

БИОХИМИЯ





СОДЕРЖАНИЕ

Tom 89, № 4, 2024

Пространственная организация генома и регуляция транскрипции (специальный выпуск)

Приглашённый редактор С.В. Разин

когезиновый комплекс: структура и принципы взаимодеиствия с днк (оозор)	
А.К. Голов, А.А. Гаврилов	537
Когезин-зависимая экструзия: роль в клеточной физиологии и молекулярная механика (обзор)	
А.К. Голов, А.А. Гаврилов	555
Роль белка Mod(mdg4)-67.2 во взаимодействиях между Su(Hw)-зависимыми комплексами и их рекрутировании на хроматин	
Л.С. Мельникова, В.В. Молодина, П.Г. Георгиев, А.К. Головнин	583
Модификация протокола Hi-C для молекулярно-генетического исследования парафиновых срезов опухолей	
М.М. Гридина, Я.К. Степанчук, М.А. Нуриддинов, Т.А. Лагунов, Н.Ю. Торгунаков, А.А. Шадский, А.И. Рябова, Н.В. Васильев, С.В. Вторушин, Т.С. Геращенко, Е.В. Денисов, М.А. Травин, М.А. Королев, В.С. Фишман	594
Разработка метода детекции пространственных контактов плазмидной ДНК с геномом в клетках человека	
А.П Ян, П.А Сальников, М.М Гридина, П.С. Белокопытова, В.С. Фишман	612
Функциональная роль C-концевых доменов белка MSL2 Drosophila melanogaster	
Е.А. Тихонова, П.Г. Георгиев, О.Г. Максименко	623
Изучение структуры и функций нуклеосом методом атомно-силовой микроскопии (обзор)	
А.А. Украинцев, М.М. Кутузов, О.И. Лаврик	635
Неспецифические взаимодействия в регуляции транскрипции и организации транскрипционных конденсатов (обзор)	
А.А. Валяева, Е.В. Шеваль	651
РЕГУЛЯРНЫЕ СТАТЬИ	
Акрилатредуктаза анаэробной электрон-транспортной цепи морской бактерии Shewanella woodyi	
Ю.В. Берцова, М.В. Серебрякова, В.А. Богачев, А.А. Байков, А.В. Богачев	666
Гиппокамп под давлением: молекулярные механизмы развития когнитивных нарушений у крыс SHR (обзор)	
М.Ю. Степаничев, Л.И. Мамедова, Н.В. Гуляева	677

Уникальная роль виментина в семействе белков промежуточных филаментов (обзор)				
И.Б. Алиева, А.С. Шахов, А.А. Даял, А.С. Чуркина, О.И. Парфентьева, А.А. Минин				
Рациональная разработка лекарств, направленных на рецепторы, сопряженные с G-белком: взгляд со стороны структурной биологии (обзор)				
П.А. Хорн, А.П. Лугинина, В.А. Поспелов, Д.Е. Дашевский, А.Н. Хныкин, О.В. Моисеева, Н.А. Сафронова, А.С. Белоусов, А.В. Мишин, В.И. Борщевский	705			
хроника				
Памятные и юбилейные даты истории биохимии 2024 года	726			

CONTENTS

Vol. 89, Issue 4, 2024

Spatial Organization of the Genome and Transcription Regulation (Special Issue)

