человека, совмещенное с данными по ассоциации с ВВО аллелей/генотипов rs12621296 и аллелей других SNP, входящих в состав биаллельных сочетаний с rs12621296. Изображение области 2q32.1 создано на основе схемы, полученной с веб-сайта NCBI Sequence Viewer для Genomic Sequence: NC_000002.12 Chromosome 2 Reference GRCh38.p14 Primary Assembly (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/sviewer/?id=NC_000002). Локализация rs17582219 показана вертикальной зеленой линией, rs12621296 – красной, rs12465214 – голубой и rs1344706 – бирюзовой. Для ассоциированных с ВВО генетических вариантов (голубые столбцы) представлены значения $-\lg p_f$ (левая шкала), а также значения ОШ и 95% ДИ (правая шкала). Красные точки соответствуют значениям ОШ для предрасполагающих к ВВО генетических вариантов, зеленые – для протективных; вертикальные отрезки – диапазон ДИ. Эпистатическое сочетание указано звездочкой (*).

них (rs17582219), находясь вне известных транскриптов, влияет на регуляцию экспрессии близлежащих генов (*LOC105373777* и *LOC102724340*) по энхансерному механизму. Если учесть, что SNP rs12621296 локализован в гене *LOC102724340*, то можно предположить, что энхансерное действие rs17582219 на этот ген проявляется в форме эпистаза.

В целом, проведенное нами исследование свидетельствует о том, что синкопальные состояния различных типов имеют отнюдь не идентичную генетическую составляющую. Следовательно, ассоциативные исследования, ценность которых для установления природы заболеваний и поиска их маркеров трудно переоценить, необ-

ходимо проводить на однородных выборках пациентов с использованием адекватных контрольных групп.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова” Минздрава России (№ 121031300196-1).

От всех индивидов, принимавших участие в исследовании, было получено информированное согласие. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 года и одобрено этическим комитетом ФГБУ “НМИЦК им. академика Е.И. Чазова” Минздрава России (протокол № 252 от 12 сентября 2019 года).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Matveeva N., Titov B., Bazyleva E., Pevzner A., Favorova O. (2021) Towards understanding the genetic nature of vasovagal syncope. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 10316.
2. Sheldon R.S., Sandhu R.K. (2019) The search for the genes of vasovagal syncope. *Front. Cardiovasc. Med.* **6**, 175.
3. Hadji-Turdeghal K., Andreassen L., Hagen C.M., Ahlberg G., Ghouse J., Bækvad-Hansen M., Bybjerg-Grauholm J., Hougaard D.M., Hedley P., Haunsø S., Svendsen J.H., Kanters J.K., Jepps T.A., Skov M.W., Christiansen M., Olesen M.S. (2020) Genome-wide association study identifies locus at chromosome 2q32.1 associated with syncope and collapse. *Cardiovasc. Res.* **116**(1), 138–148.
4. Aegisdottir H.M., Thorolfsson R.B., Sveinbjornsson G., Stefansson O.A., Gunnarsson B., Tragante V., Thorleifsson G., Stefansson L., Thorgeirsson T.E., Ferkingstad E., Sulem P., Norddahl G., Rutsdottir G., Banasik K., Christensen A.H., Mikkelsen C., Pedersen O.B., Brunak S., Bruun M.T., Erikstrup C., Jacobsen R.L., Nielsen K.R., Sørensen E., Frigge M.L., Hjorleifsson K.E., Ivarsdottir E.V., Helgadóttir A., Gretarsdottir S., Steinthorsdottir V., Oddsson A., Eggertsson H.P., Halldorsson G.H., Jones D.A., Anderson J.L., Knowlton K.U., Ndauld L.D., DBDS Genomic Consortium, Haraldsson M., Thorgeirsson G., Bundgaard H., Arnar D.O., Thorsteinsdottir U., Gudbjartsson D.F., Ostrowski S.R., Holm H., Stefansson K. (2023) Genetic variants associated with syncope implicate neural and autonomic processes. *Eur. Heart J.* **44**(12), 1070–1080.
5. Favorov A.V., Andreewski T.V., Sudomoina M.A., Favorova O.O., Parmigiani G., Ochs M.F. (2005) A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans. *Genetics*. **171**, 2113–2121.
6. Barsova R.M., Lvovs D., Titov B.V., Matveeva N.A., Shakhnovich R.M., Sukhinina T.S., Kukava N.G., Ruda M.Y., Karamova I.M., Nasibullin T.R., Mustafina O.E., Osmak G.J., Tsareva E.Y., Kulakova O.G., Favorov A.V., Favorova O.O. (2015) Variants of the coagulation and inflammation genes are replicably associated with myocardial infarction and epistatically interact in Russians. *PLoS One*. **10**, e0144190.
7. Lvovs D., Favorova O.O., Favorov A.V. (2012) A polygenic approach to the study of polygenic diseases. *Acta Naturae*. **4**(3), 59–71.
8. Kichaev G., Bhatia G., Loh P.R., Gazal S., Burch K., Freund M.K., Schoech A., Pasaniuc B., Price A.L. (2019) Leveraging polygenic functional enrichment to improve GWAS power. *Am. J. Hum. Genet.* **104**(1), 65–75.
9. Suh Y., Lee C. (2017) Genome-wide association study for genetic variants related with maximal voluntary ventilation reveals two novel genomic signals associated with lung function. *Medicine (Baltimore)*. **96**(44), e8530.

Association of Polymorphic Genome Variants in the 2q32.1 Locus with the Development of Vasovagal Syncope

N. A. Matveeva^{1,2,*}, B. V. Titov^{1,2}, E. A. Bazyleva¹, E. A. Kuchinskaya¹, M. S. Kozin^{1,2}, A. V. Favorov³, A. V. Pevzner¹, and O. O. Favorova^{1,2}

¹National Medical Research Center for Cardiology named after academician E.I. Chazov, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 121552 Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 117997 Russia

³Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD, 21205 USA

*e-mail: natalijamat@rambler.ru

Vasovagal syncope (VVS) is the most common form of syncope. The mechanisms of VVS development are not entirely clear. It is known that there is a genetic predisposition to this disease, but the data on the role of individual genes are quite contradictory. Recently, a genome-wide association study identified a locus at chromosome 2q32.1 associated with a united group of diseases — syncope and collapse; among the single nucleotide polymorphisms (SNPs) of this locus, the most significant association was observed for rs12465214. In a homogeneous sample of patients according to the diagnosis of VVS, we analyzed the association of rs12465214, rs12621296, rs17582219 and rs1344706 located on chromosome 2q32.1, with this form of syncope. In the enrolled set, only rs12621296 was associated with VVS by itself, whereas associations of other SNPs were observed only in biallelic combinations. An epistatic interaction between the components of the combination rs12621296*A + rs17582219*A was revealed. The possible involvement of individual genes localized in the 2q32.1 locus in the genetic architecture of the VVS is discussed.

Keywords: genetic polymorphism, genetic predisposition, syncope, vasovagal syncope

УДК 577.24;577.214.5;575.832

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ *Drosophila melanogaster* РЕГУЛИРУЕТСЯ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА *nejire* В ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ТКАНЯХ И НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ¹

© 2023 г. Л. А. Коваль^а, Е. Н. Прошкина^а, Н. В. Земская^а, И. А. Соловьёв^{а, б}, Е. В. Щеголева^а, М. В. Шапошников^а, А. А. Москалев^{а, с, d, *}

^аИнститут биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, 167982 Россия

^бСыктывкарский государственный университет им. Питирима Сорокина, Сыктывкар, 167001 Россия

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

^dРоссийский клинический научный центр геронтологии,

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 129226 Россия

*e-mail: amoskalev@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 25.12.2022 г.

После доработки 27.03.2023 г.

Принята к публикации 28.03.2023 г.

Гистонацетилтрансферазы семейства CBP/p300 участвуют в регуляции транскрипции и в осуществлении ряда биологических процессов (пролиферации и дифференцировки клеток, развитии организма, регуляции стресс-ответа и метаболизма). В исследовании на плодовой мушке *Drosophila melanogaster* нами впервые проанализировано влияние сверхэкспрессии и нокдауна гена *nejire* (*nej*), кодирующего ортолог белков CBP/p300 человека, в различных тканях (жировом теле, кишечнике, нервной системе) и на разных стадиях жизненного цикла (все стадии развития или только имаго) на продолжительность жизни. Активация *nej* оказывала, в зависимости от способа индукции, а также от половой принадлежности, как положительное, так и отрицательное влияние на продолжительность жизни мух. Установлен эффект увеличения продолжительности жизни (на 6–15%) самок при кондиционной сверхэкспрессии *nej* в кишечнике и конститутивной сверхэкспрессии *nej* в нервной системе. В остальных случаях наблюдали укорочение жизни (до 44%) либо отсутствие статистически значимых изменений. Кроме того, активация *nej* приводила к изменению экспрессии генов стресс-ответа (*Sod1*, *Gadd45*, *Hsp27*, *Hsp68*, *Hif1*). В то же время нокдаун *nej* в большинстве вариантов эксперимента приводил к выраженному отрицательному воздействию на длительность жизни дрозофил.

Ключевые слова: гистонацетилтрансфераза, CBP/p300, *nejire*, продолжительность жизни, стрессоустойчивость, *Drosophila melanogaster*

DOI: 10.31857/S0026898423050063, EDN: FYAQLK

ВВЕДЕНИЕ

Старение — многофакторный процесс дерегуляции гомеостаза и гомеодинамики организма, связанный с дегенеративными изменениями на молекулярном, клеточном, тканевом и системном уровнях [1]. В основе старения лежит нарушение баланса между возникновением повреждений макромолекул клетки, с одной стороны, и эффективностью работы компенсаторных механизмов, с другой [1]. Значительную роль играют эпигенетические механизмы, поскольку от них

зависит архитектура хроматина и глобальная регуляция экспрессии генов. В частности, ацетилирование гистонов критически важно для формирования структуры хроматина при изменении условий окружающей среды, поддержании протеостаза и митохондриальной функции, для дифференцировки клеток и обеспечения функционирования тканей за счет контроля экспрессии генов гистонацетилтрансферазами [2].

Белки CBP (белок, связывающий CREB) и p300 относятся к транскрипционным коактиваторам из класса ацетилтрансфераз, которые модифицируют ряд ядерных белков, включая гистоны H3 (по K18 и K27) и H4 (по K8) [3]. Однако эти

¹ Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898423050063 для авторизованных пользователей.

ацетилтрансферазы могут регулировать также активность негистоновых белков [4, 5]. Изучение профилей экспрессии генов, регулируемых СВР/р300, показало, что они вовлечены в такие процессы, как клеточная сигнализация, пролиферация и дифференцировка, развитие организма, малигнизация, ответ на воздействие стресс-факторов [6, 7]. СВР/р300 вносит важный вклад в запуск механизмов клеточного старения. Например, р300 индуцирует динамическое гиперацетилированное состояние хроматина и способствует образованию активных энхансерных элементов в некодирующих участках генома, что приводит к запуску специфичной для клеточного старения программы экспрессии генов [8]. СВР/р300 вместе с транскрипционным фактором р53 вовлечены в индукцию р21 при клеточном старении [9, 10]. Вместе с тем, с возрастом активность р300 в некоторых тканях снижается, а геропротекторные вмешательства, такие как ограничение питания, усиливают функцию СВР/р300 [2].

Высококонсервативные ацетилтрансферазы семейства СВР/р300 встречаются как у беспозвоночных, так и у млекопитающих [11]. Несмотря на важную роль СВР/р300 в процессах клеточного старения, его вклад в продолжительность жизни организма не исследован. Цель данной работы состояла в изучении эффектов сверхэкспрессии и нокдауна гена *nejire* (*nej*) *Drosophila melanogaster*, кодирующего ортолог СВР, в клетках жирового тела, кишечника и нервной системы на продолжительность жизни (ПЖ) мух.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линии *D. melanogaster*. В работе использовали трансгенные линии дрозофил с UAS-конструкциями и драйверами GAL4.

Линия *EP-nej* (#30733, Блумингтон, США) содержит в X хромосоме инсерцию энхансерного элемента (EP), определяющего активацию экспрессии *nej* под контролем промотора UAS [12, 13]. *UAS-nej* (#32573, Блумингтон) содержит в третьей хромосоме копию гена *nej* под контролем промотора UAS. *UAS-nej.siRNA(X)* (#32576, Блумингтон) и *UAS-nej.siRNA(2)* (#32577, Блумингтон) экспрессируют двухцепочечную РНК для РНК-интерференции *nej* под контролем UAS. Конструкции встроены в X и вторую хромосому соответственно. Эффективность использованных UAS-конструкций подтверждена ранее [14–16].

Конструкция *ELAV-GS-GAL4* (#43642, Блумингтон), встроенная в хромосому 3, активирует RU486-зависимую экспрессию *GS-GAL4* в нейронах под действием мифепристона (RU486). *S106-GS-GAL4* (#8151, Блумингтон) экспрессирует RU486-активируемый *GS-GAL4* в клетках жирового тела. Конструкция встроена во вторую хро-

мосому. *TIGS-2-GS-GAL4* (получена от L. Se-groude, Университет Куинс, Кингстон, Канада) содержит конструкцию для экспрессии *GS-GAL4* в клетках кишечника. *ELAV-GAL4* (#8765, Блумингтон), локализованная во второй хромосоме, вырабатывает конститутивный драйвер GAL4 в клетках нервной системы. *D42-GAL4* (#8816, Блумингтон), встроенная в третью хромосому, конститутивно экспрессирует GAL4 в мотонейронах.

Активация сверхэкспрессии и сайленсинг гена *nejire*. Для сверхэкспрессии и нокдауна гена *nej* использовали систему GAL4/UAS [17, 18].

В случае сверхактивации UAS-линия содержала дополнительную копию исследуемого гена под контролем промотора UAS. При нокдауне она несла дцРНК, специфично подавляющую один из исследуемых генов посредством РНК-интерференции, под контролем UAS.

В качестве GAL4-компонента использовали кондиционные (мифепристон-активируемые) драйверы GAL4-GeneSwitch или конститутивные GAL4. Применение этих драйверов позволяет контролировать уровень экспрессии исследуемых генов, стадию развития (имаго или в течение всего жизненного цикла) и возраст дрозофил, при котором происходит индукция экспрессии, а также локализацию подавления или сверхактивации генов (повсеместно или тканеспецифично).

Для получения экспериментальных особей, поддерживающих обе конструкции, девственных самок UAS-линии скрещивали с самцами GAL4-линии.

Если использовали один из кондиционных драйверов, то добавление мифепристона (RU486, “Merck”, США) в питательную среду потомства от этого скрещивания приводило к активации транскрипционного фактора GAL4-GeneSwitch и индукции транскрипции UAS-конструкции. Чтобы снизить влияние мифепристона на продолжительность жизни, отбирали самцов и девственных самок [19], которых рассаживали отдельно по 30 особей в пробирку. На поверхность питательной среды в пробирках с опытными вариантами наносили по 30 мкл раствора мифепристона (3.2 мг/мл в 96%-ном этаноле). В качестве контроля использовали мух с тем же генотипом, но живущих на питательной среде без мифепристона (в пробирки с этими мухами добавляли по 30 мкл 96%-ного этанола). Схема и условия эксперимента со сверхэкспрессией и нокдауном *nej* были идентичными, отличались только линии, используемые для скрещивания.

При конститутивной сверхэкспрессии *nej* у потомков скрещивания транскрипционный фактор GAL4 запускал экспрессию дополнительной копии этого гена в течение всего жизненного цикла. В качестве контроля использовали дрозофил родительских линий. Генетический фон всех

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров

Ген-мишень	Прямой праймер (5' → 3')	Обратный праймер (5' → 3')
<i>nej</i>	GATCCACTGCAATCGCAAACCC	TCCAGTTCGAGGTGATCGTTCTTC
<i>Gadd45</i>	AAGTCGCGCACAGATACTCACG	TTTGTTGGTTCGGCAGCTGGTC
<i>Hif1</i>	TGAGCACAGGCGACCCAAATTAC	TGTCCTGTATGTTTCGCCTCGTC
<i>Hsp27</i>	ACTGGGTCGTCGTCGTTATTTCG	CGCGCGACGTGACATTTGATTG
<i>Hsp68</i>	TCAAGTGTTTGAGGGCGAGAGG	ACGCCAGTGAGATCGAATGTGC
<i>Sod1</i>	TGCACGAGTTCGGTGACAACAC	TCCTTGCCATACGGATTGAAGTGC
β - <i>Tubulin56D</i>	GCAACTCCACTGCCATCC	CCTGCTCCTCCTCGAACT
<i>eEF1α2</i>	AGGGCAAGAAGTAGCTGGTTTGC	GCTGCTACTACTGCGTGTGTTG
<i>RpL32</i>	GAAGCGCACCAAGCACTTCATC	CGCCATTTGTGCGACAGCTTAG

используемых линий был предварительно выровнен по линии *w¹¹¹⁸* (#3605, Блумингтон).

Условия содержания дрозофил. Мух содержали в постоянных условиях в климатической камере Binder KBF720-ICH (“Binder”, Германия) при температуре 25°C, относительной влажности воздуха 60% и 12 ч режиме освещения. Состав питательной среды, на которой содержали контрольных и опытных мух при проведении всех экспериментов, адаптирован из работы [20]: вода — 1 л, кукурузная мука — 92 г, сухие дрожжи — 32.1 г, агар-агар — 5.2 г, глюкоза — 136.9 г.

Количественная ПЦР в реальном времени с этапом обратной транскрипции. Для верификации сверхэкспрессии гена *nej* и анализа уровня экспрессии генов стресс-ответа использовали по 20 имаго самцов и 10 имаго самок в возрасте 5 сут. Экспрессию измеряли методом количественной ПЦР в режиме реального времени с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР). РНК выделяли из целых тел имаго с помощью Aurum Total RNA Mini Kit (“Bio-Rad”, США) по инструкции изготовителя. Концентрацию РНК измеряли с помощью Quant-iT RNA Assay Kit (“Invitrogen”, США). Далее синтезировали кДНК по инструкции iScript cDNA Synthesis Kit (“Bio-Rad”). Смесь для проведения реакции ПЦР готовили по инструкции изготовителя qPCRmix-HS SYBR (“Евроген”, Россия) и праймеров (табл. 1). ПЦР проводили в амплификаторе CFX96 (“Bio-Rad”), используя следующую программу:

- 1) 95.0°C, 30 с;
- 2) 95.0°C, 10 с;
- 3) 60.0°C, 30 с;
- 4) пункты 2 и 3 повторяли 39 раз.

Уровень экспрессии гена *nej* в скрещиваниях рассчитывали относительно экспрессии гена домашнего хозяйства β -*Tubulin56D* с использованием программного обеспечения CFX Manager 3.1 (“Bio-Rad”). Статистическую значимость различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Уровень экспрессии гена *nej* и генов стресс-ответа (*Gadd45*, *Hif1*, *Hsp27*, *Hsp68*, *Sod1*) рассчитывали относительно уровня референсных генов (β -*Tubulin56D*, *eEF1 α 2*, *RpL32*) с использованием программного обеспечения CFX Manager 3.1 (“Bio-Rad”). Значимость различий оценивали с помощью критерия Манна–Уитни.

Анализ параметров продолжительности жизни. Самцов и девственных самок для анализа ПЖ получали из синхронных кладок. Отбор имаго проводили в течение 6 ч после вылета из куколок с использованием аппарата для CO₂-анестезии Benchtop Flowbuddy Complete (“Genesee Scientific”, США). Мух (по 30 особей) рассаживали в пробирки с контрольной и экспериментальной питательной средой. Самцы и самки жили раздельно. Три–пять пробирок использовали в каждой повторности эксперимента. Умерших мух учитывали каждые 24 ч. Два раза в неделю мух переносили на свежую среду.

Результаты представляли в виде кривых дожития. Также рассчитывали медианную ПЖ (длительность жизни наиболее типичных представителей выборки) и возраст 90%-ной смертности (показатель максимальной ПЖ). При статистической обработке данных применяли непараметрические методы. Функции дожития сравнивали, используя критерий Колмогорова–Смирнова [21]. Достоверность различий по медианной ПЖ оценивали с помощью критериев Мантеля–Кокса [22] и Гехана–Бреслоу–Вилкоксона [23]. Статистическую значимость различий максимальной ПЖ определяли с использованием метода Ванг–Аллисона [24]. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica, версия 6.1 (StatSoft, США), статистической среды R, версия 2.15.1 (The R Foundation) и онлайн-приложения OASIS 2 (Online application for survival analysis) [25].

Анализ стрессоустойчивости *D. melanogaster*. Устойчивость к неблагоприятным факторам изучали на особях в возрасте 10 сут. Мух содержали

Таблица 2. Влияние сверхэкспрессии гена *nej* в жировом теле на продолжительность жизни *D. melanogaster*

Генотип	Пол	RU486 (+/–)	М	dM	Лог-ранговый критерий, <i>p</i>	90%	d90%	Критерий Ванг–Аллисона, <i>p</i>	<i>n</i>
<i>S106-GS-GAL4>UAS-nej</i>	♂	–	59			66			145
<i>S106-GS-GAL4>UAS-nej</i>	♂	+	36	–39.0	1.4e–49	42	–36.4	0.0007	146
<i>S106-GS-GAL4>UAS-nej</i>	♀	–	73			85			142
<i>S106-GS-GAL4>UAS-nej</i>	♀	+	46	–37.0	8.4e–29	71	–16.5	5.1e–9	158
<i>S106-GS-GAL4>EP-nej</i>	♂	–	63			72			165
<i>S106-GS-GAL4>EP-nej</i>	♂	+	57	–9.5	0.000044	67	–6.9	0.0075	144
<i>S106-GS-GAL4>EP-nej</i>	♀	–	61			71			162
<i>S106-GS-GAL4>EP-nej</i>	♀	+	61	0	0.9574	71	0	0.8207	155

Примечание. Здесь и в табл. 3–6. ♂ – самцы. ♀ – самки. RU486 (+/–) – отсутствие “–”; контроль или наличие “+”; эксперимент кондиционной сверхэкспрессии. М – медианная продолжительность жизни (сут). 90% – возраст 90%-ной смертности (сут). dM и d90% – отношение значений в эксперименте и в контроле (%). *n* – количество мух в выборке.

на среде, состоящей из 2% агар-агара и 5% сахарозы в воде. Для определения устойчивости к окислительному стрессу в среду добавляли 20 ммоль/л параквата (Methyl Viologen, “Merck”), а для оценки устойчивости к стрессу эндоплазматической сети (ЭПС) – 12 мкмоль/л туникамицина (“Merck”). Погибших мух идентифицировали с помощью монитора индивидуальной активности DAM2 *Drosophila* Activity Monitor (“TriKinetics Inc.”, США) по полному отсутствию движения. Стрессовые условия сохранялись до гибели мух без пересадки в свежие пробирки. В каждом варианте опыта использовали 16–32 мухи в 2–4 повторностях (всего 32–112 особей).

Статистическую значимость различий оценивали с использованием дисперсионного анализа по Краскелу–Уоллису и апостериорного U-критерия Манна–Уитни с поправкой Бонферрони [26].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уровень экспрессии гена *nej*. Кондиционную сверхэкспрессию гена *nej* подтверждали, сравнивая уровень экспрессии этого гена у особей с генотипами *S106-GS-GAL4>EP-nej* и *S106-GS-GAL4>UAS-nej*, а также *TIGS-2-GS-GAL4>EP-nej* и *TIGS-2-GS-GAL4>UAS-nej*, содержащихся на среде с мифепристоном (особи с кондиционной сверхэкспрессией гена *nej*), и у особей с таким же генотипом, но содержащихся на среде без мифепристона. Показано увеличение активности *nej* у самцов в 2.8–4.1, а у самок – в 1.2–4.7 раза (рис. 1).

Для подтверждения конститутивной сверхэкспрессии гена *nej* сравнивали уровень экспрессии этого гена между родительскими линиями и потомками от скрещиваний *ELAV-GAL4>EP-nej*, *ELAV-GAL4>UAS-nej*, *D42-GAL4>EP-nej*, *D42-GAL4>UAS-nej*. В случае линии с драйвером *ELAV*

транскрипция гена *nej* у самцов была в 2.3–3.4 раза выше, чем в *UAS*-родительской линии, а у самок – в 1.2–2.0 раза (рис. 1д, 1е). У самцов, полученных в скрещивании с линией с драйвером *D42*, экспрессия *nej* была в 4.5–11.0, а у самок – в 2.0–15.0 раз выше, чем в родительской линии (рис. 1ж, 1з).

Стоит отметить, что в некоторых случаях различия не имели статистической значимости ($p > 0.05$).

Влияние сверхэкспрессии гена *nej* на продолжительность жизни и стрессоустойчивость *D. melanogaster*. Нами изучено влияние сверхэкспрессии гена *nej* в жировом теле, кишечнике и нервной системе на ПЖ самцов и самок *D. melanogaster*.

Обнаружено, что кривые выживаемости дрозофил с генотипами *S106-GS-GAL4>UAS-nej* и *S106-GS-GAL4>EP-nej* с мифепристон-индуцированной сверхэкспрессией гена *nej* в жировом теле расположены ниже, чем кривые особей без сверхэкспрессии ($p < 0.001$). Анализ параметров ПЖ подтверждает данный результат. Медианная ПЖ в результате активации *nej* была снижена на 9.5–39.0% ($p < 0.001$), а максимальная – на 6.9–36.4% ($p < 0.01$) (рис. 2, табл. 2). Однако у самок *S106-GS-GAL4>EP-nej* с индукцией сверхэкспрессии *nej* отсутствовали статистически значимые изменения параметров ПЖ. В то же время, активация экспрессии *nej* у самок *S106-GS-GAL4>UAS-nej* вызвала существенное ($p < 0.001$) снижение устойчивости к индуктору стресса ЭПС туникамицину, но статистически значимого влияния на стрессоустойчивость самцов не обнаружено ($p > 0.05$) (табл. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/5/supp_Koval_rus.pdf).

Кривая выживаемости у самцов *TIGS-2-GS-GAL4>UAS-nej* с кондиционной сверхэкспрессией гена *nej* в кишечнике располагается ниже, чем у

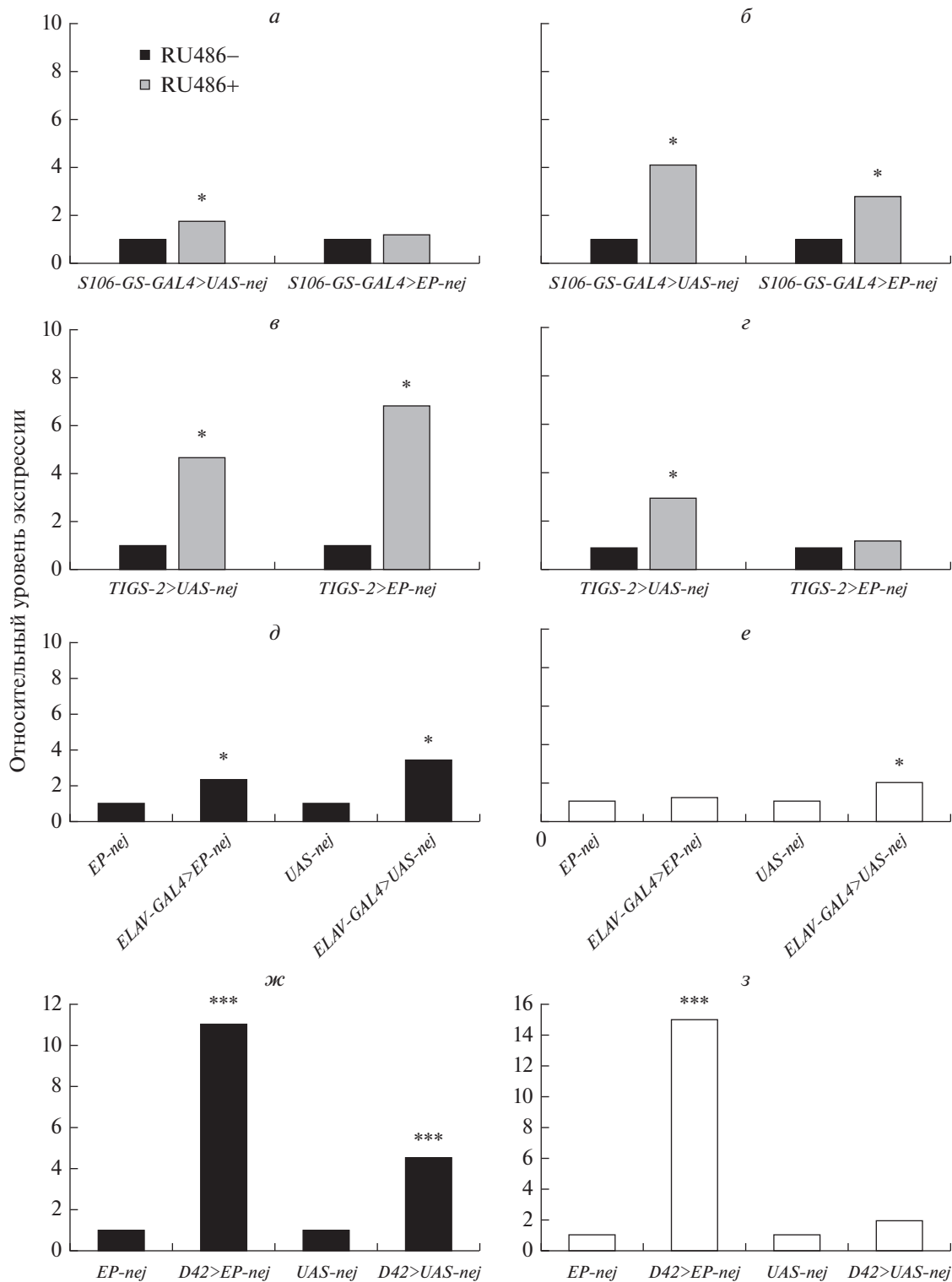


Рис. 1. Верификация сверхэкспрессии гена *nej* у самцов (а, в, д, ж) и самок (б, г, е, з) *D. melanogaster*. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по *t*-критерию Стьюдента.

самцов без сверхэкспрессии этого гена ($p < 0.001$). Медианная ПЖ и возраст 90%-ной смертности меньше на 14.9 и 30.3%, соответственно, ($p < 0.001$), чем у контрольных мух без сверхэкспрессии (рис. 3,

табл. 3). При этом кривые выживаемости самцов и самок *TIGS-2-GS-GAL4>EP-nej*, а также самок *TIGS-2-GS-GAL4>UAS-nej* с активацией *nej* в кишечнике расположены выше, чем кривые попу-

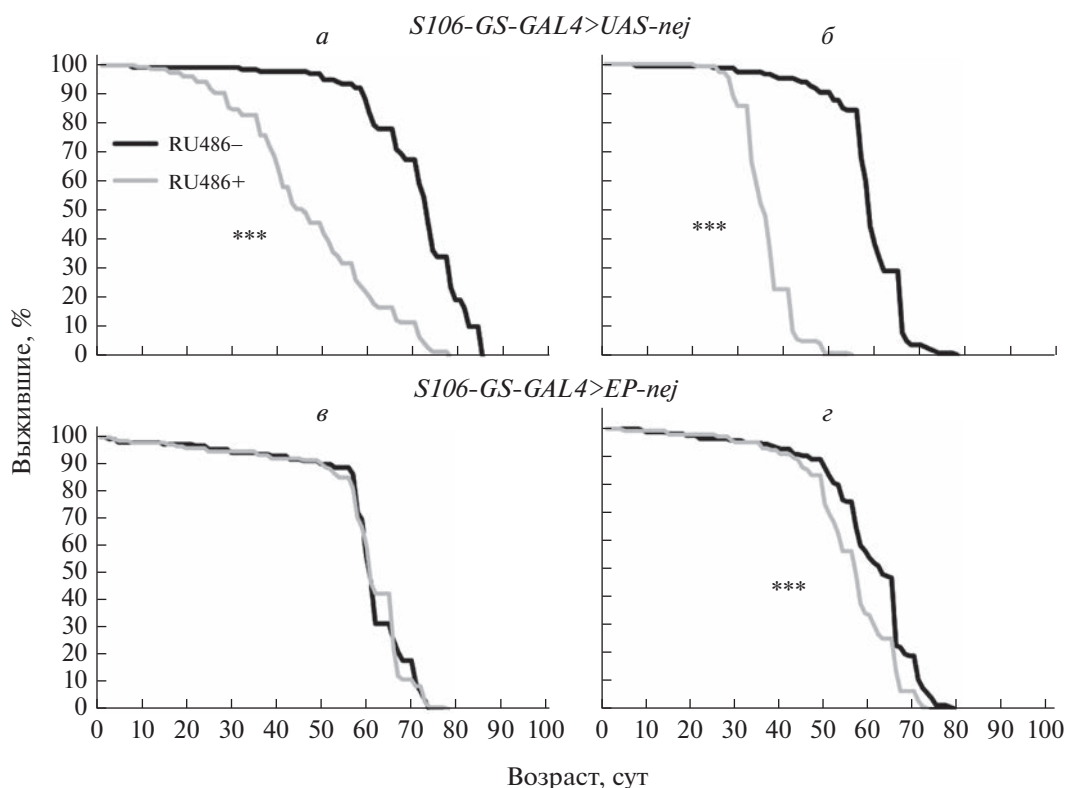


Рис. 2. Влияние сверхэкспрессии гена *nej* в жировом теле на продолжительность жизни самцов (а, в) и самок (б, г) *D. melanogaster*. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по критерию Колмогорова–Смирнова.

ляций контрольных особей ($p < 0.05$). Медианная ПЖ у данных особей больше на 6.4–8.0% ($p < 0.01$), а увеличение возраста 90% смертности на 5.1% ($p < 0.05$) наблюдали только у самок с генотипом *TIGS-2-GS-GAL4>EP-nej* (рис. 3, табл. 3).

В следующей серии экспериментов изучено влияние сверхэкспрессии гена *nej* в нервной системе.

У самок *ELAV-GS-GAL4>UAS-nej* с кондиционной активацией *nej* в нервной системе наблюдали статистически значимое сокращение меди-

анной ПЖ 16.9% ($p < 0.0001$) (рис. 4, табл. 4). Самки с генотипом *ELAV-GS-GAL4>EP-nej* и сверхэкспрессией *nej* имели максимальную (но не медианную) ПЖ, на 10.4% ($p < 0.05$) большую, чем в контрольной группе, не получавшей мифепристон. В то же время не выявлено статистически значимых различий у самцов (рис. 4, табл. 4).

Среди мух с конститутивной сверхэкспрессией гена *nej* в нервной системе наблюдали статистически значимое сокращение количества самцов *ELAV-GAL4>EP-nej*, достигших возраста ме-

Таблица 3. Влияние сверхэкспрессии гена *nej* в кишечнике на продолжительность жизни особей *D. melanogaster*

Генотип	Пол	RU486 (+/–)	М	dM	Лог-ранговый критерий, p	90%	d90%	Критерий Ванг–Аллисона, p	n
<i>TIGS-2-GS-GAL4>UAS-nej</i>	♂	–	47			66			157
<i>TIGS-2-GS-GAL4>UAS-nej</i>	♂	+	40	–14.9	8.20E–22	46	–30.3	2.3E–06	155
<i>TIGS-2-GS-GAL4>UAS-nej</i>	♀	–	47			59			164
<i>TIGS-2-GS-GAL4>UAS-nej</i>	♀	+	50	6.4	0.001	62	5.1	0.2826	164
<i>TIGS-2-GS-GAL4>EP-nej</i>	♂	–	50			59			65
<i>TIGS-2-GS-GAL4>EP-nej</i>	♂	+	54	8.0	0.0014	62	5.1	0.246	36
<i>TIGS-2-GS-GAL4>EP-nej</i>	♀	–	65			78			78
<i>TIGS-2-GS-GAL4>EP-nej</i>	♀	+	67	3.1	0.1034	82	5.1	0.0269	79

Примечание. Обозначения, как в табл. 2.

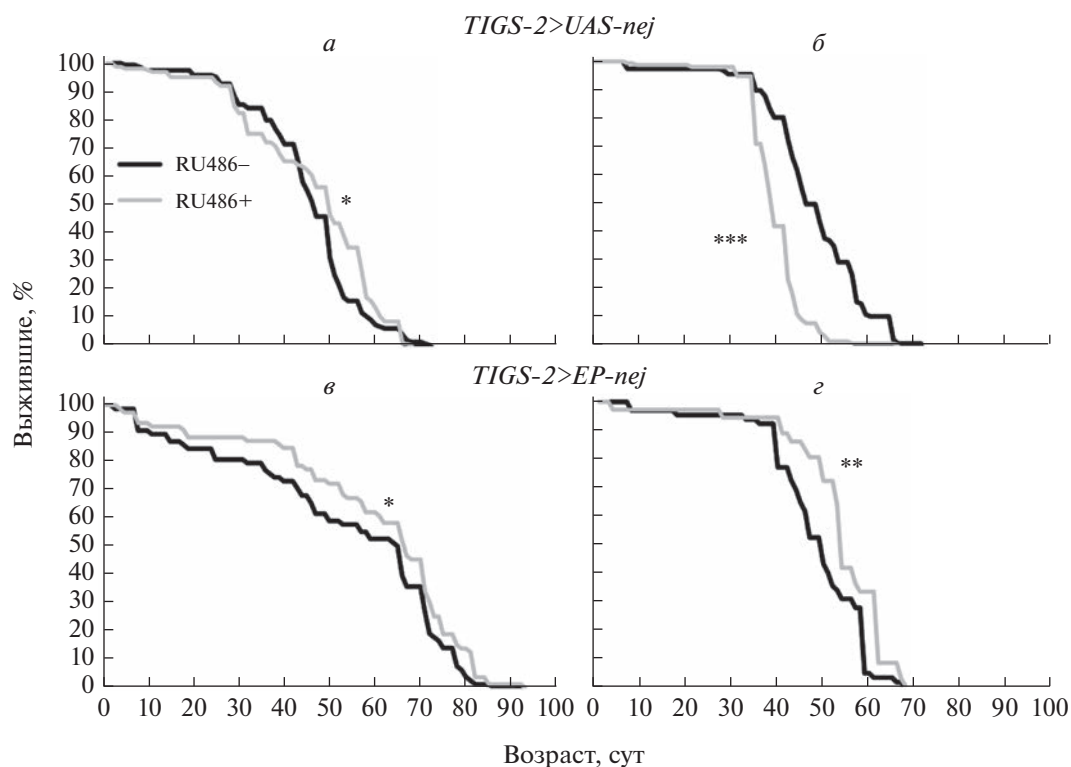


Рис. 3. Влияние сверхэкспрессии гена *nej* в кишечнике на продолжительность жизни самцов (а, в) и самок (б, г) *D. melanogaster*. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по критерию Колмогорова–Смирнова.

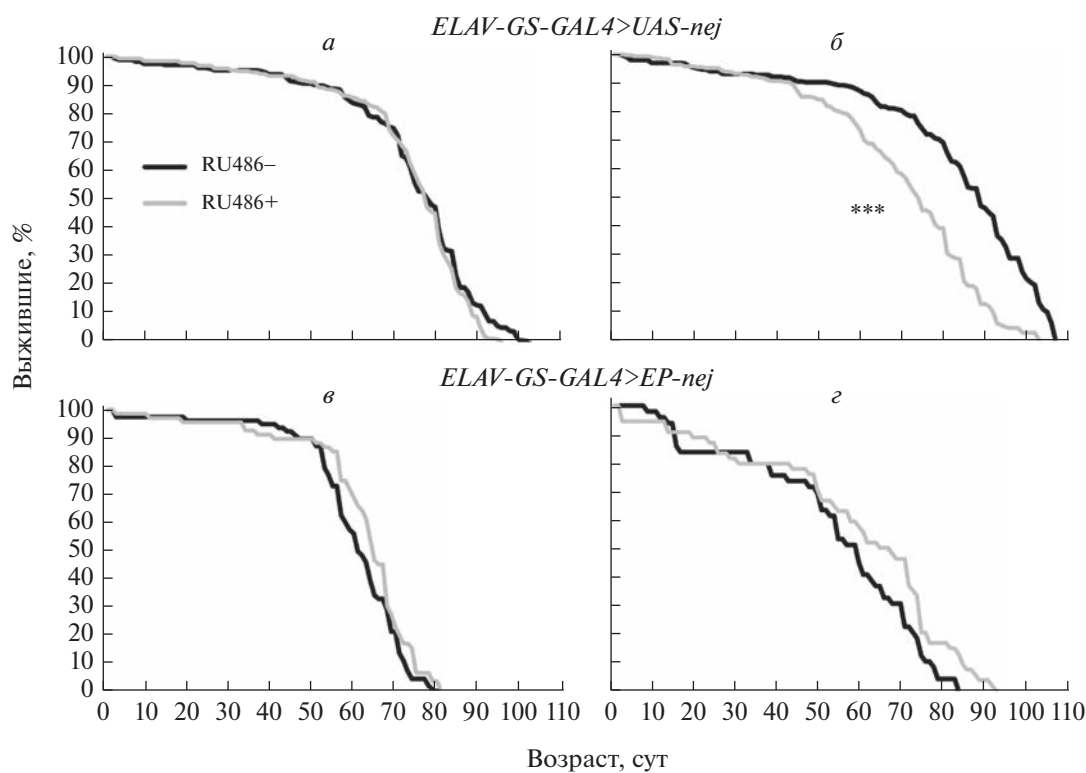


Рис. 4. Влияние сверхэкспрессии гена *nej* в нервной системе на продолжительность жизни самцов (а, в) и самок (б, г) *D. melanogaster*. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ по критерию Колмогорова–Смирнова.

дианной ПЖ (на 11.2% по сравнению с особями драйверной линии *ELAV-GAL4*), а также сдвиг кривой дожития влево (табл. 5, рис. 5а). Отмечено статистически значимое увеличение медианной ПЖ у самок *ELAV-GAL4>UAS-nej* и *ELAV-GAL4>EP-nej* – на 10.2–15.3% ($p < 0.001$) относительно родительских линий и сдвиг кривых дожития вправо (табл. 5, рис. 5б). При этом у особей обоего пола увеличивался возраст 90%-ной гибели (на 6.2–20.6% по сравнению с контрольными генотипами ($p < 0.05$)) либо отсутствовал статистически значимый эффект (табл. 5).

Наблюдали также повышение устойчивости самцов и самок линий *ELAV-GAL4>UAS-nej* и самцов *ELAV-GAL4>EP-nej* к воздействию туни-

камицина по сравнению с мухами линии *ELAV-GAL4* (табл. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/5/sup-p_Koval_rus.pdf).

У мух линий *D42-GAL4>UAS-nej* и *D42-GAL4>EP-nej* обоего пола, конститутивно сверхэкспрессирующих *nej* в мотонейронах в условиях окислительного стресса, наблюдалось сокращение медианной выживаемости на 27.1–43.8% ($p < 0.001$) и максимальной выживаемости на 13.8–24.7% ($p < 0.01$) относительно родительских линий (табл. 6). Эти эффекты подтверждают графики выживаемости (рис. 6). Кроме того, выживаемость самок *D42-GAL4>UAS-nej* в условиях окислительного стресса также была существенно сни-

Таблица 4. Влияние сверхэкспрессии гена *nej* в нервной системе на продолжительность жизни особей *D. melanogaster*

Генотип	Пол	RU486 (+/–)	М	dM, %	Лог-ранговый критерий, <i>p</i>	90%	d90%	Критерий Ванг–Аллисона, <i>p</i>	<i>n</i>
<i>ELAV-GS-GAL4>UAS-nej</i>	♂	–	79			92			353
<i>ELAV-GS-GAL4>UAS-nej</i>	♂	+	78	–1.3	0.519	89	–3.3	<0.0001	313
<i>ELAV-GS-GAL4>UAS-nej</i>	♀	–	89			105			307
<i>ELAV-GS-GAL4>UAS-nej</i>	♀	+	74	–16.9	<0.0001	92	–12.4	<0.0001	311
<i>ELAV-GS-GAL4>EP-nej</i>	♂	–	61			73			77
<i>ELAV-GS-GAL4>EP-nej</i>	♂	+	65	6.6	0.0915	75	2.7	0.022	67
<i>ELAV-GS-GAL4>EP-nej</i>	♀	–	60			77			49
<i>ELAV-GS-GAL4>EP-nej</i>	♀	+	66.5	10.8	0.153	85	10.4	0.042	54

Примечание. Обозначения, как в табл. 2.

Таблица 5. Влияние конститутивной сверхэкспрессии гена *nej* в нервной системе на продолжительность жизни *D. melanogaster*

Генотип	Пол	М	dM, %	Лог-ранговый критерий, <i>p</i>	90%	d90%	Критерий Ванг–Аллисона, <i>p</i>	<i>n</i>
<i>UAS-nej</i>	♂	54			66			158
<i>EP-nej</i>	♂	47			65			151
<i>ELAV-GAL4</i>	♂	54			65			276
<i>ELAV-GAL4>UAS-nej</i>	♂	54	0' 0*	0.0056 0.1285	68	4.6' 3.03*	0.0878 0.5377	309
<i>ELAV-GAL4>EP-nej</i>	♂	48	–11.1' 2.1 [#]	0.3878 0.6899	69	6.2' 6.2 [#]	0.0418 0.1272	300
<i>UAS-nej</i>	♀	58			68			167
<i>EP-nej</i>	♀	61			72			158
<i>ELAV-GAL4</i>	♀	59			71			301
<i>ELAV-GAL4>UAS-nej</i>	♀	65	10.2' 12.1*	0 0	82	15.5' 20.6*	0 0	320
<i>ELAV-GAL4>EP-nej</i>	♀	68	15.3' 11.5 [#]	0 0	75	5.7' 4.2 [#]	0 0.1253	288

'Относительно *ELAV-GAL4*.

*Относительно *UAS-nej*.

[#]Относительно *EP-nej*.

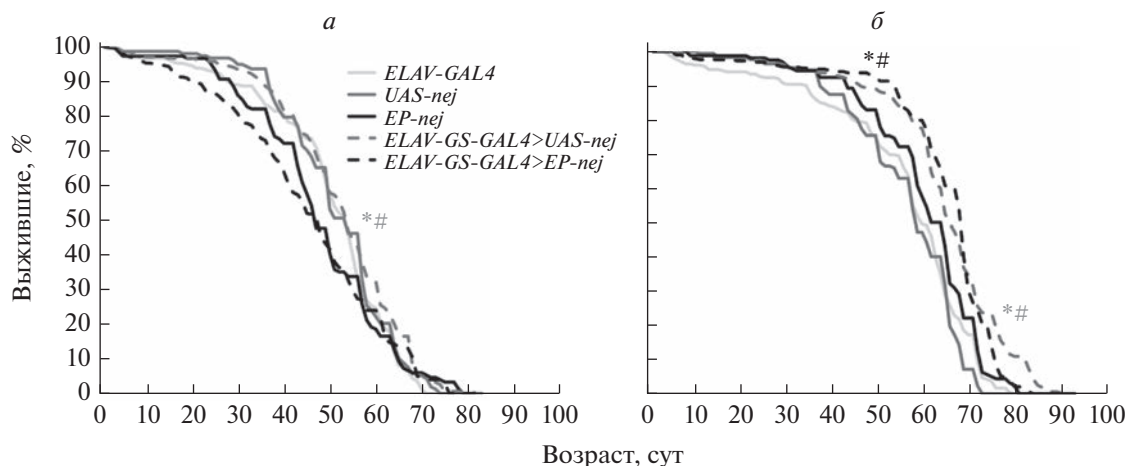


Рис. 5. Влияние конститутивной сверхэкспрессии гена *nej* в нервной системе на продолжительность жизни самцов (а) и самок (б) *D. melanogaster*. $p < 0.05$ по критерию Колмогорова—Смирнова относительно драйверной (*) или UAS (#) линий соответственно.

жена ($p < 0.001$) по сравнению с контрольной родительской линией *D42-GAL4* (табл. S1).

С возрастом происходит нарушение регуляции транскрипции многих генов. В данной серии экспериментов нами впервые показано влияние тканеспецифичной сверхэкспрессии гена *nej* (*CBP/p300*), кодирующего коактиватор транскрипции, на ПЖ целого организма. Установлено, что эффекты сверхэкспрессии гена *nej* зависят от драйвера, типа ткани, в которой происходит индукция сверхэкспрессии, а также половой принадлежности. В некоторых вариантах активация *nej* вызывает незначительное увеличение медианной и макси-

мальной ПЖ (до 8–15%), но при этом может (в других случаях) приводить к существенному негативному эффекту (до 30–44%).

Влияние сверхэкспрессии гена *nej* на активность генов стресс-ответа. Повышенная экспрессия гена *nej* в жировом теле, нервной системе и кишечнике приводила к изменению активности генов стресс-ответа *D. melanogaster*, обеспечивающих детоксикацию свободных радикалов (*Sod1*), ответ на повреждение ДНК (*Gadd45*) и белков (*Hsp27*, *Hsp68*), а также ответ на гипоксию (*Hif1*) (рис. 7, 8). При этом наблюдали как стимуляцию, так и подавление транскрипции генов *Sod1*,

Таблица 6. Влияние конститутивной сверхэкспрессии гена *nej* в мотонейронах на продолжительность жизни мух *D. melanogaster*

Генотип	Пол	M	dM, %	Лог-ранговый критерий, p	90%	d90%	Критерий Ванг—Аллисона, p	n
<i>UAS-nej</i>	♂	54			66			158
<i>EP-nej</i>	♂	47			65			151
<i>D42-GAL4</i>	♂	48			58			139
<i>D42-GAL4>UAS-nej</i>	♂	35	–27.1' –35.2*	0.0000061' 0*	54	–6.9' –18.2*	0.4454' 0.0076*	133
<i>D42-GAL4>EP-nej</i>	♂	34	–29.2' –27.7#	0' 0#	50	–13.8' –23.1#	0.0104' 0.0031#	114
<i>UAS-nej</i>	♀	58			68			167
<i>EP-nej</i>	♀	61			72			158
<i>D42-GAL4</i>	♀	64			77			134
<i>D42-GAL4>UAS-nej</i>	♀	36	–43.8' –37.9*	0' 0*	58	–24.7' –14.7*	0.0006' 0.0028*	131
<i>D42-GAL4>EP-nej</i>	♀	40	–37.5' –34.4#	0' 0#	58	–24.7' –19.4#	0.0006' 0.0057#	121

'Относительно *D42-GAL4*.

*Относительно *UAS-nej*.

#Относительно *EP-nej*.

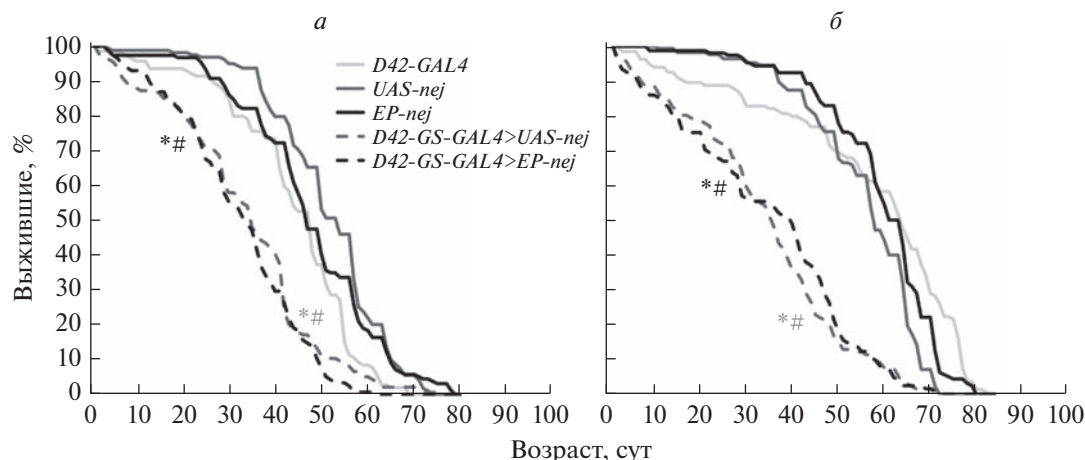


Рис. 6. Влияние конститутивной сверхэкспрессии гена *nej* в мотонейронах на продолжительность жизни самцов (а) и самок (б) *D. melanogaster*. $p < 0.05$ по критерию Колмогорова—Смирнова относительно драйверной (*) или UAS (#)-линий соответственно.

Gadd45, *Hsp27*, *Hsp68* в зависимости от пола, использованных конструкций (UAS и GAL4) и ткани с повышенной активностью *nej*. Наиболее воспроизводимой была тенденция к снижению экспрессии гена белка теплового шока *Hsp27* (в 2–5 раз) у самцов и самок с тканеспецифичной активацией *nej*. Кроме того, сверхэкспрессия гена *nej* в различных тканях самцов и самок дрозофилы приводила к подавлению транскрипции *Hif1* (рис. 7, 8).

Влияние нокдауна гена *nejire*, вызванного РНК-интерференцией, на продолжительность жизни *D. melanogaster*. При снижении активности *nej* в жировом теле и кишечнике происходило уменьшение медианной ПЖ (на 10–77%, $p < 0.0001$) и возраста 90%-ной смертности (на 11–74%, $p < 0.0001$) у самцов и самок *D. melanogaster* (рис. 9, 10, табл. 7). Менее выраженное снижение медианной ПЖ (на 9–10%, $p < 0.05$) наблюдалось также у мух со сниженной активностью *nej* в нервной системе в случае с локализацией UAS-конструкции в хромосоме 2 (рис. 11, табл. 7). В то же время, у самок с конструкцией UAS для РНК-интерференции *nej*, встроенной в хромосому X, нейрон-специфичный нокдаун приводил к увеличению медианной ПЖ и возраста 90%-ной смертности на 11% ($p < 0.05$) (рис. 11, табл. 7).

Полученные результаты согласуются с результатами исследований, проведенных на нематоде *Caenorhabditis elegans*. Полный нокдаун *cbp-1* (ортолог СВР/р300 у нематод) вызывал уменьшение средней ПЖ на 30% и выживаемости в условиях окислительного стресса [27].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами изучено влияние сверхэкспрессии и нокдауна гена *nej* в жировом теле, кишечнике и нервной системе на ПЖ *D. melanogaster*.

Сверхактивация *nej* в жировом теле, как правило, оказывала отрицательное влияние на ПЖ и стрессоустойчивость мух. Но повышенная экспрессия этого гена в кишечнике, напротив, чаще вызывала увеличение ПЖ. При этом эффект активации *nej* в клетках нервной системы варьировал в зависимости от используемых UAS- и GAL4-конструкций. Кондиционная сверхэкспрессия *nej* с использованием *UAS-nej* или *EP-nej* в нервной системе оказывала противоположные эффекты на ПЖ мух. Конститутивная сверхэкспрессия *nej* в нервной системе, как правило, увеличивала ПЖ и устойчивость к индуктору стресса ЭПС, но повышение активности этого гена в мотонейронах приводило к отрицательным изменениям. Эти эффекты сопровождались разнонаправленным изменением уровней экспрессии генов стресс-ответа с общей тенденцией к снижению.

Разнонаправленные эффекты тканеспецифичной сверхэкспрессии гена *nej* могут быть связаны с тем, что семейство ацетилтрансфераз СВР/р300, к которому относится белок, кодируемый изучаемым нами геном, имеет целый ряд мишеней в клетке (включая гистоновые и негистоновые белки), на которые воздействует разными способами, проявляя ферментативную и неферментативную активности.

Ацетилтрансферазы СВР/р300 способствуют транскрипции путем “разрыхления” хроматина, рекрутирования РНК-полимеразы II и перехода к элонгации, а также усиления связывания факторов транскрипции с геномной ДНК [28, 29]. Это необходимо для поддержания нормального функционирования клеток и организма в меняющихся условиях окружающей среды. СВР/р300 регулируют клеточную локализацию и активность таких транскрипционных факторов, как

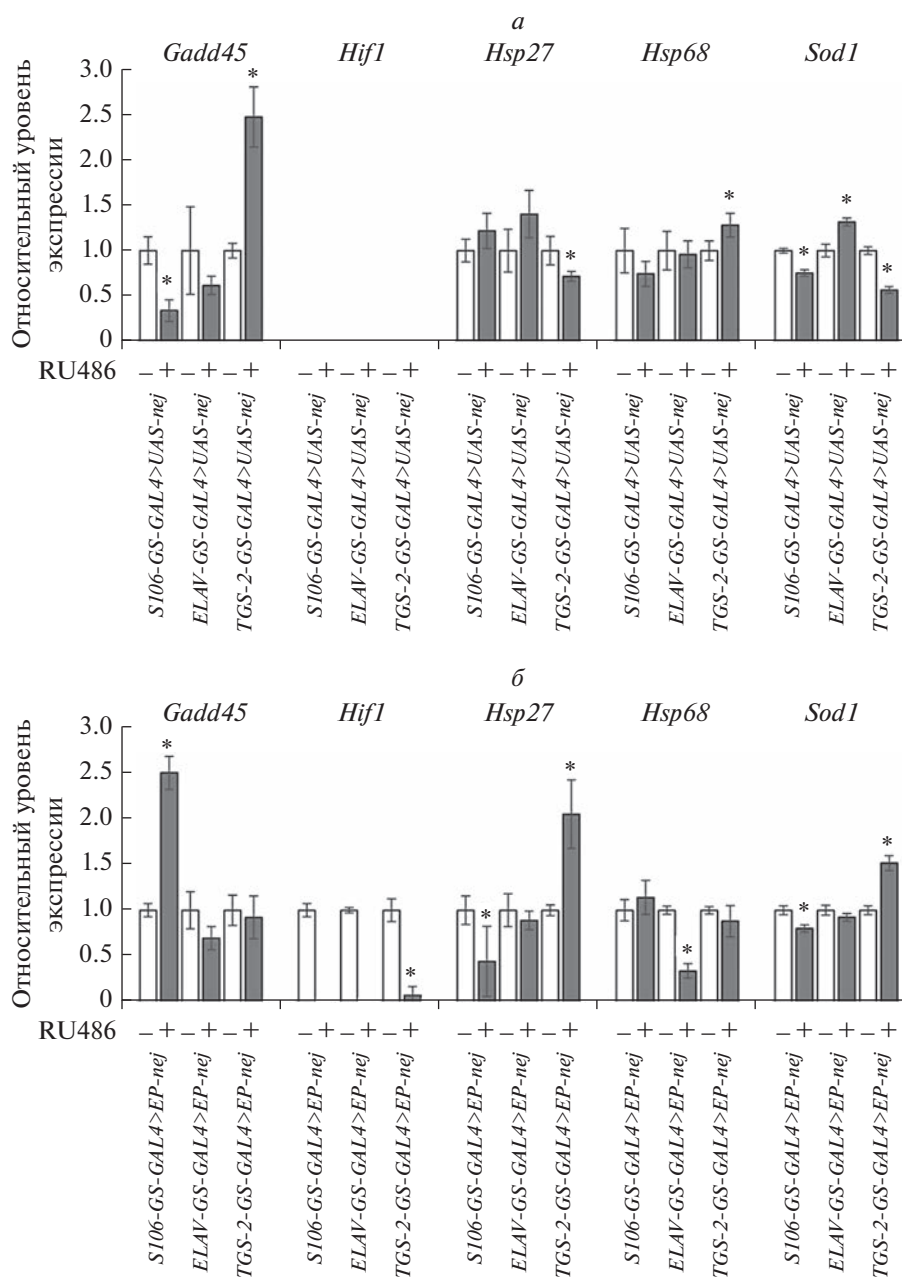


Рис. 7. Влияние активации дополнительной копии гена *nej* под контролем промотора UAS (а) или элемента EP (б) на экспрессию генов стресс-ответа у самцов *D. melanogaster*. * $p < 0.05$ по *t*-критерию Манна–Уитни.

p53 [30–32], FOXO [33], NRF2 [27, 34], HSF1 [35], HIF-1 [36], влияют на экспрессию их генов-мишеней (например, генов, кодирующих супероксид-дисмутазы, белки ответа на повреждение ДНК и контроля клеточного цикла, белки теплового шока). Так, активация СВР/p300 в клетках рака кишечника повышает уровень Gadd45 и p21 — важных регуляторов ответа на повреждение ДНК и ингибиторов роста опухолей [10]. Однако в нашем исследовании количество мРНК гена *Gadd45* как увеличивалось, так и снижалось у мух со

сверхэкспрессией *nej* в различных тканях и, по-видимому, не было связано с изменениями ПЖ. СВР-1 идентифицирован как негативный регулятор HSF-1 у *C. elegans* [37], что согласуется со сниженной активностью генов белков теплового шока у дрозофил со сверхэкспрессией гена *nej*.

Известно, что СВР стабилизирует РНК-полимеразу II в репрессивных сайтах, связанных с белками группы Polycomb, и способствует приостановке полимеразы. Это необходимо для образования гибрида РНК-ДНК (R-петли) и истощения

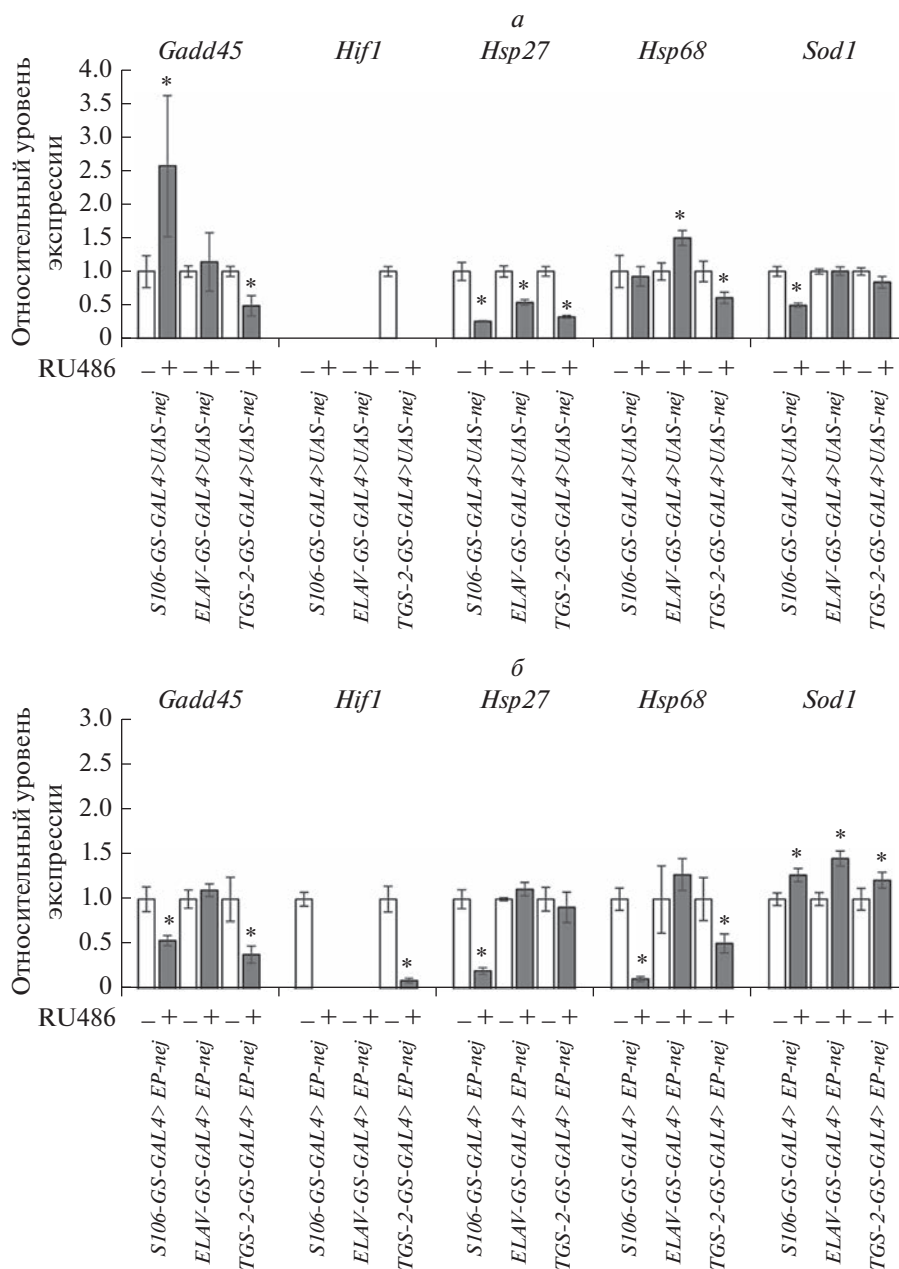


Рис. 8. Влияние активации дополнительной копии гена *nej* под контролем промотора UAS (а) или элемента EP (б) на экспрессию генов стресс-ответа у самок *D. melanogaster*. * $p < 0.05$ по *t*-критерию Манна–Уитни.

нуклеосом в элементах ответа на Polycomb [38]. Эпигенетическая регуляция с помощью Polycomb является важным негативным регулятором скорости старения и стрессоустойчивости организма [39, 40].

На посттранскрипционном уровне СВР/p300 могут влиять на генную экспрессию путем ацетилирования экзорибонуклеазы CAF1a с последующим усилением распада поли(А)РНК и усилением обмена мРНК. Стимуляция обмена мРНК необходима для пролиферации и дифференцировки

клеток, развития организма в целом. Кроме того, обмен мРНК помогает клеткам поддерживать высокодинамичный режим регуляции экспрессии генов [41]. С другой стороны, чрезмерная активация ацетилтрансфераз может вызывать усиленную деградацию мРНК, необходимых для поддержания жизнеспособности организма.

СВР/p300 участвует во многих молекулярных путях и клеточных процессах, детерминируя баланс между ними и конечную судьбу клетки и организма. Так, исследования, проведенные на

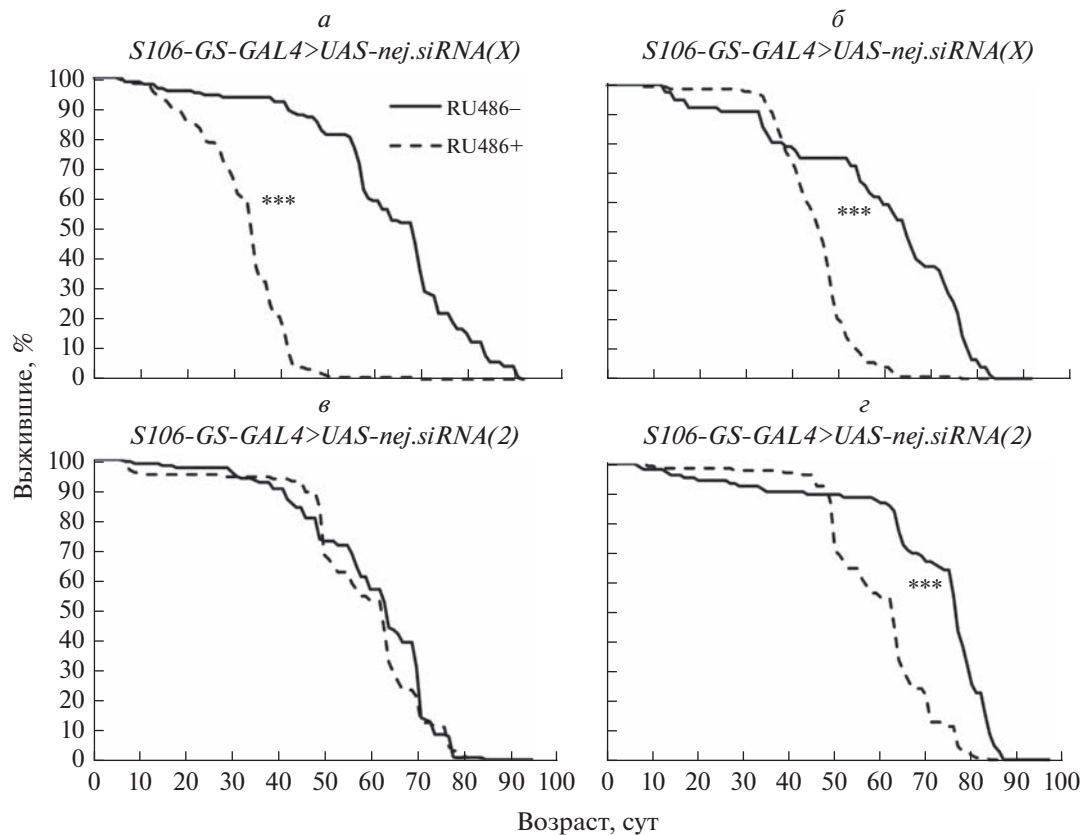


Рис. 9. Влияние нокдауна гена *nej* в жировом теле на продолжительность жизни самцов (а, в) и самок (б, г) *D. melanogaster*. *** $p < 0.0001$ по критерию Колмогорова–Смирнова.

клетках немелкоклеточного рака легких, показали, что СВР/p300 играет важную роль в поддержании баланса между продукцией активных форм кислорода, ответом на повреждение ДНК и запуском аутофагии; от его активности зависит, будут клетки делиться дальше либо они подвергнутся остановке клеточного цикла или апоптозу [42].

Белки СВР/p300 необходимы для запуска ответа на повреждение ДНК. Прежде всего, они ацетируют гистоны в местах повреждения ДНК для облегчения репарации. Однако они также способны ацетилировать ключевые белки, обеспечивающие передачу сигналов о повреждении ДНК и разные механизмы репарации ДНК, за счет чего регулируют каталитическую активность, ядерную локализацию, связывание с ДНК и обмен данных белков [4]. С другой стороны, можно предположить, что дополнительная активация СВР/p300 (например, в результате сверхэкспрессии гена *nej*) приводит к чрезмерной релаксации хроматина в результате избыточного ацетилирования гистонов, повышающего уязвимость генетического материала для повреждающих факторов различной природы [43]. В нашей работе это могло привести к снижению выживаемости особей *D. melanogaster* в нормальных и

стрессовых условиях, а также к изменению уровней транскрипции генов стресс-ответа.

Ацетилтрансферазы СВР/p300 являются важными регуляторами аутофагии (положительными или отрицательными, в зависимости от условий) и способны осуществлять эту функцию как на транскрипционном, так и на пострансляционном уровне [2, 5, 44]. Снижение активности СВР/p300 в скелетных мышцах, сердце, печени, жировой ткани животных, связано с усилением аутофагии, а повышение — с ее подавлением [2]. Например, p300 опосредует вызванное активацией mTORC1 подавление аутофагии, связанное с голоданием, и активирует клеточный липогенез [45]. Механически активация p300 обусловлена его фосфорилированием с помощью mTORC1, которое предотвращает связывание каталитического домена HAT с ингибирующим доменом RING, устраняя тем самым внутримолекулярное подавление активности p300 [45]. Однако в *in vitro* исследованиях установлено, что в ответ на цитотоксическое воздействие арсенидом сигнальный путь IKK α /CHK1/p300/СВР/p53 важен для активации аутофагии [32].

Несмотря на то, что СВР/p300 способствуют старению за счет уменьшения аутофагии в пери-

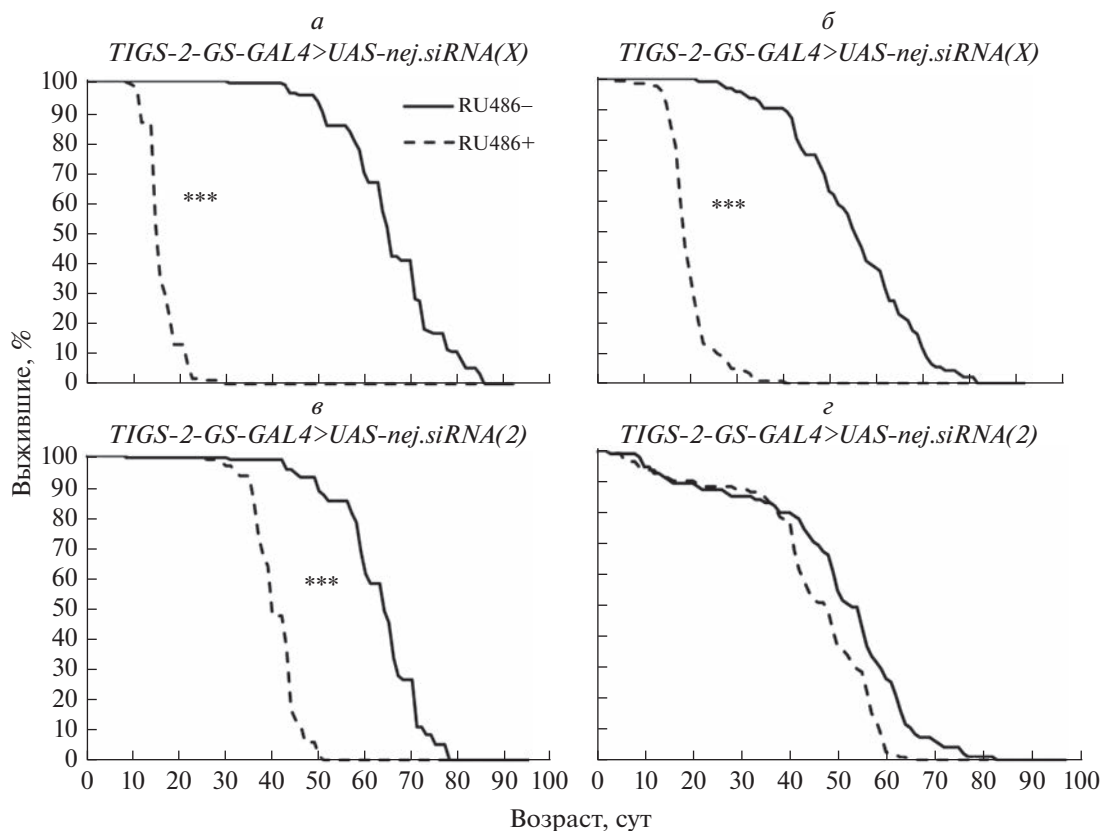


Рис. 10. Влияние нокдауна гена *nej* в кишечнике на продолжительность жизни самцов (а, в) и самок (б, г) *D. melanogaster*. * $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$ по критерию Колмогорова—Смирнова.

ферических тканях, ацетилирование гистонов на промоторе нейропротекторных генов, включая гены-мишени фактора транскрипции EB (TFEB), приводит к усилению биогенеза лизосом и аутофагии и, напротив, способствует долголетию [2]. Возможно, аналогичный механизм лежит в основе положительного влияния сверхэкспрессии *nej* в нервной системе на ПЖ и устойчивость к протеотоксическому воздействию. В исследовании, проведенном на клетках студенистого ядра, выделенных из межпозвонковых дисков с возрастной дегенерацией, обнаружено, что активация p300 способствует пролиферации и аутофагии, но ингибирует апоптоз через сигнальный путь FOXO3/SIRT1 [46]. С другой стороны, на *in vitro* и *in vivo* моделях таупатии показано, что гиперактивация p300/CBP блокирует поток аутофагии и увеличивает секрецию тау-белка в нейронах, а ингибирование p300/CBP оказывает противоположный эффект, уменьшая распространение тау-белка [47].

Роль CBP-1 как важного регулятора митохондриального ответа на “развернутые” белки (UPR^{mt}) и митохондриального стресс-индуцированного иммунного ответа показана в исследованиях на *C. elegans*. Ацетилирование гистонов с помощью CBP-1

в сочетании с их деметилированием ферментами JMJD-1.2/JMJD-3.1 индуцирует транскрипцию широкого спектра генов, необходимых для восстановления работы митохондрий в условиях стресса [11, 48]. Уровни транскриптов CBP/p300 положительно коррелируют с уровнями транскриптов генов UPR^{mt} и долголетием в популяциях мышей и у человека. Ингибирование CBP/p300 нарушает работу механизма UPR^{mt}, в то время как принудительной экспрессии p300 достаточно для его активации в клетках млекопитающих [11, 48].

Также ацетилтрансфераза, кодируемая геном *nej* *D. melanogaster*, сопряжена с димером CLOCK/CYCLE и является неотъемлемым компонентом циркадных часов, выполняющим регуляторные функции, связанные с транскрипцией, ассоциированной с осциллятором. При этом усиление экспрессии *nej* связано с потерей поведенческих и молекулярных ритмов [49].

Таким образом, CBP/p300 и его ортолог у *D. melanogaster*, кодируемый геном *nej*, способны действовать разными путями как способствующими долголетию, так и усиливающими старение. Более того, известно, что активность CBP/p300 осуществляется во взаимодействии с рецептором эстрогена и гормональная регуляция

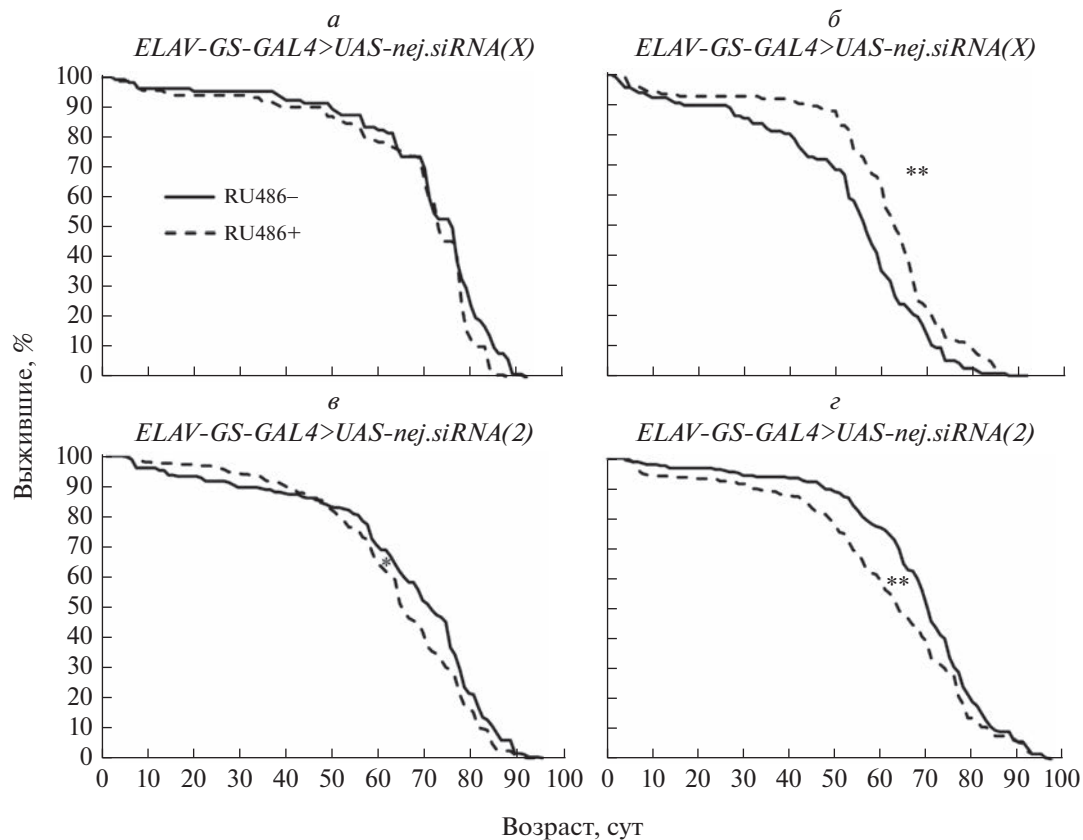


Рис. 11. Влияние нокдауна гена *nej* в нервной системе на продолжительность жизни самцов (а, в) и самок (б, г) *D. melanogaster*. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ по критерию Колмогорова–Смирнова.

СВР/р300 оказывает влияние на все мишени данных ацетилтрансфераз [50]. Для понимания и предсказания эффектов активации СВР/р300 на ПЖ требуется проведение детальных исследований с учетом максимального количества возможных механизмов.

СВР/р300 часто описывают как фактор, способствующий клеточному старению за счет образования гиперацетилированного хроматина и активных энхансерных элементов в некодирующих областях генома [8]. Ингибирование р300 лежит в основе геропротекторного действия спермидина [12] и нордигидрогваяретовой кислоты [51]. Также фармакологические ингибиторы СВР/Р300 облегчают течение радиационно-индуцированного желудочно-кишечного синдрома, способствуя восстановлению стволовых клеток и крипт кишечника путем задержки клеточного цикла [52].

Тем не менее, в нашей работе РНК-интерференция гена *nej* в кишечнике и жировом теле *D. melanogaster* преимущественно снижала medianную ПЖ мух вне зависимости от пола и использованных UAS-конструкций. Однако нокдаун *nej* в нервной системе самок продлевал жизнь при локализации UAS-конструкции на X-хромосоме

(а не на второй хромосоме), что указывает на критичность положения трансгена, по-видимому, обусловленную состоянием хроматина [53]. В то же время существует вероятность того, что наблюдаемый положительный результат может быть обусловлен действием мифепристона [54].

Полученные данные в целом согласуются с результатами [55], согласно которым инактивация СВР/р300 с помощью РНК-интерференции значительно уменьшает ПЖ тлей *Acyrtosiphon pisum*, ускоряет их старение, снижает число потомков и укорачивает репродуктивную фазу. На это же указывают результаты изучения *C. elegans* с мутацией *cbp-1* [37], а также с повсеместной, а в некоторых случаях тканеспецифичной РНК-интерференцией *cbp-1* (специфичной для нервной системы, кишечника и зародышевой линии) [56]. При этом описан эффект удвоения ПЖ у нематод (в аксенической культуре), критическую роль в котором играет активность *cbp-1*, действующая через механизмы нейропептидной регуляции в ГАМКергических нейронах. Нокдаун *cbp-1* в нервной системе препятствовал положительному влиянию ограничения питания [56].

Примечательно также, что мутации в структуре домена СН1 ацетилтрансфераз СВР и р300

Таблица 7. Влияние тканеспецифичного нокдауна гена *nej* на продолжительность жизни *D. melanogaster*

Генотип	RU486	Пол	М, сут	dM, %	МК, <i>p</i>	ГВ, <i>p</i>	90%, сут	d90% (%)	ВА, <i>p</i>	<i>n</i>
<i>S106-GS-GAL4></i> <i>UAS-nej.siRNA(X)</i>	—	♂	68				83			137
	+	♂	33	–51	<0.0001	<0.0001	41	–51	<0.0001	148
	—	♀	64				78			76
	+	♀	46	–28	<0.0001	<0.0001	54	–31	<0.0001	126
<i>S106-GS-GAL4></i> <i>UAS-nej.siRNA(2)</i>	—	♂	63				73			143
	+	♂	62	–2	>0.05	>0.05	76	+4	>0.05	133
	—	♀	76				83			106
	+	♀	48	–37	<0.0001	<0.0001	73	–12	<0.0001	137
<i>TIGS-2-GS-GAL4></i> <i>UAS-nej.siRNA(X)</i>	—	♂	65				80			149
	+	♂	15	–77	<0.0001	<0.0001	21	–74	<0.0001	160
	—	♀	55				70			92
	+	♀	18	–67	<0.0001	<0.0001	25	–64	<0.0001	122
<i>TIGS-2-GS-GAL4></i> <i>UAS-nej.siRNA(2)</i>	—	♂	63				72			155
	+	♂	39	–38	<0.0001	<0.0001	46	–36	<0.0001	152
	—	♀	52				65			95
	+	♀	47	–10	<0.0001	<0.01	58	–11	<0.0001	112
<i>ELAV-GS-GAL4></i> <i>UAS-nej.siRNA(X)</i>	—	♂	75				84			101
	+	♂	72	–4	<0.05	>0.05	81	–4	<0.01	128
	—	♀	56				71			117
	+	♀	62	+11	<0.001	<0.0001	79	+11	<0.05	124
<i>ELAV-GS-GAL4></i> <i>UAS-nej.siRNA(2)</i>	—	♂	70				84			251
	+	♂	64	–9	<0.01	<0.05	81	–4	<0.05	246
	—	♀	70				84			242
	+	♀	63	–10	<0.01	<0.001	83	–1	>0.05	235

Примечание. М — медианная продолжительность жизни (сут). 90% — возраст 90%-ной смертности (сут). dM и d90% — различия между медианной продолжительностью жизни и возрастом 90%-ной смертности у контрольных и экспериментальных мух соответственно (%). ГВ — критерий Гехана—Вилкоксона. МК — критерий Мантеля—Кокса. ВА — тест Ванг—Аллисона. *n* — количество особей в выборке.

приводят к значительному снижению массы тела у мышей *CBP^{ΔCH1/ΔCH1}* и *p300^{ΔCH1/ΔCH1}* и повышенной чувствительности к инсулину [57]. p300/CBP является ключевым регулятором энергетического обмена в печени (у дрозофилы аналогом печени является жировое тело), в том числе, липогенеза, экспорта липидов, глюконеогенеза [58]. На ключевую роль в координации баланса между анаболизмом и катаболизмом на клеточном уровне играет путь mTORC1/p300 [45]. Следовательно, семейство транскрипционных регуляторов p300/CBP может влиять на контроль ПЖ и старение, действуя через энергетический гомеостаз. Кроме того, нокаут гена *p300 S89A* негативно сказывался на состоянии кишечника у мышей, способствовал изменению состава микробиоты и иммунных реакций, приводил к изменениям в метаболических сигнальных путях [59].

Отметим, что наиболее интересные данные получены нами при сверхактивации и нокдауне гена *nej* в нервной системе. Критическую роль в проявлении их эффектов (помимо прочих факторов) сыграл тип клеток нервной системы, в котором менялась активность *nej*; стадия жизненного цикла, на которой работал драйвер; локализация UAS-конструкции. CBP/p300 определяют развитие нервной системы, регуляцию транскрипции и пластичности в постмитотических нейронах [60]. У дрозофилы белок p300 также идентифицирован как важный регулятор синаптического возбуждения через модуляцию пути Pum/Mef2 [61]. Полученные нами результаты и опубликованные данные [60, 61] показывают, что в нервной системе семейство CBP/p300 ацетилтрансфераз действуют через сеть механизмов, которые могут как способствовать долголетию, так и снижать ПЖ. Белки

СВР/p300 можно рассматривать в качестве мишени для геропротекторных вмешательств, направленных специфично на нервную систему, но требуется четкая настройка их экспрессии с учетом возможных негативных последствий.

Известно, что ацетилтрансферазы СВР/p300 вовлечены в патогенез таупатий, включая болезнь Альцгеймера. Гиперактивация СВР/p300 усиливает секрецию тау в результате блокирования аутофагии [47]. Накопление β -амилоида (А β) мешает активности белка CREB (с которым связываются коактиваторы СВР/p300), важного для формирования памяти. Вирусная доставка СВР в головной мозг приводит к восстановлению функции CREB, улучшает обучаемость и снижает дефицит памяти у мышей, используемых в качестве модели болезни Альцгеймера. Примечательно, что такое улучшение наступает без изменения концентрации пептида А β и тау-белка, при этом оно связано с повышенным уровнем нейротрофического фактора головного мозга [62]. Индуцированная А β дегградация BMAL1 (белок, подобный ядерному транслокатору АНР) и СВР приводит к нарушению циркадного ритма при болезни Альцгеймера [63]. Кроме того, СВР-1 участвует в снижении агрегации β -амилоида и увеличении ПЖ у *C. elegans* [11].

Важно отметить, что СВР/p300 вносит вклад в процесс старения, участвуя в патогенезе ряда других возрастзависимых заболеваний [2]. Изменение активности этих ацетилтрансфераз, причем как в сторону подавления, так и в сторону гиперактивации, может привести к возникновению различных типов рака [64–67]. Например, мутации СВР находят при синдроме Рубинштейна–Тайби, который характеризуется повышенной предрасположенностью к злокачественным новообразованиям уже в детском возрасте [64]. Повышенная активность СВР/p300 усиливает активацию андрогеновых и эстрогеновых рецепторов, за счет чего способствует развитию рака предстательной железы или молочной железы [66]. Нарушение регуляции СВР/p300 вызывает изменение профилей экспрессии генов, вовлеченных в гипертрофические и фиброгенные процессы в миокарде, что приводит к развитию гипертрофии сердца, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, диабетической кардиомиопатии [68]. С другой стороны, подавление СВР/p300 у млекопитающих может быть связано с метаболическими расстройствами — от чрезмерного снижения жировых запасов и массы тела [57] до развития ожирения [2]. Применение ингибиторов данных ацетилтрансфераз подавляет патологическое изменение органов при сахарном диабете, например, посредством регуляции продукции активных форм кислорода и снижения воспаления [69].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На плодовой мушке *D. melanogaster* нами впервые проанализировано влияние сверхэкспрессии и нокдауна гена *nejire* (*nej*), кодирующего ортолог белков СВР/p300 человека, в различных тканях на ПЖ. В зависимости от использованного драйвера и типа ткани, в которой индуцировали *nej*, а также от половой принадлежности мух, активация *nej* оказала как положительное, так и отрицательное влияние на ПЖ. Эффект увеличения ПЖ наблюдали у самок при кондиционной сверхэкспрессии *nej* в кишечнике и конститутивной сверхэкспрессии *nej* в нервной системе. В то же время нокдаун *nej* в большинстве вариантов эксперимента снижал ПЖ *D. melanogaster*.

Анализ опубликованных данных позволил нам выявить комплексную связь СВР/p300 с механизмами, вовлеченными в регуляцию ПЖ и старения организма, а также обозначить вклад дерегуляции этих ацетилтрансфераз в развитие возрастных заболеваний человека. Дальнейшее изучение ортологов, относящихся к семейству СВР/p300 (включая белок, кодируемый *nej*), перспективно с точки зрения его использования в качестве фармакологической мишени. Однако необходимо учитывать, что такое воздействие требует тонкой настройки и детального изучения вовлеченных механизмов, поскольку для положительного эффекта может потребоваться подавление либо стимуляция активности ацетилтрансфераз в конкретных тканях. Так, в настоящее время достигнут прогресс в разработке ингибиторов СВР/p300 применительно к лечению онкологических, воспалительных, сердечно-сосудистых, аутоиммунных заболеваний человека [67, 70, 71]. При этом активация ацетилирования белков может требоваться для терапии нейродегенеративных расстройств [72, 73].

Авторы выражают благодарность Институту биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН за предоставленную коллекцию лабораторных линий плодовых мушек *Drosophila*.

Исследования выполнены в рамках государственного задания Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН по теме “Генетические и функциональные исследования эффектов геропротекторных интервенций на модели *Drosophila melanogaster*” (№ 122040600022-1).