Guest Editor Sergey V. Razin

A. K. Golov and A. A. Gavrilov	537
Cohesin-Dependent Loop Extrusion: Molecular Mechanics and Role in Cell Physiology (Review)	
A. K. Golov and A. A. Gavrilov	555
Role of Mod(mdg4)-67.2 Protein in Interactions between Su(Hw)-Dependent Complexes and Their Recruitment to Chromatin	
L. S. Melnikova, V. V. Molodina, P. G. Georgiev, and A. K. Golovnin	583
Modification of the Hi-C Technology for Molecular Genetic Analysis of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Sections of Tumor Tissues	
M. M. Gridina, Ya. K. Stepanchuk, M. A. Nuriddinov, T. A. Lagunov, N. Yu. Torgunakov, A. A. Shadsky, A. I. Ryabova, N. V. Vasiliev, S. V. Vtorushin, T. S. Gerashchenko, E. V. Denisov, M. A. Travin, M. A. Korolev, and V. S. Fishman	594
Towards Development of the 4C-Based Method Detecting Interactions of Plasmid DNA with Host Genome	
A. P. Yan, P. A. Salnikov, M. M. Gridina, P. S. Belokopytova, and V. S. Fishman	612
Functional Role of the C-Terminal Domains of the MSL2 Protein of Drosophila melanogaster	
E. A. Tikhonova, P. G. Georgiev, and O. G. Maksimenko	623
Studying the Structure and Function of Nucleosomes by Atomic Force Microscopy (Review)	
A. A. Ukraintsev, M. M. Kutuzov, and O.I. Lavrik	635
Nonspecific Interactions in Transcription Regulation and Organization of Transcriptional Condensates (Review)	
A. A. Valyaeva and E. V. Sheval	651
REGULAR ARTICLES	
Acrylate Reductase of an Anaerobic Electron Transport Chain of the Marine Bacterium <i>Shewanella woodyi</i>	
Y. V. Bertsova, M. V. Serebryakova, V. A. Bogachev, A. A. Baykov, and A. V. Bogachev	666
Hippocampus under Pressure: Molecular Mechanisms of Cognitive Impairment in SHR Rats (Review)	
M. Yu. Stepanichev, D. I. Mamedova, and N. V. Gulyaeva	677

The Unique Role of Vimentin in the Intermediate Filament Proteins Family (Review)				
I. B. Alieva, A. S. Shakhov, A. A. Dayal, A. S. Churkina, O. I. Parfentyeva, and A. A. Minin	693			
Rational Drug Design Targeting G-Protein-Coupled Receptors: a Structural Biology Perspective (Review)				
P. A. Khorn, A. P. Luginina, V. A. Pospelov, D. E. Dashevskii, A. N. Khnykin, O. V. Moiseeva, N. A. Safronova, A. S. Belousov, A. V. Mishin, and V. I. Borshchevskiy	705			
CHRONICLE				

Notable and Anniversary Dates in Biochemistry for 2024 726

УДК 577.29

КОГЕЗИНОВЫЙ КОМПЛЕКС: СТРУКТУРА И ПРИНЦИПЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ДНК

Обзор

© 2024 А.К. Голов^{1,2*}, А.А. Гаврилов^{1*}

 1 Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия; электронная почта: golovstein@gmail.com; aleksey.a.gavrilov@gmail.com 2 Технион – Израильский технологический институт, 3525433 Хайфа, Израиль

Поступила в редакцию 14.10.2023 После доработки 19.02.2024 Принята к публикации 23.02.2024

Точная репликация и разделение длинных линейных молекул геномной ДНК связаны с преодолением ряда чисто механических трудностей. SMC-Комплексы являются ключевыми компонентами клеточной машинерии, обеспечивающей декатенацию сестринских хромосом, а также компактизацию геномной ДНК во время деления. Один из базовых эукариотических SMC-комплексов, когезин, имеет типичную для этой группы кольцевую структуру с межсубъединичной порой, сквозь которую могут быть продеты нити ДНК. На способности когезина к такому топологическому надеванию на ДНК основано участие комплекса в пострепликативном сцеплении сестринских хроматид – когезии. Сравнительно недавно стало ясно, что когезин, так же как и другие SMC-комплексы, является моторным белком, своеобразное движение которого по молекуле ДНК ведет к выпетливанию ДНК (процесс, получивший название «экструзия»). Экструзия обеспечивает выполнение функций когезина за пределами когезии, однако молекулярный механизм процесса остается загадкой. В этом обзоре мы суммировали данные об архитектуре когезина, о влиянии связывания и гидролиза АТР на эту архитектуру, а также о ряде альтернативных способов связывания комплекса с ДНК. Многие из представленных структурных закономерностей в ближайшем будущем, вероятно, станут частью целостной модели, описывающей молекулярный механизм процесса экструзии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SMC-комплексы, когезин, SMC-субъединицы, клейзин, HAWK-субъединицы, когезия, топологическое надевание, экструзия ДНК-петель, «ДНК-захват».