В работе соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и обращения с животными.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Прошкина Е.Н., Соловьёв И.А., Шапошников М.В., Москалев А.А. 2020. Ключевые молекулярные ме-

- ханизмы старения, биомаркеры и потенциальные интервенции. *Молекуляр. биология*. **54**(6), 883–921.
2. Bradshaw P.C. (2021) Acetyl-CoA metabolism and histone acetylation in the regulation of aging and lifespan. *Antioxidants* (Basel). **10**, 572.
 3. Santos-Rosa H., Valls E., Kouzarides T., Martinez-Balbas M. (2003) Mechanisms of P/CAF auto-acetylation. *Nucl. Acids Res.* **31**, 4285–4292.
 4. Dutto I., Scalera C., Prosperi E. (2018) CREBBP and p300 lysine acetyl transferases in the DNA damage response. *Cell Mol. Life Sci.* **75**, 1325–1338.
 5. Xu Y., Wan W. (2023) Acetylation in the regulation of autophagy. *Autophagy*. **19**, 379–387.
 6. Goodman R.H., Smolik S. (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* **14**, 1553–1577.
 7. Xue Y., Wen H., Shi X. (2018) CBP/p300: intramolecular and intermolecular regulations. *Front. Biol.* **13**, 168–179.
 8. Sen P., Lan Y., Li C.Y., Sidoli S., Donahue G., Dou Z., Frederick B., Chen Q., Luense L.J., Garcia B.A., Dang W., Johnson F.B., Adams P.D., Schultz D.C., Berger S.L. (2019) Histone acetyltransferase p300 induces *de novo* super-enhancers to drive cellular senescence. *Mol. Cell.* **73**, 684–698 e688.
 9. Vaziri H., West M.D., Allsopp R.C., Davison T.S., Wu Y.S., Arrowsmith C.H., Poirier G.G., Benchimol S. (1997) ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J.* **16**, 6018–6033.
 10. Huang W.S., Kuo Y.H., Kuo H.C., Hsieh M.C., Huang C.Y., Lee K.C., Lee K.F., Shen C.H., Tung S.Y., Teng C.C. (2017) CIL-102-Induced cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells via upregulation of p21 and GADD45. *PLoS One*. **12**, e0168989.
 11. Li T.Y., Sleiman M.B., Li H., Gao A.W., Mottis A., Bachmann A.M., El Alam G., Li X., Goeminne L.J.E., Schoonjans K., Auwerx J. (2021) The transcriptional coactivator CBP/p300 is an evolutionarily conserved node that promotes longevity in response to mitochondrial stress. *Nat. Aging*. **1**, 165–178.
 12. Madeo F., Carmona-Gutierrez D., Kepp O., Kroemer G. (2018) Spermidine delays aging in humans. *Aging* (Albany NY). **10**, 2209–2211.
 13. Marek K.W., Ng N., Fetter R., Smolik S., Goodman C.S., Davis G.W. (2000) A genetic analysis of synaptic development: pre- and postsynaptic dCBP control transmitter release at the *Drosophila* NMJ. *Neuron*. **25**, 537–547.
 14. Smolik S., Jones K. (2007) *Drosophila* dCBP is involved in establishing the DNA replication checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 135–146.
 15. Taylor J.P., Taye A.A., Campbell C., Kazemi-Esfarjani P., Fischbeck K.H., Min K.T. (2003) Aberrant histone acetylation, altered transcription, and retinal degeneration in a *Drosophila* model of polyglutamine disease are rescued by CREB-binding protein. *Genes Dev.* **17**, 1463–1468.
 16. Tseng A.S., Hariharan I.K. (2002) An overexpression screen in *Drosophila* for genes that restrict growth or cell-cycle progression in the developing eye. *Genetics*. **162**, 229–243.
 17. Osterwalder T., Yoon K.S., White B.H., Keshishian H. (2001) A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**, 12596–12601.
 18. Duffy J.B. (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis*. **34**, 1–15.
 19. Landis G.N., Salomon M.P., Keroles D., Brookes N., Sekimura T., Tower J. (2015) The progesterone antagonist mifepristone/RU486 blocks the negative effect on life span caused by mating in female *Drosophila*. *Aging* (Albany NY). **7**, 53–69.
 20. Xia B., de Belle J.S. (2016) Transgenerational programming of longevity and reproduction by post-eclosion dietary manipulation in *Drosophila*. *Aging* (Albany NY). **8**, 1115–1134.
 21. Fleming T.R., O'Fallon J.R., O'Brien P.C., Harrington D.P. (1980) Modified Kolmogorov–Smirnov test procedures with application to arbitrarily right-censored data. *Biometrics*. **36**, 607–625.
 22. Mantel N. (1966) Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother. Rep.* **50**, 163–170.
 23. Martinez R.L.M.C., Naranjo J.D. (2012) A pretest for choosing between logrank and wilcoxon tests in the two-sample problem. *Metron*. **68**, 111–125.
 24. Wang C., Li Q., Redden D.T., Weindruch R., Allison D.B. (2004) Statistical methods for testing effects on “maximum lifespan”. *Mech. Ageing Dev.* **125**, 629–632.
 25. Han S.K., Lee D., Lee H., Kim D., Son H.G., Yang J.S., Lee S.V., Kim S. (2016) OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research. *Oncotarget*. **7**, 56147–56152.
 26. Kruskal W.H., Wallis W.A. (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J. Am. Stat. Assoc.* **47**, 583–621.
 27. Ganner A., Gerber J., Ziegler A.K., Li Y., Kandzia J., Matulenski T., Kreis S., Breves G., Klein M., Walz G., Neumann-Haefelin E. (2019) CBP-1/p300 acetyltransferase regulates SKN-1/Nrf cellular levels, nuclear localization, and activity in *C. elegans*. *Exp. Gerontol.* **126**, 110690.
 28. Wang D., Kon N., Lasso G., Jiang L., Leng W., Zhu W.G., Qin J., Honig B., Gu W. (2016) Acetylation-regulated interaction between p53 and SET reveals a widespread regulatory mode. *Nature*. **538**, 118–122.
 29. Boija A., Mahat D.B., Zare A., Holmqvist P.H., Philip P., Meyers D.J., Cole P.A., Lis J.T., Stenberg P., Mannervik M. (2017) CBP regulates recruitment and release of promoter-proximal RNA polymerase II. *Mol. Cell.* **68**, 491–503.e495.
 30. Li Y., Zhong H., Wu M., Tan B., Zhao L., Yi Q., Xu X., Pan H., Bi Y., Yang K. (2019) Decline of p300 contributes to cell senescence and growth inhibition of hUC-MSCs through p53/p21 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **515**, 24–30.
 31. Ghosh R., Kaypee S., Shasmal M., Kundu T.K., Roy S., Sengupta J. (2019) Tumor suppressor p53-mediated structural reorganization of the transcriptional coactivator p300. *Biochemistry*. **58**, 3434–3443.
 32. Xu X., Zhang C., Xu H., Wu L., Hu M., Song L. (2020) Autophagic feedback-mediated degradation of IKK α

- requires CHK1- and p300/CBP-dependent acetylation of p53. *J. Cell Sci.* **133**, jcs246868.
33. Wondisford A.R., Xiong L., Chang E., Meng S., Meyers D.J., Li M., Cole P.A., He L. (2014) Control of *Foxo1* gene expression by co-activator P300. *J. Biol. Chem.* **289**, 4326–4333.
 34. Wu J., Jiang Z., Zhang H., Liang W., Huang W., Zhang H., Li Y., Wang Z., Wang J., Jia Y., Liu B., Wu H. (2018) Sodium butyrate attenuates diabetes-induced aortic endothelial dysfunction via P300-mediated transcriptional activation of Nrf2. *Free Radic. Biol. Med.* **124**, 454–465.
 35. Xu D., Zalmas L.P., La Thangue N.B. (2008) A transcription cofactor required for the heat-shock response. *EMBO Rep.* **9**, 662–669.
 36. Ruas J.L., Berchner-Pfannschmidt U., Malik S., Gradin K., Fandrey J., Roeder R.G., Pereira T., Poellinger L. (2010) Complex regulation of the transactivation function of hypoxia-inducible factor-1 alpha by direct interaction with two distinct domains of the CREB-binding protein/p300. *J. Biol. Chem.* **285**, 2601–2609.
 37. Barrett L.N., Westerheide S.D. (2022) The CBP-1/p300 lysine acetyltransferase regulates the heat shock response in *C. elegans*. *Front. Aging.* **3**, 861761.
 38. Hunt G., Boija A., Mannervik M. (2022) p300/CBP sustains Polycomb silencing by non-enzymatic functions. *Mol. Cell.* **82**, 3580–3597 e3589.
 39. Siebold A.P., Banerjee R., Tie F., Kiss D.L., Moskowitz J., Harte P.J. (2010) Polycomb repressive complex 2 and Trithorax modulate *Drosophila* longevity and stress resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 169–174.
 40. Dasari V., Srivastava S., Khan S., Mishra R.K. (2018) Epigenetic factors Polycomb (Pc) and Suppressor of zeste (Su(z)2) negatively regulate longevity in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology.* **19**, 33–45.
 41. Sharma S., Poetz F., Bruer M., Ly-Hartig T.B., Schott J., Séraphin B., Stoecklin G. (2016) Acetylation-dependent control of global Poly(A) RNA degradation by CBP/p300 and HDAC1/2. *Mol. Cell.* **63**, 927–938.
 42. Ansari M.S.Z., Stagni V., Iuzzolino A., Rotili D., Mai A., Del Bufalo D., Lavia P., Degrossi F., Trisciuglio D. (2023) Pharmacological targeting of CBP/p300 drives a redox/autophagy axis leading to senescence-induced growth arrest in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Gene Ther.* **30**, 124–136.
 43. Solovev I., Shaposhnikov M., Kudryavtseva A., Moskalev A. (2018) *Drosophila melanogaster* as a model for studying the epigenetic basis of aging. In: *Epigenetics of Aging and Longevity*. **4**. Eds Moskalev A., Vaiserman A.M. Boston: Acad. Press, pp. 293–307.
 44. Lee I.H., Finkel T. (2009) Regulation of autophagy by the p300 acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **284**, 6322–6328.
 45. Wan W., You Z., Xu Y., Zhou L., Guan Z., Peng C., Wong C.C.L., Su H., Zhou T., Xia H., Liu W. (2017) mTORC1 phosphorylates acetyltransferase p300 to regulate autophagy and lipogenesis. *Mol. Cell.* **68**, 323–335.e326.
 46. Hao Y., Ren Z., Yu L., Zhu G., Zhang P., Zhu J., Cao S. (2022) p300 arrests intervertebral disc degeneration by regulating the FOXO3/Sirt1/Wnt/ β -catenin axis. *Aging Cell.* **21**, e13677.
 47. Chen X., Li Y., Wang C., Tang Y., Mok S.A., Tsai R.M., Rojas J.C., Karydas A., Miller B.L., Boxer A.L., Gestwicki J.E., Arkin M., Cuervo A.M., Gan L. (2020) Promoting tau secretion and propagation by hyperactive p300/CBP via autophagy-lysosomal pathway in tauopathy. *Mol. Neurodegener.* **15**, 2.
 48. Auwerx J., Li T.Y. (2020) A conserved role of CBP/p300 in mitochondrial stress response and longevity. *FASEB J.* **34**, 1. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.00128>
 49. Hung H.C., Maurer C., Kay S.A., Weber F. (2007) Circadian transcription depends on limiting amounts of the transcription co-activator nejdire/CBP. *J. Biol. Chem.* **282**, 31349–31357.
 50. Lakshmanan M.D., Shaheer K. (2020) Endocrine disrupting chemicals may deregulate DNA repair through estrogen receptor mediated seizing of CBP/p300 acetylase. *J. Endocrinol. Invest.* **43**, 1189–1196.
 51. Tezil T., Chamoli M., Ng C.P., Simon R.P., Butler V.J., Jung M., Andersen J., Kao A.W., Verdin E. (2019) Lifespan-increasing drug nordihydroguaiaretic acid inhibits p300 and activates autophagy. *NPJ Aging Mech. Dis.* **5**, 7.
 52. Rao X., Tang P., Li Y., Fu G., Chen S., Xu X., Zhou Y., Li X., Zhang L., Mo S., Cai S., Peng J., Zhang Z., Gao J., Hua G. (2021) CBP/P300 Inhibitors mitigate radiation-induced GI syndrome by promoting intestinal stem cell-mediated crypt regeneration. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **110**, 1210–1221.
 53. McCarroll S.A., Murphy C.T., Zou S., Pletcher S.D., Chin C.S., Jan Y.N., Kenyon C., Bargmann C.I., Li H. (2004) Comparing genomic expression patterns across species identifies shared transcriptional profile in aging. *Nat. Genet.* **36**, 197–204.
 54. Landis G.N., Hilsabeck T.A.U., Bell H.S., Ronnen-Oron T., Wang L., Doherty D.V., Tejawanata F.I., Erickson K., Vu W., Promislow D.E.L., Kapahi P., Tower J. (2021) Mifepristone increases life span of virgin female *Drosophila* on regular and high-fat diet without reducing food intake. *Front. Genet.* **12**, 751647.
 55. Kirfel P., Vilcinskis A., Skaljic M. (2020) Lysine acetyltransferase p300/CBP plays an important role in reproduction, embryogenesis and longevity of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insects.* **11**, 265.
 56. Cai H., Dhondt I., Vandemeulebroucke L., Vlaeminck C., Rasulova M., Braeckman B.P. (2019) CBP-1 acts in GABAergic neurons to double life span in axenically cultured *Caenorhabditis elegans*. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **74**, 1198–1205.
 57. Bedford D.C., Kasper L.H., Wang R., Chang Y., Green D.R., Brindle P.K. (2011) Disrupting the CH1 domain structure in the acetyltransferases CBP and p300 results in lean mice with increased metabolic control. *Cell Metab.* **14**, 219–230.
 58. Yao W., Wang T., Huang F. (2018) p300/CBP as a key nutritional sensor for hepatic energy homeostasis and liver fibrosis. *Biomed. Res. Int.* **2018**, 8168791.
 59. Lai K.K.Y., Hu X., Chosa K., Nguyen C., Lin D.P., Lai K.K., Kato N., Higuchi Y., Highlander S.K., Melendez E., Eriguchi Y., Fueger P.T., Ouellette A.J., Chinge N.O., Ono M., Kahn M. (2021) P300 serine 89:

- a critical signaling integrator and its effects on intestinal homeostasis and repair. *Cancers* (Basel). **13**(6), 1288.
60. Lipinski M., Del Blanco B., Barco A. (2019) CBP/p300 in brain development and plasticity: disentangling the KAT's cradle. *Curr. Opin. Neurobiol.* **59**, 1–8.
 61. Lin W.H., Baines R.A. (2019) Myocyte enhancer factor-2 and p300 interact to regulate the expression of homeostatic regulator Pumilio in *Drosophila*. *Eur. J. Neurosci.* **50**, 1727–1740.
 62. Caccamo A., Maldonado M.A., Bokov A.F., Majumder S., Oddo S. (2010) CBP gene transfer increases BDNF levels and ameliorates learning and memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 22687–22692.
 63. Song H., Moon M., Choe H.K., Han D.H., Jang C., Kim A., Cho S., Kim K., Mook-Jung I. (2015) A β -Induced degradation of BMAL1 and CBP leads to circadian rhythm disruption in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **10**, 13.
 64. Iyer N.G., Özdag H., Caldas C. (2004) p300/CBP and cancer. *Oncogene.* **23**, 4225–4231.
 65. Wang F., Marshall C.B., Ikura M. (2013) Transcriptional/epigenetic regulator CBP/p300 in tumorigenesis: structural and functional versatility in target recognition. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 3989–4008.
 66. Waddell A.R., Huang H., Liao D. (2021) CBP/p300: critical co-activators for nuclear steroid hormone receptors and emerging therapeutic targets in prostate and breast cancers. *Cancers* (Basel). **13**(12), 2872.
 67. Chen Q., Yang B., Liu X., Zhang X.D., Zhang L., Liu T. (2022) Histone acetyltransferases CBP/p300 in tumorigenesis and CBP/p300 inhibitors as promising novel anticancer agents. *Theranostics.* **12**, 4935–4948.
 68. Ghosh A.K. (2020) p300 in cardiac development and accelerated cardiac aging. *Aging Dis.* **11**, 916–926.
 69. Lazar A.G., Vlad M.L., Manea A., Simionescu M., Manea S.A. (2021) Activated histone acetyltransferase p300/CBP-related signalling pathways mediate up-regulation of NADPH oxidase, inflammation, and fibrosis in diabetic kidney. *Antioxidants* (Basel). **10**, 1356.
 70. Xiong Y., Zhang M., Li Y. (2020) Recent advances in the development of CBP/p300 bromodomain inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **27**, 5583–5598.
 71. He Z.X., Wei B.F., Zhang X., Gong Y.P., Ma L.Y., Zhao W. (2021) Current development of CBP/p300 inhibitors in the last decade. *Eur. J. Med. Chem.* **209**, 112861.
 72. Valor L.M., Viosca J., Lopez-Atalaya J.P., Barco A. (2013) Lysine acetyltransferases CBP and p300 as therapeutic targets in cognitive and neurodegenerative disorders. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 5051–5064.
 73. Singh A.K., Neo S.H., Liwang C., Pang K.K.L., Leng J.C.K., Sinha S.H., Shetty M.S., Vasudevan M., Rao V.J., Joshi I., Eswaramoorthy M., Pavon M.V., Sheila A.R., Navakkode S., Kundu T.K., Sajikumar S. (2022) Glucose derived carbon nanosphere (CSP) conjugated TTK21, an activator of the histone acetyltransferases CBP/p300, ameliorates amyloid-beta 1–42 induced deficits in plasticity and associativity in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Aging Cell.* **21**, e13675.

***Drosophila melanogaster* Lifespan Is Regulated by *nejire* Gene Expression in Peripheral Tissues and Nervous System**

**L. A. Koval¹, E. N. Proshkina¹, N. V. Zemskaya¹, I. A. Solov'ev^{1, 2}, E. V. Shegoleva¹,
M. V. Shaposhnikov¹, and A. A. Moskal'ev^{1, 3, 4, *}**

¹*Institute of Biology, Komi Science Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982 Russia*

²*Pitirim Sorokin Syktyvkar State University, Syktyvkar, 167001 Russia*

³*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

⁴*Laboratory of Genetics and Epigenetic of Aging, Russian Clinical Research Center for Gerontology, Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 129226 Russia*

*e-mail: amoskalev@ib.komisc.ru

Histone acetyltransferases of the CBP/p300 family play the role of transcriptional regulators and are required for a number of biological processes (cell proliferation and differentiation, organism development, regulation of stress response and metabolism). In a study on the fruit fly *Drosophila melanogaster*, we analyzed for the first time the effect of overexpression and knockdown of the *nejire* (*nej*) ortholog gene in various tissues (fat body, intestine, nervous system) on lifespan. The activation of *nej* had both a positive and a negative effect on this parameter, depending on the driver and the tissue where *nej* was induced, as well as the sex of the animals. The effect of increasing lifespan (by 6–15%) was found in females with conditional overexpression of *nej* in the intestine and constitutive overexpression of *nej* in the nervous system. But in other cases, a shortening of life (up to 44%), or the absence of statistically significant changes were observed. In addition, activation of *nej* revealed changes in the expression of stress response genes (*Sod1*, *Gadd45*, *Hsp27*, *Hsp68*, *Hif1*). At the same time, knockdown of *nej* in most variants of the experiment caused a pronounced negative effect on the *Drosophila* lifespan.

Keywords: histone acetyltransferase, CBP/p300, *nejire*, lifespan, stress resistance, *Drosophila melanogaster*

УДК 576.54

МЕХАНИЗМ БИМОДАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ DL-БУТИОНИНСУЛЬФОКСИМИНА НА КОНСТИТУТИВНЫЙ РЕЦЕПТОР АНДРОСТАНА И X-РЕЦЕПТОР ПРЕГНАНА *in vitro*

© 2023 г. Ю. В. Абаленихина^а, *, А. В. Щулькин^а, А. А. Сеидкулиева^а,
Е. Д. Рокунов^а, Ф. Т. Гаджиева^а, Е. Н. Якушева^а

^аРязанский государственный университет им. академика И.П. Павлова, Рязань, 390026 Россия

*e-mail: abalenihiina88@mail.ru

Поступила в редакцию 04.12.2022 г.

После доработки 03.03.2023 г.

Принята к публикации 29.03.2023 г.

Конститутивный рецептор андростана (CAR) и X-рецептор прегнана (PXR) — ядерные рецепторы, участвующие в регуляции транскрипции генов ферментов биотрансформации и экскреции эндо- и ксенобиотиков. Изучено влияние и механизмы действия DL-бутионинсульфоксими́на (БСО, ингибитор γ -глутамилцистеин-синтетазы) на продукцию CAR и PXR в клетках линии Сасо-2. БСО использовали в концентрациях 1–500 мкМ при длительности воздействия 24 и 72 ч. Образование активных форм кислорода (АФК) определяли, используя флуоресцентные зонды MitoTracker Red CM-H₂ XROS. Цитотоксичность БСО анализировали с помощью МТТ-теста. Относительное количество CAR и PXR оценивали методом вестерн-блоттинга. Обработка клеток БСО (24 ч в концентрации 10, 50 и 100 мкМ; 72 ч — в концентрации 50, 100 мкМ) увеличивала образование АФК. При этом БСО в концентрации 500 мкМ снижал жизнеспособность клеток при всех сроках воздействия. Относительное количество CAR возрастало при обработке клеток БСО (50 и 100 мкМ) в течение 24 ч, в концентрации 10, 50 мкМ в течение 72 ч. Количество PXR повышалось при инкубации с БСО 50 мкМ — в течение 72 ч, а при 100 и 500 мкМ в течение и 24, и 72 ч. Установлено, что совместное применение БСО (24 ч, 50 мкМ; 10 и 50 мкМ, 72 ч) и глутатиона подавляет индукцию CAR, тогда как воздействие БСО в концентрации 50 и 100 мкМ в течение 72 ч подавляло продукцию PXR. Внесение 1 мМ глутатиона в среду культивирования клеток вместе с БСО (100 и 500 мкМ (24 ч) и 500 мкМ (72 ч)) не влияло на относительное количество PXR, а на количество CAR — при концентрации 100 мкМ (24 ч) и 50 и 100 мкМ (72 ч). Таким образом, БСО может как индуцировать продукцию CAR и PXR за счет повышения уровня свободных радикалов и развития окислительного стресса, так и действовать как ксенобиотик.

Ключевые слова: конститутивный рецептор андростана, X-рецептор прегнана, DL-бутионинсульфоксими́н, клетки линии Сасо-2

DOI: 10.31857/S0026898423050026, **EDN:** XVODRS

ВВЕДЕНИЕ

Конститутивный рецептор андростана (CAR; NR1I3) и X-рецептор прегнана (PXR; NR1I2, SXR и PAR) являются ядерными рецепторами и ключевыми регуляторами генов ферментов, катализирующих реакции биотрансформации и экскреции эндо- и ксенобиотиков [1].

CAR и PXR участвуют в регуляции метаболических процессов, включая углеводный, липид-

ный и энергетический обмен. Доказано, что CAR и PXR активируют экспрессию цитохромов P450 (изоформы CYP 3A4, CYP 2A6, CYP2Cs, CYP 2B), ферментов фазы II биотрансформации ксенобиотиков (глутатион-S-трансфераза, сульфотрансфераза, UDP-глюкуронозилтрансфераза), белков-транспортёров (белок множественной лекарственной устойчивости 1, Р-гликопротеин) [2–5], а также ферментов углеводного и липидного обмена [6, 7].

Механизмы регуляции CAR и PXR активно изучаются. Уровень этих рецепторов в клетке зависит от экспрессии их генов [8], а также от посттрансляционной модификации (фосфорилирование [9], убиквитинирование [10]) и белок-белковых взаимодействий [11].

Сокращения: АФК — активные формы кислорода; БСО — DL-бутионинсульфоксими́н; Сасо-2 — клетки аденокарциномы ободочной кишки человека; CAR — конститутивный рецептор андростана; CYP — цитохром; GSH — глутатион; Nrf2 — фактор эритроидного происхождения 2; PXR — X-рецептор прегнана; МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид.

Ранее нами было показано, что развитие окислительного стресса (ОС) приводит к увеличению количества CAR и PXR [12, 13]. Индукция синтеза опосредовалась малоновым диальдегидом и не зависела от фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) [14]. В условиях нитрозативного стресса, вызванного нитрозоглутатионом, индукция CAR регулируется через сигнальный путь NO-cGMP, а при повышении концентрации донора оксида азота(II) — за счет битирозина, продукта нитрозативного стресса [15].

Глутатионзависимая регуляция CAR и PXR остается слабо изученной. Ключевую роль в синтезе глутатиона и поддержании его уровня в клетках играет γ -глутамилцистеин-синтетаза, селективным ингибитором которой является DL-бутионинсульфоксимин (БСО) [16].

Нами изучено влияние и механизм воздействия БСО на относительное количество CAR и PXR в клетках Caco-2 *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследование выполнено на линии клеток Caco-2 (клетки аденокарциномы ободочной кишки человека), полученной из Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Клетки линии Caco-2 культивировали при 37°C и 5% CO₂ в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) (“Sigma-Aldrich”, Германия), содержащей L-глутамин (4 мМ), 15% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед./мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина соответственно. После достижения 70–90% монослоя клетки снимали с поверхности флакона, добавляя раствор трипсин-EDTA (0.25% трипсина и 0.2% EDTA, “Sigma-Aldrich”) и высевали в 6- и 96-луночные планшеты (“Corning”, США). Клетки культивировали в течение 21 сут, поскольку на данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки.

В ходе эксперимента клетки линии Caco-2 инкубировали в питательной среде с добавлением БСО в концентрации 1–500 мкМ в течение 24 и 72 ч.

В качестве контроля использовали интактные клетки, которые инкубировали в питательной среде с добавлением воды для инъекций (растворитель БСО). На следующем этапе исследования для уточнения эффекта ОС или прямого воздействия БСО корректировали дефицит синтеза глутатиона. В питательную среду клеток одновременно с добавлением БСО вносили восстановленный глутатион (“Sigma-Aldrich”) в концентрации 1 мМ и инкубировали в течение 24 и 72 ч [17]. При экспозиции в течение 72 ч смену питательной среды

проводили каждые 24 ч. Каждый эксперимент выполняли в трех повторностях ($n = 3$).

Содержание небелковых SH-групп в лизате клеток определяли по методу Элмана с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (DTNB) [19]. Пробу предварительно смешивали с охлажденной 5%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ, “Химмед”, Россия), инкубировали на льду в течение 15 мин, затем центрифугировали при 11000 g (CM-50, “Eppendorf”, Германия) в течение 5 мин при 4°C. Полученный супернатант нейтрализовали с помощью 1%-ого NaOH и использовали для анализа. К 100 мкл супернатанта добавляли 100 мкл 2 мМ DTNB (“Serva”, Германия) в 1 М Трис-НСl-буфере (pH 8.0) и 1000 мкл дистиллированной воды. После экспозиции в течение 30 мин определяли содержание 5-тио-2-нитробензойной кислоты при 412 нм на фотометре Stat Fax 2100 (“Awareness Technology”, США). Концентрацию SH-групп рассчитывали, используя коэффициент экстинкции $\lambda_{412} = 13.6 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [20], и выражали в мкмоль/мг белка.

Гиперпродукцию активных форм кислорода (АФК) под действием БСО подтверждали с помощью флуоресцентных зондов MitoTracker Red CM-H₂ XROS (“Invitrogen”, США). Восстановленный дигидро-Х-розамин проникает в живые клетки и окисляется АФК с образованием флуоресцентного зонда, который связывается с тиоловыми группами в митохондриях. Таким образом, по интенсивности флуоресценции можно судить об уровне АФК в клетке. После инкубации клетки снимали с поверхности 6-луночных планшетов раствором трипсин-EDTA и лизировали 0.2%-ным раствором Triton X-100 (“Sigma-Aldrich”). Уровень АФК в лизате клеток оценивали количественно по степени флуоресценции ($\lambda_{\text{ext}} = 579 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{em}} = 599 \text{ нм}$) с помощью спектрофлуориметра (Shimadzu RF-6000) и пересчитывали на количество клеток (счетчик и анализатор жизнеспособности клеток Countess 3 Automated Cell Counter, США). Работу с флуоресцентными зондами проводили согласно инструкции к набору (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M22426>).

Оценка выживаемости клеток (цитотоксическое действие БСО), МТТ-тест. Клетки Caco-2 культивировали в 96-луночном планшете. После экспозиции с тестируемым веществом в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 20 мкл 0.5%-ого раствора МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1%-ого раствора диметилсульфоксида (“ПанЭко”, Россия) [18]. Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (“Awareness Technology”).

Жизнеспособность клеток Сасо-2 рассчитывали по формуле:

$$\text{Жизнеспособность} = \frac{\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}}{\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}} \times 100\%,$$

где ОП — оптическая плотность.

Приготовление полных клеточных лизатов. Лизаты клеток готовили после окончания экспозиции с тестируемыми веществами. Для этого клетки снимали с лунок раствором трипсин-EDTA (0.25% трипсина и 0.2% EDTA, “Sigma-Aldrich”), трижды промывали раствором фосфатного буфера (“Bio-Rad”, США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (“Thermo Fisher Scientific”, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (гидрохлорид 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонилфторида, AEBSF) 2 мМ, апротинина 0.3 мкМ, бестатина 130 мкМ, EDTA 1 мМ, *транс*-эпоксисукцинил-*L*-лейциламидо(4-гуанидино)бутана (E-64) 14 мкМ, лейпептина 1 мкМ (“Sigma-Aldrich”) в течение 30 мин при +4°C и постоянном перемешивании из расчета 10^7 клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 5000 g (CM-50, “Eppendorf”). Супернатант использовали для проведения биохимических анализов.

Количественное определение белка. Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, “ThermoFisher”) [21].

Определение относительного количества CAR, PXR. Относительное количество CAR, PXR определяли методом вестерн-блоттинга. Белки клеточного лизата (20 мкг) подвергали электрофорезу с использованием 7.5% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (“Bio-Rad”) в буферной системе Laemmli (“Bio-Rad”). Образцы смешивали с буфером Laemmli (“Bio-Rad”), содержащим 50 мМ β-меркаптоэтанол (“Helicon”, США) в соотношении 3 : 1, инкубировали в течение 10 мин при 70°C. Электрофорез проводили при 100 В в течение 90 мин.

Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose, “Bio-Rad”) с использованием Mini Trans-Blot (“Bio-Rad”) в течение 10 мин при 25 В и 1.3 А.

Белки на мембране блокировали 1%-ным раствором Casein Blocker (“Bio-Rad”), содержащим 0.1% Tween-20 (“Sigma”), инкубируя в течение 1 ч и комнатной температуре.

CAR и PXR детектировали с использованием первичных моноклональных антител мыши (MB67 CAR Monoclonal Antibody, “Invitrogen”, США; MA5-31808 PXR Monoclonal Antibody 1D12G1, “Invitrogen”) в концентрации 1 : 200 в блокирующем растворе Casein blocker (“Bio-Rad”) в течение 2 ч при 37°C. Первичные антите-

ла визуализировали с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit-anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”) в разведении 1 : 4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Хемилуминесценцию фиксировали с помощью ChemiDocXRS+ (“Bio-Rad”). Интенсивность полученных полос анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (“Bio-Rad”). Молекулярную массу CAR и PXR подтверждали, используя маркеры молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, “Bio-Rad”).

Содержание CAR и PXR оценивали по содержанию белка домашнего хозяйства GAPDH (глицеральдегид-фосфат-дегидрогеназа) (первичные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 (“Invitrogen”), разведение 1 : 1000; вторичные кроличьи антитела — Rabbit-anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP (“Invitrogen”), разведение 1 : 4000).

Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистическую значимость различий оценивали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA), попарные сравнения выполняли с использованием теста Даннетта. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе исследования оценивали уровень небелковых SH-групп, основным источником которых служит глутатион, в клетках линии Сасо-2, подвергнутых воздействию БСО.

Воздействие БСО (ингибитор γ-глутамилцистеин-синтетазы) в концентрации 10, 50, 100 и 500 мкМ приводило к снижению содержания небелковых SH-групп в течение 24 ч на 40.71% ($p = 0.002$); 57.6% ($p = 0.0004$); 67.8% ($p = 0.0002$) и 55.9% ($p = 0.0004$), а при воздействии в течение 72 ч — на 31.96% ($p = 0.007$); 48.36% ($p = 0.0006$); 62.29% ($p = 0.0002$) и 57.4% ($p = 0.0002$) соответственно (табл. 1).

Снижение уровня небелковых SH-групп приводило к повышению продукции АФК.

Так, БСО (10, 50, 100 мкМ в течение 24 ч) повышал интенсивность флуоресценции клеток Сасо-2, окрашенных Mitotracker Red CM-H₂ XRos на 38.8% ($p = 0.001$), 46.5% ($p = 0.0004$) и 70.2% ($p = 0.0001$), соответственно, по сравнению

Таблица 1. Концентрация небелковых SH-групп в лизате клеток линии Сасо-2, обработанных БСО и БСО в сочетании с глутатионом

БСО, мкМ	SH-группы, мкмоль/мг белка			
	БСО	БСО + глутатион	БСО	БСО + глутатион
	24 ч		72 ч	
Контроль	0.118 ± 0.015	0.120 ± 0.017	0.122 ± 0.018	0.119 ± 0.025
1	0.120 ± 0.019	0.118 ± 0.014	0.134 ± 0.005	0.135 ± 0.009
5	0.117 ± 0.022	0.115 ± 0.013	0.119 ± 0.022	0.117 ± 0.022
10	0.070 ± 0.010**	0.117 ± 0.021	0.083 ± 0.013**	0.117 ± 0.010
50	0.050 ± 0.004***	0.115 ± 0.034	0.063 ± 0.002***	0.115 ± 0.014
100	0.038 ± 0.008***	0.118 ± 0.025	0.046 ± 0.008***	0.118 ± 0.019
500	0.052 ± 0.011***	0.119 ± 0.021	0.052 ± 0.012***	0.158 ± 0.023

Примечание. Концентрация глутатиона 1 мМ; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – статистически значимые отличия от показателей в контроле. Данные представлены как $M \pm SD$, $n = 3$.

с контролем (рис. 1а). При воздействии БСО в течение 72 ч и концентрации 50 и 100 мкМ интенсивность флуоресценции клеток Сасо-2 возрастала на 12.7% ($p = 0.026$) и 15.7% ($p = 0.007$), соответственно, по сравнению с контролем (рис. 1б). Обработка клеток БСО в концентрации 1–5 и 1–10 мкМ в течение 24 и 72 ч, соответственно, на уровень АФК не влияла [22].

При внесении в инкубационную среду с БСО в концентрации 10 мкМ (24 ч) и 50, 100 мкМ (24 и 72 ч) восстановленного глутатиона в концентрации 1 мМ уровень АФК не отличался от значений в контроле, интенсивность флуоресценции в среднем составила $93.5 \pm 6.7\%$.

Далее оценивали жизнеспособность клеток, принимая за 100% значения в контроле. Жизнеспособность клеток, инкубируемых с БСО в концентрации 1–100 мкМ в течение 24 и 72 ч, была такой же, как в контроле, а в присутствии 500 мкМ БСО снижалась на 23.9% ($p = 0.003$) и 30.1% ($p = 0.001$) соответственно (рис. 2).

Таким образом, БСО (10–500 мкМ) способствует снижению уровня глутатиона и выработке АФК, а в концентрации 500 мкМ приводит также к потере жизнеспособности клеток.

Воздействие БСО (24 ч, 50 и 100 мкМ) приводило к статистически значимому повышению относительного количества CAR – на 32.7% ($p = 0.0006$)

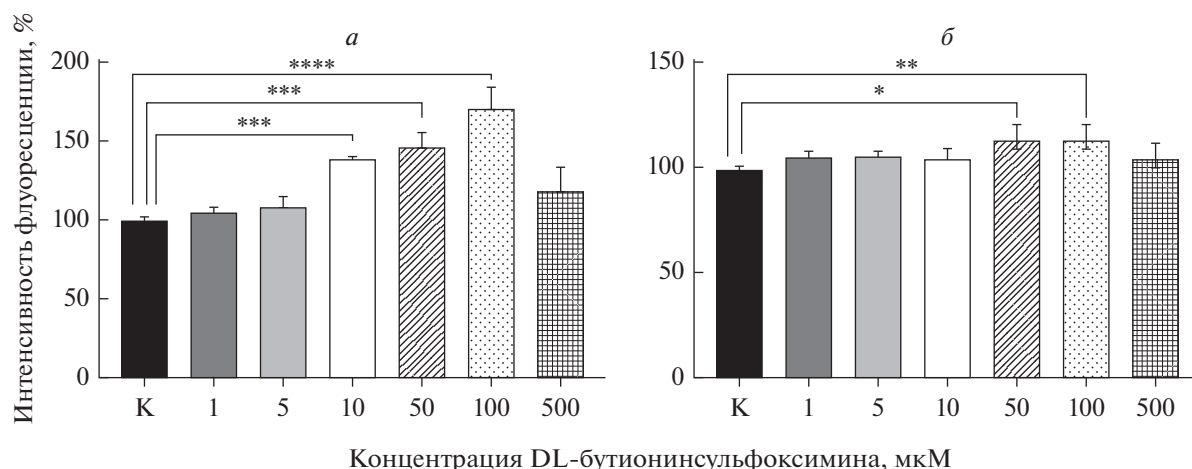


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции в лизате клеток, обработанных DL-бутионинсульфоксимином в концентрации 1–500 мкМ в течение 24 (а) и 72 ч (б). Клетки окрашены Mito tracker Red CM-H2 XROS. * $p < 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p < 0.0001$ – статистически значимые отличия от показателей в контроле.

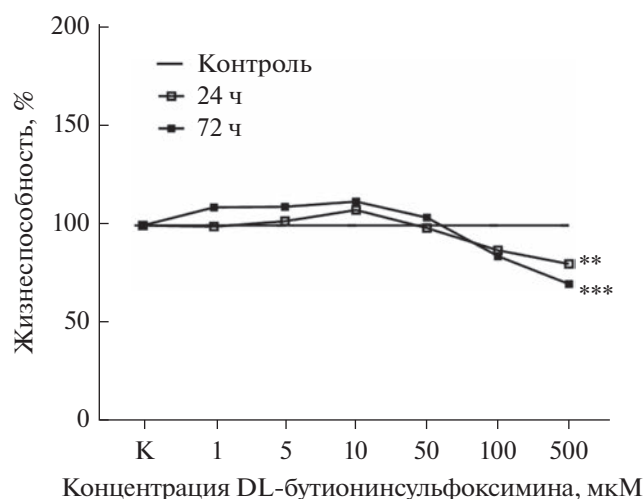


Рис. 2. Изменение жизнеспособности клеток линии Сасо-2 в зависимости от концентрации БСО при инкубации в течение 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n = 3$). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ — статистически значимые отличия от показателей в контроле.

и 39.6% ($p = 0.0001$) соответственно (рис. 3а) по сравнению с контролем. Инкубация клеток с БСО в течение 72 ч и концентрации 10 и 50 мкМ приводила к увеличению относительного количества CAR на 24.9% ($p = 0.045$) и 43.3% ($p = 0.0007$) соответственно (рис. 3б).

Относительное количество PXR в клетках, инкубируемых с БСО в концентрации 100 и 500 мкМ в течение 24 ч, возрастало статистически значимо — на 33.6% ($p < 0.0001$) и 40.5% ($p < 0.0001$) соответственно (рис. 4а), а при инкубации в течение 72 ч и концентрации БСО 50, 100 и 500 мкМ — на 26.4% ($p = 0.047$), 41.5% ($p = 0.002$) и 36.5% ($p = 0.006$) (рис. 4б).

Для изучения механизмов индукции CAR и PXR под действием БСО, а также для уточнения активности БСО как ксенобиотика или как агента, вызывающего ОС, в качестве антиоксиданта использовали восстановленный глутатион.

Показано, что сочетанное воздействие БСО (50 мкМ) и глутатиона (1 мМ) в течение 24 ч не приводило к изменению относительного количества CAR по сравнению с контролем, тогда как при применении 100 мкМ БСО относительное количество CAR было на 43.1% ($p = 0.01$) выше, чем в контроле (рис. 5а).

Индукрующий эффект БСО в концентрации 10 мкМ и инкубации в течение 72 ч подавлялся глутатионом — относительное количество CAR не отличалось от значений в контроле. Совместное применение глутатиона и БСО (50 и 100 мкМ) приводило к повышению относительного количества CAR — на 26.7% ($p = 0.04$) и 46.7% ($p = 0.03$) (рис. 5б).

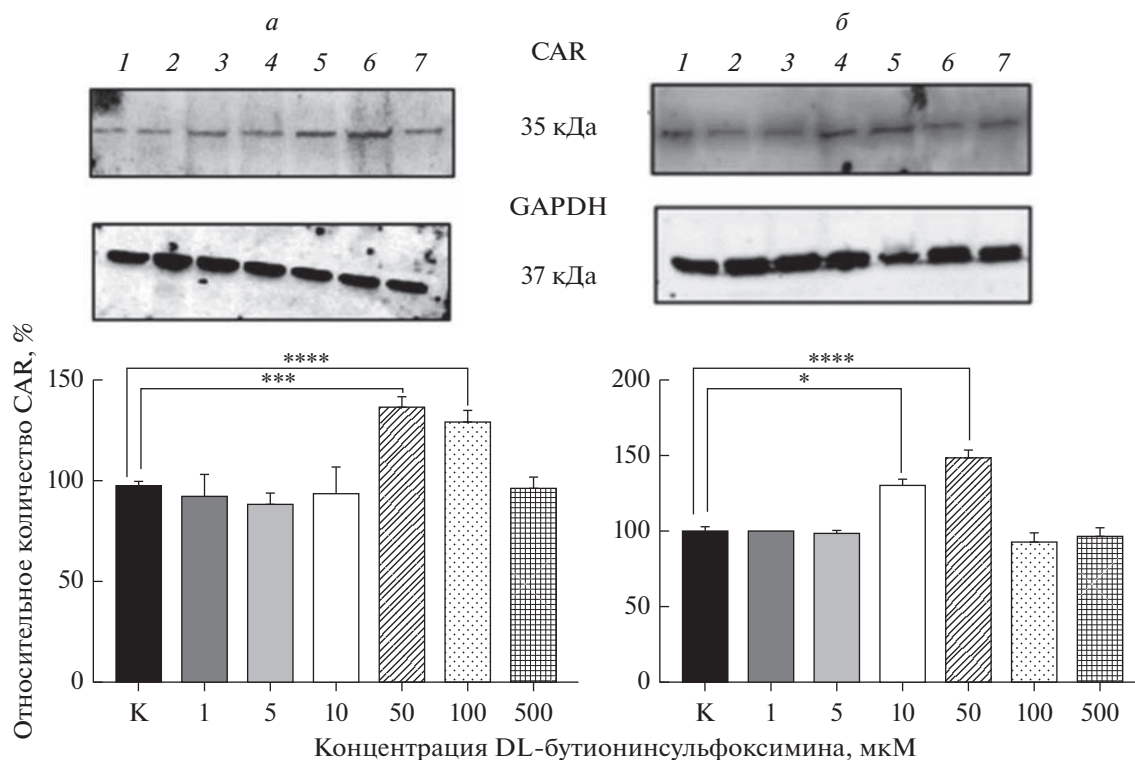


Рис. 3. Относительное количество CAR в клетках линии Сасо-2 в норме (1) и при воздействии DL-бутионинсульфоксима в концентрации 1–500 мкМ (2–7) в течение 24 (а) и 72 ч (б). ($M \pm SD$, $n = 3$). * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$ — статистически значимые отличия от показателей в контроле.

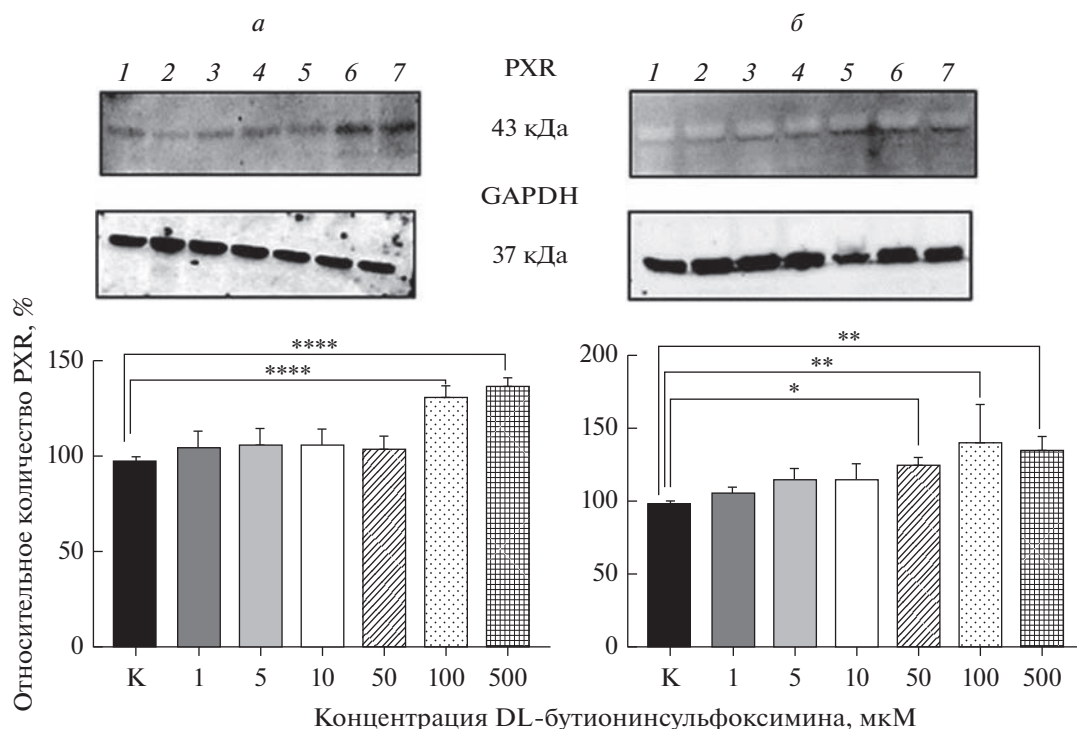


Рис. 4. Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 в норме (1) и при воздействии DL-бутионинсульфоксими-на в концентрации 1–500 мкМ (2–7) в течение 24 (а) и 72 ч (б). ($M \pm SD$, $n = 3$). * $p < 0.05$; ** $p \leq 0.01$; **** $p \leq 0.0001$ – статистически значимые отличия от показателей в контроле.

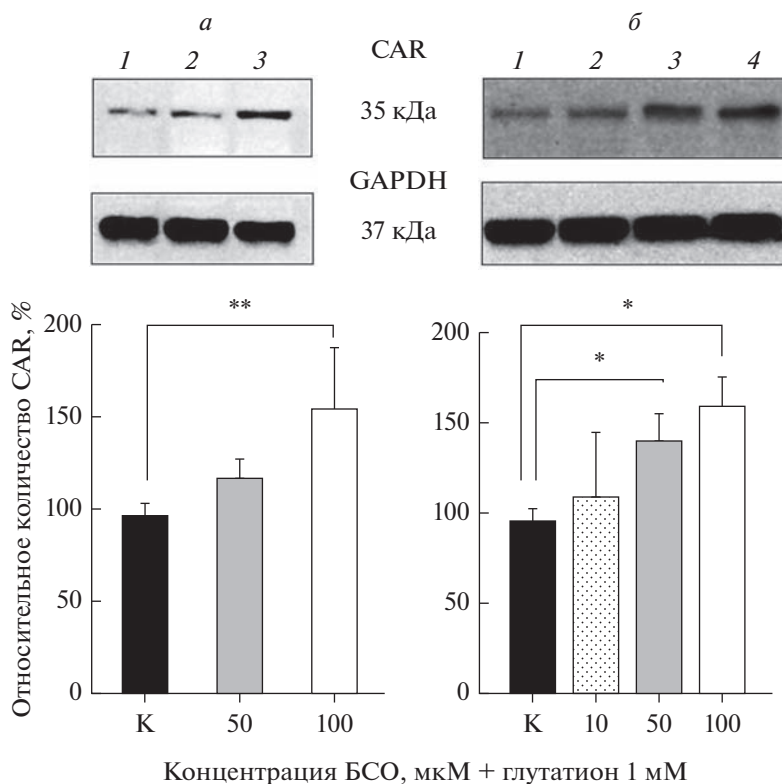


Рис. 5. Относительное количество CAR в клетках линии Сасо-2 в норме (1) и при сочетанном применении глутатиона (1 мМ) и DL-бутионинсульфоксими-на (БСО) в концентрации 10 (б, 2), 50 (а, 2; б, 3) и 100 (а, 3; б, 4) мкМ в течение 24 (а) и 72 ч (б). ($M \pm SD$, $n = 3$). * $p < 0.05$; ** $p \leq 0.01$ – статистически значимые отличия от показателей в контроле.

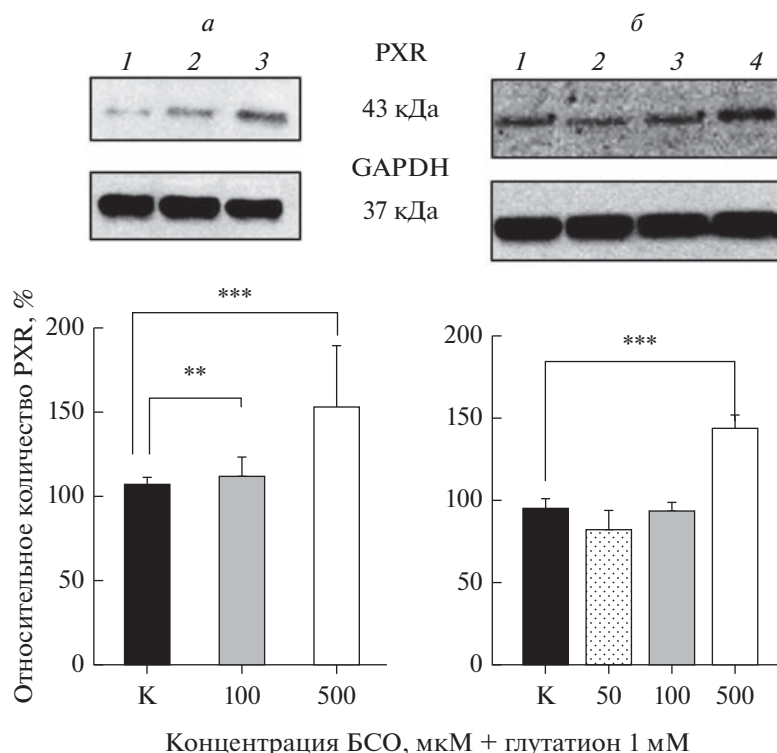


Рис. 6. Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 в норме (1) и при сочетанном применении глутатиона (1 мМ) и DL-бутионинсульфоксида (БСО) в концентрации 50 (б, 2), 100 (а, 2; б, 3) и 500 (а, 3; б, 4) мкМ в течение 24 (а) и 72 ч (б). ($M \pm SD$, $n = 3$). ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ – статистически значимые отличия от показателей в контроле.

Индукция PXR не подавлялась при воздействии БСО (100 и 500 мкМ, 24 ч) в присутствии глутатиона – относительное количество рецептора возрастало на 20.9% ($p = 0.001$) и 27.3% ($p = 0.0002$), соответственно, по сравнению со значениями в контроле (рис. 6а). Однако стоит отметить, что в присутствии антиоксиданта относительное количество PXR стало ниже, чем в клетках, которые обрабатывали только БСО – на 12.7% ($p = 0.02$) и 13.2% ($p = 0.02$).

Способность БСО в концентрации 50 и 100 мкМ и воздействию в течение 72 ч увеличивать количество CAR и PXR в клетках линии Сасо-2 подавлялась глутатионом. Но при совместном действии БСО (500 мкМ) и глутатиона относительное количество PXR возрастало на 49.4% ($p = 0.001$) по сравнению с контролем (рис. 6б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Глутатион – основной небелковый тиол, содержащийся в клетках и играющий важную роль в защитных механизмах, действует как антиоксидант или вступает в реакции с электрофильными соединениями [23]. Глутатион может реагировать со многими токсичными агентами с образованием конъюгатов [24, 25].

Концентрация глутатиона в клетке поддерживается несколькими механизмами, основными из которых являются синтез глутатиона *de novo* и восстановление дисульфида глутатиона глутатионредуктазой при участии $NADPH_2$. *De novo* глутатион синтезируется из глутамата, цистеина и глицина посредством двух последовательных АТФ-зависимых реакций, катализируемых γ -глутамилцистеин-синтетазой и глутатионсинтазой [23].

Глутатион синтезируется только в цитозоле, откуда он проникает в остальные компартменты клеток. Известны три варианта транспорта глутатиона: внутриклеточный, межклеточный и межорганелльный. Внеклеточный глутатион подвергается гидролизу до аминокислот, которые транспортируются в клетку и используются для синтеза антиоксиданта [26].

Ингибирование γ -глутамилцистеин-синтетазы с помощью БСО приводит к снижению синтеза глутатиона и, как следствие, к истощению антиоксидантной защиты клетки, что часто применяют в качестве методического подхода при моделировании окислительного стресса [16, 27].

Использование БСО в качестве специфического ингибитора синтеза глутатиона имеет преимущества перед другими глутатион-истощающими агентами, действующими как конкурентные

субстраты глутатионтрансфераз, такие как N-этил-малеимид, йодацетат, 2-йодацетамид. В отличие от них, БСО не влияет на активность цитохрома P-450 и на оксидазную активность ферментов [27]. Таким образом, БСО представляет собой удобный агент для снижения уровня глутатиона и моделирования эндогенного ОС.

В настоящем исследовании показано, что воздействие БСО в концентрации 10–500 мкМ в течение 24 и 72 ч вызывает снижение уровня небелковых SH-групп, что свидетельствует о снижении концентрации глутатиона внутри клеток. При этом БСО в концентрации 500 мкМ не усиливало снижение концентрации глутатиона, что, видимо, свидетельствует о достижении максимального ингибирования γ -глутамилцистеин-синтетазы.

Снижение уровня глутатиона под действием БСО приводило к повышению уровня АФК, что при максимальной концентрации ингибитора γ -глутамилцистеин-синтетазы проявлялось в снижении жизнеспособности клеток. Внесение в питательную среду глутатиона нивелировало эти изменения.

На фоне таких изменений относительное количество CAR возрастало в присутствии 50 и 100 мкМ БСО и длительности воздействия 24 ч, а также 10, 50 мкМ БСО в течение 72 ч. Относительное количество PXR также повышалось в присутствии 100 и 500 мкМ БСО и инкубации в течение 24 ч; 50, 100 и 500 мкМ БСО в течение 72 ч.

При нивелировании ОС глутатионом (воздействие 24 ч, 50 мкМ БСО; экспозиция 72 ч, 10 и 50 мкМ БСО) продукция CAR была в норме, т.е. подавлялся индуцирующий эффект БСО. Важно отметить, что индукция CAR продолжалась при инкубации клеток в течение 24 ч со 100 мкМ БСО, что, вероятно, связано с самостоятельным эффектом БСО как ксенобиотика.

Индукция PXR подавлялась при внесении глутатиона в среду с БСО (50 и 100 мкМ) и инкубации в течение 72 ч, что свидетельствует об опосредованном действии БСО — через развитие ОС.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что индукция экспрессии изучаемых транскрипционных факторов может быть обусловлена развитием ОС. Ранее нами было показано, что продукты пероксидации — малоновый диальдегид и карбонильные производные белков — способны индуцировать продукцию CAR и PXR [12, 13]. Именно поэтому подавление развития ОС способствовало нормализации уровня этих рецепторов.

Представленные результаты показывают, что CAR и PXR по-разному отвечают на воздействие ингибитора γ -глутамилцистеин-синтетазы. Так, относительное количество CAR возрастало в присутствии БСО (50 мкМ, 24 ч и 10 мкМ, 72 ч), тогда как относительное количество PXR в этих усло-

виях не изменялось. Стоит отметить, что БСО в концентрации 100 мкМ (24 ч) и 50 мкМ (72 ч) вызывал повышение относительного количества CAR и PXR, но количество PXR повышалось в меньшей степени.

Культивирование клеток Сасо-2 в среде, содержащей глутатион и БСО в концентрации 500 мкМ в течение 72 ч, не повлияло на продукцию PXR, как и культивирование в присутствии 100 мкМ (24 ч), 50 и 100 мкМ БСО в течение 72 ч — на CAR. Следовательно, БСО в указанных концентрациях и при данных условиях выступает в качестве ксенобиотика и индуцирует продукцию рецепторов CAR и PXR.

Собственный эффект БСО как ксенобиотика может, по-видимому, проявляться и на фоне ОС. Так, например, в присутствии БСО (100 и 500 мкМ, 24 ч) и антиоксиданта уровень индукции PXR был ниже, чем при воздействии только БСО.

В качестве индукторов CAR и PXR могут выступать многие эндобиотики, в том числе стероиды (андростаны, эстрогены и прогестины), желчные кислоты, метаболиты холестерина, а также пестициды, пищевые флавоноиды и полифенолы, полученные из спирта [28]. Стоит отметить, что не установлены общие признаки индукторов орфанных рецепторов, к которым относятся CAR и PXR, а механизм действия индукторов может быть как прямым, так и косвенным. Прямой механизм характерен для веществ, способных проникать в ядро, что не типично для БСО, поэтому механизм его действия можно отнести скорее к опосредованному (косвенному).

Таким образом, БСО вызывает индукцию CAR и PXR, причем делает это двумя разными способами: в низких концентрациях преимущественно за счет снижения уровня глутатиона и развития ОС, а в высоких БСО действует непосредственно как ксенобиотик.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых-кандидатов наук МК-1856.2020.7.

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

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gao J., Xie W. (2010) Pregnane X receptor and constitutive androstane receptor at the crossroads of drug metabolism and energy metabolism. *Drug. Metab. Dispos.* **38**(12), 2091–2095.
2. Lemmen J., Tozakidis I.E.P., Bele P., Gala H. (2013) Constitutive androstane receptor upregulates Abcb1

- and Abcg2 at the blood–brain barrier after CITCO activation. *Brain Res.* **1501**, 68–80.
3. Slosky L.M., Thompson B.J., Sanchez-Covarrubias L., Zhang Y., Laracuenta M.L., Vanderah T.W., Ronaldson P.T., Davis T.P. (2013) Acetaminophen modulates P-glycoprotein functional expression at the blood–brain barrier by a constitutive androstane receptor-dependent mechanism. *Mol. Pharmacol.* **84**(5), 774–786.
 4. Li Y., Wang Q., Yao X., Li Y. (2010) Induction of *CYP3A4* and *MDR1* gene expression by baicalin, baicalein, chlorogenic acid, and ginsenoside Rf through constitutive androstane receptor- and pregnane X receptor-mediated pathways. *Eur. J. Pharmacol.* **640**(1–3), 46–54.
 5. Daujat-Chavanieu M., Gerbal-Chaloin S. (2020) Regulation of CAR and PXR expression in health and disease. *Cells.* **9**, 2395.
 6. Yang H., Wang H. (2014) Signaling control of the constitutive androstane receptor (CAR). *Protein Cell.* **5**(2), 113–123.
 7. Lynch C., Pan Y., Li L., Heyward S., Moeller T., Swaan P.W., Wang H. (2014) Activation of the constitutive androstane receptor inhibits gluconeogenesis without affecting lipogenesis or fatty acid synthesis in human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **279**(1), 33–42.
 8. Scopino K., Dalgarno C., Nachmanoff C., Krizanc D., Thayer K.M., Weir M.P. (2021) Arginine methylation regulates ribosome CAR function. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(3), 1335.
 9. Chen T., Chen Q., Xu Y., Zhou Q., Zhu J., Zhang H., Wu Q., Xu J., Yu C. (2011) SRC-3 is required for CAR-regulated hepatocyte proliferation and drug metabolism. *J. Hepatol.* **56**(1), 210–217.
 10. Chen T., Laurenzana E.M., Coslo D.M., Chen F., Omiecinski C.J. (2014) Proteasomal interaction as a critical activity modulator of the human constitutive androstane receptor. *Biochem. J.* **458**(1), 95–107.
 11. Timsit Y.E., Negishi M. (2014) Coordinated regulation of nuclear receptor CAR by CCRP/DNAJC7, HSP70 and the ubiquitin-proteasome system. *PLoS One.* **9**(5), e96092.
 12. Шулькин А.В., Абаленихина Ю.В., Сеидкулиева А.А., Рябков А.Н., Якушева Е.Н. (2021) Индукция конститутивного андростанового рецептора при развитии окислительного стресса. *Бюлл. эксп. биологии и медицины.* **171**(5), 588–591.
 13. Абаленихина Ю.В., Судакова Е.А., Слепнев А.А., Сеидкулиева А.А., Ерохина П.Д., Шулькин А.В., Якушева Е.Н. (2022) Функционирование прегнан Х рецептора в условиях окислительного стресса. *Биол. мембраны.* **39**(2), 107–115.
 14. Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Сеидкулиева А.А., Правкин С.К., Якушева Е.Н. (2022) Регуляция конститутивного андростанового рецептора в клетках линии Сасо-2 при моделировании окислительного стресса *in vitro*. *Биомед. химия.* **68**(4), 297–301.
 15. Абаленихина Ю.В., Судакова Е.А., Сеидкулиева А.А., Шулькин А.В., Якушева Е.Н. (2022) Влияние донора оксида азота S-нитрозоглутатиона на экспрессию конститутивного андростанового рецептора. *Журн. эволюционной биохимии и физиологии.* **58**(5), 1341–1352.
 16. Haddad J.J. (2001) L-Buthionine-(S,R)-sulfoximine, an irreversible inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase, augments LPS-mediated pro-inflammatory cytokine biosynthesis: evidence for the implication of an IkappaB-alpha/NF-kappaB insensitive pathway. *Eur. Cytokine.* **12**(4), 614–624.
 17. Rao R.K., Li L., Baker R.D., Baker S.S., Gupta A. (2000) Glutathione oxidation and PTPase inhibition by hydrogen peroxide in Caco-2 cell monolayer. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279**(2), 332–340.
 18. Tolosa L., Donato M.T., Gómez-Lechón M.J. (2015) General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Methods Mol. Biol.* **1250**, 333–348.
 19. Boschi-Muller S, Azza S., Sanglier-Cianferani S., Tal-fournier F., Van Dorsselaar A., Branlant G. (2000) A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**(46), 35908–35913.
 20. Ellman G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**(1), 70–77.
 21. 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.* **7**(2), 248–254.
 22. Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Мыльников П.Ю., Рокунов Е.Д., Якушева Е.Н. (2022) Механизмы регуляции Р-гликопротеина в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*. *Acta Naturae.* **14**(3), 69–78.
 23. Forman H.J., Zhang H., Rinna A. (2009) Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* **30**(1–2), 1–12.
 24. Usta M., Wortelboer H.M., Vervoort J., Boersma M.G., Rietjens I.M., van Bladeren P.J., Cnubben N.H. (2007) Human glutathione S-transferase-mediated glutathione conjugation of curcumin and efflux of these conjugates in Caco-2 cells. *Chem. Res. Toxicol.* **20**(12), 1895–1902.
 25. Schumacher F., Neuber C., Finke H., Nieschalke K., Baesler J., Gulbins E., Kleuser B. (2017) The sphingosine 1-phosphate breakdown product, (2E)-hexadecenal, forms protein adducts and glutathione conjugates *in vitro*. *J. Lipid Res.* **58**(8), 1648–1660.
 26. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (2009) Система глутатиона I. Синтез, транспорт, глутатион-трансферазы, глутатионпероксидазы. *Биомед. химия.* **55**(3), 255–277.
 27. Drew R., Miners J.O. (1984) The effects of buthionine sulfoximine (BSO) on glutathione depletion and xenobiotic biotransformation. *Biochem. Pharmacol.* **33**(19), 2989–2994.
 28. Cherian M.T., Chai S.C., Chen T. (2015) Small-molecule modulators of the constitutive androstane receptor. *Exp. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **11**(7), 1099–1114.

Mechanism of Bimodal Effect of DL-Butyonine Sulfoximine of Constitutive Androstane and Pregnane X Receptors *in vitro*

Y. V. Abalenikhina^{1, *}, A. V. Shchulkin¹, A. A. Seidkulieva¹, E. D. Rokunov¹,
F. T. Gadzhieva¹, and E. N. Yakusheva¹

¹Ryazan State Medical University, Ryazan, 390026 Russia

*e-mail: abalenikhina88@mail.ru

The constitutive androstane receptor (CAR) and the pregnane X receptor (PXR) are nuclear receptors that are involved in the regulation of gene transcription of enzymes responsible for biotransformation and excretion of endo- and xenobiotics. The aim of the study was to study the effect of DL-butyronine sulfoximine (BSO, gamma-glutamylcysteine synthetase inhibitor) on the relative amount of CAR and PXR in Caco-2 cells and to evaluate its mechanisms. BSO was used in concentrations of 1–500 μM and exposure duration of 24 and 72 h. The generation of reactive oxygen species (ROS) was determined using MitoTracker Red CM-H2 XROS fluorescent probes. Cytotoxicity was analyzed according to the results of the MTT test. The relative amount of CAR and PXR was estimated by the Western blot method. It was shown that BSO caused an increase in the formation of ROS at exposure duration of 24 h at concentrations of 10, 50 and 100 μM , at 72 h – at concentrations of 50, 100 μM . At the same time, at a concentration of 500 μM , BSO reduced the viability of cells during all periods of exposure. The relative amount of CAR increased at BSO concentrations of 50, 100 μM and exposure duration of 24 hours and 10, 50 μM at exposure of 72 h, and PXR – at concentrations of 100 and 500 μM and incubation of 24 h and 50, 100, 500 μM and incubation of 72 h. When used together with BSO, glutathione, the synthesis of which it blocks, it was found that at exposure time of 24 h and BSO concentrations of 50 μM and 72 h and concentrations of 10 and 50 μM , CAR induction was suppressed, and at 50 and 100 μM and exposure time of 72 h – PXR. The introduction of glutathione into the nutrient medium with BSO had no effect on PXR at xenobiotic concentrations of 100 and 500 μM (24 h) and 500 μM (72 h), on CAR – at concentrations of 100 μM (24 h) and 50 and 100 μM (72 h). Thus, BSO can induce CAR and PXR both by increasing the production of free radicals and the development of oxidative stress, and independently as a xenobiotic.

Keywords: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, DL-butyronine sulfoximine, Caco-2 cells

УДК 578.23

НЕСТРУКТУРНЫЙ БЕЛОК 3 ВИРУСА ГЕПАТИТА С ПОВЫШАЕТ СЕКРЕЦИЮ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1БЕТА В КЛЕТКАХ НЕК293Т С РЕКОНСТРУИРОВАННОЙ ИНФЛАММАСОМой NLRP3

© 2023 г. А. А. Латанова^{а, *}, К. К. Тучинская^б, Е. С. Стародубова^а, В. Л. Карпов^а^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия^бФедеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова Российской академии наук (Институт полиомиелита), пос. Института полиомиелита, поселение Московский, Москва, 108811 Россия

*e-mail: aalatanova@gmail.com

Поступила в редакцию 02.03.2023 г.

После доработки 30.03.2023 г.

Принята к публикации 31.03.2023 г.

Патология заболеваний, вызываемых вирусами семейства Flaviviridae, во многом определяется развитием системного воспаления. Ключевую роль в запуске воспаления играют цитокины интерлейкин-1бета и интерлейкин-18. Секреция этих цитокинов из клеток в свою очередь индуцируется при активации инфламмасом. В клетках, инфицированных вирусами Flaviviridae, обнаружена активация инфламмасы типа NLRP3 (NLR family pyrin domain-containing 3). Некоторые неструктурные белки этих вирусов способны активировать или ингибировать инфламмасому NLRP3, в том числе, за счет взаимодействия с ее компонентами. В данном исследовании в клетках человека HEK293T реконструирована функциональная инфламмаза NLRP3 и изучено воздействие на нее ряда неструктурных белков отдельных представителей семейства Flaviviridae. В этой модели не обнаружено влияния неструктурных белков NS1 вируса Западного Нила, NS3 вируса гепатита С, NS5 вируса клещевого энцефалита на содержание компонентов инфламмасы. При этом уровень секреции интерлейкина-1бета в присутствии белков NS1 вируса Западного Нила и NS5 вируса клещевого энцефалита не изменялся, повышаясь в 1.5 раза в присутствии белка NS3 вируса гепатита С. Таким образом, NS3 можно рассматривать как один из факторов активации инфламмасы NLRP3 и воспалительного патогенеза при хронической инфекции вирусом гепатита С.

Ключевые слова: инфламмаза, NLRP3, интерлейкин-1бета, вирус клещевого энцефалита, вирус гепатита С, вирус Западного Нила, неструктурные белки, Flaviviridae

DOI: 10.31857/S0026898423050099, EDN: RVPIUQ

ВВЕДЕНИЕ

Инфламмаза — это мультибелковый комплекс, активируемый различными факторами, в том числе вирусными инфекциями. Активация инфламмасы ведет к секреции провоспалительных цитокинов интерлейкинов (ИЛ)-1бета и ИЛ-18, индуцирующих воспалительные реакции. Инфламмазы локализуются в цитоплазме клеток иммунной системы, некоторых немиелоидных клеток и нейронов [1]. Инфламмаза типа NLRP3 (NLR family pyrin domain-containing 3),

изучению которой посвящено большинство работ в этой области, активируется при многих вирусных инфекциях и включает в себя три компонента: сенсор, адаптор ASC (an apoptosis associated speck-like protein containing a CARD) и эффектор — прокаспазу-1 [2, 3]. Сенсор NLRP3 — цитоплазматический белок, состоящий из трех доменов: N-концевого пиринового (PYD), центрального нуклеотидсвязывающего и олигомеризующего (NACHT) и C-концевого лейцин-богатого домена (LRR) [4, 5]. Адаптор ASC состоит из PYD- и

Сокращения. ASC — Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ассоциированный с апоптозом speck-подобный белок, содержащий CARD); DAMP — Damage-associated molecular pattern (молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждениями); IQR — Interquartile range (интерквартильный размах); NLRP3 — NLR family pyrin domain-containing 3 (белок 3, содержащий пириновый домен, семейства NLR); NS1, NS3, NS5 — Nonstructural proteins 1, 3, 5 (неструктурные белки 1, 3, 5); PAMP — Pathogen-associated molecular pattern (патогенассоциированный молекулярный паттерн); TLR — Toll-like receptor (Toll-подобный рецептор); ВГС — вирус гепатита С; ВЗН — вирус Западного Нила; ВКЭ — вирус клещевого энцефалита; ИЛ-1бета — интерлейкин-1бета; ИФА — иммуноферментный анализ; ИФН — интерферон; ПААГ — полиакриламидный гель; ФНО-альфа — фактор некроза опухоли альфа.

CARD-доменов, а эффекторная прокаспаз-1 — из каталитического домена и CARD [3]. Сборка инфламмасы происходит после распознавания сенсором NLRP3 активирующих сигналов за счет взаимодействия однотипных доменов ее компонентов (PYD-PYD и CARD-CARD) [6, 7]. Сборка активирует инфламмасому, происходит автокаталитическое расщепление прокаспазы-1 до ее активной формы, которая процессирует неактивные предшественники ИЛ-1бета (про-ИЛ-1бета) и ИЛ-18 (про-ИЛ-18) до активных форм [8–10]. Кроме того, каспаза-1 разрезает предшественник белка гасдермина D с образованием его активной формы, которая встраивается в мембрану клетки и образует в ней поры. Это способствует выбросу образовавшихся активных ИЛ-1бета и ИЛ-18 из клетки, а также пироптозу — одной из форм программируемой клеточной смерти [11, 12]. Секретированные ИЛ-1бета и ИЛ-18 запускают каскад воспалительных реакций, в частности, привлекают нейтрофилы к сайту инфекции, изменяют проницаемость сосудов и пр. [13, 14].

Для запуска работы инфламмасы необходимы два сигнала — праймирующий и активирующий [15, 16]. Праймирующим сигналом являются различные PAMP/DAMP (Pathogen-associated molecular pattern/Damage-associated molecular pattern), которые узнаются Toll-подобными рецепторами (TLR) и рецепторами цитокинов. Праймирование активирует NF-каппаВ-зависимые каскады реакций, запуская экспрессию компонентов инфламмасы — NLRP3, прокаспазы-1, а также про-ИЛ-1бета и про-ИЛ-18 [17]. PAMP/DAMP, разрушение лизосом, митохондриальный стресс и стресс эндоплазматического ретикула служат активирующими сигналами, которые индуцируют сборку инфламмасы в комплекс и образование активной каспазы-1 [18, 19].

Активация инфламмасы выявлена при инфекциях, вызываемых вирусами семейства Flaviviridae, включая вирусы японского энцефалита, денге, Зика, Западного Нила (ВЗН) и гепатита С (ВГС) [20]. При этом вирусные белки могут напрямую участвовать в активации инфламмасы. Так, белок NS5 вируса Зика может усиливать сборку инфламмасы NLRP3, взаимодействуя с NLRP3 посредством РНК-зависимого РНК-полимеразного домена [21, 22], а также, возможно, за счет индукции окислительного стресса [21]. Сборку инфламмасы NLRP3 может усиливать белок NS1 вируса Зика, который стабилизирует каспазу-1, подавляя ее деградацию [23]. Показано также, что вирус Зика, напротив, ингибирует инфламмасому NLRP3 за счет действия его протеазы NS3, индуцирующей деградацию сенсора NLRP3, возможно, посредством его разрезания [24]. Белки NS2A и NS2B вируса денге также способны усиливать активацию NLRP3, действуя как виropo-рины [25].

Нами изучено влияние отдельных неструктурных белков трех вирусов — ВЗН, ВГС и вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) — на активацию инфламмасы NLRP3. К настоящему моменту известно, что инфекция ВЗН активирует инфламмасому NLRP3, что совместно с ответом интерферона типа I (ИФН I) способствует супрессии репликации ВЗН в нейронах [26]. Инфекция ВГС также индуцирует NLRP3-зависимую секрецию ИЛ-1бета/ИЛ-18 в макрофагах печени [27–29]. Об активации инфламмасы при инфекции ВКЭ косвенно свидетельствует обнаружение ИЛ-1бета в сыворотках пациентов [30], однако факторы активации неизвестны. Мы выбрали неструктурные белки NS1 ВЗН, NS3 ВГС, NS5 ВКЭ, поскольку эти белки других флавивирусов участвуют в активации/ингибировании инфламмасы NLRP3 [21–24]. В модели с реконструированной инфламмасой NLRP3 клетки HEK293T были котрансфицированы плазмидами, кодирующими выбранные вирусные белки. Обнаружено, что только экспрессия NS3 ВГС повышала уровень секреции ИЛ-1бета клетками HEK293T, т.е., по всей видимости, приводила к усилению активации инфламмасы NLRP3. Таким образом, протеазу NS3 можно рассматривать как один из факторов воспаления при инфекции ВГС. Эти данные позволяют лучше понять механизмы хронического воспаления при ВГС и могут использоваться в целенаправленной разработке противовирусных препаратов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение плазмид, кодирующих неструктурные белки вирусов семейства Flaviviridae. На первом этапе работы получены плазмиды, кодирующие 3×Flag-метку. Нуклеотидная последовательность 3×Flag собрана путем отжига длинных праймеров при прогреве (95°C, 5 с) с последующей инкубацией при постепенном снижении температуры в диапазоне 95–37°C. Праймеры содержали нуклеотидную последовательность 3×Flag (Addgene #101178), а также, в зависимости от N- или C-концевого положения 3×Flag, последовательность Козак (GGC-ACC-ATG-G) или стоп-кодон, соответственно, и нуклеотидные последовательности сайтов рестрикции BamHI/ApaI, KpnI/NotI, PstI/ApaI. После отжига достраивали выступающие липкие 5'-концы с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I (“Сибэнзим”, Россия) при 37°C в течение 1 ч. Полученные 3×Flag-фрагменты клонировали в плазмиду pVax (“Invitrogen”, США) по соответствующим сайтам и получили плазмиды pVax-3×Flag, кодирующие N- и C-концевые 3×Flag-метки.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие NS1 ВЗН (штамм HP-94, линия 1) и NS5

ВКЭ (штамм ЭК-328, сибирский подтип), получены на основе кДНК этих вирусов. Вирусную РНК выделяли с помощью Triagent LS (“Sigma-Aldrich”, США) с последующей экстракцией хлороформом. Обратную транскрипцию проводили с использованием специфических праймеров: ВЗН — 5'-TTCTCCTGGTTGGTCCATCTCG-3'; ВКЭ — 5'-AGCGGGTGT TTTTCCGAGTC-3' и набора Superscript III Reverse Transcriptase (“Invitrogen”). Плазмиду pCMV, несущую ген NS3 ВГС (изолят 1b линия 274933RU), использовали для амплификации последовательности, кодирующей белок NS3 ВГС [31]. ПЦР со специфическими праймерами проводили на кДНК ВКЭ и ВЗН, а также на плазмиде pCMV, кодирующей NS3 ВГС. Полученные фрагменты клонировали в сконструированные на первом этапе плазмиды pVax-3×Flag: NS1 ВЗН — по сайтам NheI/BamHI и NS5 — по сайтам NheI/PstI в плазмиды, кодирующие C-концевой 3×Flag, NS3 — по сайтам NotI/XbaI в плазмиду, кодирующую N-концевой 3×Flag. Присутствие соответствующих вставок подтверждали секвенированием со специфическими праймерами. Полученные плазмиды выделяли с помощью набора QIAprep Spin Miniprep kit (“QIAGEN”, Нидерланды).

Реконструкция инфламмасы NLRP3 в клетках НЕК293Т. Клетки НЕК293Т (CRL-2539™, ATCC) культивировали в среде DMEM (“Панэко”, Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (“Hyclone Cytiva”, США) и пенициллином/стрептомицином (100 мкг/мл) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для реконструкции функциональной инфламмасы NLRP3 клетки рассеивали в 6/12-луночные планшеты (2 × 10⁵ клеток/мл) и на следующий день проводили котрансфекцию липосомным реагентом Lipofectamine™ LTX (“ThermoFisherScientific”, США) и смесью плазмид, кодирующих компоненты инфламмасы NLRP3 человека: EGFP-NLRP3 (Addgene #73955), ASC-НА (Addgene #41553), прокаспазу-1-мус (Addgene #41552), а также про-ИЛ-1β (Addgene #166783) в соотношении (по массе) 2 : 1 : 1 : 6, соответственно, выбранном на основании методик, описанных в [32–35], и равным (по массе) количеством контрольной плазмиды pVax-3×Flag. В экспериментах по оценке влияния неструктурных вирусных белков на функционирование инфламмасы вместо контрольной плазмиды использовали pVax-3×Flag, кодирующие NS1 ВЗН, NS3 ВГС, NS5 ВКЭ. Через 24 ч проводили смену культуральной жидкости и в часть контрольных образцов, котрансфицированных только плазмидами, кодирующими компоненты инфламмасы и про-ИЛ-1β, добавляли активатор инфламмасы нигерицин (10 мкМ, “Sigma-Aldrich”). Через 1–6 ч после добавления нигерицина собирали культуральную жидкость и получали клеточные лизаты.

Вестерн-блоттинг. Клетки НЕК293Т лизировали в буфере Лэммли (50 мМ трис-НСl pH 6.8, 2% SDS, 10% глицерин, 2% β-меркаптоэтанол, 0.025% бромфеноловый синий). Полученные образцы анализировали электрофорезом в 8–10%-ном ПААГ, белки из геля переносили на мембрану PVDF (“Hybond-P”, США). NLRP3, ASC, активную форму ИЛ-1β и его предшественника, прокаспазу-1-мус выявляли с использованием специфических антител: моноклональных антител кролика к NLRP3 (1 : 5000, “Abcam”, Великобритания), ASC (1 : 5000, “Abcam”), ИЛ-1β (1 : 10000, “Abcam”), поликлональных антител кролика к мус-метке (“Affinity”, Китай), а для детекции неструктурных вирусных белков, конъюгированных с Flag-меткой, использовали моноклональные антитела мыши к Flag (1 : 2500, “Transgen”, Китай). В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с пероксидазой хрена антитела козы к иммуноглобулинам кролика и мыши (“Jackson”, США). Иммунные комплексы на мембране выявляли с помощью хемилюминесцентного реагента ECL (“Bio-Rad”) и рентгеновской пленки (“FujiFilm”, Япония), пленку сканировали, данные обрабатывали в программе ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Для контроля равномерности нанесения образцов мембрану окрашивали моноклональными антителами мыши к β-актину (клон AC-74, “Sigma”, США), а затем вторичными конъюгированными с пероксидазой хрена антителами козы к иммуноглобулинам мыши (“Jackson”).

Иммуноферментный анализ. Пробы для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) получали, осветляя культуральную жидкость, собранную с котрансфицированных клеток, центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин. Концентрацию ИЛ-1β в культуральной жидкости измеряли с помощью набора Интерлейкин-1β-ИФА-БЕСТ (“Вектор-Бест”, Новосибирск) в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистический анализ. Уровни синтеза белков и концентраций ИЛ-1β сравнивали с помощью программы GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, Inc., США). Для сравнения в группах использовали непараметрический тест Краскела–Уоллиса, для попарных сравнений — тест Манна–Уитни. Относительное содержание ИЛ-1β анализировали с использованием критерия Вилкоксона для одной выборки. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инфламмасому NLRP3 изучают преимущественно на миелоидных клетках, конститутивно экспрессирующих отдельные компоненты этой инфламмасы, при этом в ряде случаев используют и немиелоидные клетки [36]. Так, удобной

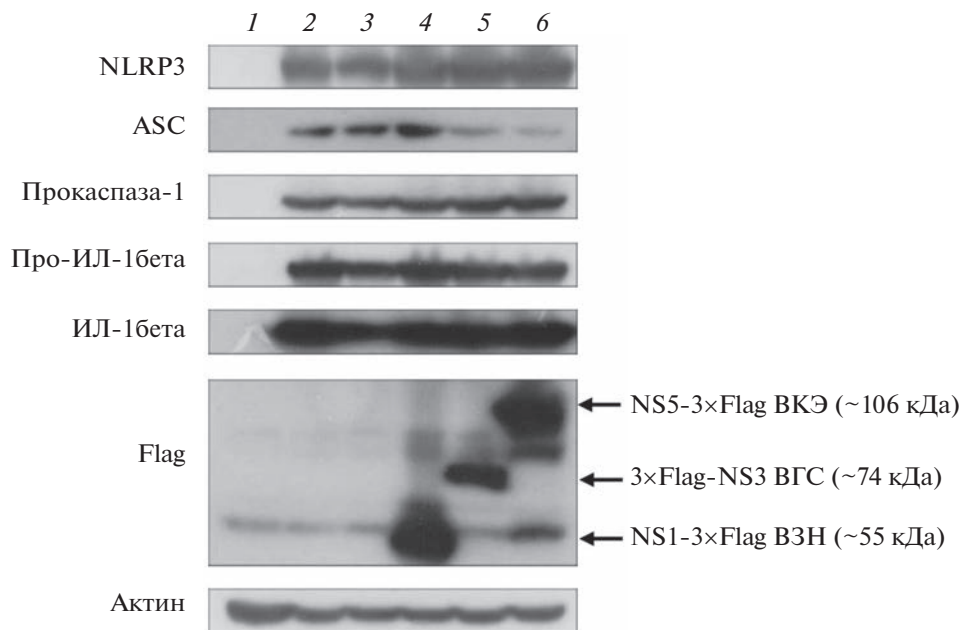


Рис. 1. Экспрессия компонентов инфламмасы NLRP3, реконструированной при котрансфекции клеток HEK293T, в присутствии неструктурных белков флавивирусов. Клетки HEK293T были трансфицированы контрольной плазмидой pVax-3×Flag (1) или котрансфицированы плазмидами, кодирующими NLRP3, ASC, прокаспазу-1, про-ИЛ-1β, а также либо контрольной плазмидой pVax-3×Flag (2, 3), либо плазмидами pVax-3×Flag, кодирующими NS1 B3H (4), NS3 B7C (5) и NS5 BКЭ (6). Через 24 ч проводили смену культуральной среды, к образцам добавляли активатор инфламмасы NLRP3 нигерицин (10 мкМ) (3). Содержание компонентов инфламмасы, про-ИЛ-1β, активного ИЛ-1β, вирусных белков и актина оценивали с помощью вестерн-блотинга клеточных лизатов, полученных через 25–30 ч после котрансфекции, с использованием коммерческих антител, специфических к NLRP3, ASC, тус-метке (прокаспазы-1), ИЛ-1β, Flag-метке, актину. На панели “Flag” стрелки указывают полосы, соответствующие детектированным вирусным белкам, приведены их молекулярные массы. Эксперимент воспроизведен в трех повторях.

моделью для изучения молекулярных механизмов функционирования инфламмасы *in vitro* считаются клетки HEK293T [32, 37–39]. Следует отметить, что эффекты, обнаруженные при изучении инфламмасы в миелоидных клетках, воспроизводятся в клетках HEK293T [22, 40]. HEK293T не экспрессируют компоненты инфламмасы [36], поэтому реконструировать инфламмасу в этих клетках можно путем введения плазмид, кодирующих все ее компоненты. В нашей работе мы использовали эту модель, поскольку она позволяет экспрессировать в клетках вместе с компонентами инфламмасы и исследуемые вирусные белки. На первом этапе для реконструкции функциональной инфламмасы NLRP3 клетки котрансфицировали плазмидами, кодирующими три компонента инфламмасы NLRP3 человека — NLRP3, ASC, прокаспазу-1, а также субстрат каспазы-1 — про-ИЛ-1β. Среду культивирования клеток заменяли через 24 ч после котрансфекции и к части проб добавляли нигерицин — K^+/H^+ -ионофор [41]. Нигерицин индуцирует выброс ионов калия из клетки [42], что активирует инфламмасу, аутопротеолиз прокаспазы-1 и секрецию ИЛ-1β. Через 1–6 ч после смены среды собирали культуральные жидкости, осветляли их

центрифугированием и получали клеточные лизаты, которые анализировали методом вестерн-блотинга (рис. 1). В культуральных жидкостях измеряли концентрацию активного ИЛ-1β с помощью набора для ИФА (рис. 2). Вестерн-блотинг клеточных лизатов с коммерческими антителами к компонентам инфламмасы показал, что в клетках синтезируются все компоненты инфламмасы, а также про-ИЛ-1β (рис. 1, панели NLRP3, ASC, прокаспазы-1, про-ИЛ-1β, 2, 3). Активный ИЛ-1β (рис. 1, панель ИЛ-1β) выявлен как в необработанных (2), так и в обработанных нигерицином клетках (3), причем обработанные клетки содержали меньше ИЛ-1β (3). Методом ИФА показано, что концентрация активного ИЛ-1β в культуральных жидкостях котрансфицированных клеток, обработанных нигерицином, была в 5–7 раз выше, чем в необработанных (рис. 2, $p < 0.05$). Детекция активной формы ИЛ-1β в клеточных лизатах и культуральных жидкостях свидетельствует о его секреции клетками, что указывает на активацию инфламмасы NLRP3 в данной системе. Снижение количества активного ИЛ-1β в лизатах клеток, обработанных нигерицином (активатор инфламмасы), и значительное повышение количества этого цитокина в культуральной жидкости

клеток свидетельствует об усилении секреции ИЛ-1бета под действием нигерицина.

Стоит отметить, что ИЛ-1бета выявлен в лизатах и культуральных жидкостях необработанных нигерицином клеток, что свидетельствует об активации инфламмасы в данной модели в отсутствие активатора. Полученные результаты согласуются с данными, согласно которым котрансфекция клеток НЕК293Т генами, кодирующими NLRP3, ASC, прокаспазу-1 и про-ИЛ-1бета, в отсутствие специальных активирующих сигналов приводит к образованию и секреции активной формы ИЛ-1бета [22, 23, 32, 40]. По всей видимости, этот эффект может быть обусловлен действием трансфекционного реагента липофектамина. Этот реагент создан на основе катионных липосом, способных индуцировать апоптоз, аутофагию и окислительный стресс [43–45], что, в свою очередь, может служить сигналом, активирующим инфламмасому. Более того, ряд исследований прямо указывает на активацию инфламмасы катионными липосомами [46–48]. При этом на модели котрансфицированных клеток НЕК-293Т показано усиление секреции ИЛ-1бета при действии различных активаторов инфламмасы, включая АТР и вирусные белки [22, 23, 32, 40]. В нашей работе мы наблюдали такой же эффект: в присутствии нигерицина уровень секреции ИЛ-1бета повысился в 6 раз по сравнению с образцами без активатора. Таким образом, эта модель, несмотря на фоновую активацию инфламмасы за счет самого процесса трансфекции, позволяет детектировать активацию специфическими факторами, такими как вирусные белки.

Далее на этой модели оценили влияние отдельных неструктурных белков вирусов семейства Flaviviridae на секрецию ИЛ-1бета. Неструктурные белки этих вирусов являются патогенными факторами, влияющими на реакции врожденного иммунитета [20, 49]. Некоторые из этих белков входят в состав вакцин, а также используются в качестве мишеней для антивирусной терапии. Расширение знаний о способности неструктурных белков флавивирусов вызывать воспаление позволит ускорить разработку эффективных безопасных вакцин и противовирусных препаратов. В данной работе исследованы неструктурные белки ВЗН, ВГС, ВКЭ, так как при инфекциях, вызываемых этими вирусами, наблюдается активация инфламмасы и/или секреция ИЛ-1бета [26–30]. Учитывая эффекты неструктурных белков NS1, NS3, NS5 других представителей *Flaviviridae* [21–24], мы проанализировали NS1 ВЗН, NS3 (протеаза) ВГС и NS5 (РНК-полимераза) ВКЭ. Для изучения влияния экспрессии неструктурных белков флавивирусов на инфламмасому NLRP3 клетки НЕК293Т котрансфицировали плазмидами, кодирующими компоненты системы инфламмасы, как указано выше, а также

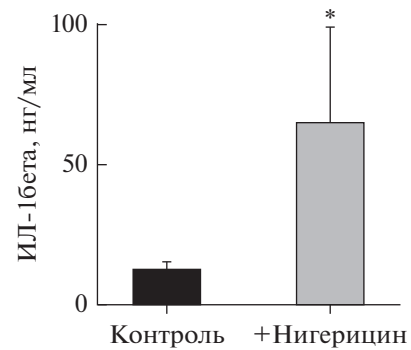


Рис. 2. Концентрация ИЛ-1бета в культуральных жидкостях клеток НЕК293Т с реконструированной инфламмасомой NLRP3. Культуральные жидкости клеток, котрансфицированных плазмидами, кодирующими NLRP3, ASC, прокаспазу-1, про-ИЛ-1бета, и контрольной плазмидой pVax-3×Flag, не обработанных (Контроль) и обработанных нигерицином (+Нигерицин), анализировали методом ИФА. $n = 4$, медиана +95% ДИ, $*p < 0.05$ (тест Манна–Уитни).

дополнительно плазмидами, кодирующими белки NS1 ВЗН, NS3 ВГС, NS5 ВКЭ с 3×Flag-меткой. Анализировали клеточные лизаты и культуральные жидкости клеток. Проведенный нами вестерн-блоттинг лизатов клеток, котрансфицированных плазмидами, кодирующими вирусные белки, не выявил существенных изменений в уровне синтеза компонентов системы инфламмасы NLRP3 по сравнению с контрольными образцами (рис. 2, дорожки 4–6, $p > 0.1$). Таким образом, экспрессия неструктурных вирусных белков не повлияла на содержание компонентов инфламмасы в клетках НЕК293Т. Чтобы понять, влияют ли вирусные белки на уровень секреции ИЛ-1бета, оценили концентрацию этого цитокина в культуральных жидкостях клеток методом ИФА. На рис. 3 эти результаты представлены как отношение концентрации ИЛ-1бета в образцах, где синтезировались вирусные белки, к концентрации ИЛ-1бета в контрольных образцах (без вирусных белков). Показано, что в присутствии белков NS1 ВЗН и NS5 ВКЭ уровень секреции ИЛ-1бета не изменялся (рис. 3, $p > 0.1$), однако синтез белка NS3 ВГС повышал секрецию ИЛ-1бета в 1.5 раза (рис. 3, $p = 0.0029$). Таким образом, в использованной нами модели НЕК293Т с реконструированной инфламмасомой NLRP3 только NS3 ВГС усиливал активацию инфламмасы. Два других белка — NS1 ВЗН и NS5 ВКЭ — подобного эффекта не оказывали. Это указывает на необходимость дальнейшего поиска факторов, участвующих в активации инфламмасы при инфекциях, вызванных этими вирусами.

РНК ВГС является праймирующим сигналом для инфламмасы, запускающим TLR7-зависи-

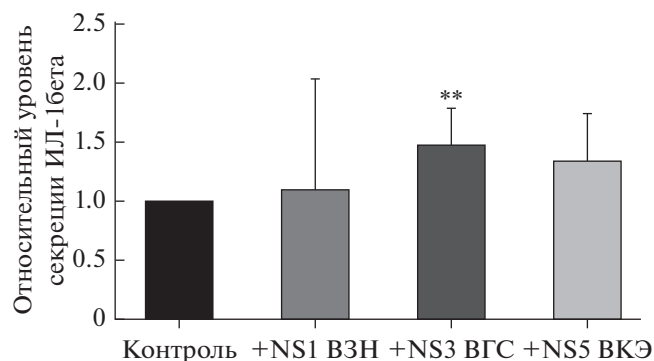


Рис. 3. Влияние белков NS1 В3Н, NS3 ВГС, NS5 ВКЭ на секрецию ИЛ-1β клетками HEK293T с реконструированной инфламмасомой NLRP3. Клетки HEK293T котрансфицированы плазмидами, кодирующими компоненты инфламмасы, а также либо контрольной плазмидой рVax-3×Flag (Контроль), либо плазмидами, кодирующими NS1 В3Н, NS3 ВГС или NS5 ВКЭ. На следующий день после котрансфекции в культуральных жидкостях измеряли концентрацию ИЛ-1β (нг/мл) методом ИФА. Результаты представлены как соотношение концентрации ИЛ-1β в опытных образцах и в контроле. $n = 4-12$, медиана + IQR, ** $p < 0.01$ (критерий Вилкоксона для одной выборки).

мую экспрессию мРНК ИЛ-1β [27, 28]. Кроме того, известны белки ВГС, способные активировать сборку инфламмасы – виropорин p7 [29] и коровый белок [50], действие которого, по всей видимости, обусловлено активацией внутриклеточных кальциевых сигнальных путей [50]. Данные о способности белка NS3 ВГС активировать инфламмасому NLRP3 к настоящему времени отсутствуют. При этом в ряде *in vitro* исследований отмечена роль NS3 в индукции секреции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов разными типами клеток: ФНО-α и ИЛ-10 моноцитами/макрофагами [51, 52], ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-α, ИЛ-1β клетками микроглии [53], ИЛ-8, ИЛ-6 и ФНО-α эпителиальными клетками роговицы [54]. ИЛ-1β (наряду с ИЛ-18) детектируется в сыворотках пациентов на ранних стадиях инфекции ВГС [28, 55] и считается одним из ключевых факторов, определяющих развитие хронического воспаления печени при гепатите С [28, 56, 57]. При этом тяжесть поражения печени прямо коррелирует с уровнем ИЛ-1β [28]. Основными продуцентами ИЛ-1β при инфекции ВГС являются макрофаги печени, в том числе клетки Купфера. Они способны к захвату вирионов ВГС, что провоцирует активацию инфламмасы NLRP3 [28, 29, 58]. Некоторые исследования указывают на активацию инфламмасы NLRP3 и в гепатоцитах [59] – основных сайтах репликации ВГС [60], но эти данные противоречивы [28]. Помимо этого, опубликованы данные, согласно которым NS3 способен активировать

окислительный стресс в моноцитах и гепатоцитах [61, 62]. Способность к индукции секреции провоспалительных цитокинов, в том числе ИЛ-1β, и окислительного стресса, показывает, что NS3 может быть активатором инфламмасы. Эффект усиления активации инфламмасы белком NS3 ВГС зарегистрирован нами в клетках HEK293T с реконструированной инфламмасомой. Дальнейшие эксперименты в клеточных линиях, являющихся сайтами репликации ВГС и/или участвующих в противовирусном ответе, позволят более детально понять роль NS3 в патогенезе NLRP3-/ИЛ-1β-зависимого воспаления при ВГС.

Следует отметить, что ВГС обладает высоким уровнем генетической изменчивости: на данный момент известно восемь генотипов ВГС и до 90 подтипов [63], среди которых генотипы 1a и 1b вызывают большую часть ВГС инфекций в мире [64]. Заболевания, индуцируемые ВГС разных генотипов, характеризуются особенностями патогенеза [65], а также эффективностью ответа на противовирусную терапию [66, 67]. Так, в ряде работ отмечено, что инфекция ВГС генотипа 1b, белок NS3 которого изучен в нашей работе, может быть ассоциирована с большей тяжестью поражения печени, а также с развитием цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы, хотя эти особенности патогенеза могут быть обусловлены факторами, не связанными с генотипом вируса [65, 68–70]. Наблюдаются также различия в патогенезе и профиле цитокинов, индуцируемых при инфекции, вызываемой вирусом Зика, еще одним представителем семейства Flaviviridae, в частности, между африканской и азиатской линиями вируса [71–73]. При этом обнаружены различия и в активации инфламмасы NLRP3: инфекция “азиатским” вирусом, а также его белок NS5 активировали инфламмасому [21, 22], в то время как “африканский” вирус ослаблял активацию NLRP3. При этом не наблюдали активации инфламмасы белком NS5 [24]. Изученный нами белок NS3 ВГС содержит полиморфные аминокислотные остатки [74, 75]; как сказано выше, заболевания, вызываемые ВГС разных генотипов, могут иметь патогенетические отличия. В связи с этим можно предположить, что, как и в случае вируса Зика и его белка NS5, влияние NS3 на инфламмасому будет зависеть от генотипа ВГС, что представляет интерес для дальнейших исследований. Необходимо подчеркнуть, что NS3 ВГС является одной из мишеней противовирусных препаратов прямого действия, эффективных при гепатите С [76], однако не лишенных при этом некоторых недостатков, таких как возможность появления лекарственно-устойчивых форм вируса [77, 78], а также снижение эффективности, обусловленное влиянием полиморфизмов в NS3 [74, 75, 79]. Терапия может быть неэффективной

для отдельных вариантов вируса [80], при этом препараты прямого действия не излечивают последствия воспалительного поражения печени при хронической инфекции ВГС и не предотвращают развитие цирроза и рака печени [81, 82].

Таким образом, нами получены данные, важные для понимания механизмов вирусного патогенеза, в частности, индукции воспаления при активации инфламмасом и выявления мишеней для противовирусной терапии. Расширение знаний о факторах воспаления при ВГС важно для разработки препаратов, эффективно предотвращающих воспалительные поражения при инфекции, вызванной этим вирусом.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 21-74-00124.