DOI: 10.31857/S0320972524040015 **EDN:** ZGRUGG

ВВЕДЕНИЕ

Когезин – это панэукариотический белковый комплекс, относящийся к группе SMC-комплексов (Structural Maintenance of Chromosomes, белок структурного поддержания хромосом), участвующий в процессах индивидуализации сестринских хроматид, декатенации хромосом, митотической и мейотической когезии, создания и поддержания специфической укладки ДНК в клетках, репарации двухцепочечных разрывов и стабилизации остановленных репликативных вилок [1, 2]. Как и другие SMC-комплексы, когезин представляет со-

бой, с одной стороны, мультисубъединичную АВС-АТРазу, а с другой – ДНК-связывающий комплекс, не имеющий предпочтений к специфическим нуклеотидным последовательностям. Связывание и гидролиз АТР сопряжены с конформационными изменениями когезина, а также с изменениями аффинности разных элементов комплекса к ДНК. Повторяющиеся циклы связывания/гидролиза АТР приводят к направленному движению комплекса вдоль ДНК-нити, таким образом, когезин является моторным белком – ДНК-транслоказой.

В клетках эукариотических организмов когезин выполняет две различные функции: обеспечение

Принятые сокращения: FRET (Förster Resonance Energy Transfer) – анализ ферстеровского переноса энергии; HAWK (HEAT protein Associated With Kleisin) – HEAT-белок, ассоциированный с клейзином; SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) – белок структурного поддержания хромосом.

^{*} Адресат для корреспонденции.

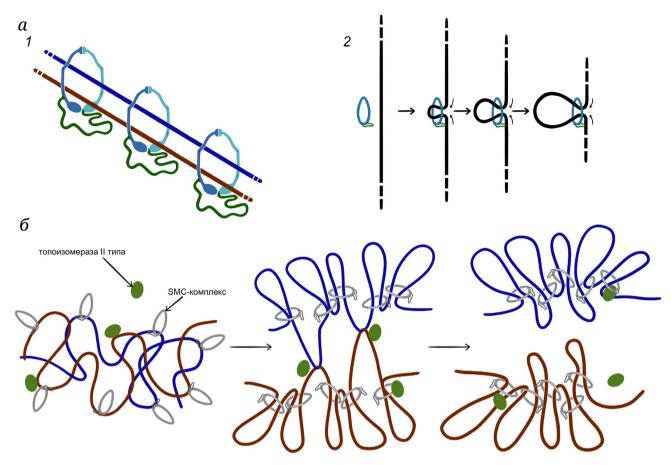


Рис. 1. Когезия сестринских хроматид и экструзия ДНК-петель, осуществляемые SMC-комплексами. a – Две базовые активности когезина: когезия (1) и экструзия (2). δ – Экструзия, осуществляемая SMC-комплексами, и активность ДНК-топоизомераз типа II обеспечивают пострепликативную индивидуализацию сестринских геномов во всех клетках, прокариотических и эукариотических

когезии сестринских хроматид и так называемую экструзию хроматиновых петель (рис. 1, а). Процесс экструзии начинается с захвата небольшой ДНК-петли, после чего ее рост происходит за счет процессивного затягивания фланкирующих участков ДНК внутрь [3-6]. В основании растущих петель располагается активный SMC-комплекс, а их размер может достигать сотен тысяч пар оснований (рис. 1, a (2)). Экструзионная активность сопряжена с гидролизом АТР и является универсальной биохимической активностью всех SMC-комплексов [1]. По всей видимости, экструзия возникла на заре клеточной эволюции как способ пострепликативного разделения массивных молекул геномной ДНК (рис. 1, б); в этом процессе SMC-комплексы кооперируют с топоизомеразами II типа. Обеспечиваемая когезиновыми кольцами когезия сестринских хроматид (рис. 1, a(1)), по всей вероятности, не связана с экструзионной активностью комплекса [7, 8], хотя для погрузки на ДНК когезиновых колец, участвующих в когезии, также необходим гидролиз АТР [7, 9].