Статья не содержит экспериментов с привлечением животных или людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Franchi L., Warner N., Viani K., Nunez G. (2009) Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol. Rev.* **227**, 106–128.
2. Yang Y., Wang H., Kouadir M., Song H., Shi F. (2019) Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Disease*. **10**, 128.
3. Lu A., Li Y., Schmidt F.I., Yin Q., Chen S., Fu T.M., Tong A.B., Ploegh H.L., Mao Y., Wu H. (2016) Molecular basis of caspase-1 polymerization and its inhibition by a new capping mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 416–425.
4. Malik A., Kanneganti T.D. (2017) Inflammasome activation and assembly at a glance. *J. Cell Sci.* **130**, 3955–3963.
5. Swanson K.V., Deng M., Ting J.P. (2019) The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 477–489.
6. Gram A.M., Frenkel J., Rensing M.E. (2012) Inflammasomes and viruses: cellular defence versus viral offence. *J. General Virol.* **93**, 2063–2075.
7. Cai X., Chen J., Xu H., Liu S., Jiang Q.X., Halfmann R., Chen Z.J. (2014) Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell*. **156**, 1207–1222.
8. Broz P., Dixit V.M. (2016) Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 407–420.
9. Mangan M.S.J., Olhava E.J., Roush W.R., Seidel H.M., Glick G.D., Latz E. (2018) Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug Discovery*. **17**, 688.
10. Rathinam V.A., Fitzgerald K.A. (2016) Inflammasome complexes: emerging mechanisms and effector functions. *Cell*. **165**, 792–800.
11. He W.T., Wan H., Hu L., Chen P., Wang X., Huang Z., Yang Z.H., Zhong C.Q., Han J. (2015) Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. *Cell. Res.* **25**, 1285–1298.
12. Shi J., Zhao Y., Wang K., Shi X., Wang Y., Huang H., Zhuang Y., Cai T., Wang F., Shao F. (2015) Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. **526**, 660–665.
13. Dinarello C.A., Novick D., Kim S., Kaplanski G. (2013) Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front. Immunol.* **4**, 289.
14. Joosten L.A., Netea M.G., Dinarello C.A. (2013) Interleukin-1beta in innate inflammation, autophagy and immunity. *Semin. Immunol.* **25**, 416–424.
15. Bauernfeind F.G., Horvath G., Stutz A., Alnemri E.S., MacDonald K., Speert D., Fernandes-Alnemri T., Wu J., Monks B.G., Fitzgerald K.A., Hornung V., Latz E. (2009) Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.* **183**, 787–791.
16. Christgen S., Kanneganti T.D. (2020) Inflammasomes and the fine line between defense and disease. *Curr. Opin. Immunol.* **62**, 39–44.
17. Afonina I.S., Zhong Z., Karin M., Beyaert R. (2017) Limiting inflammation—the negative regulation of NF-kappaB and the NLRP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* **18**, 861–869.
18. Lamkanfi M., Dixit V.M. (2014) Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*. **157**, 1013–1022.
19. Zhao C., Zhao W. (2020) NLRP3 inflammasome—A key player in antiviral responses. *Front. Immunol.* **11**, 211.
20. Latanova A., Starodubova E., Karpov V. (2022) Flaviviridae nonstructural proteins: the role in molecular mechanisms of triggering inflammation. *Viruses*. **14**, 1808.
21. He Z., Chen J., Zhu X., An S., Dong X., Yu J., Zhang S., Wu Y., Li G., Zhang Y., Wu J., Li M. (2018) NLRP3 Inflammasome activation mediates Zika virus-associated inflammation. *J. Infect. Dis.* **217**, 1942–1951.
22. Wang W., Li G., De W., Luo Z., Pan P., Tian M., Wang Y., Xiao F., Li A., Wu K., Liu X., Rao L., Liu F., Liu Y., Wu J. (2018) Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1beta secretion. *Nat. Commun.* **9**, 106.
23. Zheng Y., Liu Q., Wu Y., Ma L., Zhang Z., Liu T., Jin S., She Y., Li Y.P., Cui J. (2018) Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS1-caspase-1 axis. *EMBO J.* **37**, e99347.
24. Gim E., Shim D.W., Hwang I., Shin O.S., Yu J.W. (2019) Zika virus impairs host NLRP3-mediated inflammasome activation in an NS3-dependent manner. *Immune Network*. **19**, e40.
25. Shrivastava G., Visoso-Carvajal G., Garcia-Cordero J., Leon-Juarez M., Chavez-Munguia B., Lopez T., Nava P., Villegas-Sepulveda N., Cedillo-Barron L. (2020) Dengue virus serotype 2 and its non-structural proteins 2A and 2B activate NLRP3 inflammasome. *Front. Immunol.* **11**, 352.
26. Ramos H.J., Lanteri M.C., Blahnik G., Negash A., Suthar M.S., Brassil M.M., Sodhi K., Treuting P.M., Busch M.P., Norris P.J., Gale M., Jr. (2012) IL-1beta

- signaling promotes CNS-intrinsic immune control of West Nile virus infection. *PLoS Pathogens*. **8**, e1003039.
27. Chen W., Xu Y., Li H., Tao W., Xiang Y., Huang B., Niu J., Zhong J., Meng G. (2014) HCV genomic RNA activates the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *PLoS One*. **9**, e84953.
 28. Negash A.A., Ramos H.J., Crochet N., Lau D.T., Doehle B., Papic N., Delker D.A., Jo J., Bertoletti A., Hagedorn C.H., Gale M., Jr. (2013) IL-1 β production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. *PLoS Pathogens*. **9**, e1003330.
 29. Shrivastava S., Mukherjee A., Ray R., Ray R.B. (2013) Hepatitis C virus induces interleukin-1 β (IL-1 β)/IL-18 in circulatory and resident liver macrophages. *J. Virol.* **87**, 12284–12290.
 30. Atrasheuskaya A.V., Fredeking T.M., Ignatyev G.M. (2003) Changes in immune parameters and their correction in human cases of tick-borne encephalitis. *Clin. Exp. Immunol.* **131**, 148–154.
 31. Isaguliant M.G., Petrakova N.V., Mokhonov V.V., Pokrovskaya K., Suzdaltzeva Y.G., Krivonos A.V., Zaberezhny A.D., Garaev M.M., Smirnov V.D., Nordenfelt E. (2003) DNA immunization efficiently targets conserved functional domains of protease and ATPase/helicase of nonstructural 3 protein (NS3) of human hepatitis C virus. *Immunol. Lett.* **88**, 1–13.
 32. Shi C.S., Nabar N.R., Huang N.N., Kehl J.H. (2019) SARS-coronavirus open reading frame-8b triggers intracellular stress pathways and activates NLRP3 inflammasomes. *Cell Death Discov.* **5**, 101.
 33. Chuang Y.T., Lin Y.C., Lin K.H., Chou T.F., Kuo W.C., Yang K.T., Wu P.R., Chen R.H., Kimchi A., Lai M.Z. (2011) Tumor suppressor death-associated protein kinase is required for full IL-1 β production. *Blood*. **117**, 960–970.
 34. Ito S., Hara Y., Kubota T. (2014) CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res. Therapy*. **16**, R52.
 35. Mao L., Kitani A., Hiejima E., Montgomery-Recht K., Zhou W., Fuss I., Wiestner A., Strober W. (2020) Bruton tyrosine kinase deficiency augments NLRP3 inflammasome activation and causes IL-1 β -mediated colitis. *J. Clin. Investigation*. **130**, 1793–1807.
 36. Zito G., Buscetta M., Cimino M., Dino P., Bucchieri F., Cipollina C. (2020) Cellular models and assays to study NLRP3 inflammasome biology. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4294.
 37. Coll R.C., Hill J.R., Day C.J., Zamoshnikova A., Boucher D., Massey N.L., Chitty J.L., Fraser J.A., Jennings M.P., Robertson A.A.B., Schroder K. (2019) MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nat. Chem. Biol.* **15**, 556–559.
 38. Hafner-Bratkovic I., Susjan P., Lainscek D., Tapia-Abellan A., Cerovic K., Kadunc L., Angosto-Bazarrá D., Pelegrin P., Jerala R. (2018) NLRP3 lacking the leucine-rich repeat domain can be fully activated via the canonical inflammasome pathway. *Nat. Commun.* **9**, 5182.
 39. Vande Walle L., Stowe I.B., Sacha P., Lee B.L., Demon D., Fossoul A., Van Hauwermeiren F., Saavedra P.H.V., Simon P., Subrt V., Kostka L., Stivala C.E., Pham V.C., Staben S.T., Yamazoe S., Konvalinka J., Kayagaki N., Lamkanfi M. (2019) MCC950/CRID3 potently targets the NACHT domain of wild-type NLRP3 but not disease-associated mutants for inflammasome inhibition. *PLoS Biol.* **17**, e3000354.
 40. Wang W., Xiao F., Wan P., Pan P., Zhang Y., Liu F., Wu K., Liu Y., Wu J. (2017) EV71 3D protein binds with NLRP3 and enhances the assembly of inflammasome complex. *PLoS Pathogens*. **13**, e1006123.
 41. Guffanti A.A., Davidson L.F., Mann T.M., Krulwich T.A. (1979) Nigericin-induced death of an acidophilic bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **114**, 201–206.
 42. Eytan G.D., Carlenor E., Rydstrom J. (1990) Energy-linked transhydrogenase. Effects of valinomycin and nigericin on the ATP-driven transhydrogenase reaction catalyzed by reconstituted transhydrogenase-ATPase vesicles. *J. Biol. Chem.* **265**, 12949–12954.
 43. Kongkaneramt L., Sarisuta N., Azad N., Lu Y., Iyer A.K., Wang L., Rojanasakul Y. (2008) Dependence of reactive oxygen species and FLICE inhibitory protein on lipofectamine-induced apoptosis in human lung epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*. **325**, 969–977.
 44. Mo R.H., Zaro J.L., Ou J.H., Shen W.C. (2012) Effects of lipofectamine 2000/siRNA complexes on autophagy in hepatoma cells. *Mol. Biotechnol.* **51**, 1–8.
 45. Napoli E., Liu S., Marsilio I., Zarbalis K., Giulivi C. (2017) Lipid-based DNA/siRNA transfection agents disrupt neuronal bioenergetics and mitophagy. *Biochem. J.* **474**, 3887–3902.
 46. He J., Li T., Prochnicki T., Horvath G., Latz E., Takeoka S. (2019) Membrane fusogenic lysine type lipid assemblies possess enhanced NLRP3 inflammasome activation potency. *Biochem. Biophys. Rep.* **18**, 100623.
 47. Li T., He J., Horvath G., Prochnicki T., Latz E., Takeoka S. (2018) Lysine-containing cationic liposomes activate the NLRP3 inflammasome: effect of a spacer between the head group and the hydrophobic moieties of the lipids. *Nanomedicine: Nanotechnol. Biol. Med.* **14**, 279–288.
 48. Zhong Z., Zhai Y., Liang S., Mori Y., Han R., Sutterwala F.S., Qiao L. (2013) TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat. Commun.* **4**, 1611.
 49. Elrefaey A.M.E., Hollinghurst P., Reitmayer C.M., Alphey L., Maringer K. (2021) Innate immune antagonism of mosquito-borne flaviviruses in humans and mosquitoes. *Viruses*. **13**, 2116.
 50. Negash A.A., Olson R.M., Griffin S., Gale M., Jr. (2019) Modulation of calcium signaling pathway by hepatitis C virus core protein stimulates NLRP3 inflammasome activation. *PLoS Pathogens*. **15**, e1007593.
 51. Chang S., Dolganiuc A., Szabo G. (2007) Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *J. Leukocyte Biol.* **82**, 479–487.
 52. Dolganiuc A., Kodys K., Kopasz A., Marshall C., Do T., Romics L., Jr., Mandrekar P., Zapp M., Szabo G. (2003) Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines

- and inhibit dendritic cell differentiation. *J. Immunol.* **170**, 5615–5624.
53. Rajalakshmy A.R., Malathi J., Madhavan H.N. (2015) Hepatitis C virus NS3 mediated microglial inflammation via TLR2/TLR6 MyD88/NF-kappaB pathway and Toll like receptor ligand treatment furnished immune tolerance. *PLoS One.* **10**, e0125419.
54. Rajalakshmy A.R., Malathi J., Madhavan H.N. (2014) HCV core and NS3 proteins mediate toll like receptor induced innate immune response in corneal epithelium. *Exp. Eye Res.* **128**, 117–128.
55. Martinez-Esparza M., Tristan-Manzano M., Ruiz-Alcaraz A.J., Garcia-Penarrubia P. (2015) Inflammatory status in human hepatic cirrhosis. *World J. Gastroenterol.* **21**, 11522–11541.
56. Chattergoon M.A., Levine J.S., Latanich R., Osburn W.O., Thomas D.L., Cox A.L. (2011) High plasma interleukin-18 levels mark the acute phase of hepatitis C virus infection. *J. Infectious Diseases.* **204**, 1730–1740.
57. Vecchiet J., Falasca K., Cacciatore P., Zingariello P., Dalessandro M., Marinopiccoli M., D'Amico E., Palazzo C., Petrarca C., Conti P., Pizzigallo E., Guagnano M.T. (2005) Association between plasma interleukin-18 levels and liver injury in chronic hepatitis C virus infection and non-alcoholic fatty liver disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **35**, 415–422.
58. Chattergoon M.A., Latanich R., Quinn J., Winter M.E., Buckheit R.W., 3rd, Blankson J.N., Pardoll D., Cox A.L. (2014) HIV and HCV activate the inflammasome in monocytes and macrophages via endosomal Toll-like receptors without induction of type 1 interferon. *PLoS Pathogens.* **10**, e1004082.
59. Ramachandran A., Kumar B., Waris G., Everly D. (2021) Deubiquitination and activation of the NLRP3 inflammasome by UCHL5 in HCV-infected cells. *Microbiol. Spectrum.* **9**, e0075521.
60. Farquhar M.J., McKeating J.A. (2008) Primary hepatocytes as targets for hepatitis C virus replication. *J. Viral. Hepatitis.* **15**, 849–854.
61. Bureau C., Bernad J., Chaouche N., Orfila C., Beraud M., Gonindard C., Alric L., Vinel J.P., Pipy B. (2001) Non-structural 3 protein of hepatitis C virus triggers an oxidative burst in human monocytes via activation of NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **276**, 23077–23083.
62. Pal S., Polyak S.J., Bano N., Qiu W.C., Carithers R.L., Shuhart M., Gretch D.R., Das A. (2010) Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **25**, 627–634.
63. Shah R., Ahoegbe L., Niebel M., Shepherd J., Thomson E.C. (2021) Non-epidemic HCV genotypes in low- and middle-income countries and the risk of resistance to current direct-acting antiviral regimens. *J. Hepatol.* **75**, 462–473.
64. Polaris Observatory H.C.V.C. (2017) Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet. Gastroenterol. Hepatol.* **2**, 161–176.
65. Webster G., Barnes E., Brown D., Dusheiko G. (2000) HCV genotypes—role in pathogenesis of disease and response to therapy. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **14**, 229–240.
66. Liu G., Cai Q., Li Z., Shao X., Luo Q., Zhang X., Zhao Z. (2016) Effect of drug resistance mutations on antiviral agents in HCV patients. *Antiviral. Therapy.* **21**, 369–375.
67. Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolino A., Cacciapuoti C. (2016) Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J. Gastroenterol.* **22**, 7824–7840.
68. Irshad M., Mankotia D.S., Irshad K. (2013) An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* **19**, 7896–7909.
69. Yamane D., McGivern D.R., Masaki T., Lemon S.M. (2013) Liver injury and disease pathogenesis in chronic hepatitis C. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **369**, 263–288.
70. Mondelli M.U., Silini E. (1999) Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J. Hepatol.* **31**(Suppl 1), 65–70.
71. Lanciotti R.S., Lambert A.J., Holodniy M., Saavedra S., Signor Ldel C. (2016) Phylogeny of Zika virus in Western Hemisphere, (2015) *Emerging Infect. Dis.* **22**, 933–935.
72. Shao Q., Herrlinger S., Zhu Y.N., Yang M., Goodfellow F., Stice S.L., Qi X.P., Brindley M.A., Chen J.F. (2017) The African Zika virus MR-766 is more virulent and causes more severe brain damage than current Asian lineage and dengue virus. *Development.* **144**, 4114–4124.
73. Dowall S.D., Graham V.A., Hewson R. (2020) Lineage-dependent differences of Zika virus infection in a susceptible mouse model are associated with different profiles of cytokines, chemokines, growth factors and acute phase proteins. *Cytokine.* **125**, 154864.
74. Mundim A., de Castro F.O.F., Albuquerque M.B.B., Vilanova-Costa C., Pfrimer I.A.H., Silva A. (2020) Major mutations in the NS3 gene region of hepatitis C virus related to the resistance to direct acting antiviral drugs: a systematic review. *Virus. Dis.* **31**, 220–228.
75. Sagnelli E., Starace M., Minichini C., Pisaturo M., Macera M., Sagnelli C., Coppola N. (2018) Resistance detection and re-treatment options in hepatitis C virus-related chronic liver diseases after DAA-treatment failure. *Infection.* **46**, 761–783.
76. Lanini S., Scognamiglio P., Mecozzi A., Lombardozzi L., Vullo V., Angelico M., Gasbarrini A., Taliani G., Attili A.F., Perno C.F., De Santis A., Puro V., Cerqua F., D'Offizi G., Pellicelli A., Armignacco O., Mennini F.S., Siciliano M., Girardi E., Panella V., Ippolito G., members of the Lazio Region H.C.V.t.g. (2018) Impact of new DAA therapy on real clinical practice: a multicenter region-wide cohort study. *BMC Infect. Dis.* **18**, 223.
77. Bradshaw D., Mbisa J.L., Geretti A.M., Healy B.J., Cooke G.S., Foster G.R., Thomson E.C., McLauchlan J., Agarwal K., Sabin C., Mutimer D., Moss P., Irving W.L., Barnes E., Hepatitis C Trust U.K. (2019) Consensus recommendations for resistance testing in the management of chronic hepatitis C virus infection: Public Health England HCV Resistance Group. *J. Infection.* **79**, 503–512.
78. Costa V.D., Pellegrini P., Rotman V., Pittella A.M., Nunes E.P., Lago B.V., Lampe E., Mello F.C.A. (2019) Resistance mutations A30K and Y93N associated with

- treatment failure with sofosbuvir and daclatasvir for hepatitis C virus infection non-responder patients: case reports. *Viruses*. **11**, 1004.
79. Sarrazin C. (2021) Treatment failure with DAA therapy: importance of resistance. *J. Hepatol.* **74**, 1472–1482.
80. Paolucci S., Novazzi F., Piralla A., Maserati R., Gulminetti R., Novati S., Barbarini G., Sacchi P., Fratini A., Bellotti L., Baldanti F. (2019) Viral dynamics among HCV infected patients with different genotypes treated with genotypic specific or pan-genotypic direct-acting antiviral agent combinations. *Infect. Drug Resist.* **12**, 1975–1984.
81. Schwerk J., Negash A., Savan R., Gale M., Jr. (2021) Innate immunity in hepatitis C virus infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **11**, a036988.
82. Welsch C., Efinger M., von Wagner M., Herrmann E., Zeuzem S., Welzel T.M., Lange C.M. (2017) Ongoing liver inflammation in patients with chronic hepatitis C and sustained virological response. *PLoS One*. **12**, e0171755.

Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 3 Increases Secretion of Interleukin-1beta in HEK293T Cells with Reconstructed NLRP3 Inflammasome

A. A. Latanova^{1, *}, K. K. Tuchinskaya², E. S. Starodubova¹, and V. L. Karpov¹

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

²Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products (Institute of Poliomyelitis), Russian Academy of Sciences, pos. Institut Poliomyelita, poselenie Moskovskii, Moscow, 108811 Russia

*e-mail: aalatanova@gmail.com

Infections caused by Flaviviridae pose a threat in the modern world. The pathology of diseases arising from these infections is largely determined by the development of systemic inflammation. The cytokines interleukin-1 beta and interleukin-18 play a key role in triggering inflammation. Their secretion from cells, in its turn, is induced upon activation of inflammasomes. Activation of NLRP3 (NLR family pyrin domain-containing 3) inflammasomes was detected in the cells infected with Flaviviridae. Some nonstructural proteins of these viruses have been shown to be able to activate or inhibit the NLRP3 inflammasome, in particular, through interaction with its components. In this study, the functional NLRP3 inflammasome was reconstructed in human HEK293T cells and the effect of some nonstructural proteins of individual Flaviviridae viruses on it was studied. This model did not reveal any impact of nonstructural proteins NS1 of West Nile virus, NS3 of hepatitis C virus, NS5 of tick-borne encephalitis virus on the inflammasome components content. At the same time, in the presence of the NS1 of the West Nile virus and NS5 of the tick-borne encephalitis virus, the level of secretion of interleukin-1 beta did not change, whereas in the presence of the NS3 protein of the hepatitis C virus, it increased by 1.5 times. Thus, NS3 can be considered as one of the factors of NLRP3 inflammasome activation and inflammatory pathogenesis in chronic hepatitis C virus infection.

Keywords: inflammasome, NLRP3, co-transfection, HEK293T, interleukin-1 beta, tick-borne encephalitis virus, hepatitis C virus, West Nile virus, Flaviviridae, nonstructural proteins

УДК 57.042

ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ И АКТИВНОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ФОРМ ПРОТЕАСОМ В ОБРАЗЦАХ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ РАЗВИТИИ ПАТОЛОГИИ У МЫШЕЙ ЛИНИИ 5xFAD

© 2023 г. А. В. Морозов^a, *, А. В. Буров^a, С. Ю. Фуников^a, Е. В. Тетерина^b, Т. М. Астахова^c,
П. А. Ерохов^c, А. А. Устюгов^b, В. Л. Карпов^a

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

^bИнститут физиологически активных веществ Российской академии наук,
Черноголовка, Московская обл., 142432 Россия

^cИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*e-mail: Runkel@inbox.ru

Поступила в редакцию 04.03.2023 г.

После доработки 20.03.2023 г.

Принята к публикации 21.03.2023 г.

Убиквитин-протеасомная система обеспечивает гидролиз большинства внутриклеточных белков в протеасомах. Разные формы протеасом различаются, в том числе, набором протеолитических субъединиц и присутствием активаторов. Нарушения в функционировании убиквитин-протеасомной системы выявлены при болезни Альцгеймера. При этом обнаружено увеличение экспрессии отдельных форм протеасом, в частности, протеасом, содержащих иммунные субъединицы (неконститутивные протеасомы). В данной работе нами изучены динамические изменения экспрессии генов каталитических субъединиц протеасом и содержания белков в коре головного мозга мышей трансгенной линии 5xFAD, служащей моделью болезни Альцгеймера. Показано, что в образцах коры головного мозга мышей 5xFAD в возрасте 380 дней содержание транскриптов генов *PSMB9* и *PSMB8*, кодирующих иммунные субъединицы протеасом в 4 и 6 раз больше, чем у мышей в возрасте 60 дней. Кроме того, в гомогенатах тканей значительно повышено содержание иммунных субъединиц (в 2.8 раза – $\beta 1i$, в 2.2 раза – $\beta 2i$). Полученные данные свидетельствуют об активации синтеза иммунных субъединиц и сборки неконститутивных протеасом на терминальной стадии развития патологии. По данным электрофореза в нативных условиях в коре головного мозга 380-дневных мышей 5xFAD активируются как 20S, так и 26S протеасомы, содержащие иммунные субъединицы. Полученные нами, а также другими авторами данные свидетельствуют в пользу того, что активация неконститутивных протеасом – это универсальный феномен, характерный для различных животных моделей болезни Альцгеймера, который может отражать как развитие нейровоспаления, так и адаптационные процессы в тканях.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, протеасомы, неконститутивные протеасомы

DOI: 10.31857/S0026898423050142, **EDN:** RNKDOL

ВВЕДЕНИЕ

Убиквитин-протеасомная система (УПС), центральным компонентом которой являются протеасомы, осуществляет деградацию большинства внутриклеточных белков [1]. Протеасома состоит из четырех, находящихся друг на друге, семиленных колец. Каждое кольцо состоит или из альфа-субъединиц (внешние кольца), или из бета-субъединиц (внутренние кольца). В каждом бета-кольце три субъединицы обладают каталитической активностью. Благодаря их наличию, протеасомы способны гидролизовать пептидные связи после кислых, основных и гидрофобных

аминокислотных остатков и проявлять каспаза-подобную, трипсинподобную и химотрипсинподобную активности соответственно. При этом конститутивные каталитические субъединицы ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) при сборке комплексов могут заменяться на “иммунные” аналоги $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$, что приводит к формированию иммунных и промежуточных (если заменяются не все конститутивные субъединицы) протеасом [2]. Все это увеличивает гетерогенность пула протеасом, сказывается на активности и спектре производимых ими пептидов [2]. (Протеасомы, содержащие иммунные каталитические субъединицы, далее будем называть неконститутивными). УПС в целом и

протеасомы в частности, вовлечены во все основные метаболические процессы в клетках, поэтому нарушение их функционирования имеет серьезные последствия для клеток и тканей организма.

Нейродегенеративные заболевания — это тяжелые, прогрессирующие заболевания центральной нервной системы (ЦНС), этиология которых, как правило, не установлена, а специфическое эффективное лечение на данный момент отсутствует. К нейродегенеративным заболеваниям относятся болезни Альцгеймера (БА), Паркинсона, Хантингтона, боковой амиотрофический склероз и другие [3]. Гибель нейронов ЦНС при таких заболеваниях приводит к развитию когнитивных и/или двигательных нарушений. Важной особенностью многих нейродегенеративных заболеваний является накопление в клетках или в межклеточном пространстве агрегатов, состоящих из пептидов или белков с измененной структурой, зачастую сильно убиквитинированных, что может указывать на непосредственное вовлечение системы контроля качества белков, в том числе УПС, в патогенез заболеваний этого класса [4, 5]. Действительно, схожие изменения функциональной активности УПС и пула протеасом выявлены при различных нейродегенеративных заболеваниях [6, 7].

БА — наиболее распространенная форма деменции, диагностированная более чем у 33 млн человек в мире, и ежегодно это число увеличивается на 6–7 млн (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>). При БА наблюдается потеря памяти, возникают нарушения речи и когнитивных функций; во внеклеточном пространстве и внутри нейронов формируются агрегаты пептида бета-амилоида (A β), а также нейрофибриллярные клубки (внутри нейронов), основным компонентом которых является гиперфосфорилированная форма белка тау [8].

Накопление белковых агрегатов указывает на вероятные нарушения функционирования УПС при БА [9]. Действительно, в постмортальных образцах мозга обнаружено снижение химотрипсиноподобной и каспазаподобной активности протеасом [10]. Снижение функциональной активности протеасом в образцах головного мозга также выявлено у мышей, моделирующих БА [11–13]. Кроме того, при инкубации культуры нейронов с A β 42 наблюдается интернализация пептида в клетки и снижение активности внутриклеточных протеасом [12]. В клетках, инкубированных с A β , выявлено повышение экспрессии убиквитин-конъюгирующего белка E2-25K/Nip-2 [14, 15]. Этот белок ингибирует активность протеасом, стабилизируя таким образом каспазу-12, активация которой опосредует гибель клеток, вызванную стрессом эндоплазматического ретикулума [14, 15]. У мышей APP^{swe}/PS1^{dE9}, модели-

рующих БА, выявлено накопление в коре головного мозга и гиппокампе репортерного белка GFPu, а также эндогенного субстрата протеасом p53, что указывает на снижение эффективности функционирования УПС [16]. С другой стороны, на той же модели не наблюдали накопления аналогичного белка-индикатора активности УПС — UbG76V-GFP [17]. С использованием еще одной модели БА — мышей 5xFAD — показано, что снижение уровня деубиквитирующего фермента Uch-L1 увеличивает количество β -секретазы 1, что, в свою очередь, вызывает повышение уровня A β [18]. Кроме того, в постмортальных образцах мозга пациентов с БА отмечено снижение содержания убиквитинлигазы HRD-1, локализованной в эндоплазматическом ретикулуме, что также может способствовать увеличению образования A β из белка-предшественника [19]. Недавно показали, что как окисление, так и чрезмерное фосфорилирование могут ограничивать протеасомный процессинг A β и тау [20]. При этом A β увеличивает экспрессию белка-регулятора гена кальцинейрина (RCAN1), который ингибирует дефосфорилирование тау [21], а гиперфосфорилированный и фибриллярный тау, в свою очередь, может напрямую снижать активность протеасом [22]. В образцах мозга пациентов с БА при снижении общей активности протеасом наблюдалось увеличение количества протеасом, содержащих иммунные субъединицы, и полиморфизм субъединицы β 1i [23]. Показано также повышение экспрессии и активности неконститутивных протеасом вокруг амилоидных бляшек в клетках микроглии [17]. Таким образом, изменения в УПС при БА уже достаточно неплохо изучены, опубликованы данные, указывающие на существование тесной связи между накоплением агрегатов A β и тау и изменениями в пуле внутриклеточных протеасом при развитии болезни. Однако неясно, активность каких форм протеасом претерпевает наибольшие изменения при БА.

На животной модели БА нами изучены динамические изменения пула протеасом, сопровождающие развитие патологии. Кроме того, проведены детальные исследования, направленные на то, чтобы выявить, активность каких форм протеасом в тканях меняется при развитии болезни. В работе использовали наиболее распространенную среди моделей БА линию трансгенных мышей Tg(APP^SSwF1Lon, PSEN1*^{M146L}*^{L286V}) 6799Vas/J, известную под условным названием 5xFAD. В геноме мышей этой линии встроена трансгенная кассета, содержащая кодирующую часть белка-предшественника амилоида (APP) с тремя аминокислотными заменами (K670N/M671L; I716V; V717I), ассоциированными с известными наследственными формами БА, и кодирующую часть белка пресенилина с двумя аминокислотными заменами (M146L; L286V), также соответствующи-

ми мутациям, обнаруживаемым при наследственных формах БА. Экспрессия трансгенов регулируется промотором гена *Thy1* мыши. Эта линия воспроизводит основные патологические черты БА и служит моделью Аβ42-индуцированной нейродегенерации, а также моделью для изучения образования амилоидных бляшек [24–26].

В работе проведено комплексное изучение пула протеасом в образцах коры головного мозга мышей 5xFAD в возрасте 60, 190 и 380 дней, соответствующих досимптоматической, предсимптоматической и симптоматической стадиям развития патологии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. В работе использовали мышей линии 5xFAD – модели БА ($n = 8$), и контрольных животных линии C57BL/6 ($n = 6$). Мышей всех линий содержали в SPF-виварии (Specific Pathogen Free) при ИФАВ РАН в условиях искусственно регулируемого светового дня (12 ч день и 12 ч ночь) при температуре 22–26°C и свободном доступе к корму и воде; не более пяти особей в клетке. Работы с животными проводили в соответствии с “Правилами лабораторной практики в Российской Федерации” от 01.04.2016 № 199н.

Получение образцов головного мозга мышей. Образцы головного мозга мышей 5xFAD и C57BL/6 разного возраста получали хирургическим путем после терминальной анестезии животных. Все тканевые образцы были маркированы по принципу: уникальный номер животного, дата забора ткани. Образцы коры головного мозга разделяли на четыре части и маркировали. Все образцы помещали в 1.5 мл пробирки и моментально замораживали в жидком азоте, после чего хранили при –80°C.

Выделение РНК и получение кДНК. Тотальную РНК выделяли из клеток с помощью набора GeneJET RNA Purification Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию и чистоту РНК определяли спектрофотометрически, используя прибор NanoDrop (“Thermo Fisher Scientific”). Образцы РНК обрабатывали с помощью набора RapidOut DNA Removal kit (“Thermo Fisher Scientific”) для удаления ДНК. Далее проводили реакцию обратной транскрипции, используя обратную транскриптазу Maxima H Minus (“Thermo Fisher Scientific”) и праймер oligo(dT)20 для получения кДНК (1.5 мкг суммарной РНК в реакционной смеси).

Оценка уровней экспрессии протеасомных генов. Количественную ПЦР в реальном времени и сравнительный анализ уровней экспрессии протеасомных генов: *PSMB3*, кодирующего структурную субъединицу β3, а также *PSMB5* (субъединица β5), *PSMB6* (субъединица β1), *PSMB7* (субъединица β2), *PSMB8* (субъединица β5i), *PSMB9* (субъединица β1i), *PSMB10* (субъединица β2i), проводили, используя разработанную нами ранее ПЦР-систему [27]. ПЦР проводили на образцах кДНК из тканей животных, а также на серийных разведениях плазмид, содержащих амплифицируемый фрагмент каждого гена, используя набор Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (“Thermo Fisher Scientific”) и специфические праймеры (табл. 1). Определяли количество копий каждой плазмиды в единице объема. Используя значения пороговых циклов ПЦР для известного количества плазмид, получена калибровочная кривая. Количество транскриптов исследуемого гена в образце определяли с использованием калибровочной кривой после нормирования по экспрессии гена *Actb*.

Лизирование тканей. Ткани гомогенизировали в буфере для гомогенизации (50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреитол, 10% глицерина, 10 мМ Na₂S₂O₅ и 2 мМ АТФ) из расчета 10 мг ткани на 50 мкл буфера. Гомогенаты осветляли центрифугированием в центрифуге 5418R (“Eppendorf”, Германия) при максимальных оборотах в течение 30 мин. Концентрацию общего белка в образцах измеряли по методу Лоури.

Иммуноблотинг. Наличие белков в лизатах анализировали методом иммуноблотинга. Белки разделяли с помощью электрофореза в 12%-ном денатурирующем (содержащем додецилсульфат натрия (ДСН)) полиакриламидном геле (ПААГ) в Трис-глициновом буфере, после чего переносили на нитроцеллюлозную мембрану (“Bio-Rad”, США). Эффективность переноса оценивали, окрашивая мембраны 0.1%-ным раствором Ponceau Rouge (“Sigma-Aldrich”, США). Для выявления субъединиц протеасом мембраны инкубировали с первичными антителами (табл. 2) в течение 2 ч, затем отмывали фосфатным буфером (ФБ), содержащим 0.1% Tween 20 (“Fisher Scientific”, США), и инкубировали с соответствующими вторичными антителами (табл. 2), конъюгированными с пероксидазой хрена. Блоты проявляли с помощью набора ECL Prime (“GE Healthcare”, Великобритания). В качестве контроля в гели загружали коммерческие препараты конститутивных и иммунных 20S протеасом (“Boston Biochem”, США). Для нормирования сигнала мембраны отмывали от антител сначала буфером для снятия антител (ФБ, 2% ДСН, 100 мМ β-меркаптоэтанол), а затем дополнительно ФБ. Мембраны инкубировали с первичными антителами к β-актину (табл. 2) в течение 1 ч, после чего отмывали и инкубировали с соответствующими вторичными антителами, меченными пероксидазой хрена (табл. 2), и проявляли, как описано выше.

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Праймер*	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
PSMB3 for	AGCGTCTCAAGTTCCGACTG
PSMB3 rev	CATGGGACAGCCAATGAGGT
PSMB5 for	TAAGGAACGCATCTCGGTCTG
PSMB5 rev	GTTCCCCTCGCTGTCTACG
PSMB6 for	ACTGCCAATGCTCTCGCTTT
PSMB6 rev	CGTCGGTATGGACCATCCTT
PSMB7 for	CATGGGTTCTGGCTCCTTGG
PSMB7 rev	GCTGCAATAGCCTCACTCAC
PSMB8 for	TGCCTATGGGGTGATGGACA
PSMB8 rev	CGTCTTCCTTCATGTGGTAC
PSMB9 for	ACCGTGAGGACTTGTTAGCG
PSMB9 rev	AAGCTGCGTCCACATAACCA
PSMB10 for	GGCTTGTGTTCCGAGATGG
PSMB10 rev	CAGCCCCACAGCAGTAGATT

*Последовательности праймеров аналогичны использованным нами ранее [27].

Таблица 2. Антитела, использованные в работе

Антитела	Производитель
Моноклональные антитела мыши к набору α -субъединиц протеасом $\alpha 1,2,3,5,6,7$	“Enzo”, США
Поликлональные антитела кролика к субъединице $\beta 1$	“Abcam”, Великобритания
Моноклональные антитела мыши к субъединице $\beta 2$	“Enzo”
Поликлональные антитела кролика к субъединице $\beta 5$	“GeneTex”, США
Поликлональные антитела кролика к субъединице $\beta 1i$	“Abcam”
Моноклональные антитела кролика к субъединице $\beta 2i$	“Abcam”
Моноклональные антитела мыши к β -актину	“Abcam”
Антитела козы против IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена	“Enzo”
Поликлональные антитела козы к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена	“Abcam”

Определение активности протеасом. Химотрипсинподобную, каспазаподобную, активности протеасом, а также специфическую активность субъединицы $\beta 5i$ в осветленных гомогенатах тканей оценивали согласно [28]. Химотрипсинподобную активность протеасом определяли по уровню гидролиза флуорогенного субстрата Suc-LLVY-AMC (“Sigma-Aldrich”), каспазаподобную — субстрата Z-LLE-AMC (“Sigma-Aldrich”), а специфическую активность субъединицы $\beta 5i$ — по уровню гидролиза флуорогенного субстрата Ac-Ala-Asn-Trp-AMC (“Boston Biochem”) с использованием VersaFluor Fluorometer (“Bio-Rad”). Активность измеряли как минимум в трех повторностях в 100 мкл буфера для определения активности (20 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 1 мМ дитиотреитол, 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ АТФ и 30 мкМ субстрата), содержащего 6 мкл осветленного гомогената;

концентрации АТФ и $MgCl_2$ выбирали, учитывая данные [29]. Специфическую активность протеасом контролировали, добавляя в отдельные пробы 10 мкМ ингибитора протеасом MG132 (“Sigma-Aldrich”). Полученные значения пересчитывали на 1 мкл осветленного гомогената, умножали на уравнивающий коэффициент (определяется после оценки концентрации белка в пробах), вычисляли среднее значение и стандартное отклонение, после чего пересчитывали относительно уровня активности в контрольных клетках (в процентах).

Определение активности протеасом в геле. Гомогенаты тканей животных (~20 мкг общего белка), а также препараты конститутивных 20S протеасом (0.5 мкг/дорожку) (“Enzo”) наносили на градиентный 4–20%-ный ПААГ. Электрофорез проводили в течение 36 ч при +4°C (80 В, 12 ч; 140 В,

12 ч; 240 В, 12 ч). После проведения электрофореза в нативных условиях гели вымачивали в растворе, содержащем флуорогенные субстраты (Suc-LLVY-AMC, “Sigma”, США), для оценки химо tripsиноподобной активности или Ac-ANW-AMC (“Boston Biochem”) — для оценки специфической активности $\beta 5i$ -субъединицы. Гель инкубировали в течение 30 мин, затем анализировали под ультрафиолетом и фотографировали, после чего фотографии анализировали с помощью программы ImageJ (<https://imagej.net/software/fiji/>). Для подтверждения одинаковой белковой нагрузки в образцах гель окрашивали раствором Кумасси (“Serva”, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспрессия генов иммунных протеасом возрастает в коре головного мозга животных 5xFAD на поздних стадиях развития патологии

На первом этапе работы с использованием разработанной ранее ПЦР-системы, позволяющей количественно сравнивать уровни экспрессии различных генов между собой [27], определяли уровни экспрессии протеасомных генов в коре головного мозга контрольных и трансгенных животных разного возраста. Сначала провели сравнительный анализ экспрессии генов протеасом у 60-дневных животных 5xFAD. Оказалось, что среди протестированных генов на самом высоком уровне экспрессируется ген *PSMB6*, кодирующий конститутивную каталитическую субъединицу $\beta 1$, а среди генов, кодирующих иммунные субъединицы протеасом — наиболее высокими были уровни экспрессии гена *PSMB10* (субъединица $\beta 2i$) (рис. 1).

В целом, в коре головного мозга мышей линии 5xFAD экспрессия генов, кодирующих конститутивные субъединицы протеасом, значительно превосходила уровни экспрессии генов иммунных субъединиц.

Далее оценили динамику экспрессии генов всех каталитических субъединиц протеасом в образцах головного мозга мышей 5xFAD и контрольных животных C57BL/6 в возрасте 60, 190 и 380 дней. Оказалось, что на фоне относительной стабильности уровней экспрессии в образцах, полученных от контрольных животных, в образцах коры головного мозга мышей 5xFAD, начиная с возраста 190 дней, наблюдался прогрессирующий рост уровней экспрессии генов иммунных субъединиц *PSMB8* и *PSMB9*. Это повышение зависело от субъединицы и составило от 4 (*PSMB9*) до 6 раз (*PSMB8*) у животных в возрасте 380 дней в сравнении с образцами от мышей 60-дневного возраста (рис. 2).

Эти данные указывают на вероятное значительное увеличение количества неконститутив-

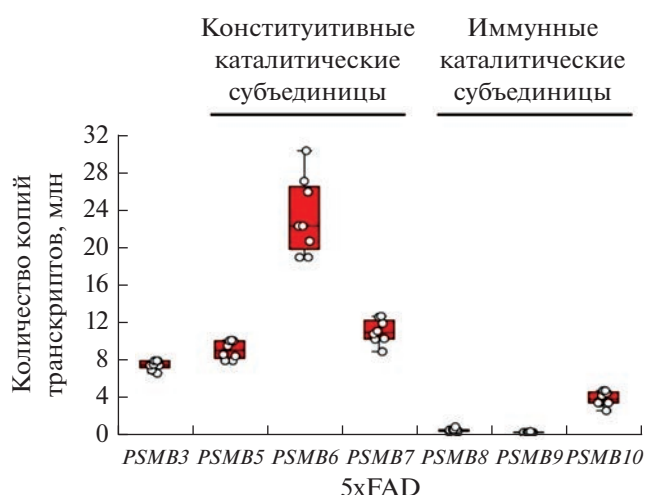


Рис. 1. Уровни экспрессии генов субъединиц протеасом в образцах коры головного мозга мышей линии 5xFAD ($n = 8$) в возрасте 60 дней. Указаны медианные значения количества копий транскриптов соответствующих субъединиц (миллионы штук в расчете на 1 мкг total RNA, выделенной из ткани).

ных протеасом в тканях головного мозга трансгенных животных, сопровождающее развитие патологии.

Экспрессия субъединиц иммунных протеасом в коре головного мозга животных 5xFAD возрастает на поздних стадиях развития патологии

В продолжение исследований методом иммуноблоттинга изучено содержание субъединиц протеасом в лизатах коры головного мозга мышей 5xFAD разного возраста. Показано сопоставимое количество конститутивных субъединиц протеасом $\beta 1$ и $\beta 2$, а также некоторое повышение содержания конститутивной субъединицы $\beta 5$ к 190 и 380 дню в образцах коры головного мозга трансгенных животных по сравнению с образцами, полученными от контрольных мышей (рис. 3, 4). Сравнительный анализ содержания α -субъединиц протеасом у мышей 5xFAD и C57BL/6 разного возраста выявил их разнонаправленные изменения между 60 и 190 днями, однако к 380 дням количество субъединиц в лизатах коры головного мозга контрольных и трансгенных мышей было сопоставимым (рис. 4). В то же время, выявлено значительное увеличение количества иммунных β -субъединиц ($*p < 0.05$ — $\beta 1i$, $*p < 0.05$, $\beta 2i$), рассчитано по критерию Стьюдента) в образцах трансгенных мышей в возрасте 380 дней (рис. 5). При анализе содержания иммунных субъединиц можно заметить, что на поздних стадиях развития патологии неконститутивные протеасомы могут составлять до 25% пула (соотношение содержа-

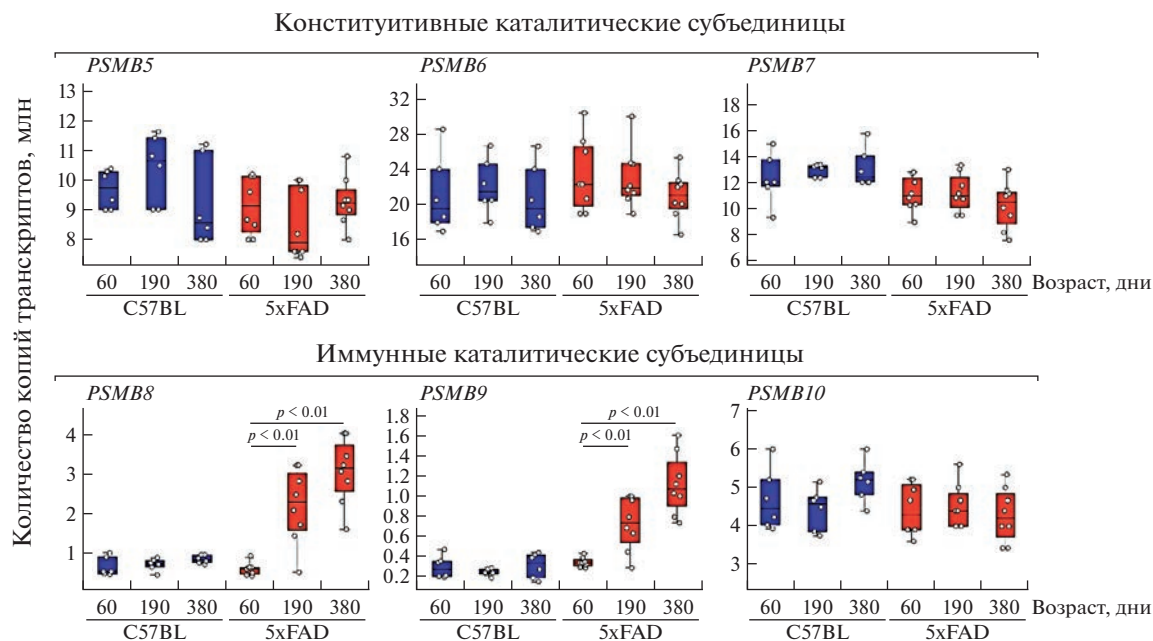


Рис. 2. Сравнительный анализ динамики экспрессии генов субъединиц протеасом в образцах коры головного мозга мышей линии C57BL/6 ($n = 6$) и 5xFAD ($n = 7$) разного возраста. Точки соответствуют количеству транскриптов в тканях конкретных животных. Указаны медианные значения количества копий транскриптов отдельных субъединиц (миллионы штук в расчете на 1 мкг суммарной РНК, выделенной из ткани). Статистическая значимость различий оценена с использованием критерия Стьюдента.

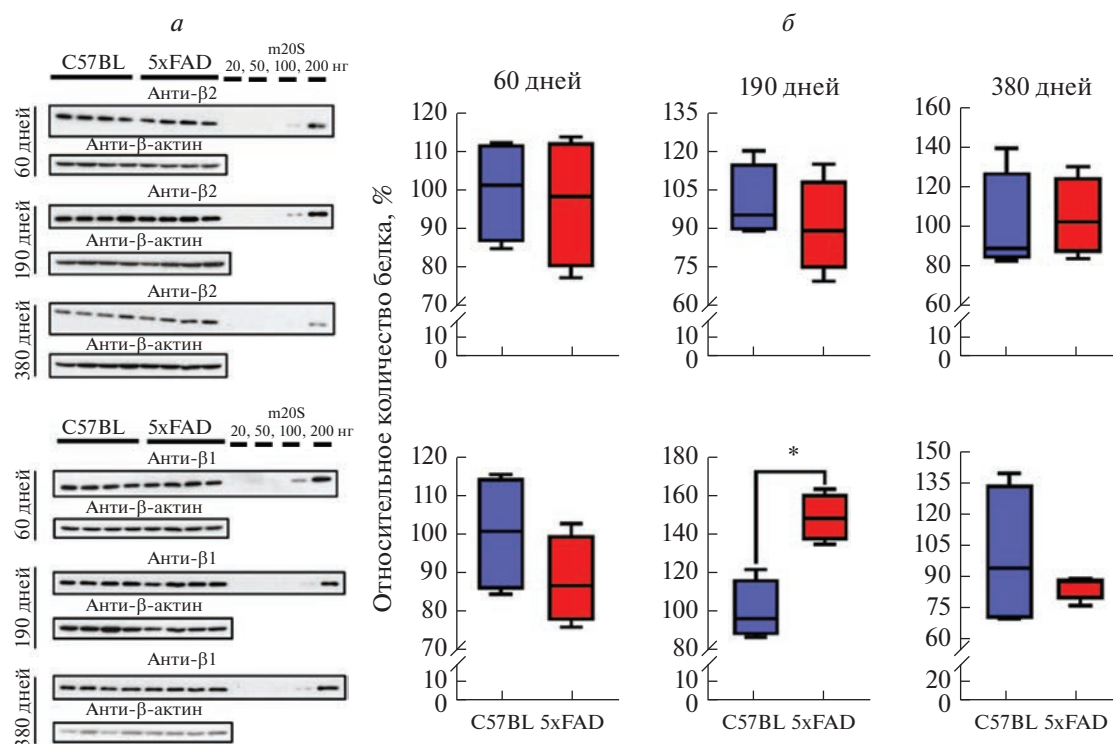


Рис. 3. Анализ содержания субъединиц протеасом $\beta 1$ и $\beta 2$ в лизатах коры головного мозга четырех мышей C57BL/6 и четырех 5xFAD различного возраста. *a* – Иммуноблоттинг образцов коры головного мозга животных. Для сравнения и оценки содержания целевого белка использованы серийные разведения коммерческого препарата 20S протеасом мыши (“R&D Systems”, США). *б* – Анализ изображений (*a*) с помощью программы ImageJ. Статистически значимые различия в содержании белков отмечены звездочками: $*p < 0.05$, рассчитано по *t*-критерию Стьюдента.

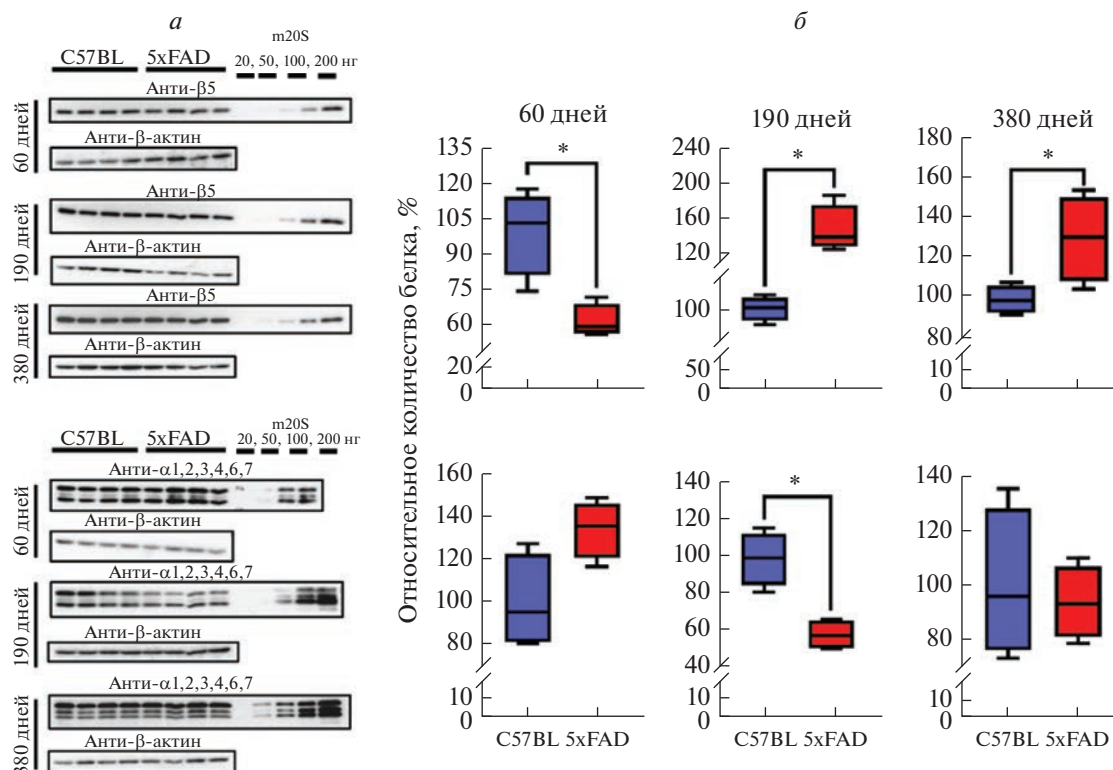


Рис. 4. Анализ содержания субъединиц протеасом $\beta 5$ и $\alpha 1,2,3,4,6,7$ в лизатах тканей коры головного мозга четырех мышей C57BL/6 и четырех 5xHAD различного возраста. *a* – Иммуноблоттинг образцов коры головного мозга животных. Для сравнения и оценки содержания целевого белка использованы серийные разведения коммерческого препарата 20S протеасом мыши (“R&D Systems”). *б* – Анализ изображений (*a*) с помощью программы ImageJ. Статистически значимые различия в содержании белков отмечены звездочками: $*p < 0.05$, рассчитано по *t*-критерию Стьюдента.

ния субъединиц $\beta 2$ и $\beta 2i$ в лизатах трансгенных мышей (рис. 3, 5)).

Полученные данные подтверждают увеличение количества неконститутивных протеасом в головном мозге мышей линии 5xHAD, а также указывают на вероятные изменения активности протеасом.

Активность протеасом в образцах коры головного мозга животных имеет тенденцию к снижению с возрастом и на терминальной стадии развития патологии

В образцах коры головного мозга контрольных животных выявлена тенденция к постепенному снижению всех исследованных активностей протеасом по мере старения. В образцах, полученных от трансгенных животных, снижение активности протеасом к 380 дню было более выраженным: статистически значимым в случае каспазаподобной активности и близким к статистической значимости ($p = 0.08$, критерий Стьюдента) в случае химотрипсинподобной активности. Существенного изменения $\beta 5i$ -специфической активности протеасом при этом не выявлено (рис. 6). Эти

данные указывают на более выраженное снижение активности протеасом при развитии БА-подобной патологии по сравнению с возрастными изменениями у контрольных животных.

Активность конститутивных и неконститутивных 26S протеасом имеет тенденцию к увеличению в коре головного мозга животных 5xHAD на поздних стадиях развития патологии при анализе в нативном геле

На следующем этапе методом электрофореза в ПААГ в нативных условиях определено содержание и активность различных форм протеасом в лизатах тканей головного мозга животных. В образцах выявлены свободные 20S протеасомы, вероятно, 20S протеасомы с 11S регуляторами, а также 26S протеасомы с одним или двумя 19S регуляторами (26S протеасомы) (рис. 7) [30]. Можно отметить, что в образцах коры головного мозга как контрольных, так и опытных мышей химотрипсинподобная активность ассоциирована в основном с 26S протеасомами, а химотрипсинподобная активность 20S протеасом и, предположительно, 20S протеасом с 11S активатором – сильно снижена (рис. 7).

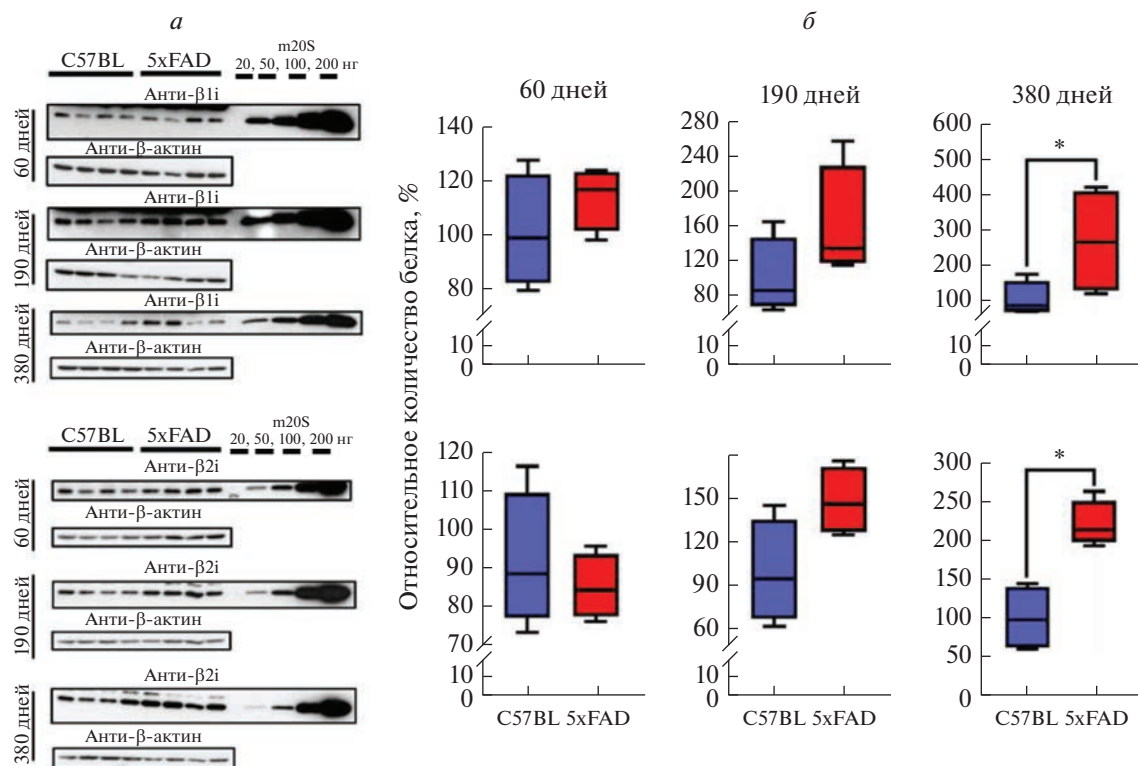


Рис. 5. Анализ содержания субъединиц протеасом β1i и β2i в лизатах тканей коры головного мозга четырех мышей C57BL/6 и четырех 5xFAD разного возраста. *а* – Иммуноблоттинг лизатов коры головного мозга животных. Для сравнения и оценки содержания целого белка использованы серийные разведения коммерческого препарата иммунных 20S протеасом мыши (“R&D Systems”). *б* – Анализ изображений (*а*) с помощью программы ImageJ. Статистически значимые различия в содержании белков отмечены звездочками: * $p < 0.05$, t -критерию Стьюдента.

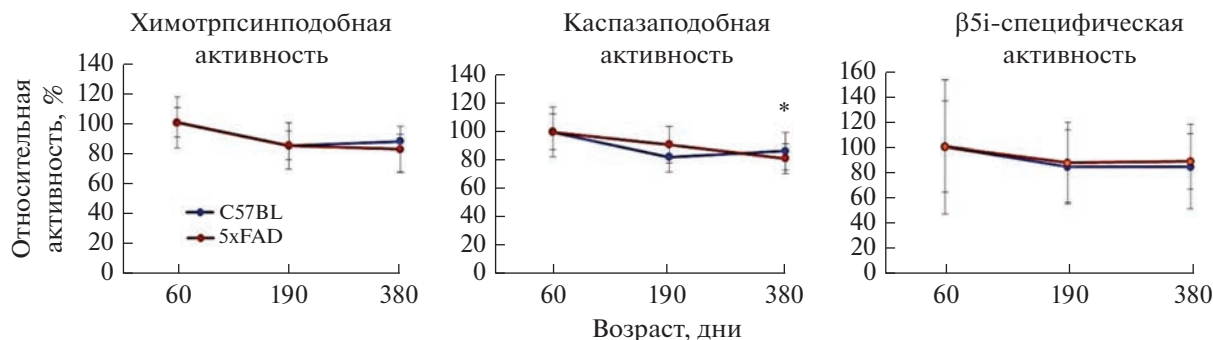


Рис. 6. Сравнительный анализ химотрипсинподобной, каспазаподобной и β5i-специфической активностей протеасом в образцах коры головного мозга мышей линий C57BL/6 ($n = 6$) и 5xFAD ($n = 6$) в возрасте 60, 190, 380 дней. Активность определяли в коре головного мозга шести животных в возрасте 60, 190 и 380 дней. Указаны средние значения. “Усы” отражают стандартное отклонение. Статистически значимые различия отмечены звездочкой: * $p < 0.05$, рассчитано по t -критерию Стьюдента.

Полученные нами результаты в отличие от данных определения активности протеасом в осветленных гомогенатах тканей (рис. 6) выявляют тенденцию к повышению активности протеасом трансгенных животных с возрастом (рис. 6, 7). Так, после нормирования на общий белок обнаружено близкое к статистически достоверному повыше-

ние химотрипсинподобной и специфической активности субъединицы β5i в 26S области в образцах коры головного мозга мышей 5xFAD в возрасте 380 дней по сравнению с активностью протеасом у контрольных животных того же возраста (рис. 7). Эти данные коррелируют с динамикой экспрессии гена, кодирующего субъединицу

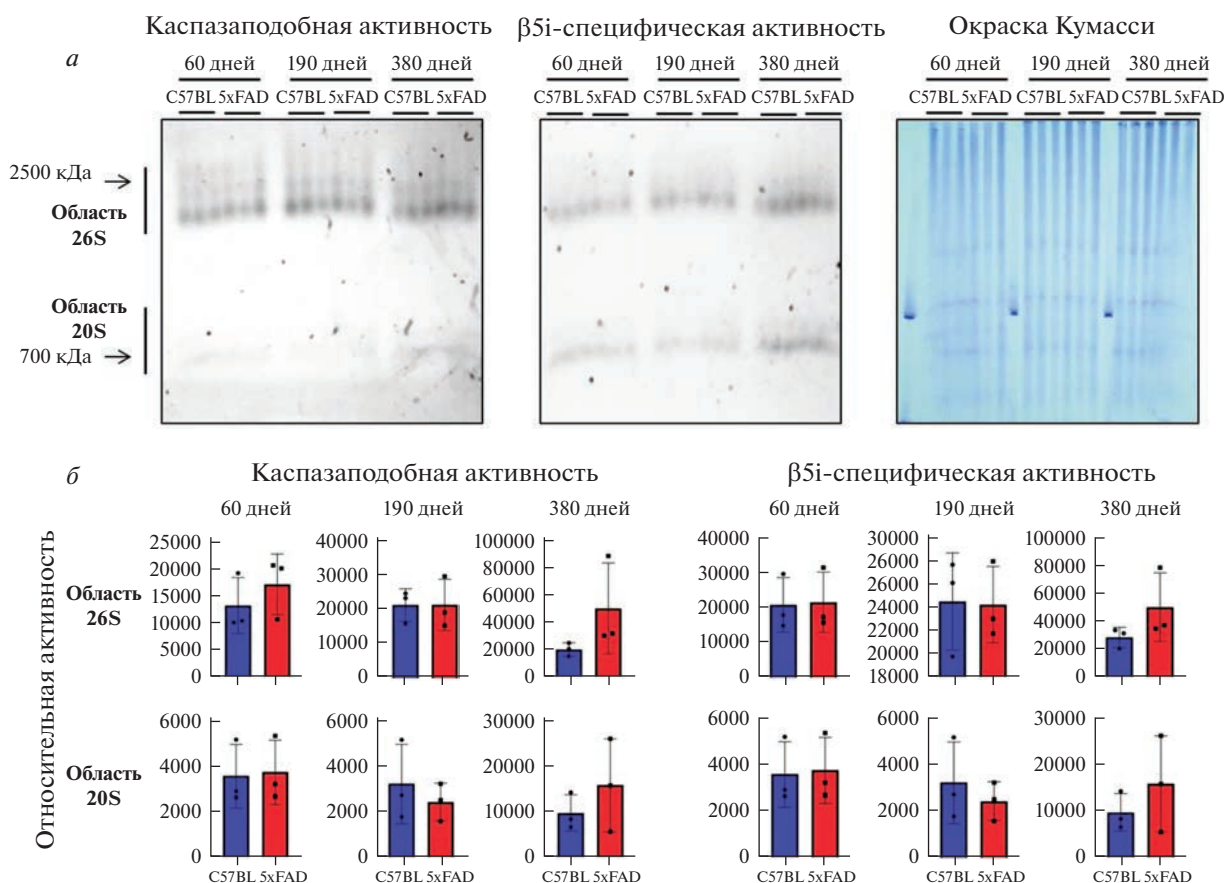


Рис. 7. *а* – Анализ форм протеасом и их активности в образцах коры головного мозга контрольных (C57BL/6, $n = 3$) и опытных животных (5xFAD, $n = 3$) разного возраста методом электрофореза в нативном ПААГ. После инкубации с субстратами для оценки активности протеасом гели анализировали под ультрафиолетом и фотографировали. Для подтверждения равномерности белковой нагрузки гель окрашивали раствором Кумасси. *б* – Анализ химотрипсинподобной и $\beta 5i$ -специфической активности протеасом в геле (*а*) с помощью программы ImageJ с учетом нормирования. Указаны средние значения и стандартное отклонение.

$\beta 5i$, в ходе развития патологии. Следует также отметить тенденцию к повышению химотрипсинподобной активности 20S протеасом у животных 5xFAD в возрасте 380 дней по сравнению с контрольными. Полученные данные указывают на изменения в пуле протеасом, перераспределение активности между различными формами протеасом, на вероятную активацию 26S и 20S неконститутивных протеасом при развитии патологии, подобной БА.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

БА – неизлечимое нейродегенеративное заболевание неизвестной этиологии. Однако известна ассоциация БА с накоплением в мозгу пациентов бета-амилоидных (A β) бляшек, а также внутриклеточных нерастворимых скоплений (нейрофибриллярных клубков), основным компонентом которых является тау-белок. Центральным событием при БА, согласно гипотезе амилоидно-

го каскада, считается агрегация A β [31]. При этом A β выявляется как вне, так и внутри клеток ЦНС [32]. Наличие внутриклеточных белковых агрегатов и нарастающее количество опубликованных данных указывают, с одной стороны, на нарушение функции УПС при прогрессировании БА [9, 33], а с другой, на растущий интерес к изучению связи между УПС и БА.

Активация экспрессии неконститутивных протеасом показана на различных моделях БА [17, 34]. Обнаружено существенное увеличение количества неконститутивных протеасом в глиальных клетках вокруг областей мозга, содержащих амилоидные бляшки [17]. При этом неконститутивные протеасомы, по-видимому, регулируют экспрессию цитокинов в клетках микроглии, влияя таким образом на развитие воспаления в ткани мозга [35], что также может стимулировать синтез таких протеасом. Последние данные говорят о первостепенной роли нейровоспаления в нарушении работы мозга при развитии БА [36]. Тем

самым снижением активности иммунных и промежуточных протеасом, играющих важную роль в развитии иммунных реакций, может рассматриваться как перспективный подход к терапии БА. Действительно, активно разрабатываются препараты, направленные на подавление активности неконститутивных протеасом [37, 38]. На животной модели 5xFAD нами получены аналогичные данные, указывающие на активацию экспрессии неконститутивных протеасом в клетках коры головного мозга животных на терминальной стадии развития патологии. Более того, нами показано, что, вероятно, происходит увеличение содержания и активности как 20S, так и 26S неконститутивных протеасом.

Синтез неконститутивных протеасом может также индуцироваться под действием стресса. Известно, что при БА выявляются признаки окислительного стресса [39], а A β 42 может вызывать подобные изменения в нейронах [40]. Важно отметить, что иммунные протеасомы обеспечивают деградацию окисленных, поврежденных, склонных к агрегации белков в клетках, а их содержание возрастает при окислительном стрессе [41]. На модели другого нейродегенеративного заболевания показано, что при нарушении сборки иммунных протеасом происходит накопление агрегатов α -синуклеина [42]. Тем самым активация иммунных протеасом может быть также и адаптационной реакцией клеток на накопление окисленных и поврежденных белков, направленной на предотвращение образования ими агрегатов. Учитывая рассмотренные функции иммунных протеасом, можно предположить, что выявленная нами активация 26S и 20S протеасом может происходить в разных клетках: в одних она обеспечивает разрушение потенциально опасных белковых субстратов, а в других — регуляцию экспрессии цитокинов.

Согласно результатам ряда работ, развитие БА сопровождается снижением активности протеасом [11–13]. Наши данные, полученные с использованием лизатов коры головного мозга мышей 5xFAD (рис. 6), согласуются с этими результатами, однако оценка уровней активности различных форм протеасом в нативном геле указывает на отсутствие достоверных различий и даже на некоторое повышение активности протеасом, сопровождающее развитие патологии (рис. 7). Данное противоречие может быть связано с разными условиями определения активности. Действительно, определение активности протеасом в лизатах тканей головного мозга с помощью флуорогенных пептидов показало, что у пациентов с БА активность протеасом существенно ниже, чем у здоровых доноров. Однако активность комплексов, измеренная после выделения протеасом, наоборот превосходила активность протеасом, выделенных из образцов здоровых доноров [43]. Это

различие связывают с возможным отделением белков, влияющих на активность протеасом, в процессе хроматографической очистки [43]. Таким образом, нельзя исключить, что различия в динамике изменений активности протеасом, выявленные в гомогенатах и после электрофореза в нативном геле, могут быть связаны с присутствием белков, влияющих на активность протеасом. Известно, что различные белки, не относящиеся к “каноническим” активаторам протеасом, могут существенно влиять на активность комплексов. Так, при взаимодействии молекул убиквитина, белков, содержащих убиквитин-подобные домены, или, например, белка Usp14 с субъединицами 19S регулятора 26S протеасомы происходят конформационные перестройки, приводящие к открытию α -ворот, повышению активности протеасом и гидролизу АТФ [44–48]. Введение в нейроны агрегатов белков, содержащих множество GA-повторов, способствовало привлечению большого количества 26S протеасом, а также “замораживанию” комплексов в состоянии деградации субстрата, подразумевающему открытие альфа ворот 20S протеасом, но затрудняющему деградацию субстратов [49]. Кроме того, можно предположить, что изменения активности протеасом могут быть связаны с белками и пептидами, которые накапливаются непосредственно при развитии БА. Так, модуляция активности внутриклеточных протеасом A β считается важным фактором, влияющим на развитие БА [11–14, 50–53]. Показано, что A β может быть субстратом 20S комплексов и “конкурировать” с другими субстратами протеасом, снижая тем самым их активность в отношении этих субстратов [53]. С другой стороны, ранее нами показано, что в присутствии низкомолекулярных олигомеров A β 42 активность 26S протеасом, измеряемая с помощью флуорогенных пептидов, может возрастать [54]. Наконец, активность протеасом может регулироваться посредством посттрансляционных модификаций как субъединиц протеасом, так и белков активаторов [55]. В постмортальных образцах больных выявлены посттрансляционные модификации субъединиц протеасом, не обнаруживаемые в контрольных образцах [43]. Таким образом, наблюдаемые изменения активности могут быть связаны с действием как эндогенных, так и патологических факторов, влияние которых с возрастом изменяется.

В целом, совокупность результатов, полученных нами, и опубликованных данных указывает на то, что активация неконститутивных протеасом — это универсальный феномен, характерный для различных животных моделей БА. На терминальной стадии заболевания, по-видимому, происходит активация как 20S, так и 26S неконститутивных протеасом. При этом можно предположить, что повышение активности протеасом,

обусловленное повышением экспрессии иммунных субъединиц, посттрансляционными модификациями субъединиц, взаимодействием с другими белками, компенсируется негативным эффектом от взаимодействия протеасом с другими белками или агрегатами, что приводит, в конечном итоге, к ингибированию активности протеасом при развитии БА. Повышение активности неконститутивных протеасом может быть связано при этом как с адаптационными процессами, так и с развитием нейровоспаления в тканях. Дальнейшие исследования помогут более детально охарактеризовать роль отдельных форм протеасом в развитии БА.

Работа получила финансовую поддержку Российского научного фонда (грант № 18-74-10095).

Работы с животными проводили в соответствии с “Правилами лабораторной практики в Российской Федерации” от 01.04.2016 № 199н.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ciechanover A., Kwon Y.T. (2015) Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp. Mol. Med.* **47**, e147–e147.
2. Morozov A.V., Karpov V.L. (2018) Biological consequences of structural and functional proteasome diversity. *Heliyon*. **4**, e00894.
3. Kovacs G.G. (2017) Concepts and classification of neurodegenerative diseases. *Handb. Clin. Neurol.* **145**, 301–307.
4. Fernández-Cruz I., Reynaud E. (2021) Proteasome subunits involved in neurodegenerative diseases. *Arch. Med. Res.* **52**, 1–14.
5. Schmidt M.F., Gan Z.Y., Komander D., Dewson G. (2021) Ubiquitin signalling in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ.* **28**, 570–590.
6. Dantuma N.P., Bott L.C. (2014) The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution. *Front. Mol. Neurosci.* **7**, 70.
7. Thibautaud T.A., Anderson R.T., Smith D.M. (2018) A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers. *Nat. Commun.* **9**, 1097.
8. d’Errico P., Meyer-Luehmann M. (2020) Mechanisms of pathogenic Tau and A β protein spreading in Alzheimer’s disease. *Front. Aging Neurosci.* **12**, 265.
9. Hegde A.N., Smith S.G., Duke L.M., Pourquoy A., Vaz S. (2019) Perturbations of ubiquitin-proteasome-mediated proteolysis in aging and Alzheimer’s disease. *Front. Aging Neurosci.* **11**, 324.
10. Keller J.N., Hanni K.B., Markesbery W.R. (2001) Impaired proteasome function in Alzheimer’s disease. *J. Neurochem.* **75**, 436–439.
11. Almeida C.G., Takahashi R.H., Gouras G.K. (2006) Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *J. Neurosci.* **26**, 4277–4288.
12. Oh S., Hong H.S., Hwang E., Sim H.J., Lee W., Shin S.J., Mook-Jung I. (2005) Amyloid peptide attenuates the proteasome activity in neuronal cells. *Mech. Ageing Dev.* **126**, 1292–1299.
13. Tseng B.P., Green K.N., Chan J.L., Blurton-Jones M., LaFerla F.M. (2008) A β inhibits the proteasome and enhances Amyloid and Tau accumulation. *Neurobiol. Aging*. **29**, 1607–1618.
14. Song S., Kim S.Y., Hong Y.M., Jo D.G., Lee J.Y., Shim S.M., Chung C.W., Seo S.J., Yoo Y.J., Koh J.Y., Lee M.C., Yates A.J., Ichijo H., Jung Y.K. (2003) Essential role of E2-25K/Hip-2 in mediating amyloid-beta neurotoxicity. *Mol. Cell.* **12**, 553–563.
15. Song S., Lee H., Kam T.I., Tai M.L., Lee J.Y., Noh J.Y., Shim S.M., Seo S.J., Kong Y.Y., Nakagawa T., Chung C.W., Choi D.Y., Oubrahim H., Jung Y.K. (2008) E2-25K/Hip-2 regulates caspase-12 in ER stress-mediated A β neurotoxicity. *J. Cell Biol.* **182**, 675–684.
16. Liu Y., Hettinger C.L., Zhang D., Rezvani K., Wang X., Wang H. (2014) The proteasome function reporter GFPu accumulates in young brains of the APP^{swe}/PS1^{dE9} Alzheimer’s disease mouse model. *Cell Mol. Neurobiol.* **34**, 315–322.
17. Orre M., Kamphuis W., Dooves S., Kooijman L., Chan E.T., Kirk C.J., Dimayuga Smith V., Koot S., Mamber C., Jansen A.H., Ova H., Hol E.M. (2013) Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer’s disease. *Brain*. **136**, 1415–1431.
18. Guglielmotto M., Monteleone D., Vasciaveo V., Repetto I.E., Manassero G., Tabaton M., Tamagno E. (2017) The decrease of Uch-L1 activity is a common mechanism responsible for A β 42 accumulation in Alzheimer’s and vascular disease. *Front. Aging Neurosci.* **9**, 320.
19. Kaneko M., Koike H., Saito R., Kitamura Y., Okuma Y., Nomura Y. (2010) Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid-beta generation. *J. Neurosci.* **30**, 3924–3932.
20. Bonet-Costa V., Pomatto L.C.-D., Davies K.J.A. (2016) The proteasome and oxidative stress in Alzheimer’s disease. *Antioxid. Redox Signal.* **25**, 886–901.
21. Lloret A., Badia M.C., Giraldo E., Ermak G., Alonso M.D., Pallardó F.V., Davies K.J., Viña J. (2011) Amyloid- β toxicity and tau hyperphosphorylation are linked via RCAN1 in Alzheimer’s disease. *J. Alzheimers Dis.* **27**, 701–709.
22. Keck S., Nitsch R., Grune T., Ullrich O. (2003) Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer’s disease. *J. Neurochem.* **85**, 115–122.
23. Mishto M., Bellavista E., Santoro A., Stolzing A., Ligorio C., Nacmias B., Spazzafumo L., Chiappelli M., Licastro F., Sorbi S., Pession A., Ohm T., Grune T., Franceschi C. (2006) Immunoproteasome and LMP2

- polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. *Neurobiol. Aging*. **27**, 54–66.
24. Jawhar S., Trawicka A., Jenneckens C., Bayer T.A., Wirths O. (2012) Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. **33**, 196.e29–40.
 25. Oakley H., Cole S.L., Logan S., Maus E., Shao P., Craft J., Guillozet-Bongaarts A., Ohno M., Disterhoft J., Van Eldik L., Berry R., Vassar R. (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J. Neurosci.* **26**, 10129–10140.
 26. Richard B.C., Kurdakova A., Baches S., Bayer T.A., Weggen S., Wirths O. (2015) Gene dosage dependent aggravation of the neurological phenotype in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **45**, 1223–1236.
 27. Фуников С.Ю., Спасская Д.С., Буров А.В., Тетерина Е.В., Устюгов А.А., Карпов В.Л., Морозов А.В. (2021) Отделы центральной нервной системы мыши отличаются по количеству транскриптов протеасомных генов. *Молекуляр. биология*. **55**, 54–63.
 28. Morozov A.V., Astakhova T.M., Garbuz D.G., Krasnov G.S., Bobkova N.V., Zatsepina O.G., Karpov V.L., Evgen'ev M.B. (2017) Interplay between recombinant Hsp70 and proteasomes: proteasome activity modulation and ubiquitin-independent cleavage of Hsp70. *Cell. Stress Chaperones*. **22**, 687–697.
 29. Morozov A., Astakhova T., Erokhov P., Karpov V. (2022) The ATP/Mg²⁺ Balance affects the degradation of short fluorogenic substrates by the 20S proteasome. *Methods Protoc.* **5**, 15.
 30. Erokhov P.A., Lyupina Y.V., Radchenko A.S., Kolacheva A.A., Nikishina Y.O., Sharova N.P. (2017) Detection of active proteasome structures in brain extracts: proteasome features of August rat brain with violations in monoamine metabolism. *Oncotarget*. **8**, 70941–70957.
 31. Hardy J., Selkoe D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. **297**, 353–356.
 32. LaFerla F.M., Green K.N., Oddo S. (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 499–509.
 33. de Vrij F.M., Fischer D.F., van Leeuwen F.W., Hol E.M. (2004) Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system. *Prog. Neurobiol.* **74**, 249–270.
 34. Aso E., Lomoio S., López-González I., Joda L., Carmona M., Fernández-Yagüe N., Moreno J., Juvés S., Pujol A., Pamplona R., Portero-Otin M., Martín V., Díaz M., Ferrer I. (2012) Amyloid generation and dysfunctional immunoproteasome activation with disease progression in animal model of familial Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **22**, 636–653.
 35. Wagner L.K., Gilling K.E., Schormann E., Kloetzel P.M., Heppner F.L., Krüger E., Prokop S. (2017) Immunoproteasome deficiency alters microglial cytokine response and improves cognitive deficits in Alzheimer's disease-like APPPS1 mice. *Acta Neuropathol. Commun.* **24**, 52.
 36. Lemprière S. (2023) Neuroinflammation, not amyloid- β deposition, associated with brain network dysfunction in AD. *Nat. Rev. Neurol.* **19**, 66.
 37. Yeo I.J., Lee M.J., Baek A., Miller Z., Bhattarai D., Baek Y.M., Jeong H.J., Kim Y.K., Kim D.E., Hong J.T., Kim K.B. (2019) A dual inhibitor of the proteasome catalytic subunits LMP2 and Y attenuates disease progression in mouse models of Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* **5**, 18393.
 38. Lee M.J., Bhattarai D., Jang H., Baek A., Yeo I.J., Lee S., Miller Z., Lee S., Hong J.T., Kim D.E., Lee W., Kim K.B. (2021) Macrocyclic immunoproteasome inhibitors as a potential therapy for Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* **12**, 10934–10950.
 39. Tönnies E., Trushina E. (2017) Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **57**, 1105–1121.
 40. Butterfield D.A. (2002) Amyloid beta-peptide (1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic. Res.* **36**, 1307–1313.
 41. Pickering A.M., Koop A.L., Teoh C.Y., Ermak G., Grune T., Davies K.J. (2010) The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 $\alpha\beta$ proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem. J.* **432**, 585–595.
 42. Bi M., Du X., Xiao X., Dai Y., Jiao Q., Chen X., Zhang L., Jiang H. (2021) Deficient immunoproteasome assembly drives gain of α -synuclein pathology in Parkinson's disease. *Redox Biol.* **47**, 102167.
 43. Gillardon F., Kloss A., Berg M., Neumann M., Mechtler K., Hengerer B., Dahlmann B. (2007) The 20S proteasome isolated from Alzheimer's disease brain shows post-translational modifications but unchanged proteolytic activity. *J. Neurochem.* **101**, 1483–1490.
 44. Bashore C., Dambacher C.M., Goodall E.A., Matyskiela M.E., Lander G.C., Martin A. (2015) Ubp6 deubiquitinase controls conformational dynamics and substrate degradation of the 26S proteasome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 712–719.
 45. Bech-Otschir D., Helfrich A., Enenkel C., Consiglieri G., Seeger M., Holzhütter H.G., Dahlmann B., Kloetzel P.M. (2009) Polyubiquitin substrates allosterically activate their own degradation by the 26S proteasome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 219–225.
 46. Li X., Demartino G.N. (2009) Variably modulated gating of the 26S proteasome by ATP and polyubiquitin. *Biochem. J.* **421**, 397–404.
 47. Collins G.A., Goldberg A.L. (2017) The logic of the 26S proteasome. *Cell*. **169**, 792–806.
 48. Peth A., Besche H.C., Goldberg A.L. (2009) Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S gate opening. *Mol. Cell.* **36**, 794–804.
 49. Guo Q., Lehmer C., Martínez-Sánchez A., Rudack T., Beck F., Hartmann H., Pérez-Berlanga M., Frottin F., Hipp M.S., Hartl F.U., Edbauer D., Baumeister W.,

- Fernández-Busnadiego R. (2018) *In situ* structure of neuronal C9orf72 Poly-GA aggregates reveals proteasome recruitment. *Cell*. **172**, 696–705.e12.
50. Gregori L., Fuchs C., Figueiredo-Pereira M.E., Van Nostrand W.E., Goldgaber D. (1995) Amyloid beta-protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **270**, 19702–19708.
51. Gregori L., Hainfeld J.F., Simon M.N., Goldgaber D. (1997) Binding of amyloid beta protein to the 20S proteasome. *J. Biol. Chem.* **272**, 58–62.
52. Lopez Salon M., Pasquini L., Besio Moreno M., Pasquini J.M., Soto E. (2003) Relationship between beta-amyloid degradation and the 26S proteasome in neural cells. *Exp. Neurol.* **180**, 131–143.
53. Zhao X., Yang J. (2010) Amyloid- β peptide is a substrate of the human 20S proteasome. *ACS Chem. Neurosci.* **1**, 655–660.
54. Morozov A.V., Kulikova A.A., Astakhova T.M., Mitkevich V.A., Burnysheva K.M., Adzhubei A.A., Erokhov P.A., Evgen'ev M.B., Sharova N.P., Karpov V.L., Makarov A.A. (2016) Amyloid- β increases activity of proteasomes capped with 19S and 11S regulators. *J. Alzheimer's Dis.* **54**, 763–776.
55. Hirano H., Kimura Y., Kimura A. (2016) Biological significance of co- and post-translational modifications of the yeast 26S proteasome. *J. Proteomics.* **134**, 37–46.

Changes in the Activity and Content of Individual Forms of Proteasomes in Samples of the Cerebral Cortex during Pathology Development in 5xFAD Mice

A. V. Morozov^{1, *}, A. V. Burov¹, S. Yu. Funikov¹, E. V. Teterina², T. M. Astakhova³, P. A. Erokhov³, A. A. Ustyugov², and V. L. Karpov¹

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

²Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia

³Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: Runkel@inbox.ru

The ubiquitin-proteasome system (UPS) provides hydrolysis of most intracellular proteins in proteasomes. There are various forms of proteasomes differing, among other things, in the set of proteolytic subunits and the presence of activators. Alzheimer's disease (AD) is characterized by disturbances in the functional state of the UPS. At the same time, an increase in the expression of certain forms of proteasomes, in particular, proteasomes containing immune subunits (non-constitutive proteasomes), was shown. Here, we studied dynamic changes in the expression of catalytic proteasome subunit genes and protein content in the cerebral cortex of animals using a mouse model of AD (5xFAD transgenic mice). In samples from 5xFAD mice, at the age of 380 days, compared with samples from mice of 60 days of age, 4 and 6 times more gene transcripts of the immune subunits *PSMB9* and *PSMB8* were detected, as well as a significant increase in the number of immune β -subunits (2.8 times – $\beta 1i$, 2.2 times – $\beta 2i$) was observed. The results obtained indicate activation of the synthesis of immune subunits and assembly of non-constitutive proteasomes at the terminal stage of pathology development. At the same time, the results of electrophoresis in native conditions indicate the activation of both 20S and 26S proteasomes containing immune subunits in samples from 5xFAD mice, 380 days of age. The obtained data, in combination with available literature, indicate that the activation of non-constitutive proteasomes is a universal phenomenon characteristic of various animal models of AD, that may reflect both the development of neuroinflammation and adaptive processes in tissues.

Keywords: Alzheimer's disease, proteasomes, non-constitutive proteasomes

УДК 57.042

ДИНАМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ И СОДЕРЖАНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ФОРМ ПРОТЕАСОМ В ОБРАЗЦАХ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ СТАРЕНИИ МЫШЕЙ C57BL/6

© 2023 г. А. В. Буров^а, С. Ю. Фуников^а, Т. М. Астахова^б, Е. В. Тетерина^с, В. О. Небогатилов^с, П. А. Ерохов^б, А. А. Устюгов^с, В. Л. Карпов^а, А. В. Морозов^а, *

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

^бИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

^сИнститут физиологически активных веществ Российской академии наук, Черноголовка, Московская обл., 142432 Россия

*e-mail: Runkel@inbox.ru

Поступила в редакцию 03.04.2023 г.

После доработки 02.05.2023 г.

Принята к публикации 04.05.2023 г.

Протеасомы — ключевые компоненты убиквитин-протеасомной системы. Известны различные формы протеасом. При старении выявлены нарушения в функционировании протеасом, а также повышенная экспрессия отдельных их форм. Учитывая эти данные, мы изучили экспрессию генов, кодирующих конститутивные и иммунные субъединицы протеасом, в образцах коры головного мозга мышей линии C57BL/6 в возрасте 60, 190, 380 и 720 сут. Кроме того, в осветленных гомогенатах тканей исследовано содержание конститутивных и иммунных субъединиц протеасом, химо-трипсинподобная и каспазаподобная активности протеасомных пулов, а также активность иммунной субъединицы $\beta 5i$. Охарактеризованы химо-трипсинподобная активность и активность субъединицы $\beta 5i$ разных форм протеасом, разделенных электрофорезом в нативных условиях. По сравнению с молодыми особями в коре головного мозга животных в возрасте 720 сут выявлены следующие изменения в паттернах экспрессии генов протеасом: снижение для гена *PSMB5*, кодирующего конститутивную субъединицу протеасом $\beta 5$; активация генов, кодирующих иммунные субъединицы $\beta 5i$ и $\beta 1i$. В осветленных гомогенатах тканей возрастных мышей увеличено содержание иммунных субъединиц $\beta 1i$ и $\beta 2i$. В образцах от старых животных также выявлено снижение общей химо-трипсинподобной активности и тенденция к снижению каспазаподобной, а также активности $\beta 5i$ субъединицы протеасом. По результатам анализа нативных комплексов в тканях старых животных обнаружено снижение химо-трипсинподобной активности как 26S, так и 20S протеасом, содержащих субъединицу $\beta 5i$. На основании полученных данных можно предполагать, что в пуле неконститутивных протеасом головного мозга мышей происходят изменения, отражающие адаптационные процессы при старении.

Ключевые слова: старение, неконститутивные протеасомы, экспрессия генов, головной мозг, мышцы

DOI: 10.31857/S0026898423050038, **EDN:** VFWCPU

ВВЕДЕНИЕ

Убиквитин-протеасомная система важна для поддержания гомеостаза клеток и тканей за счет деградации большинства внутриклеточных белков [1]. Центральный элемент убиквитин-протеасомной системы — 20S протеасомы. Это мульти-субъединичные белковые комплексы, осуществляющие протеолиз белков. Функциональная активность и субстратная специфичность протеасом зависят от набора протеолитических субъединиц в составе комплекса. Протеасомы могут содержать только конститутивные субъединицы (конститутивные протеасомы), только иммунные или

иммунные и конститутивные каталитические субъединицы одновременно (в данной работе все протеасомы, содержащие иммунные субъединицы, мы называем “неконститутивные протеасомы”). Соотношение конститутивных и неконститутивных протеасом различно в разных органах. Так, в коре головного мозга большая часть протеасомного пула представлена конститутивными протеасомами, а иммунные органы, напротив, обогащены неконститутивными протеасомами. Протеасомный пул динамичен: при стрессе, накоплении в клетках белковых агрегатов или чужеродных белков в них возрастает содержание неконститутивных протеасом и меняется профиль

активности комплексов [2]. Формы протеасом, кроме того, отличаются наличием/отсутствием активаторов, которые обеспечивают доступ субстратов в протеолитическую камеру, что также сказывается на активности протеасом. Так, 20S протеасомы, несущие 19S активатор, называют 26S протеасомами. Такие комплексы специфически распознают и разрушают белки, меченные убиквитином. Протеасомы, в частности неконститутивные, могут взаимодействовать и с другими активаторами, например с 11S, что, по всей видимости, сказывается на их активности в отношении определенных субстратов [3]. Кроме того, активность протеасом может регулироваться их взаимодействием с другими белками (не входящими в состав активаторов) и посттрансляционными модификациями [3].

Процессы старения связаны с накоплением потенциально токсичных белковых агрегатов в клетках [4]. В этой связи функциональные изменения, происходящие в пуле протеасом с возрастом, представляют большой интерес и активно изучаются. Ранее при исследовании пула протеасом разных органов, в том числе центральной нервной системы стареющих крыс линий F344BN и Wistar, выявлено повышение экспрессии протеасом с иммунными каталитическими субъединицами [5–7]. С. Giannini и соавт. [8] сообщали, что в коре головного мозга стареющих крыс линии Sprague Dawley усиливается экспрессия субъединиц иммунных протеасом и снижается эффективность гидролиза флуорогенных субстратов 20S и 26S протеасомами. В тоже время деградация полиубиквитинированных модельных субстратов 26S протеасомами старых животных была немного повышена по сравнению с выделенными от молодых животных. Стоит заметить, что работ по изучению ассоциированных со старением изменений функциональной активности и состава протеасомного пула коры головного мозга мышей мало.

Нами исследована экспрессия генов протеасом, их субъединичный состав и активность отдельных форм (в том числе содержащих иммунные субъединицы) в коре головного мозга мышей линии C57BL/6 на разных этапах естественного старения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные. В экспериментах использовали самцов линии C57BL/6. Мышей содержали в SPF (Specific Pathogen Free) виварии Института физиологически активных веществ Российской академии наук в условиях искусственно регулируемого светового дня при температуре 22–26°C и свободном доступе к корму и воде. Работы с мышами проводили в полном соответствии с “Пра-

вилами лабораторной практики в Российской Федерации” от 01.04.2016 № 199н.

Получение образцов головного мозга мышей. В работе использовали образцы коры головного мозга мышей C57BL/6 в возрасте 60, 190 и 380 сут ($n = 6$ для каждого возраста) и 720 сут ($n = 4$). Все образцы головного мозга были изъяты хирургическим способом после терминальной анестезии животного и промаркированы, как описано ранее [9]. Образцы коры головного мозга помещали в 1.5-миллилитровые пробирки, замораживали в жидком азоте, после чего помещали на хранение при -80°C .

Выделение РНК и получение кДНК. Выделение тотальной РНК из образцов тканей животных проводили, используя набор GeneJET RNA Purification kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически, используя прибор NanoDrop (“Thermo Fisher Scientific”). Для удаления ДНК образцы РНК обрабатывали ДНКазой, используя набор RapidOut DNA Removal kit (“Thermo Fisher Scientific”). Для получения кДНК использовали 1.5 мкг тотальной РНК. Реакцию обратной транскрипции проводили с обратной транскриптазой Maxima H Minus (“Thermo Fisher Scientific”) и праймером oligo(dT)₂₀.

Оценка уровней экспрессии протеасомных генов. Содержание транскриптов генов субъединиц протеасом: *PSMB5*, *PSMB6*, *PSMB7*, *PSMB8*, *PSMB9*, *PSMB10* – и гена, кодирующего β -актин (*Actb*), оценивали методом ПЦР в реальном времени, используя набор Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (“Thermo Fisher Scientific”). Сравнительный анализ абсолютных уровней экспрессии протеасомных генов проводили с помощью разработанной ранее системы для количественный ПЦР в реальном времени [10].

Лизирование тканей и иммуноблотинг. Ткани коры головного мозга животных гомогенизировали в буфере для гомогенизации: 50 мМ Трис-HCl (pH 7.5), 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреитол, 10% глицерина, 10 мМ Na₂S₂O₅, 2 мМ АТФ – из расчета 50 мкл буфера на 10 мг ткани. Полученные гомогенаты осветляли центрифугированием при 13000 g на центрифуге Eppendorf 5418R (“Eppendorf”, Германия) в течение 30 мин. Надосадочную фракцию собирали и определяли в ней концентрацию общего белка по методу Лоури. Белки разделяли электрофорезом в 12%-ном ДСН-ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (“Bio-Rad”, США). Эффективность переноса оценивали, окрашивая мембрану 0.1%-ным раствором Ponceau Rouge (“Sigma-Aldrich”, США).

Для выявления субъединиц протеасом мембраны инкубировали с первичными антителами (табл. 1) в течение 2 ч, затем отмывали фосфат-

Таблица 1. Антитела, использованные в работе

Антитела/разведение	Производитель
Поликлональные антитела кролика к субъединице $\beta 1/(1 : 1000)$	“Abcam”, Великобритания
Моноклональные антитела мыши к субъединице $\beta 2/(1 : 1000)$	“Enzo”, США
Поликлональные антитела кролика к субъединице $\beta 5/(1 : 2000)$	“GeneTex”, США
Поликлональные антитела кролика к субъединице $\beta 1i/(1 : 1000)$	“Abcam”, Великобритания
Моноклональные антитела кролика к субъединице $\beta 2i/(1 : 1000)$	“Abcam”, Великобритания
Поликлональные антитела кролика к субъединице $\beta 5i/(1 : 1000)$	“Abcam”, Великобритания
Моноклональные антитела мыши к β -актину/(1 : 3000)	“Abcam”, Великобритания
HRP-меченые поликлональные антитела козы против IgG мыши/(1 : 30000)	“Enzo”, США
HRP-меченые поликлональные антитела козы против IgG кролика/(1 : 30000)	“Abcam”, Великобритания

ным буфером (ФБ), содержащим 0.1% Tween 20 (“Thermo Fisher Scientific”), и инкубировали с соответствующими вторичными антителами (табл. 1), конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP). Для дополнительного подтверждения наличия целевого белка и полуквантитативной оценки его содержания в образцах на гель наносили коммерческие препараты конститутивных и иммунных 20S протеасом (“Boston Biochem”, США). Для нормирования сигнала мембраны инкубировали с первичными антителами к β -актину (табл. 1) (после отмывки мембран от предыдущих антител сначала буфером для снятия антител: ФБ, 2% ДСН, 100 мМ β -меркаптоэтанол, — а затем дополнительно ФБ) в течение 1 ч, после чего отмывали ФБ и инкубировали с соответствующими вторичными HRP-мечеными антителами (табл. 1). Для детекции целевых белков использовали набор ECL Prime (“GE Healthcare”, Великобритания), полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ (<https://imagej.net/software/fiji/>).

Определение активности протеасом. Химотрипсинподобную, каспазаподобную активности протеасом, а также специфическую активность субъединицы $\beta 5i$ в осветленных гомогенатах образцов коры головного мозга мышей оценивали, как описано ранее [9]. Для определения химотрипсинподобной активности протеасом использовали флуорогенный субстрат Suc-LLVY-AMC (“Sigma-Aldrich”), каспазаподобной — Z-LLE-AMC (“Sigma-Aldrich”), а активность субъединицы $\beta 5i$ оценивали по эффективности гидролиза флуорогенного субстрата Ac-ANW-AMC (“Boston Biochem”). Измерения проводили на флуориметре VersaFluor Fluorometer (“Bio-Rad”) — как минимум в трех повторах для каждого образца.

Определение активности протеасом в нативном ПААГ. Активность протеасом в неденатурирующем ПААГ определяли, как описано ранее [9]. Осветленные гомогенаты образцов коры головного мозга животных (~20 мкг общего белка) наносили на градиентный 4–20%-ный ПААГ. Элек-

трофорез проводили в течение 36 ч при 4°C (12 ч при 80 V, 12 ч при 140 V, 12 ч при 240 V). По окончании процесса гель помещали на 30 мин в раствор, содержащий флуорогенный субстрат (Suc-LLVY-AMC для оценки химотрипсинподобной активности или Ac-ANW-AMC для оценки активности $\beta 5i$ субъединицы). Гель анализировали под ультрафиолетом и фотографировали, после чего проводили анализ изображений с помощью программы ImageJ. Для подтверждения одинаковой белковой нагрузки между образцами гель окрашивали Coomassie G-250 (“Serva”, Германия).

Статистический анализ результатов. Для оценки значимости наблюдаемых изменений после проведения ПЦР использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с применением критерия Тьюки в качестве поправки на множественные сравнения. Статистический анализ результатов иммуноблотинга и измерения активности протеасом проводили, сравнивая каждую точку с данными в контрольной группе, с использованием критерия Манна–Уитни и приложения GraphPad Prism V8.4.3. (“GraphPad Software”, США). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для изучения изменений в пуле протеасом коры головного мозга, сопровождающих процессы старения мышей, использованы образцы от животных линии C57BL/6 четырех возрастных групп: 60, 190, 380, 720 сут. Используя разработанную нами ранее ПЦР-систему [10], мы оценили экспрессию генов *PSMB5–7*, кодирующих конститутивные каталитические субъединицы, и генов *PSMB8–10*, кодирующих иммунные каталитические субъединицы протеасом. Показано, что экспрессия всех исследованных генов в образцах 60, 190 и 380-дневных мышей достоверно не различалась (рис. 1) и соответствовала данным, полученным нами ранее [9]. Однако в образцах животных в возрасте 720 сут, по сравнению с животными 380-дневного возраста, обнаружены су-

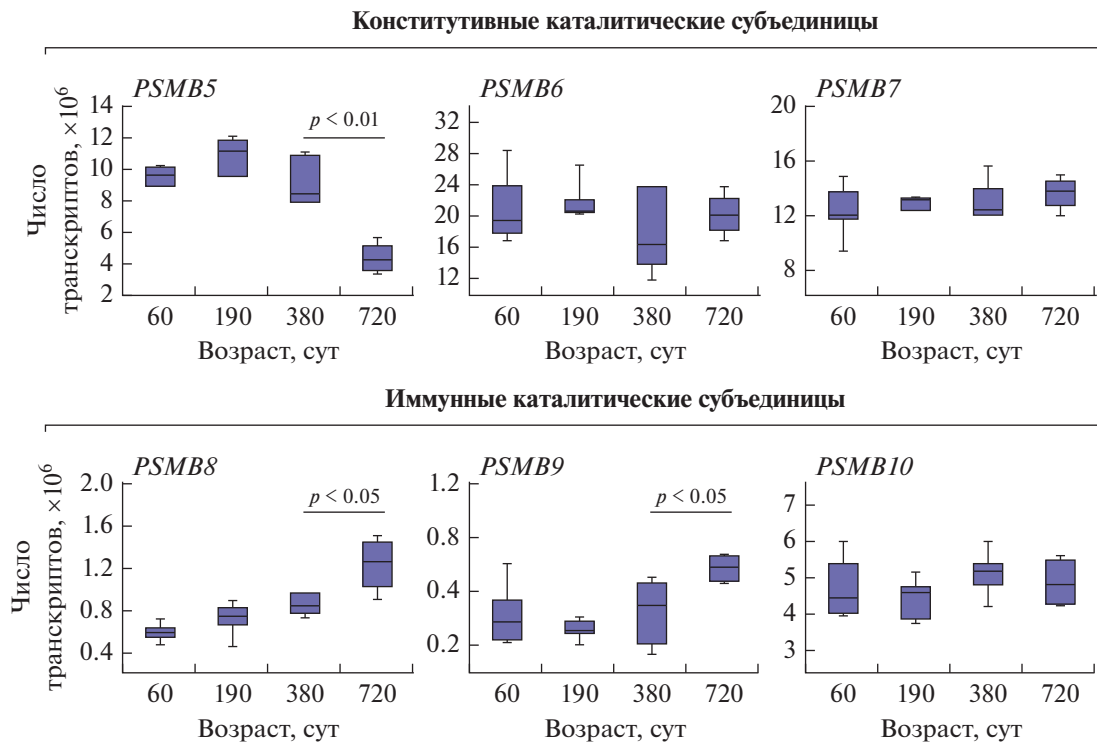


Рис. 1. Динамика уровней экспрессии генов субъединиц протеасом в образцах коры головного мозга мышей линии C57BL/6 разного возраста ($n = 6$ в группах животных в возрасте 60, 190 и 380 сут, $n = 4$ — в возрасте 720 сут). Указана медиана значений в выборке. Статистическая значимость различий оценена с помощью ANOVA (критерий Тьюки).

существенные изменения уровней транскриптов иммунных и конститутивных субъединиц протеасом. Так, выявлено почти двукратное увеличение экспрессии гена *PSMB8*, кодирующего иммунную субъединицу $\beta 5i$, и гена *PSMB9* (иммунная субъединица $\beta 1i$), а также снижение (до 2.5 раз) экспрессии гена *PSMB5*, кодирующего конститутивную субъединицу $\beta 5$ (рис. 1).

Полученные данные указывают на то, что при старении в клетках коры головного мозга мышей C57BL/6 происходят изменения в составе пула протеасом с перераспределением их форм в пользу увеличения неконститутивных. Для выяснения конкретных возрастных изменений в протеасомных паттернах мы исследовали методом иммуноблоттинга содержание конститутивных каталитических субъединиц $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ и иммунных каталитических субъединиц $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$ в осветленных гомогенатах образцов коры головного мозга мышей C57BL/6 разного возраста (рис. 2).