Информация о структуре белков важна для понимания их активности и вдвойне важна для

понимания активности моторных белков. В этом обзоре мы приведем данные о структуре когезина, а также суммируем современные представления о его взаимодействиях с ДНК, конформационных изменениях и о том, как взаимодействия с ДНК и цикл связывания/гидролиза АТР контролируют эти конформационные изменения. Данные о биологической роли когезин-зависимой экструзии, а также молекулярный механизм этого процесса подробно рассматриваются во втором обзоре серии, опубликованном в этом же выпуске журнала [10].

КОЛЬЦЕВОЙ КОРОВЫЙ ТРИМЕР КОГЕЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА

Все эукариотические геномы кодируют по крайней мере четыре SMC-комплекса из трех разных классов: две разновидности когезина (митотический и мейотический), конденсин I и SMC5/6-комплекс [3, 4] (таблица). Инвариантной основой SMC-комплексов является тример, состоящий из двух SMC-субъединиц и одной клейзиновой субъединицы [2, 3, 11]. SMC-Белки [12] и клейзины [13]

Субъединичный состав панэукариотических SMC-комплексов

Комплекс Субъединица	Мейотический когезин	Митотический когезин	Конденсин I	SMC5/6-комплекс
v-SMC	SMC3 (Smc3)	SMC3 (Smc3)	SMC2 (Smc2)	SMC6 (Smc6)
к-SMC	SMC1 (Smc1)	SMC1α (Smc1)	SMC4 (Smc4)	SMC5 (Smc5)
Клейзин	REC8 (Rec8)	RAD21 (Scc1)	CAP-H (Brn1)	NSE4A/B (Nse4)
HAWK _A	PDS5A/B (Pds5)	NIPBL (Scc2) и PDS5A/B (Pds5)	CAP-D2 (Ycs4)	_
$HAWK_B$	STAG3 (Scc3)	STAG1/2 (Scc3)	CAP-G (Ycg1)	_
KITEA	_	_	_	NSE5 (Nse5)
KITEB	_	_	_	NSE6 (Nse6)

Примечание. HAWK-Субъединицы присутствуют только в когезинах и конденсинах, в то время как прокариотические SMC-комплексы и SMC5/6-комплекс имеют в своем составе вспомогательные субъединицы, объединяемые в группу КІТЕ-белков [15]. Указаны названия субъединиц человека и названия гомологичных субъединиц Saccharomyces cerevisiae (в скобках).

представляют собой два неродственных белковых семейства. Представители разных классов SMCкомплексов разделены сотнями миллионов лет эволюции и утратили гомологию в большей части аминокислотной последовательности, сохранив сходство в пределах коротких функционально важных мотивов и общую базовую структуру [14]. Тем не менее внутри шести основных подсемейств эукариотических SMC-белков (SMC1-6) и трех подсемейств эукариотических клейзинов (клейзины α-γ) наблюдается существенная степень консервативности на уровне аминокислотной последовательности. Особенно высокая консервативность наблюдается внутри SMC1- и SMC3-подсемейств. Так, например, SMC3 человека и мыши фактически идентичны.

В случае когезина (под когезином мы будем подразумевать более изученный митотический вариант комплекса) пара SMC-белков представлена гетеродимером SMC1 (Smc1)–SMC3 (Smc3)¹, а клейзиновая субъединица – белком RAD21 (Scc1). SMC-Белки – это палочковидные молекулы длиной порядка 50 нм с двумя глобулярными доменами на концах, соединенными относительно лабильной фибриллярной структурой (рис. 2, a) [16–18]. Полипептид, состоящий из 1200–1300 а.о., сложен вдвое внутри палочковидной структуры SMC-белка так, что один из терминальных глобулярных доменов образуется в результате взаимодействия N- и C-концов, а другой – образован непрерывным фрагментом полипептидной цепи, распо-

ложенным приблизительно посредине линейной последовательности [17, 19]. Первый из глобулярных доменов носит название головного домена, а второй – петлевого (hinge), внутри последнего происходит поворот полипептидной цепи SMC-белка на 180°. Фибриллярная структура, соединяющая два глобулярных домена, представляет собой внутримолекулярную антипараллельную суперспираль (coiled-coil), называемую плечевым доменом (arm).