Как видно из результатов, представленных на рис. 2, на протяжении всего срока исследования содержание конститутивных субъединиц $\beta 1$ и $\beta 2$ было стабильным. В гомогенатах коры головного мозга мышей 380- и 720-дневного возраста выявлено существенное увеличение содержания иммунных субъединиц $\beta 1i$ и $\beta 2i$. Следует отметить, что используемые в исследовании антитела практически не «работали» на субъединице $\beta 5i$, как в

образцах тканей животных, так и в коммерческих препаратах иммунных протеасом (данные не приведены). Несмотря на полученные данные о снижении уровня экспрессии гена, кодирующего конститутивную субъединицу $\beta 5$ (рис. 1), в гомогенатах тканей старых мышей выявлено повышенное содержание этой субъединицы (рис. 2).

На основе данных об увеличении содержания иммунных субъединиц протеасом можно предположить увеличение общей химотрипсинподобной активности, снижение каспазаподобной, а также увеличение активности иммунных субъединиц в образцах тканей старых животных. Однако в ходе изучения изменений функциональной активности протеасом коры головного мозга мышей в возрасте 720 сут выявлено достоверное снижение химотрипсинподобной активности, а также тенденция к снижению каспазаподобной активности и активности субъединицы $\beta 5i$ (рис. 3).

Взаимодействие протеасом с активаторами изменяет молекулярную массу протеасом, что позволяет разделять различные формы протеасом по наличию активатора электрофорезом в условиях поддержания нативности протеолитических комплексов. При электрофоретическом анализе образцов тканей животных в неденатурирующих условиях выявлены как свободные 20S протеасомы, так и связанные с активаторами: 26S протеасомы с одним или двумя 19S активаторами и, ве-

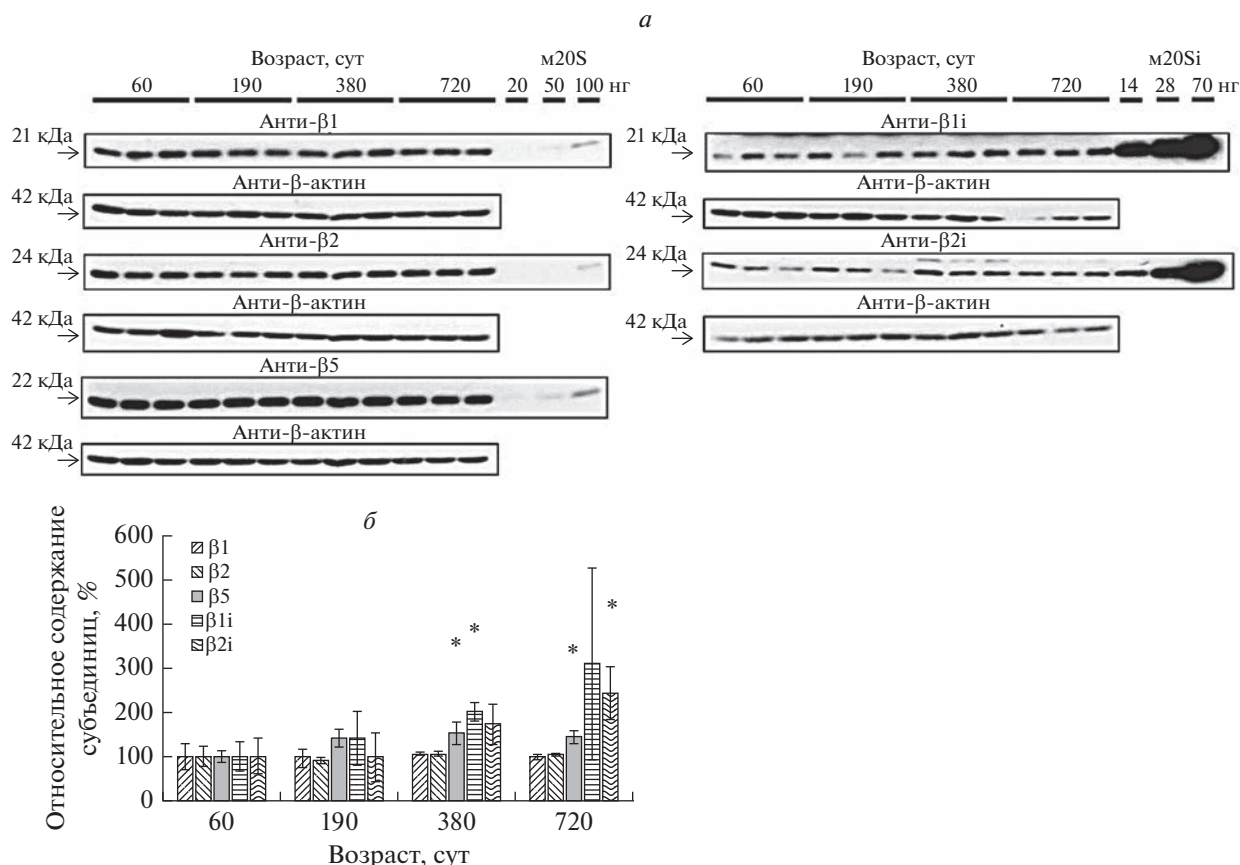


Рис. 2. Анализ содержания субъединиц $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$, $\beta 1i$, $\beta 2i$ протеасом в осветленных гомогенатах коры головного мозга мышей линии C57BL/6 разного возраста. *a* – Иммуноблоттинг гомогенатов с антителами против субъединиц $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$, $\beta 1i$, и $\beta 2i$. В каждом эксперименте использованы образцы коры головного мозга от трех мышей одного и того же возраста. В качестве стандартного образца использованы серийные разведения коммерческих мышинных конститутивных (m20S) и иммунных (m20Si) протеасом (“R&D Systems”, Великобритания). *б* – Анализ полученных результатов с помощью программы ImageJ. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистическая значимость различий оценена с использованием критерия Манна–Уитни; $*p < 0.05$.

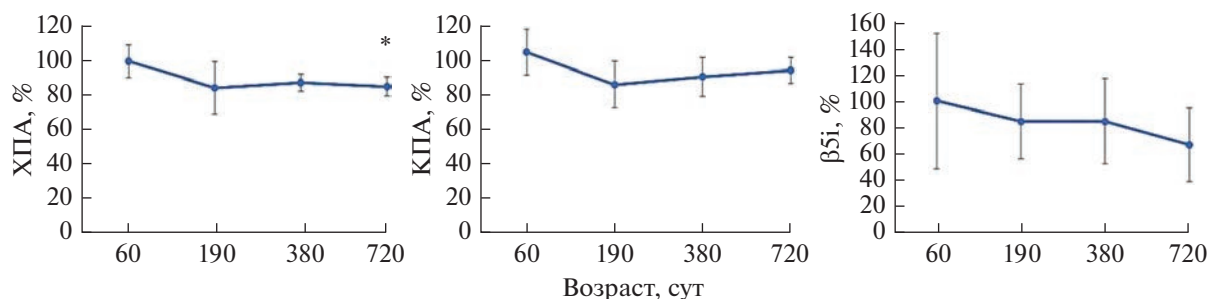


Рис. 3. Анализ химотрипсинподобной, каспазаподобной активности протеасом, а также активности субъединицы $\beta 5$ в образцах коры головного мозга мышей линии C57BL/6 разного возраста. Для определения химотрипсинподобной (ХПА) и каспазаподобной (КПА) активности протеасом, а также активности субъединицы $\beta 5i$ ($\beta 5i$) использованы флуорогенные субстраты Suc-LLVY-AMC, Z-LLE-AMC и Ac-ANW-AMC соответственно. За 100% принимали активность протеасом в группе молодых животных (60 сут). Результаты представлены как среднее $\pm$ SD. Статистическая значимость различий оценена с использованием критерия Манна–Уитни; $*p < 0.05$.

роятно, 20S протеасомы с одним или двумя 11S активаторами (рис. 4) [9, 11, 12]. С использованием флуорогенных субстратов определена их химотрипсинподобная активность, а также активность встроенных субъединиц $\beta 5i$ (рис. 4).

В результате проведенного анализа показано, что в коре головного мозга животных линии C57BL/6 с возрастом намечена тенденция к снижению химотрипсинподобной активности как в зоне локализации 26S, так и 20S протеасом. Стоит

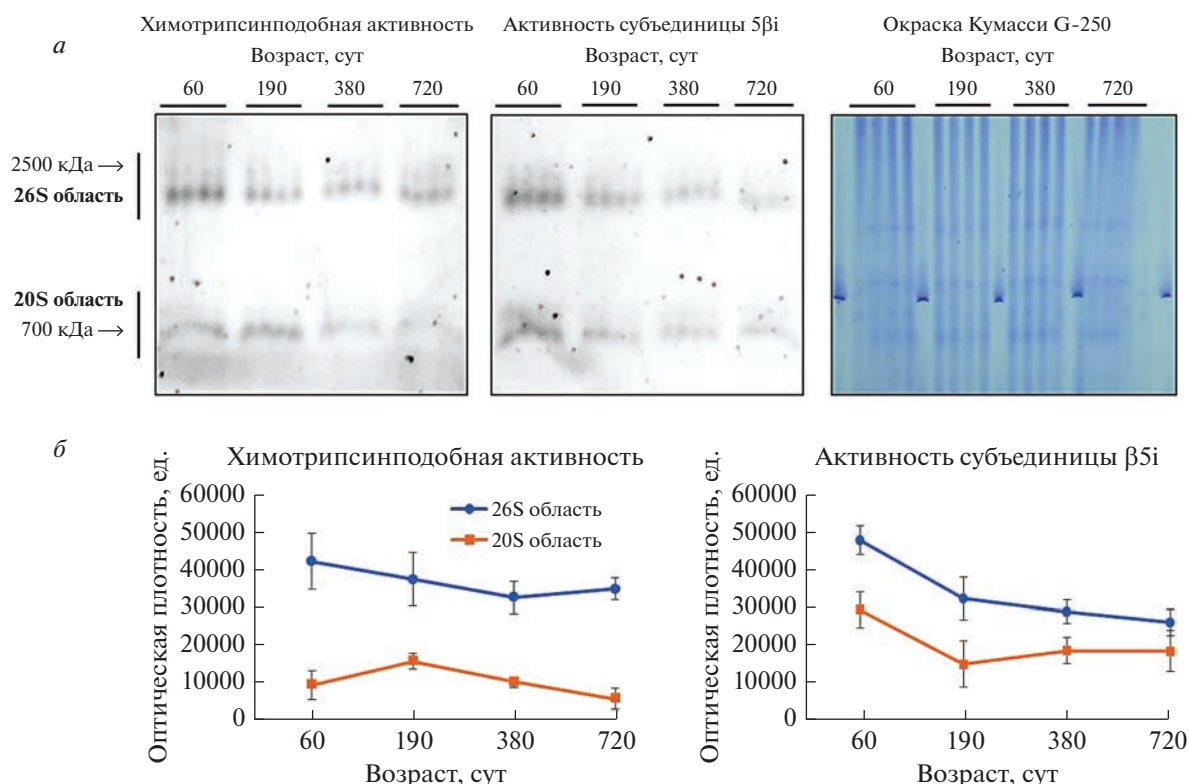


Рис. 4. Распределение химотрипсинподобной активности и активности субъединицы ̢5i между 20S и 26S протеасомами коры головного мозга мышей C57BL/6 разного возраста ($n = 4$ для каждой группы). *а* – Активность протеасом в областях геля, соответствующих подвижности 20S и 26S протеасом в нативном ПААГ (см. раздел “Экспериментальная часть”), определяли с использованием соответствующих флуорогенных субстратов. *б* – Химотрипсинподобную активность и активность субъединицы ̢5i оценивали по оптической плотности сигналов с изображений, представленных на виде *а*, с помощью программы ImageJ. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD.

отметить, что общая химотрипсинподобная активность протеасом в 26S-зоне была выше, чем в области 20S. Активность субъединицы ̢5i выявлена в обеих зонах локализации протеасом; при этом к 720 дню жизни, как в 26S-зоне, так и в 20S, замечено ее снижение, несмотря на активацию экспрессии гена, кодирующего субъединицу ̢5i.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Старение ассоциировано с накоплением окисленных и поврежденных белков в клетках и тканях, что в свою очередь может провоцировать развитие воспаления, стресса и, как следствие, различных заболеваний [13–15]. Вместе с тем накопление окисленных и поврежденных белков рассматривают как маркер нарушений в работе систем внутриклеточного протеолиза. Мы провели комплексное исследование пула протеасом коры головного мозга здоровых мышей линии C57BL/6 четырех возрастных групп: 60, 190, 380 и 720 сут – и проанализировали динамику изменений исследуемых параметров на протяжении практически всей жизни животных. Полученные данные о снижении экспрессии генов конститу-

тивных субъединиц и повышении экспрессии генов иммунных субъединиц протеасом согласуются с результатами, полученными на других моделях [4–8, 16]. В лизатах коры головного мозга животных в возрасте 720 сут выявлено увеличение (в среднем в 2–3 раза) содержания иммунных субъединиц ̢1i и ̢2i по сравнению с образцами от 60-дневных животных (рис. 2). Таким образом, в пуле внутриклеточных протеасом происходят изменения, которые ведут к перераспределению в пользу увеличения фракции протеасом с иммунными субъединицами.

Известно, что стресс и образование агрегатов белков в клетке приводит к изменению пула протеасом, в частности к повышению экспрессии неконститутивных комплексов, для которых характерна повышенная, по сравнению с конститутивными, эффективность деградации окисленных и поврежденных белков [14, 17–20]. Таким образом, индукция протеасом может отражать активацию компенсаторных механизмов, направленных на поддержание протеостаза. Кроме того, известно, что старение сопровождается развитием нейровоспаления [21], которое также может стимулировать сборку протеасом, содержащих им-

мунные субъединицы, хотя, по некоторым данным, эффективность индукции иммунопротеасом интерфероном- γ с возрастом снижается [22]. Нами показано, что, несмотря на увеличение содержания неконститутивных протеасом при старении, общая химотрипсинподобная активность, которую проявляют субъединицы $\beta 5$, $\beta 5i$ и $\beta 1i$, и активность субъединицы $\beta 5i$ в отдельности снижаются как в составе 26S, так и в составе 20S протеасом (рис. 4). Совокупность полученных данных позволяет предположить, что, с одной стороны, при старении происходит стимуляция синтеза неконститутивных протеасом, а с другой — их деактивация, вероятно, за счет посттрансляционных модификаций и/или взаимодействия с белковыми агрегатами, а также эндогенными ингибиторами, такими как PI31, — что наблюдается при различных возрастных заболеваниях [19, 23, 24]. Таким образом, несмотря на повышение экспрессии иммунных субъединиц, активность неконститутивных протеасом, как минимум при измерении с помощью флуорогенных субстратов, не увеличивается с возрастом.

В целом, можно предположить, что старение сопровождается активацией компенсаторных механизмов, в которых убиквитин-протеасомная система участвует в том числе путем повышения экспрессии неконститутивных протеасом. Однако снижение их активности не позволяет эффективно нейтрализовать накопление окисленных и поврежденных белков в клетках. В этой связи важно упомянуть, что при анализе образцов тканей долгожителей и долгоживущих животных, таких как голые землекопы и гигантские моллюски, выявлена повышенная активность протеасом [4, 25, 26]. Кроме того, у долгоживущих приматов обнаружен повышенный уровень экспрессии генов иммунных субъединиц протеасом и высокая протеасомная активность [27]. По-видимому, на основании этих данных можно говорить о прогностической значимости показателя активности протеасом, а также об использовании стратегий, направленных на модуляцию активности различных форм протеасом [28–31], для продления жизни и повышения ее качества.

Работа была поддержана грантом Российского научного фонда № 18-74-10095.

Эксперименты с животными проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 01.04.2016 № 199н.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ciechanover A., Kwon Y.T. (2015) Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp. Mol. Med.* **47**, e147.
2. Ferrington D.A., Gregerson D.S. (2012) Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **109**, 75–112.
3. Morozov A.V., Karpov V.L. (2018) Biological consequences of structural and functional proteasome diversity. *Heliyon*. **4**, e00894.
4. Chondrogianni N., Petropoulos I., Franceschi C., Friguet B., Gonos E.S. (2000) Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. *Exp. Gerontol.* **35**, 721–728.
5. Husom A.D., Peters E.A., Kolling E.A., Fugere N.A., Thompson L.V., Ferrington D.A. (2004) Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **421**, 67–76.
6. Ferrington D.A., Husom A.D., Thompson L.V. (2005) Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. *FASEB J.* **19**, 644–646.
7. Gavilán M.P., Castaño A., Torres M., Portavella M., Caballero C., Jiménez S., García-Martínez A., Parrado J., Vitorica J., Ruano D. (2009) Age-related increase in the immunoproteasome content in rat hippocampus: molecular and functional aspects. *J. Neurochemistry*. **108**, 260–272.
8. Giannini C., Klob A., Gohlke S., Mishto M., Nicholson T.P., Sheppard P.W., Kloetzel P.M., Dahlmann B. (2013) Poly-Ub-substrate-degradative activity of 26S proteasome is not impaired in the aging rat brain. *PLoS One*. **7**, e64042.
9. Морозов А.В., Буров А.В., Фуников С.Ю., Тетерина Е.В., Астахова Т.М., Ерохов П.А., Устюгов А.А., Карпов В.Л. (2023) Изменения активности и содержания отдельных форм протеасом в образцах коры головного мозга при развитии патологии у мышей линии 5×FAD. *Молекуляр. биология*. **57**(5), 873–885.
10. Фуников С.Ю., Спасская Д.С., Буров А.В., Тетерина Е.В., Устюгов А.А., Карпов В.Л., Морозов А.В. (2021) Отделы центральной нервной системы мыши отличаются по количеству транскриптов протеасомных генов. *Молекуляр. биология*. **55**(1), 54–63.
11. Erokhov P.A., Lyupina Y.V., Radchenko A.S., Kolacheva A.A., Nikishina Y.O., Sharova N.P. (2017) Detection of active proteasome structures in brain extracts: proteasome features of August rat brain with violations in monoamine metabolism. *Oncotarget*. **8**, 70941–70957.
12. Morozov A.V., Kulikova A.A., Astakhova T.M., Mitkevich V.A., Burnysheva K.M., Adzhubei A.A., Erokhov P.A., Evgen'ev M.B., Sharova N.P., Karpov V.L., Makarov A.A. (2016) Amyloid- β increases activity of proteasomes capped with 19S and 11S regulators. *J. Alzheimer's Dis.* **54**, 763–776.
13. Chondrogianni N., Stratford F.L., Trougakos I.P., Friguet B., Rivett A.J., Gonos E.S. (2003) Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 28026–28037.
14. López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. (2013) The hallmarks of aging. *Cell*. **153**, 1194–1217.

15. Saez I., Vilchez D. (2014) The mechanistic links between proteasome activity, aging and age-related diseases. *Curr. Genomics*. **15**, 38–51.
16. Ly D.H., Lockhart D.J., Lerner R.A., Schultz P.G. (2000) Mitotic misregulation and human aging. *Science*. **287**, 2486–2492.
17. Pickering A.M., Koop A.L., Teoh C.Y., Ermak G., Grune T., Davies K.J. (2010) The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28 $\alpha\beta$ proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem. J.* **432**, 585–595.
18. Pickering A.M., Davies K.J.A. (2012) Degradation of damaged proteins: the main function of the 20S proteasome. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **109**, 227–248.
19. Grune T., Jung T., Merker K., Davies K.J. (2004) Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and 'aggregates' during oxidative stress, aging, and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2519–2530.
20. Abi Habib J., De Plaen E., Stroobant V., Zivkovic D., Bousquet M.P., Guillaume B., Wahni K., Messens J., Busse A., Vigneron N., Van den Eynde B.J. (2020) Efficiency of the four proteasome subtypes to degrade ubiquitinated or oxidized proteins. *Sci. Rep.* **10**, 15765.
21. Sparkman N.L., Johnson R.W. (2008) Neuroinflammation associated with aging sensitizes the brain to the effects of infection or stress. *Neuroimmunomodulation*. **15**, 323–330.
22. Stratford F.L., Chondrogianni N., Trougakos I.P., Gonos E.S., Rivett A.J. (2006) Proteasome response to interferon- γ is altered in senescent human fibroblasts. *FEBS Lett.* **580**, 3989–3994.
23. Powell S.R., Wang P., Divald A., Teichberg S., Haridas V., McCloskey T.W., Davies K.J., Katzeff H. (2005) Aggregates of oxidized proteins (lipofuscin) induce apoptosis through proteasome inhibition and dysregulation of proapoptotic proteins. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 1093–1101.
24. Johnston-Carey H.K., Pomatto L.C.D., Davies K.J.A. (2015) The immunoproteasome in oxidative stress, aging, and disease. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **51**, 268–281.
25. Pérez V.I., Buffenstein R., Masamsetti V., Leonard S., Salmon A.B., Mele J., Andziak B., Yang T., Edrey Y., Friguet B., Ward W., Richardson A., Chaudhuri A. (2009) Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 3059–3064.
26. Ungvari Z., Csiszar A., Sosnowska D., Philipp E.E., Campbell C.M., McQuary P.R., Chow T.T., Coelmo M., Didier E.S., Gelino S., Holmbeck M.A., Kim I., Levy E., Sonntag W.E., Whitby P.W., Austad S.N., Ridgway I. (2013) Testing predictions of the oxidative stress hypothesis of aging using a novel invertebrate model of longevity: the giant clam (*Tridacna derasa*). *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **68**, 359–367.
27. Pickering A.M., Lehr M., Miller R.A. (2015) Lifespan of mice and primates correlates with immunoproteasome expression. *J. Clin. Invest.* **125**, 2059–2068.
28. Chondrogianni N., Voutetakis K., Kapetanou M., Delitsikou V., Papaevgeniou N., Sakellari M., Lefaki M., Filippopoulou K., Gonos E.S. (2015) Proteasome activation: an innovative promising approach for delaying aging and retarding age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* **23**, 37–55.
29. Chondrogianni N., Voutetakis K., Kapetanou M., Delitsikou V., Papaevgeniou N., Sakellari M., Lefaki M., Filippopoulou K., Gonos E.S. (2005) Overexpression of proteasome $\beta 5$ assembled subunit increases the amount of proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates. *J. Biol. Chem.* **280**, 11840–11850.
30. Tonoki A., Kuranaga E., Tomioka T., Hamazaki J., Murata S., Tanaka K., Miura M. (2009) Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process. *Mol. Cell Biol.* **29**, 1095–1106.
31. Vilchez D., Morante I., Liu Z., Douglas P.M., Merkwirth C., Rodrigues A.P., Manning G., Dillin A. (2012) RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions. *Nature*. **489**, 263–268.

Dynamic Changes in the Activity and Content of Particular Proteasome Forms in Cerebral Cortex of C57BL/6 Mice during Aging

A. V. Burov¹, S. Yu. Funikov¹, T. M. Astakhova², E. V. Teterina³, V. O. Nebogatikov³, P. A. Erokhov²,
A. A. Ustyugov³, V. L. Karpov¹, and A. V. Morozov^{1, *}

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

²Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

³Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia

*e-mail: Runkel@inbox.ru

Proteasomes are key components of the ubiquitin-proteasome system. Various forms of proteasomes are known. During aging, disturbances in the functioning of proteasomes were revealed, as well as an increased expression of their individual forms. Considering these data, we studied the expression of genes encoding the constitutive and immune subunits of proteasomes in the cerebral cortex samples from C57BL/6 mice at the age of 60, 190, 380, and 720 days. In addition, the content of constitutive and immune proteasome subunits, chymotrypsin-like and caspase-like activities of proteasome pools, as well as the activity of the $\beta 5i$ immune subunit were studied in tissue homogenates. The chymotrypsin-like activity and the activity of the $\beta 5i$ subunit

of different forms of proteasomes separated by electrophoresis under native conditions were characterized. Compared with samples from young animals, in the cerebral cortex of animals aged 720 days the following changes in the expression patterns of proteasome genes were revealed: a decrease in the expression of *PSMB5* gene encoding the constitutive proteasome subunit $\beta 5$; activation of genes encoding immune subunits $\beta 5i$ and $\beta 1i$. In clarified tissue homogenates of aged mice, an increase in the content of immune subunits $\beta 1i$ and $\beta 2i$ was shown. In samples from old animals, decreased chymotrypsin-like activity and a tendency to a decrease in caspase-like activity of proteasomes as well as the $\beta 5i$ subunit activity were also revealed. Analysis of the activity of native complexes in the tissues of old animals revealed decreased chymotrypsin-like activity of both 26S and 20S proteasomes containing the $\beta 5i$ subunit. Based on the data obtained, it can be assumed that changes in the pool of non-constitutive proteasomes reflect aging-associated adaptive processes in mouse brain.

Keywords: aging, non-constitutive proteasomes, gene expression, brain, mice

ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ МОДЕЛИ ПЬЕЗОБЕЛКОВ И СЕТЕЙ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ У ТРИХОПЛАКСА (ПЛАСТИНЧАТЫЕ)

© 2023 г. А. В. Кузнецов^{a, b, c}, И. Ю. Гришин^c, Д. Н. Втюрина^{d, *}

^aФедеральный исследовательский центр Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского
Российской академии наук, Севастополь, 299011 Россия

^bСевастопольский государственный университет, Севастополь, 299053 Россия

^cФилиал Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова, Севастополь, 299001 Россия

^dФедеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук,
Москва, 119991 Россия

*e-mail: vtyurinad@gmail.com

Поступила в редакцию 22.12.2022 г.

После доработки 05.03.2023 г.

Принята к публикации 06.03.2023 г.

Морской свободноживущий организм трихоплекс (тип Пластинчатые) напоминает по форме и типу движения одноклеточную амёбу. Трихоплекс отделился от основного древа эволюции в неоптерозойскую эру и считается одной из простейших моделей многоклеточного животного, а также наглядным примером взаимодействия ансамбля клеток в едином организме при его развитии и движении. В результате поиска схожих последовательностей в базах данных NCBI у двух гаплотипов трихоплексов, H1 и H2, обнаружено по одному ортологу белка Piezo1 мыши (6B3R). На основе структурного выравнивания по шаблону 6KG7 (Piezo2 мыши) созданы пространственные модели соответствующих белков: XP_002112008.1 и RDD46920.1. Проведен анализ доменных структур и построен ограниченный граф белок-белковых взаимодействий гипотетического механосенсора XP_002112008.1. Показана возможность проведения сигнала от механорецептора к мембранным комплексам, в цитоплазму и ядро клетки. Предполагается участие механосенсорных рецепторов трихоплекса в восприятии силовых воздействий соседних клеток и окружающей среды. На основании полученных данных предлагается использовать примитивный организм трихоплекс как простейшую многоклеточную модель механических и морфогенетических движений.

Ключевые слова: пьезобелки, механотрансдукция, белок-белковые взаимодействия, Placozoa

DOI: 10.31857/S0026898423050075, **EDN:** PNKHJR

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Niethammer P. (2021) Components and mechanisms of nuclear mechanotransduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **37**, 233–256.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120319-030049>
2. Fajardo-Cavazos P., Nicholson W.L. (2021) Mechanotransduction in prokaryotes: a possible mechanism of spaceflight adaptation. *Life (Basel)*. **11**(1), 33.
<https://doi.org/10.3390/life11010033>
3. Jin P., Jan L.Y., Jan Y.N. (2020) Mechanosensitive ion channels: structural features relevant to mechanotransduction mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.* **43**, 207–229.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050509>
4. Marshall K.L., Lumpkin E.A. (2012) The molecular basis of mechanosensory transduction. *Adv. Exp. Med. Biol.* **739**, 142–155.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1704-0_9
5. Clapham D.E. (2007) Calcium signaling. *Cell*. **131**(6), 1047–1058.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
6. Perozo E. (2006) Gating prokaryotic mechanosensitive channels. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**(2), 109–119.
<https://doi.org/10.1038/nrm1833>
7. Arnadóttir J., Chalfie M. (2010) Eukaryotic mechanosensitive channels. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 111–137.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125836>
8. Earley S., Santana L.F., Lederer W.J. (2021) The physiological sensor channels TRP and piezo: nobel prize in physiology or medicine. *Physiol. Rev.* **102**(2), 1153–1158.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2021>
9. Du G., Chen W., Li L., Zhang Q. (2022) The potential role of mechanosensitive ion channels in substrate stiffness-regulated Ca²⁺ response in chondrocytes. *Connect. Tissue Res.* **63**(5), 453–462.
<https://doi.org/10.1080/03008207.2021.2007902>

10. 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>
11. Fang X.Z., Zhou T., Xu J.Q., Wang Y.X., Sun M.M., He Y.J., Pan S.W., Xiong W., Peng Z.K., Gao X.H., Shang Y. (2021) Structure, kinetic properties and biological function of mechanosensitive Piezo channels. *Cell Biosci.* **11**(1), 13.
<https://doi.org/10.1186/s13578-020-00522-z>
12. Barzegari A., Omid Y., Ostadrahimi A., Gueguen V., Meddahi-Pellé A., Nouri M., Pavon-Djavid G. (2020) The role of Piezo proteins and cellular mechanosensing in tuning the fate of transplanted stem cells. *Cell Tissue Res.* **381**(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1007/s00441-020-03191-z>
13. Ge J., Li W., Zhao Q., Li N., Chen M., Zhi P., Li R., Gao N., Xiao B., Yang M. (2015) Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel. *Nature*. **527**(7576), 64–69.
<https://doi.org/10.1038/nature15247>
14. Coste B., Xiao B., Santos J.S., Syeda R., Grandl J., Spencer K.S., Kim S.E., Schmidt M., Mathur J., Dubin A.E., Montal M., Patapoutian A. (2012) Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature*. **483**(7388), 176–181.
<https://doi.org/10.1038/nature10812>
15. Coste B., Murthy S.E., Mathur J., Schmidt M., Mechoulam Y., Delmas P., Patapoutian A. (2015) Piezo1 ion channel pore properties are dictated by C-terminal region. *Nat. Commun.* **6**, 7223.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8223>
16. Syeda R., Florendo M.N., Cox C.D., Kefauver J.M., Santos J.S., Martinac B., Patapoutian A. (2016) Piezo1 channels are inherently mechanosensitive. *Cell Rep.* **17**(7), 1739–1746.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.033>
17. Syed T., Schierwater B. (2002) The evolution of the Placozoa: a new morphological model. *Palaeobiodiversity and Palaeoenvironments*. **82**(1), 315–324.
<https://doi.org/10.1007/BF03043791>
18. Srivastava M., Begovic E., Chapman J., Putnam N.H., Hellsten U., Kawashima T., Kuo A., Mitros T., Salamov A., Carpenter M.L., Signorovitch A.Y., Moreno M.A., Kamm K., Grimwood J., Schmutz J., Shapiro H., Grigoriev I.V., Buss L.W., Schierwater B., Dellaporta S.L., Rokhsar D.S. (2008) The Trichoplax genome and the nature of placozoans. *Nature*. **454**(7207), 955–960.
<https://doi.org/10.1038/nature07191>
19. Kamm K., Osigus H.J., Stadler P.F., DeSalle R., Schierwater B. (2018) Trichoplax genomes reveal profound admixture and suggest stable wild populations without bisexual reproduction. *Sci. Rep.* **8**(1), 11168.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-29400-y>
20. Smith C.L., Varoqueaux F., Kittelmann M., Azzam R.N., Cooper B., Winters C.A., Eitel M., Fasshauer D., Reese T.S. (2014) Novel cell types, neurosecretory cells, and body plan of the early-diverging metazoan *Trichoplax adhaerens*. *Curr. Biol.* **24**(14), 1565–1572.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.046>
21. Wenderoth H. (1990) Cytoplasmic vibrations due to flagellar beating in *Trichoplax adhaerens* F. E. Schulze (Placozoa). *Z. Naturforsch.* **45**, 715–722.
<https://doi.org/10.1515/znc-1990-0624>
22. Armon S., Bull M.S., Aranda-Diaz A., Prakash M. (2018) Ultrafast epithelial contractions provide insights into contraction speed limits and tissue integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **115**(44), E10333–E10341.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1802934115>
23. Kuznetsov A.V., Halaimova A.V., Ufimtseva M.A., Chelebieva E.S. (2020) Blocking a chemical communication between Trichoplax organisms leads to their disorderly movement. *Int. J. Parallel Emergent Distributed Systems*. **35**(4), 473–482.
<https://doi.org/10.1080/17445760.2020.1753188>
24. Kuznetsov A.V., Vainer V.I., Volkova Y.M., Kartashov L.E. (2021) Motility disorders and disintegration into separate cells of *Trichoplax* sp. H2 in the presence of Zn^{2+} ions and L-cysteine molecules: a systems approach. *Biosystems*. **206**, 104444.
<https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2021.104444>
25. Ueda T., Koya S., Maruyama Y.K. (1999) Dynamic patterns in the locomotion and feeding behaviors by the placozoan *Trichoplax adhaerens*. *Biosystems*. **54**(1–2), 65–70.
[https://doi.org/10.1016/s0303-2647\(99\)00066-0](https://doi.org/10.1016/s0303-2647(99)00066-0)
26. Smith C.L., Reese T.S., Govezensky T., Barrio R.A. (2019) Coherent directed movement toward food modeled in *Trichoplax*, a ciliated animal lacking a nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **116**(18), 8901–8908.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1815655116>
27. Velankar S., Burley S.K., Kurisu G., Hoch J.C., Markley J.L. (2021) The protein data bank archive. *Methods Mol. Biol.* **2305**, 3–21.
https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1406-8_1
28. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**(3), 403–410.
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
29. 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>
30. Sayle R.A., Milner-White E.J. (1995) RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem. Sci.* **20**(9), 374.
[https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)89080-5](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)89080-5)
31. Mistry J., Chuguransky S., Williams L., Qureshi M., Salazar G.A., Sonnhammer E.L.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. *Nucleic Acids Res.* **49**(D1), D412–D419.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913>
32. 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. *Nucleic Acids Res.* **49**(D1), D605–D612.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1074>

33. Guo Y.R., MacKinnon R. (2017) Structure-based membrane dome mechanism for Piezo mechanosensitivity. *Elife*. **6**, e33660. <https://doi.org/10.7554/eLife.33660>
34. Wang L., Zhou H., Zhang M., Liu W., Deng T., Zhao Q., Li Y., Lei J., Li X., Xiao B. (2019) Structure and mechanogating of the mammalian tactile channel PIEZO2. *Nature*. **573**(7773), 225–229. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1505-8>
35. Grigorov M.G. (2005) Global properties of biological networks. *Drug Discov. Today*. **10**(5), 365–372. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03369-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03369-6)
36. Ranade S.S., Syeda R., Patapoutian A. (2015) Mechanically activated ion channels. *Neuron*. **87**(6), 1162–1179. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.032>
37. Фадеева М.В., Курченко В.М., Кузнецов А.В. (2022) Описание семейства катионных TRPA1-каналов *Trichoplax adhaerens*. Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2022: материалы XVII Междунар. науч. конф. г. Севастополь, РФ, 2022. с. 201–202.
38. Фадеева М.В., Сергеева Е.В., Рыбакова К.А., Кузнецов А.В. (2022) Характеристика семейства катионных TRPA1-каналов *Trichoplax* sp. H2 (Placozoa). *Актуальные вопр. биол. физики и химии*. **7**(3), 493–450. <https://doi.org/10.29039/rusjbp.2022.0550>
39. Scheres B., van der Putten W.H. (2017) The plant percepton connects environment to development. *Nature*. **543**(7645), 337–345. <https://doi.org/10.1038/nature22010>
40. Timsit Y., Grégoire S.P. (2021) Towards the idea of molecular brains. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(21), 11868. <https://doi.org/10.3390/ijms222111868>
41. Cox C.D., Bavi N., Martinac B. (2019) Biophysical principles of ion-channel-mediated mechanosensory transduction. *Cell Rep.* **29**(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.075>
42. Lewis A.H., Grandl J. (2021) Piezo1 ion channels inherently function as independent mechanotransducers. *Elife*. **10**, e70988. <https://doi.org/10.7554/eLife.70988>
43. Yang X., Lin C., Chen X., Li S., Li X., Xiao B. (2022) Structure deformation and curvature sensing of PIEZO1 in lipid membranes. *Nature*. **604**(7905), 377–383. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04574-8>
44. Young M., Lewis A.H., Grandl J. (2022) Physics of mechanotransduction by Piezo ion channels. *J. Gen. Physiol.* **154**(7), e202113044. <https://doi.org/10.1085/jgp.202113044>

Spatial Models of Piezoproteins and Networks of Protein-Protein Interactions in *Trichoplax* Animals (Placozoa)

A. V. Kuznetsov^{1, 2, 3}, I. Yu. Grishin³, and D. N. Vtyurina^{4, *}

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

²Sevastopol State University, Sevastopol, 299053 Russia

³Branch of the Lomonosov Moscow State University, Sevastopol, 299001 Russia

⁴Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: vtyurinad@gmail.com

The marine free-living organism *Trichoplax* (phylum Placozoa) resembles the unicellular amoeba in shape and type of movement. *Trichoplax* diverged from the main evolutionary tree in the Neoproterozoic Era and is one of the simplest models of a multicellular animal, as well as a strong example of the ensemble of interacting cells in an organism during its development and movement. Two orthologs of mouse Piezo1 protein (6B3R) were found in two *Trichoplax* haplotypes H1 and H2 as a result of a search for similar sequences in the NCBI databases. Spatial models of the corresponding proteins, XP_002112008.1 and RDD46920.1, were created based on the structural alignment using a 6KG7 (mouse Piezo2) template. The analysis of domain structures was performed, and a limited graph of protein–protein interactions of the hypothetical mechanosensor XP_002112008.1 was constructed. The possibility of signal transduction from the mechanoreceptor to membrane complexes, cytoplasm and cell nucleus was shown. It is assumed that mechanosensory receptors of *Trichoplax* are involved in the perception of force stimuli between neighboring cells and the environment. Based on the obtained data, we propose to use the primitive *Trichoplax* organism as the simplest multicellular model for mechanical and morphogenetic movements.

Keywords: piezoproteins, mechanotransduction, protein-protein interactions, Placozoa

МЕТОД ЛАТЕКСНОЙ АГГЛЮТИНАЦИИ КАК АЛЬТЕРНАТИВА РЕАКЦИИ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ ВИРУСОВ ГРИППА

© 2023 г. П. А. Иванов^{a, b, *}, А. В. Ляшко^a, С. А. Ионов^{a, c}, Д. В. Щербинин^a, И. А. Руднева^a, А. А. Шилов^a, Н. И. Бунькова^a, М. М. Шмаров^{a, d}, Т. А. Тимофеева^a

^aФедеральный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

^bИнститут микробиологии им. С.Н. Виноградского Российской академии наук, Москва, 125047 Россия

^cРоссийский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, 117312 Россия

^dПервый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 101000 Россия

*e-mail: ivanovpa@mail.ru

Поступила в редакцию 05.12.2022 г.

После доработки 16.01.2023 г.

Принята к публикации 12.02.2023 г.

Для выявления и титрования вирусов гриппа А и В в качестве альтернативы классическому методу гемагглютинации эритроцитов разработана методика реакции агглютинации латекса, основанная на взаимодействии вирусов гриппа с сиалогликопротеином фетуином, иммобилизованным на поверхности полистирольных микросфер. Исследовано 12 штаммов вирусов гриппа А, относящихся к различным подтипам, и два вируса гриппа В разных линий. При одновременном титровании вирусов с помощью классической реакции гемагглютинации и предлагаемой реакции латексной агглютинации показана сходная чувствительность и высокая степень корреляции ($R = 0.94$) между двумя этими методами. Полученные микросферы могут быть использованы для титрования и других вирусов, рецепторами которых служат сialiрированные гликаны. Так, агрегацию латекса индуцировал вирус болезни Ньюкасла.

Ключевые слова: вирусы гриппа, микросферы, фетуин, реакция латексной агглютинации, гемагглютинин, рецепторсвязывающая специфичность

DOI: 10.31857/S0026898423040092, EDN: QLOTLJ

Для ряда вирусов, таких как арбовирусы, вирусы гриппа и парагриппа, полиомиелита и краснухи, было показано связывание с эритроцитами крови [1]. Впервые это явление описал американский вирусолог George Hirst для вируса гриппа А, обнаружив, что вируссодержащая аллантоисная жидкость вызывала агглютинацию эритроцитов крови, вытекающей из поврежденных сосудов куриного эмбриона [2]. Позднее этим же автором были предложены методики проведения реакции гемагглютинации (РГА) и реакции торможения гемагглютинации (РТГА) [3]. В силу воспроизводимости и дешевизны эти реакции до сих пор остаются “золотым стандартом” для определения титра вируса и нейтрализующих антител вирусов

гриппа. К недостатку обеих реакций относится необходимость использования свежих эритроцитов, то есть требуется постоянное наличие доноров крови (птиц, морских свинок, человека и др.). Также использование РГА невозможно в условиях, вызывающих лизис эритроцитов (физико-химические факторы, такие как повышенная температура и отличающийся от физиологического pH среды).

Возможной альтернативой РГА может быть реакция латексной агглютинации (РЛА), в которой используют суспензию полимерных микросфер (латекс). Этот метод широко применяется для качественного и полуколичественного выявления различных патогенов [4–7]. Все существующие системы выявления инфекционных агентов в РЛА основаны на взаимодействии антиген–антитело: на поверхности полимерных микросфер иммобилизуют антитела и их взаимодействие с антигеном вызывает агрегацию микросфер. В частности, в описанной Chen с соавт. [8] системе

Сокращения: AdV5 (adenovirus serotype V) – аденовирус V серотипа; NDV (Newcastle disease virus) – вирус болезни Ньюкасла; Neu5Ac (N-acetylneuraminic acid) – N-ацетилнейраминная кислота; ГАЕ – гемагглютинирующая единица; ЛАЕ – латекс-агглютинирующая единица; РГА – реакция гемагглютинации; РЛА – реакция латексной агглютинации; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

РЛА для качественного выявления вирусов гриппа А, содержащих гемагглютинин подтипа 5 (H5), использованы антитела к этому белку, иммобилизованные на микросферах. Универсальной системы РЛА для выявления вирусов гриппа, различающихся подтипом гемагглютинина, до сих пор не было.

Известно, что рецептором вируса гриппа служат остатки сиаловой кислоты, терминирующей полисахаридные цепи гликозилированных белков клеточной мембраны [9]. Мы предположили, что полимерные микросферы, на поверхности которых иммобилизован один из таких сиалогликопротеинов, можно использовать в РЛА для выявления любых вирусов гриппа разных подтипов. В качестве такого сиалогликопротеина мы выбрали фетуин, взаимодействие с которым давно показано как для вирусов гриппа А различных подтипов, так и для вирусов гриппа В [10–12]. Ранее были попытки использовать фетуин, ковалентно присоединенный к микросферам, для выявления нейраминидазной активности вирусов гриппа [13], хотя распространения этот метод не получил.

В представленной работе приведена методика иммобилизации фетуина на поверхности полистирольных микросфер и продемонстрирована возможность их использования в РЛА для оценки гемагглютинирующей активности вирусов гриппа разных подтипов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вирусы. Вирусы гриппа A/gull/Moscow/3100/2006 (H6N2) и A/chicken/NJ/294598-12/2004 (H7N2) были любезно предоставлены доктором А.С. Гамбарян (Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва). Штамм A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) был любезно предоставлен доктором Л.Г. Руденко (ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”, Санкт-Петербург). Вирус гриппа A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3) был ранее получен в лаборатории физиологии вирусов ФГБУ “ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России [14]. Остальные вирусы получены из Государственной коллекции вирусов ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России.

Вирусы гриппа A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) (вариант Mount Sinai), A/mallard/Pennsylvania/10218/84-MA (H5N2), A/Aichi/2/1968 (H3N2), A/chicken/NJ/294598-12/2004 (H7N2), A/swine/Hong Kong/9A-1/1998 (H9N2), A/Moscow/01/09 (H1N1)pdm09, A/gull/Moscow/3100/2006 (H6N2), A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3), A/duck/Moscow/4970-MA/2013 (H1N1), A/Leningrad/134/17/57 (H2N2), A/Darwin/9/2021 (H3N2) и вирус болезни Ньюкасла (NDV) штамм NDV-H культивировали в 10-дневных куриных эмбрионах, которые

заражали в аллантоисную полость с множественностью 1000 ЭИД₅₀ на эмбрион. После инкубации в течение 48 ч при 37°C (для вируса A/Leningrad/134/17/57 при 33°C) зараженные эмбрионы охлаждали в течение 12 ч при 4°C и отбирали вирусосодержащую аллантоисную жидкость.

Дополнительно вирус гриппа A/Moscow/01/09 (H1N1)pdm09 культивировали на клетках линии MDCK, которые заражали с множественностью 100 культуральных инфекционных доз (TCID₅₀) на 10⁶ клеток. Зараженные клетки инкубировали в среде MEM без сыворотки с добавлением 1 мг/мл ТРСК-трипсина при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Размножение вируса контролировали визуально по развитию цитопатического действия. Среду, содержащую вирус, отбирали через 48 ч.

Вирусы гриппа B/Phuket/3073/2013 (Ямагатская эволюционная линия) и B/Washington/02/2019 (Викторианская эволюционная линия) аналогично культивировали в 10-дневных куриных эмбрионах. После инкубации в течение 72 ч при 34°C зараженные эмбрионы охлаждали в течение 12 ч при 4°C и отбирали вирусосодержащую аллантоисную жидкость.

Аденовирус человека серотипа 5 (AdV5) накапливали в культуре клеток линии 293Т. К монослою клеток с конфлюэнтностью 50–70% добавляли лизат клеток линии 293Т, зараженных аденовирусом. Развитие инфекции контролировали по наступлению цитопатического действия. Инфицированные клетки концентрировали низкоскоростным центрифугированием, суспендировали в буфере, содержащем 0.01 М Трис-HCl, pH 8.0, 0.01 М NaCl, 5 мМ EDTA, и разрушали с помощью трехкратного замораживания–оттаивания. Полученную суспензию центрифугировали при 2 000 об/мин в течение 10 мин при 4°C, осадок удаляли. Вирионы, находящиеся в надосадочной жидкости, очищали ультрацентрифугированием в градиенте плотности хлорида цезия.

Препараты вирусов хранили при температуре –80°C.

Реакция гемагглютинации. В лунках круглодонного планшета делали двукратные разведения вирусосодержащей аллантоисной или культуральной жидкости в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и добавляли равный объем 0.75%-ных куриных эритроцитов. Планшеты помещали в холодильник при 4°C на 20–30 мин. Титр вируса выражали в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ), соответствующих обратной величине последнего разведения, при котором наблюдали агглютинацию эритроцитов [15].

Иммобилизация фетуина на поверхности латексных микросфер. Ниже представлен протокол получения иммобилизованных фетуином микросфер.

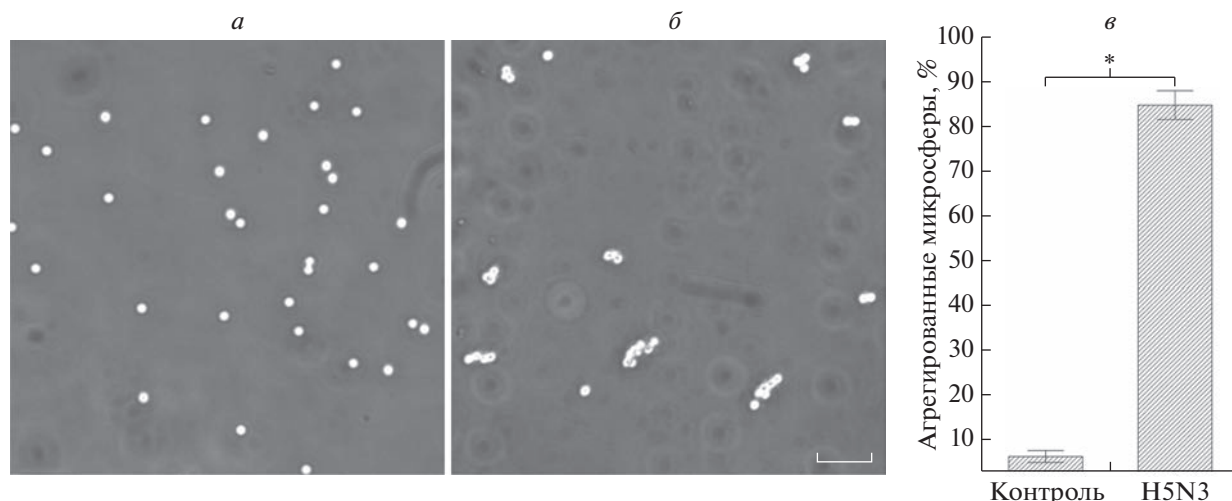


Рис. 1. Агглютинация микросфер вирусом гриппа A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3). Покрытые фетуином микросферы после инкубации с незараженной аллантаической жидкостью (а) и с вирусом гриппа (б). Масштабная линейка — 10 мкм. в — Доля агрегированных микросфер после инкубации с незараженной аллантаической жидкостью (контроль) и с вирусом гриппа (H5N3). * $p < 0.001$.

1. Полистирольные микросферы (“Панэко”, Россия) дважды промывали ФСБ (рН 7.2–7.6) с последующим центрифугированием при 10000 g в течение 1 мин.

2. Готовили 1%-ный раствор фетуина на ФСБ.

3. Ресуспендировали осадок микросфер в растворе фетуина из расчета 1 мл раствора белка на 1×10^9 полистирольных микросфер и инкубировали при комнатной температуре при постоянном перемешивании 1 ч.

4. Полученную суспензию центрифугировали при 10000 g в течение 1 мин, не менее двух раз, промывали и ресуспендировали в ФСБ в концентрации 1×10^8 частиц/мл.

5. Для предотвращения бактериальной контаминации в суспензию микросфер добавляли тиомерсал до концентрации 0.005%. Суспензию хранили при 4°C.

Обработка нейраминидазой. Суспензию, содержащую 1.0×10^7 покрытых фетуином микросфер, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в буфере MES (2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты), рН 4.2. Нейраминидазу (0.2 U) из *Clostridium perfringens* (“Sigma”, США), растворенную в том же буфере, добавляли к суспензии микросфер и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Микросферы осаждали центрифугированием и ресуспендировали в ФСБ. В качестве контроля использовали покрытые фетуином микросферы, которые инкубировали в буфере MES, рН 4.2, в тех же условиях.

Реакция латексной агглютинации (РЛА). Ниже приведен оптимизированный протокол РЛА.

1. Смешивали 10 мкл суспензии иммобилизованных фетуином полистирольных микросфер с 10 мкл вирусосодержащего образца и инкубировали при 4°C в течение 1 ч.

2. Добавляли равный объем 6%-ного раствора параформальдегида, приготовленного на ФСБ, и инкубировали 10 мин при комнатной температуре.

3. Результат оценивали методом фазово-контрастной микроскопии.

Для регистрации результатов анализа использован световой микроскоп Eclipse TS100 (“Nikon”, Япония), оснащенный камерой CMOS USB (“ZZCAT” или “IS300”, Китай) для захвата изображения с соответствующим программным обеспечением. Для каждой экспериментальной точки делали от 3 до 5 микрофотографий.

Анализ и обработка изображений. Анализ и редактирование изображений выполнен в программе ImageJ (США). На микрофотографиях подсчитывали число индивидуально расположенных микросфер, а также агрегатов, содержащих две или более микросферы. Относительное число агрегированных микросфер определяли по формуле: $100 \times (\text{число агрегированных микросфер} / \text{общее число микросфер})$.

Статистический анализ. Данные представлены как среднее $\pm$ среднеквадратичное отклонение. Для проверки достоверности отличий между выборками использовали критерий Стьюдента, для проверки корреляции — критерий Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

После инкубации покрытых фетуином микросфер с аллантаической жидкостью из незараженного

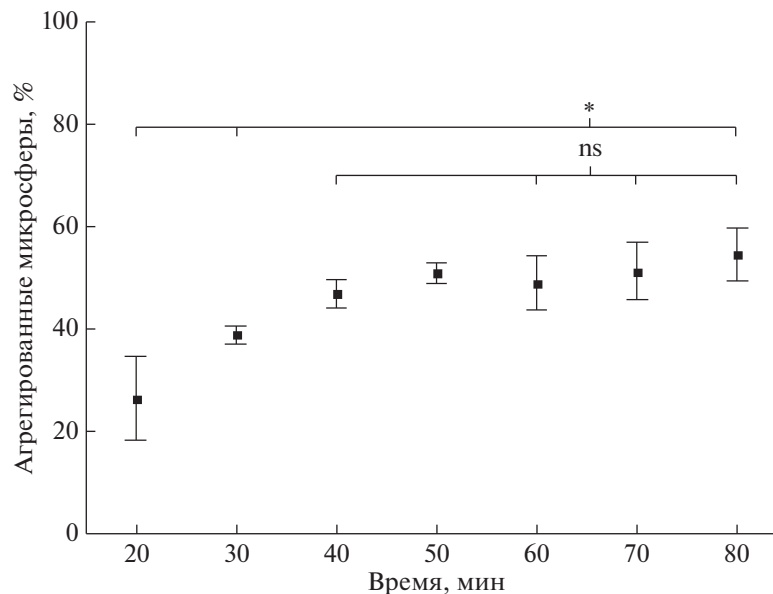


Рис. 2. Зависимость доли агрегированных покрытых фетуином микросфер от времени инкубации с вирусом гриппа A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3). * $p < 0.05$, ns — отсутствие достоверной разницы.

эмбриона (отрицательный контроль) обнаружено, что большая часть микросфер находится в виде индивидуальных частиц. В скоплениях наблюдали $6.5 \pm 1.4\%$ микросфер. После 30-минутной инкубации микросфер с вирусом гриппа A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3) доля индивидуальных частиц уменьшалась на порядок, а в скоплениях зарегистрировано $84.8 \pm 3.2\%$ микросфер, что достоверно ($p < 0.001$) отличалось от контроля. Отметим, что после обработки суспензией вируса в препарате микросфер детектировали скопления, содержащие 4 и более частиц, в то время как в отрицательном контроле такие скопления отсутствовали (рис. 1).

На основании сравнения препаратов микросфер, проинкубированных с незараженной аллантоисной жидкостью или с вирусом, мы ввели критерий “наличия агрегации” микросфер: присутствие в препарате скоплений микросфер, содержащих четыре и более частиц, и не менее 10% микросфер в составе таких агрегатов.

Для определения времени, необходимого для взаимодействия вируса с иммобилизованным на микросферах фетуином, суспензию микросфер инкубировали с разведенной аллантоисной жидкостью, содержащей вирус A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3), в течение 80 мин, при этом каждые 10 мин из реакционной смеси отбирали и фиксировали аликвоты. Доля агрегированных микросфер возрастала в течение первых 40 мин, при дальнейшей инкубации она достоверно не менялась (рис. 2). В последующих экспериментах микросферы с суспензиями вируса инкубировали в течение 1 ч.

Для проверки специфичности РЛА были исследованы два различных вируса: не вызывающий агглютинации эритроцитов AdV5 и NDV, ее вызывающий. После инкубации с аденовирусом подавляющее большинство микросфер находилось в виде индивидуальных частиц, относительное содержание микросфер в агрегатах достоверно не отличалось ($p = 0.18$) от контроля (незараженная аллантоисная жидкость) и составляло $5.2 \pm 3.2\%$. При этом после инкубации с NDV большая часть ($82.3 \pm 7.3\%$) микросфер находилась в форме агрегатов, что достоверно ($p < 0.001$) отличалось от контроля (рис. 3).

Для проверки специфичности взаимодействия вируса гриппа с сialiрированными углеводными цепями фетуина в РЛА использовали покрытые фетуином микросферы, обработанные нейрамидазой из *Clostridium perfringens*. После инкубации покрытых фетуином микросфер с вирусом гриппа A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3) большая часть микросфер находилась в составе агрегатов. Предварительная обработка нейрамидазой приводила к достоверному ($p = 0.009$) уменьшению доли агрегированных микросфер (рис. 4).

В РЛА нами исследовано 12 штаммов вируса гриппа А, а также 2 штамма вируса гриппа В, относящихся к двум эволюционным линиям. Обнаружено, что все исследованные вирусы вызывают агрегацию микросфер. Используя критерий “наличия агрегации”, для каждого исследованного вируса мы определили титр, выраженный в латексагглютинирующих единицах (ЛАЕ), соответствующих обратной величине последнего разведе-

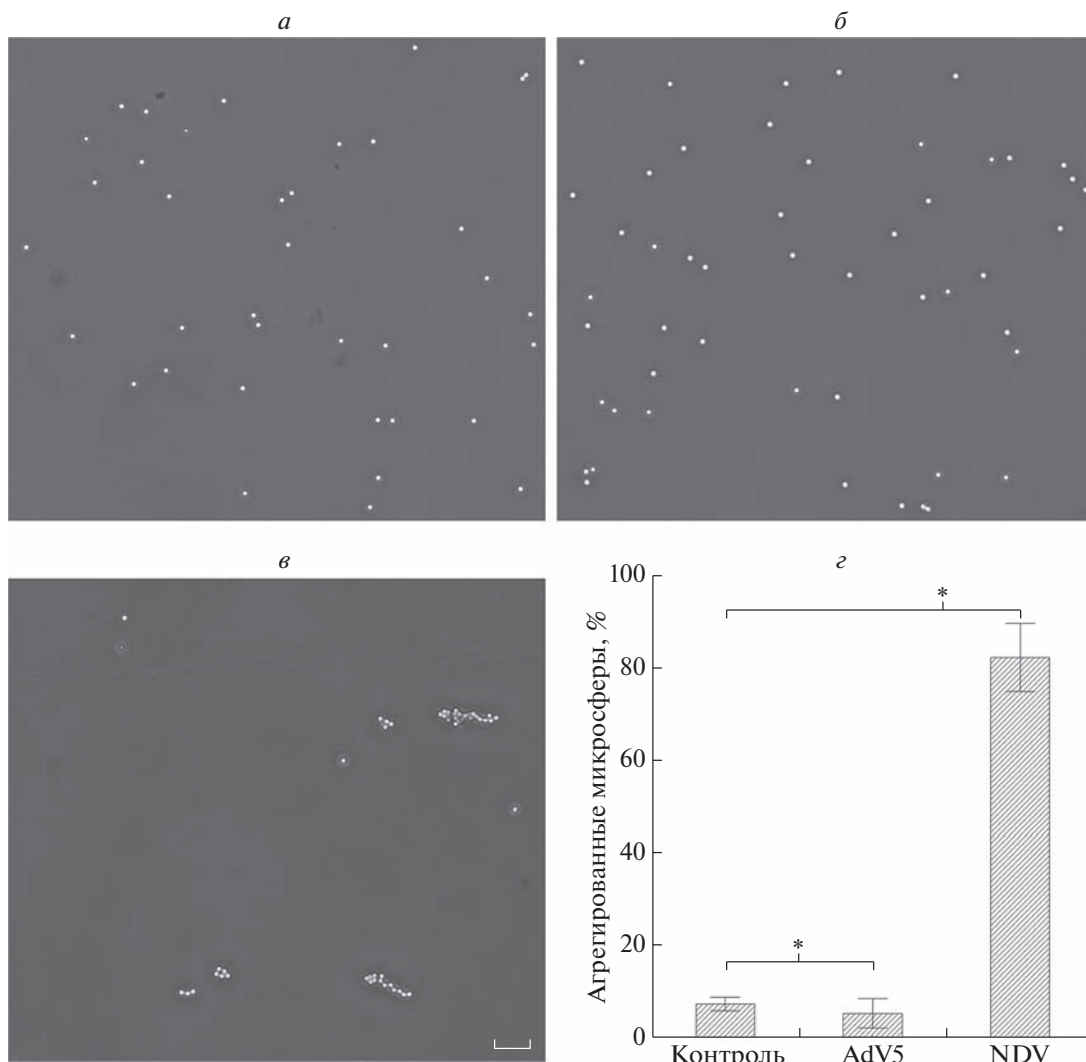


Рис. 3. Агглютинация покрытых фетуином микросфер при инкубации с аденовирусом (AdV5) и вирусом болезни Нью-касла (NDV). Покрытые фетуином микросферы после инкубации с незараженной аллантоисной жидкостью (а), с AdV5 (б), с NDV (е). Масштабная линейка — 10 мкм. z — Доля агрегированных микросфер после инкубации с незараженной аллантоисной жидкостью (Контроль), AdV5 и NDV. * $p < 0.001$, ns — отсутствие достоверной разницы.

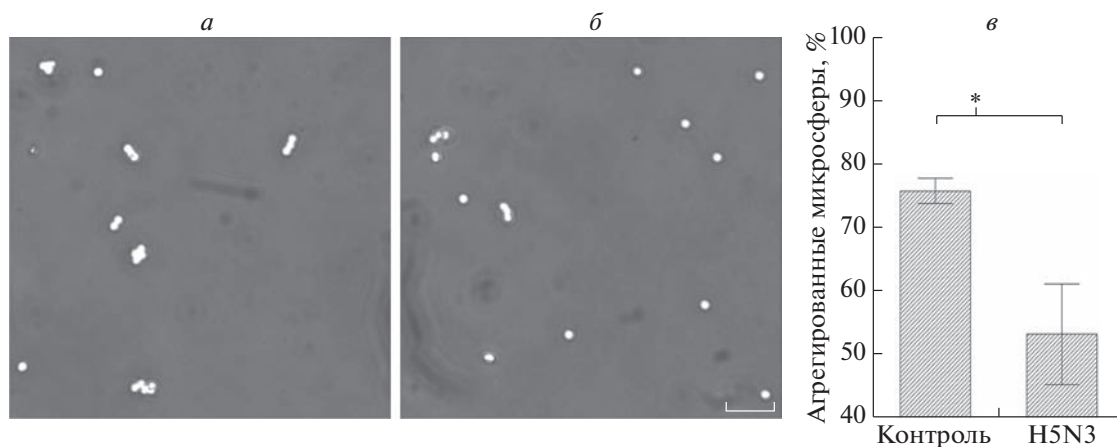


Рис. 4. Влияние нейраминидазы *Clostridium perfringens* на агрегацию микросфер в РЛА. Вирус гриппа A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3) инкубировали с покрытыми фетуином микросферами, не обработанными (а) или обработанными нейраминидазой (б). Масштабная линейка — 10 мкм. в — Доля агрегированных микросфер в РЛА с микро-частицами, не обработанными (–NA) или обработанными (+NA) нейраминидазой. * $p < 0.009$.

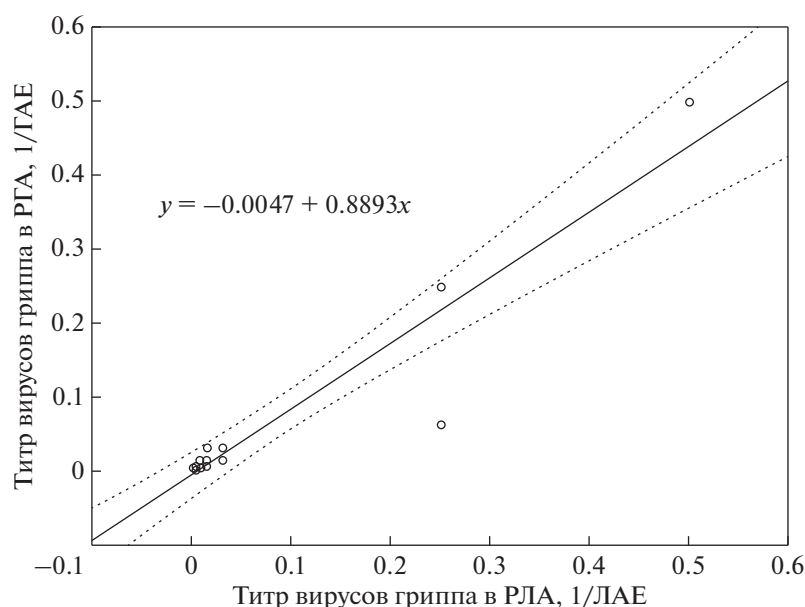


Рис. 5. Корреляционный анализ результатов РГА и РЛА

дения, при котором наблюдается агрегация микросфер. Одновременно с РЛА тот же набор вирусов был исследован в РГА и для каждого вируса был определен титр (табл. 1).

При сравнении результатов, полученных в РГА и РЛА, между ними выявлена положитель-

ная корреляция с достаточно высоким коэффициентом ($R = 0.94$, $p < 0.05$) (рис. 5).

Для исследования стабильности препарата покрытых фетуином микросфер был использован образец, хранившийся в течении 6 месяцев при 4°C. После его инкубации с вирусом гриппа

Таблица 1. Титры исследованных вирусов в РГА и РЛА

Исследуемый вирус	Титр вируса ^a	
	РГА	РЛА
A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	512	256
A/Moscow/01/09 (H1N1)pdm09 (культуральный)	2	2
A/Moscow/01/09 (H1N1)pdm09	4	4
A/duck/Moscow/4970-MA/2013 (H1N1)	32	64
A/Leningrad/134/17/57 (H2N2)	128	256
A/Aichi/2/1968 (H3N2)	32	32
A/Darwin/9/2021 (H3N2)	4	16
A/mallard/Pennsylvania/10218/84-MA (H5N2)	64	128
A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3)	256	512
A/gull/Moscow/3100/2006 (H6N2)	64	64
A/chicken/NJ/294598-12/2004 (H7N2)	128	256
A/swine/Hong Kong/9A-1/1998 (H9N2)	256	128
B/Washington/02/2019 (Викторианская линия)	64	32
B/Phuket/3073/2013 (Ямагатская линия)	64	128
Аденовирус 5 серотипа	>2	>2
Вирус болезни Ньюкасла	128	64

^aПриведены результаты одного из типичных экспериментов.

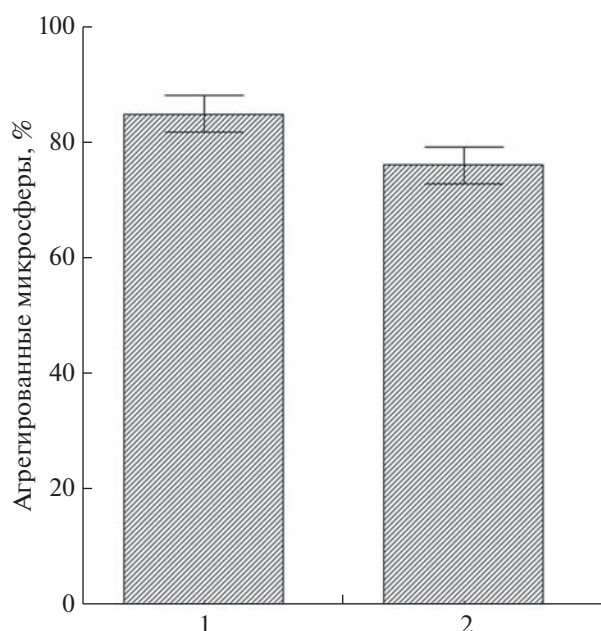


Рис. 6. Стабильность покрытых фетуином микросфер. Процент микросфер в агрегатах после инкубации с вирусом гриппа A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3) свежеприготовленного препарата покрытых фетуином микросфер (1) и этого же препарата, хранившегося в течении 6 месяцев при 4°C (2).

A/duck/Moscow/4182C-MA/2010 (H5N3) доля агрегированных микросфер составляла $75.9 \pm 3.3\%$. Таким образом, способность к агрегации препарата микросфер после хранения достоверно понизилась по сравнению со свежеприготовленным препаратом ($84.8 \pm 3.2\%$), но это снижение не превышало 10% (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами обнаружено, что вирусы гриппа могут вызывать агрегацию покрытых фетуином микросфер. Показано, что этот процесс опосредован взаимодействием вируса с сialiрированными цепями фетуина — после обработки нейраминидазой агрегация микросфер в РЛА достоверно снижалась. При сравнительном анализе титров вирусов гриппа в РГА и РЛА обнаружена корреляция полученных результатов: значения ГАЕ и ЛАЕ различались не более чем в 2 раза для всех исследованных вирусов гриппа, за исключением штамма A/Darwin/9/2021 (H3N2). Для него титр в РЛА был в 4 раза выше, чем в РГА. Возможно, это различие отражает предпочтительность взаимодействия этого вируса гриппа, недавно выделенного от человека, с “человеческим” типом сialiрированных рецепторов.

В сialiрированных углеводных цепях гликанов эпителия верхних дыхательных путей человека концевые остатки N-ацетилнейраминовой кис-

лоты (Neu5Ac) преимущественно присоединены к соседнему остатку сахара через связь $\alpha 2-6$. Именно такие углеводные цепи узнает и связывает гемагглютинин вирусов гриппа человека на хозяйских клетках — отсюда и название для этих рецепторов вирусов гриппа: “человеческий” тип. Вирусы гриппа птиц связываются с клетками, на поверхности которых есть гликаны, терминируемые $\alpha 2-3$ -связанными остатками Neu5Ac (“птичий” тип рецепторов вирусов гриппа). Природные изоляты вирусов гриппа адаптированы к тому или другому типу сialiрированных углеводных цепей, Neu5Ac $\alpha 2-6$ или Neu5Ac $\alpha 2-3$, что и определяет их хозяйскую специфичность [16]. В этом контексте следует заметить, что в экспериментах РГА мы использовали куриные эритроциты, где соотношение Neu5Ac $\alpha 2-6$ /Neu5Ac $\alpha 2-3$ -связанных остатков составляет 0.81 [17]. В случае РЛА роль рецептора вирусов гриппа выполняют сialiрированные углеводные цепи фетуина — белка из печени крупного рогатого скота, где Neu5Ac $\alpha 2-6$ -связанных остатков в 1.56 раз больше, чем Neu5Ac $\alpha 2-3$ [18, 19]. На основании вышеизложенного можно предположить, что вирус гриппа A/Darwin/9/2021 (H3N2) связывается преимущественно с Neu5Ac $\alpha 2-6$ -терминированными цепями, которых на фетуине больше, чем на куриных эритроцитах, — отсюда и возможны различия в титрах по двум тестам.

Использование световой микроскопии для анализа результатов РЛА, предположительно, позволит количественно оценивать содержание вирусных частиц в суспензии. Агрегация покрытых фетуином микросфер определяется взаимодействием гемагглютининов одной вирусной частицы с сialiрированными цепями фетуина, расположенного на разных микросферах, — то есть в местах, где происходит контакт между микросферами при образовании агрегата, находятся вирусные частицы. Очевидно, что при максимальных разведениях вирусной суспензии там будет найдено минимальное число вирионов, необходимых для удержания микросфер вместе. Исходя из того, что энергия броуновского движения частиц примерно на порядок меньше энергии связи гемагглютинина с рецептором [20], это минимальное число равно единице. Таким образом, при агрегации микросфер разбавленной суспензией вируса число образованных контактов между микросферами будет равняться числу вирусных частиц.

Вероятно, предлагаемый метод РЛА может быть расширен за счет использования помимо фетуина других сialiрированных гликопротеинов, в частности таких, на углеводных цепях которых присутствуют либо только $\alpha 2-6$ -, либо только $\alpha 2-3$ -связанные остатки Neu5Ac. В этом случае РЛА может быть использована для исследования рецептор-связывающей специфичности вирусов гриппа.

Таким образом, предлагаемая нами методика РЛА может стать альтернативой методу РГА в рутинной лабораторной практике. Вероятно, ее можно использовать для определения любых вирусов, взаимодействующих с сialiрированными углеводными цепями гликанов, — как это показано для вируса болезни Ньюкасла.

Авторы выражают глубокую признательность д.б.н. А.С. Гамбарян (Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва) и д.б.н. Л.Г. Руденко (ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”, Санкт-Петербург) за предоставленные штаммы вирусов гриппа А, а также к. ф.-м. н. Б.И. Тимофееву и к. б. н. Н.Ф. Ломакиной (ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи”, Москва) за помощь в анализе результатов.

Работа финансировалась в рамках темы Государственного задания “Проведение клинических исследований безопасности, реактогенности и иммуногенности (фазы I и II) четырехвалентной векторной вакцины для профилактики гриппа Гам-Флю-Вак-Квадри у здоровых добровольцев”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов. Также в экспериментах не использовали биологические материалы, полученные от человека.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дерябин П.Г., Бутенко А.М., Бурцева Е.И. (2013) Реакция гемагглютинации и торможения гемагглютинации. В кн.: *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. Ред. Львов Д.К. Москва: Мед. информ. агентство. 426–430.
2. Hirst G.K. (1941) The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science*. **94**, 22–23.
3. Hirst G.K. (1942) The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *J. Exp. Med.* **75**, 49–64.
4. Hajra T.K., Bag P.K., Das S.C., Mukherjee S., Khan A., Ramamurthy T. (2007) Development of a simple latex agglutination assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) by using polyclonal antibody against STEC. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 600–604.
5. Фролов Д.М., Сенина Т.В., Замакина Т.В., Храпова Н.П. (2019) Использование реакции латекс-агглютинации в ускоренном определении патогенных буркхольдерий. *Проблемы особо опасных инфекций*. **3**, 106–110.
6. Poplin V., Boulware D.R., Bahr N.C. (2020) Methods for rapid diagnosis of meningitis etiology in adults. *Bio-mark. Med.* **14**, 459–479.
7. Sedgwick A.K., Tilton R.C. (1983) Identification of *Legionella pneumophila* by latex agglutination. *J. Clin. Microbiol.* **17**, 365–368.
8. Chen J., Jin M., Yu Z., Dan H., Zhang A., Song Y., Chen H. (2007) Latex agglutination test for the rapid detection of avian influenza virus subtype H5N1 and its clinical application. *J. Vet. Diagn. Invest.* **19**, 155–160.
9. Цветкова И.В., Липкинд М.А., Закстельская Л.Я., Юсипова Н.А., Розенфельд Е.Л., (1967) Нейраминная кислота как клеточный рецептор вируса гриппа. *Биохимия*. **32**, 994–999.
10. Gambaryan A.S., Matrosovich M.N. (1992) A solid-phase enzyme-linked assay for influenza virus receptor-binding activity. *J. Virol. Methods*. **39**, 111–123.
11. Matrosovich M.N., Gambaryan A.S. (2022) Characterization of influenza virus binding to receptors on isolated cell membranes. *Methods Mol. Biol.* **2556**, 149–168.
12. Boravleva E., Treshchalina A., Postnikova Y., Gambaryan A., Belyakova A., Sadykova G., Prilipov A., Lomakina N., Ishmukhametov A. (2022) Molecular characteristics, receptor specificity, and pathogenicity of avian influenza viruses isolated from wild ducks in Russia. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 10829.
13. Quash G.A., Aymard M., Fougere J., Ripoll H. (1982) A fetuin-latex agglutination test for detecting the neuraminidases of myxoviruses in allantoic fluid. *J. Biol. Stand.* **10**(2), 115–124.
14. Timofeeva T.A., Rudneva I.A., Sadykova G.K., Lomakina N.F., Lyashko A.V., Shilov A.A., Voronina O.L., Aksenova E.I., Ryzhova N.N., Kunda M.S., Asatryan M.N., Shcherbinin D.N., Timofeeva E.B., Kushch A.A., Prilipov A.G., Adams S.E., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. (2020) Variability of nonpathogenic influenza virus H5N3 under immune pressure. *Acta Virol.* **64**, 480–489.
15. Шубладзе А.К., Гайдамович С.Я. (1964) *Краткий курс практической вирусологии*. Москва: Медгиз, 379 с.
16. Гамбарян А.С., Матросович М.Н. (2015) Какие адаптационные изменения в гемагглютинине и нейраминидазе нужны для возникновения пандемического вируса гриппа из птичьего предшественника? Обзор. *Биохимия*. **80**, 1040–1048.
17. Jankowski M.D., Glaberman S.R., Kimball D.B., Taylor-McCabe K.J., Fair J.M. (2019) Sialic acid on avian erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **238**, 110336.
18. Green E.D., Adelt G., Baenziger J.U., Wilson S., Van Halbeek H. (1988) The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz ¹H NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **263**, 18253–18268.
19. Guttman M., Lee K.K. (2016) Site-specific mapping of sialic acid linkage isomers by ion mobility spectrometry. *Anal. Chem.* **88**, 5212–5217.
20. Sawada T. (2012) Chemical insight into the influenza A virus hemagglutinin binding to the sialoside revealed by the fragment molecular orbital method. *Open Glycoscience*. **5**, 26–30.

Latex Agglutination as an Alternative to Hemagglutination Reaction of Influenza Viruses

P. A. Ivanov^{1, 2, *}, A. V. Lyashko¹, S. A. Ionov^{1, 3}, D. N. Shcherbinin¹, I. A. Rudneva¹, A. A. Shilov¹, N. I. Bunkova¹, M. M. Shmarov^{1, 4}, and T. A. Timofeeva¹

¹*National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia*

²*Winogradsky Institute of Microbiology RC Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia*

³*Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, 117312 Russia*

⁴*Sechenov First Moscow State University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 101000 Russia*

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

As an alternative to the classical method of erythrocyte hemagglutination, a latex agglutination assay based on the interaction of influenza viruses with the sialoglycoprotein fetuin immobilized on the surface of polystyrene microspheres, has been developed. Twelve influenza A virus strains of different subtypes and two influenza B viruses of different lines were tested. Simultaneous titration of viruses using the classical hemagglutination test and the proposed latex agglutination assay showed similar sensitivity and a high degree of correlation ($R = 0.94$). The obtained microspheres can be used for titration of viruses that recognize and bind sialylated glycans as receptors. In particular, latex aggregation was also induced by the Newcastle disease virus.

Keywords: influenza viruses, microspheres, fetuin, latex agglutination reaction, hemagglutinin, receptor binding specificity

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

DOI: 10.31857/S0026898423050178, EDN: ОТКСВU

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал “Молекулярная биология” публикует экспериментальные, теоретические и обзорные статьи, посвященные исследованию структуры, функций, синтеза и распада биологических макромолекул в клетке и в модельных системах, изучению взаимодействий макромолекул между собой и с низкомолекулярными лигандами. Публикуются статьи, посвященные исследованию молекулярной организации клетки и молекулярных механизмов регуляции жизни клеток.

Журнал помещает также проблемные статьи и мини-обзоры. Издаются тематические выпуски, посвященные наиболее актуальным проблемам молекулярной биологии.

Журнал выпускается на русском языке ИКЦ “Академкнига” и одновременно на английском языке Издательской группой Pleiades Publishing (<http://pleiades.online>). Англоязычный вариант журнала распространяется издательством Springer (<http://www.springer.com>).

Разделы журнала:

- Обзоры
- Геномика. Транскриптомика
- Молекулярная биология клетки
- Структурно-функциональный анализ биополимеров и их комплексов
- Биоинформатика
- Протеомика
- Методы
- Хроника (этот раздел публикуется только в русскоязычной версии журнала).

При представлении рукописи в печать авторы могут указать раздел журнала, в который хотели бы поместить свою статью. Статьи, в которых раздел авторами не указан, редакция размещает по рубрикам по своему усмотрению.

Направление статьи в Редакцию означает, что авторы не передали аналогичный материал (в оригинале или в переводе на другие языки или с других языков) в другой журнал(ы), что этот материал не был ранее опубликован и не будет направлен в печать в другое издание или не принят в печать в другом журнале.

Если в ходе работы над рукописью выяснится, что аналогичный материал (возможно, под другим названием и с другим порядком авторов) направлен

в другой журнал, статья немедленно возвращается авторам, о происшедшем сообщается в журнал, принявший к рассмотрению этот материал, с рекомендацией отклонить статью за нарушение этических норм.

Для принятия редколлегией решения о публикации статьи в журнале авторам необходимо представить в редакцию вместе с рукописью авторский договор с издателем журнала, заполненный и подписанный всеми авторами. Авторский договор вступает в силу в случае и с момента принятия статьи к публикации. Формы договоров с издателями и дополнительная юридическая информация размещены на <http://molecbio.ru/> (русская и английская версии) и <http://pleiades.online/ru/authors/agreement/> (английская версия).

Объем статьи не ограничивается.

Журнал публикует заказанные редколлегией обзоры. Обзорные статьи могут быть предложены также авторами после предварительной заявки, которую рассматривает редколлегия. К заявке необходимо приложить резюме предлагаемого обзора и список работ автора за последние 5 лет. Объем обзорной статьи согласовывается с Редакцией.

На отдельной странице укажите данные всех авторов (фамилия, имя, отчество, почтовый адрес с индексом, домашний и служебный телефоны, факс, электронная почта). Укажите лицо, с которым Редакция будет вести переговоры и переписку. Электронную версию рукописи необходимо представить через портал редакционно-издательской системы — <https://publish.sciencejournals.ru/login>. Если возникнут технические проблемы, то в исключительном случае электронная версия рукописи может быть отправлена в редакцию по электронной почте — jrmolbio@gmail.com.

Если в рукописи используются материалы (рисунки, таблицы, фрагменты текста) из другой статьи в оригинальном или модифицированном виде, необходимо предоставить редакции разрешение от Издателя на такое заимствование, а также дать ссылку на соответствующую работу.

К рукописи необходимо приложить в электронном виде копию опубликованной в зарубежных изданиях статьи по данной тематике (свою или других авторов) для адекватного перевода терминологии при подготовке англоязычной версии журнала.

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Текст печатается через 1.5 интервала и должен занимать 30–35 строк на странице: шрифт – Times New Roman, размер шрифта 12, поле слева – 30 мм. Заголовки отделяются от основного текста сверху и снизу двумя интервалами.

Страницы рукописи должны иметь сквозную нумерацию, включая список литературы, таблицы и подписи к рисункам.

Материалы необходимо разместить в следующем порядке:

УДК в верхнем левом углу, шрифт – курсив, размер 12.

Название статьи. Шрифт – заглавный, полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы, а не ее тему или объект. В названии работы недопустимы слова типа “изучение, исследование, сравнение, анализ и т.д.” из-за их не информативности.

Инициалы и фамилии авторов (А. А. Иванов, Б. В. Петров...), шрифт прямой, строчной, полужирный. Буквенными (латинский шрифт) надстрочными индексами необходимо связать фамилию автора и место его работы. Звездочкой отмечается фамилия автора, с которым ведется переписка, после адреса этого автора указывается адрес его электронной почты.

Полное название института, ведомства (например, *Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064*). Шрифт – строчной курсив. Если научных учреждений два и более, необходимо **буквенными надстрочными индексами** связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих. **Названия институтов следует давать без добавления характеристик организационно-правовой формы учреждения.** Например, не надо указывать “Федеральное государственное бюджетное учреждение науки”.

Аннотация (резюме). Шрифт – прямой строчной, кегль 12. Резюме – важная часть статьи, так как именно резюме и заглавие публикации попадает в различные зарубежные и отечественные базы данных, поэтому научное сообщество судит о работе именно по резюме. Структура резюме должна быть предельно четкой.

– Постановка проблемы и обоснование выбора объекта исследования.

– Обоснование выбора методического подхода и стратегии исследования.

– Полученные результаты с четким указанием, в чем их новизна, по сравнению с известными в литературе.

– Следствия, вытекающие из этих результатов: новая гипотеза, опровержение известной гипоте-

зы, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач и т.п.

Средний объем резюме составляет 20 строк. Размер резюме зависит не столько от размера статьи, сколько от степени новизны полученных в ней результатов. Сокращений употреблять не следует, даже если они и расшифрованы в статье.

Ключевые слова. Шрифт – прямой строчной, полужирный. В ключевых словах необходимо отразить:

– предмет исследования (названия молекул, первичная структура, трехмерная структура в растворе, процессы и т.д.),

– метод,

– объект (прокариоты, эукариоты, род/вид, клетки и т.д.),

– специфика данной работы.

Сокращения – в примечаниях к первой странице. Стандартные сокращения (п.н. при цифре, н. при цифре, мкм и т.д.) не приводятся.

Текст статьи, который включает следующие разделы (*названия разделов в статьях теоретического характера определяются автором*):

Раздел “ВВЕДЕНИЕ”

Раздел “ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ”

Редко используемые методы следует описывать достаточно подробно, чтобы их можно было воспроизвести при необходимости. Новые методы необходимо описывать детально и точно. На простые и общераспространенные методы лучше давать ссылки. Необходимо указывать квалификацию наиболее важных реактивов, названия фирм (в кавычках, на языке страны).

Раздел “РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ”.

В зависимости от объема раздел может содержать 2–4 подраздела. Заголовки подразделов должны быть информативны (“микротезисы”), а не описательны. Следует давать заголовки к рисункам и таблицам. Все иллюстрации необходимо, по крайней мере, один раз процитировать в тексте. Для документации одного и того же материала нельзя использовать и рисунки, и таблицы. Для читателя хороший рисунок всегда предпочтительней таблицы, хотя в некоторых случаях рисунок не может заменить таблицу. Весьма приветствуются схемы, поясняющие либо постановку опыта, либо полученные результаты и их интерпретацию.

Для более полного описания результатов исследования к статье могут прилагаться **дополнительные материалы (дополнительные большие таблицы, рисунки и пр.) при условии, что автор является правообладателем прилагаемых материалов.** Дополнительные материалы размещаются на сайте журнала по адресу <http://molecbio.ru> и публикуются в электронной версии англоязычного издания на сайте <http://link.springer.com>

Раздел “ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ”. В этом разделе полученные данные объясняют и сопоставляют с опубликованными ранее результатами.

Допускается объединение разделов “РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ” и “ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ” в один раздел – “РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ”.

Раздел “СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ”

Подраздел “Благодарности”. Шрифт – строчной курсив.

В этом разделе дается информация о любой помощи в проведении работы и подготовке статьи, а также сообщается об использовании центров коллективного пользования.

Подраздел “Финансирование работы”. Шрифт – строчной курсив.

В разделе указываются названия всех фондов и организаций, финансировавших работу, и в скобках – номера грантов. Сокращений в названиях финансирующих организаций употреблять не следует.

Подраздел “Соблюдение этических стандартов”. Шрифт – строчной курсив.

Если в работе исследования проведены на животных, то в этом разделе указывается, что все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Если в работе опыты на животных не проводились, то необходимо указать, что настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Если в экспериментах использовались биологические материалы, полученные от человека, формировались когорты больных и т.п., то в данный раздел необходимо вставить два пункта:

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

Подраздел “Конфликт интересов”. Указать информацию о конфликтах интересов.

Подраздел “Открытый доступ”. Если предполагается публикация английской версии статьи в режиме Open Access, то необходимо указать, что статья публикуется в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY). Шрифт – строчной курсив. **Стоимость публикации статьи в режиме Open Access можно узнать на**

сайте Издателя английской версии <https://www.ple-iades.online/ru/authors/openaccess/how-to-publish/>

Лицензия CC BY разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что указаны автор и источник публикации, включена ссылка на лицензию Creative Commons и указывается, были ли внесены какие-либо изменения. Авторы или владельцы авторских прав безоговорочно, заблаговременно и на неограниченное время предоставляют любому третьему лицу право использовать, воспроизводить или распространять статью полностью или частично в любом формате и на любом носителе при условии, что в публикации не допущено никаких существенных ошибок, указаны авторы статьи и корректная ссылка на источник публикации, а также то, что библиографические данные не были изменены. Объем статьи на английском языке не должен превышать 15 полос (приблизительно 30 страниц, включая список литературы, рисунки и таблицы). **Подраздел “Дополнительные материалы”.** Шрифт – строчной курсив.

Если в работе есть дополнительные материалы, то в этом разделе даются ссылки на сайты, на которых они размещены, а именно: <http://link.springer.com>, <http://molecbio.ru>. Просим не размещать дополнительные материалы на сторонних ресурсах.

Подраздел “Дополнительная информация”. Шрифт – строчной курсив.

В этом разделе могут быть размещены, например, нестандартные ссылки (материалы, которые по каким-то причинам не опубликованы, но могут быть предоставлены авторами по запросу); дополнительные ссылки на профили авторов (Orchid ID); информация о связанных со статьей ранее неопубликованных докладах на конференциях и семинарах и т.п.

Издатель оставляет за собой право включить в этот раздел издательскую информацию, например, выразить несогласие с выводами работы или индифферентность по отношению к полученным данным, указать составителей, ответственных за включение статьи в номер, если они не указаны другим способом, а также указать другую информацию, имеющую отношение к данной статье или журналу.

Раздел “СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ”. Печатается на отдельной странице и содержит перечень работ с **обязательным указанием заглавия (см. ниже образец)** в порядке цитирования. При упоминании в тексте ссылка (номер) дается в квадратных скобках. Номера ссылок должны идти строго по порядку. Цитирование двух и более работ под одним номером, одной и той же работы под разными номерами не допускается. **Ссылки на Интернет-ресурсы следует давать либо прямо в тексте, либо в подстрочнике, но не в списке литературы.** Ссылки на неопубликованные работы не допуска-

ются. Не допускаются также ссылки на диссертации и их авторефераты, т.к. они печатаются на правах рукописи и для читателей практически не доступны.

Обращаем внимание авторов на то, что ссылки на российские журналы, выходящие в двух версиях — на русском и английском языках, необходимо приводить для двух версий. Проверить номера страниц для ссылок на журнал “Молекулярная биология” в англоязычной версии можно на сайте издательства (<http://pleiades.online>), на котором размещены содержания номеров и резюме публикаций с 1967 г. по настоящее время, и на сайте журнала (<http://www.molecbio.ru>).

Необходимо строго соблюдать принятый в журнале порядок расположения данных в списке литературы. Оформляйте СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ по следующему образцу, обращая внимание на расположение пробелов между знаками:

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ДЛЯ ЖУРНАЛОВ:

1. Студитский В.М. (2001) Транскрипция хроматина. *Молекуляр. биология*. **35**, 235–247. (Stuitsky V.M. (2001) Transcription through chromatin. *Mol. Biol. (Mosk.)*. **35**, 194–205.)
2. Hanahan D., Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*. **100**, 57–70.

ДЛЯ СБОРНИКОВ:

3. Orlean P. (1997) Biogenesis of yeast cell wall and surface components. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces. Cell Cycle and Cell Biology*, vol. 3. Eds Pringle J.R., Broach J.R., Jones E.W. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, pp. 229–362.

ДЛЯ ТЕЗИСОВ ДОКЛАДОВ

4. Zhirnov O.P., Konakova T.E., Krichevets S.G., Iordansky S.N., Klenk H.D. *11-th international conference Negative Strand Viruses*. (2000) Quebec, Canada. Abstract book. P. 91. Abstract 102.

ДЛЯ КНИГ:

5. Уотсон Д. (1967) *Молекулярная биология гена*. Москва: Мир. (То же для иностранных изданий).

Заглавие статьи на английском языке. Шрифт — заглавный, полужирный.

Фамилии и инициалы авторов в английской транскрипции с пометками, указывающими на учреждение, в котором работает автор. Шрифт — прямой, строчный, полужирный. Цифровыми надстрочными индексами необходимо связать фамилию автора и место его работы. Звездочкой отмечается фамилия автора, с которым ведется

переписка, после адреса этого автора указывается адрес его электронной почты.

Полное название института, ведомства на английском языке. Шрифт — светлый курсив, адрес электронной почты. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.

Резюме на английском языке — точный перевод аннотации на русском языке. Шрифт — прямой, кегль 12.

Ключевые слова на английском языке. Шрифт — прямой, кегль 12.

ТРЕБОВАНИЯ К ОФОРМЛЕНИЮ РУКОПИСЕЙ

При оформлении рукописи следует во всех материалах, включая текст, рисунки и надписи на фотографиях, придерживаться следующих правил:

Знак “—” (тире) отбивается пробелами; знак “минус”, “интервал” или “связь” пробелами не отбивается.

Десятичные дроби пишутся через точки — 1.4, а не 1,4.

В качестве **знака умножения** используется только “×”: 5×10^3 моль/л. Знак “×” ставится только в том случае, если справа от него стоит число: $C \times 10^3$, но не 10^3C . Символ “·” применяется в скалярных произведениях, в химических формулах ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), в нековалентных комплексах (ДНК · РНК и т.п.).

Числовой материал следует давать в виде таблиц.

В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов;

Значки типа ~ (волна), ° (кружок), ^ (крышки над и под буквами) используются в крайних случаях.

Рисунки предоставляются в черно-белом виде в форматах JPEG, TIFF, EPS, PDF с разрешением не менее 600 dpi (каждую иллюстрацию поместить в отдельный файл, в масштабе, необходимом для воспроизведения в журнале). **Сложные цветные рисунки публикуются за счет средств авторов в бумажной версии журнала. В электронной версии — бесплатно.**

Латинские названия родов и видов живого мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга — прямым шрифтом. Названия фагов и вирусов в латинской транскрипции пишутся прямым шрифтом.

Названия генов пишутся курсивом (генов человека и дрожжей — заглавными буквами, например *EBFR*; генов мыши — с заглавной буквы, например *Ebfr*; гены других организмов — строчным курсивом).

Названия белков пишутся прямым шрифтом (белков человека, мыши, птиц, рептилий, дрожжей — заглавными буквами, например EBFR; амфибий и рыб — с заглавной буквы, например Ebfr).

Названия нуклеотидов (A, C, G, U), аминокислотных остатков (Ala, Arg, Asn и т.д.) и фосфатов (ATP, ADP) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.

Нумерация оснований и аминокислот пишется без дефиса (U25; Ala32).

Последовательности аминокислот и нуклеотидов, как правило, не публикуются, а приводятся только их номера в банке данных, например, Acc.no. (Accession number) EMBL Data Bank. Можно приводить в тексте или давать как рисунок короткие последовательности (не более 400 аминокислот или пар нуклеотидов) в случае их активного обсуждения в статье.

Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).

Приводить биохимические и химические термины, а также названия ферментов необходимо в соответствии с международными правилами, принятыми Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

Сокращение терминов и названий ферментов, как правило, затрудняет восприятие текста читателем, поэтому число таких сокращений должно быть сведено к минимуму. Вводите сокращения в примечания на первой странице.

В один файл включается аннотация, текст статьи, литература, таблицы и рисунки с подписями. Графики и рисунки необходимо дополнительно предоставить и в отдельных графических файлах. “Тексты” длинных последовательностей, полученных при секвенировании нуклеиновых кислот или белков, надо включить в отдельные текстовые файлы.

Неправильно оформленная рукопись к рассмотрению Редакцией не принимается.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Поступившая в Редакцию рукопись направляется на отзыв двум специалистам в данной конкретной области исследований. Авторы статьи имеют право назвать 3–5 фамилий (имя и отчество полностью) возможных рецензентов с обязательным указанием места работы, телефона, адреса электронной почты. Выбор рецензента остается за редколлегией журнала. В спорных случаях по усмотрению редколлегии привлекаются дополнительные рецензенты. Срок рецензирования — от 4 до 8 недель. Рукопись, получившая отрицательные отзывы двух независимых рецензентов, по решению редколлегии “отклоняется”. Редак-

ция вправе не вступать в переписку с автором относительно причин (оснований) отказа в публикации статьи. Рукописи, не соответствующие профилю журнала, “отклоняются” без рецензии. Рукописи авторам не возвращаются.

После анонимного рецензирования рукопись передается члену редколлегии, курирующему данное направление в журнале, который дает окончательное заключение о возможности публикации статьи.

Статья, условно принятая к публикации, но нуждающаяся в доработке, направляется авторам с замечаниями рецензента. Авторам следует учесть все замечания, сделанные в процессе рецензирования статьи, в сопроводительном письме ответить на каждое из замечаний и указать место в рукописи, где сделаны изменения. В случае несогласия с рецензентом автор должен кратко и четко обосновать свою позицию. Сделанные автором изменения в рукописи необходимо внести в электронный вариант текста и возвратить в Редакцию. Датой принятия к публикации считается дата поступления версии, удовлетворяющая всем требованиям рецензента и редколлегии.

Статью, отправленную Редакцией на доработку после рецензирования и исправленную в соответствии с замечаниями рецензента и редактора, необходимо возвратить в Редакцию в течение 30 дней с момента ее получения авторами, в этом случае сохраняется первая дата поступления. Статья, возвращенная в Редакцию по прошествии более чем 30 дней, будет иметь новую дату поступления.

В процессе редактирования и подготовки рукописи к печати небольшие стилистические и номенклатурные исправления вносятся по усмотрению научного редактора в соответствии с принятыми в Редакции правилами, более серьезные исправления согласовываются с авторами статьи, или статья отправляется редактором на доработку. В интересах автора как можно быстрее согласовать правку с научным редактором, это существенно ускорит срок публикации статьи.

Очередность публикации устанавливается по дате принятия статьи к печати. Вне очереди публикуются работы, отнесенные редколлегией к приоритетным, а также статьи, получившие высокую оценку рецензентов и рекомендуемые редколлегией к ускоренной публикации. Члены редколлегии журнала имеют право рекомендовать статьи к ускоренной публикации. В этом случае член редколлегии, представивший к ускоренной публикации статью, осуществляет предварительное рецензирование рукописи и целиком отвечает за ее научное и оформительское качество. Фамилия члена редколлегии, рекомендовавшего статью в печать, публикуется под названием статьи.

Имеют право на внеочередную публикацию статьи аспиранты третьего-четвертого года обучения, представившие справку из отдела аспирантуры.

КОРРЕКТУРА, ОТТИСКИ, ГОНОРАРЫ

Корректурa высылается авторам Издательством, как правило, в виде pdf-файла. На чтение корректуры отводится 3 дня со дня отправки. Все исправления необходимо внести в файл и отправить его в Издательство. В исключительных случаях можно составить подробный список исправлений и отправить его в Редакцию по электронной почте.

Исправления против оригинала, особенно в рисунках, не допускаются. В исключительных случаях они могут быть приняты за счет средств автора.

Электронный адрес Редакции: jrmolbio@gmail.com

Веб-сайт Редакции: <http://www.molecbio.ru>

Веб-сайт Издательств: <http://pleiades.online>

Телефон: (499) 343-78-07

Издательство высылает первому автору бесплатно электронные файлы статьи в формате PDF на русском и английском языках.

Авторские гонорары за публикацию статьи в журнале не предусмотрены.