Стабильная димеризация SMC-белков достигается за счет гомотипического взаимодействия между петлевыми доменами [17, 18]. Суперспиральные плечевые домены направлены в одну сторону от взаимодействующих петлевых доменов; таким образом, димер SMC1–SMC3 при отсутствии ATP представляет собой V-образную структуру с димеризованными петлевыми доменами на одном полюсе и парой разобщенных головных доменов – на другом [17, 20].

RAD21-Клейзиновая субъединица имеет длину порядка 500–700 а.о. с двумя структурированными доменами на *N*- и *C*-концах и протяженной, в значительной мере неупорядоченной, областью между ними [13]. *N*-Концевой домен клейзина взаимодействует с областью сочленения головного и плечевого доменов SMC3-субъединицы, а *C*-концевой – с головным доменом SMC1 (рис. 2, *б*) [21].

Молекулы трех коровых субъединиц когезина за счет устойчивых концевых взаимодействий образуют замкнутую кольцевую структуру [17, 22].

¹ В основном тексте указаны названия белков человека, в скобках (при первом упоминании) – названия гомологичных белков *Saccharomyces cerevisiae*.

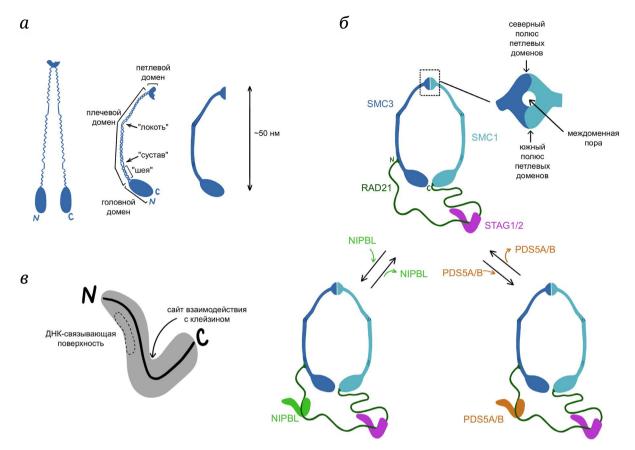


Рис. 2. Субъединичная структура когезинового комплекса. a – Фолдинг и основные структурные особенности SMC-белков. δ – Общая структура трехчастного когезинового кольца и взаимодействие с ним HAWK-субъединиц. ϵ – Общая структура крючкообразных HAWK-субъединиц SMC-комплексов

Вытянутая форма каждой из коровых субъединиц приводит к тому, что в некоторых конформациях когезин обладает пространным топологически замкнутым межсубъединичным компартментом, называемым S-K-кольцом (рис. 3, а). Просвет S-K-кольца, также называемый S-K-компартментом, может поддерживать сквозное прохождение глобулярных частиц диаметром порядка 10 нм [23, 24]. Показано, что через S-K-компартмент могут также проходить одна или две ДНК-нити, в этом случае кольцевой комплекс оказывается надет на ДНК как бисеринка на нить. В G2-фазе клеточного цикла за счет такого топологического взаимодействия молекул когезина с парами сестринских хроматид поддерживается когезия [7].

Петлевые домены SMC-белков представляют собой компактные структуры, состоящие из двух (N- и C-концевого) субдоменов α/β -класса, каждый из субдоменов имеет в своем составе небольшой β -лист [17, 18]. N-Концевой субдомен взаимодействует с C-концевым субдоменом своего димеризационного партнера с образованием единого составного β -листа. Таким образом, два петлевых домена в составе димера имеют пару взаимодействующих поверхностей. За счет того, что субдо-

мены в составе каждого из петлевых доменов разделены небольшим желобом, димеризованные петлевые домены выглядят как тороидальная структура с вращательной псевдосимметрией второго порядка (рис. 2, б). Небольшой канал внутри димера петлевых доменов содержит группу функционально важных положительно заряженных аминокислот, которые, как предполагается, могут участвовать в электростатических взаимодействиях комплекса с ДНК. Асимметрия в гетеродимере SMC-субъединиц когезина позволяет различать две поверхности взаимодействия петлевых доменов между собой. Одну из них, более удаленную от головных доменов, принято называть северной, другую – южной (рис. 2, б).

Плечевой домен каждого из SMC-белков представляет собой пару антипараллельных суперспирализованных α-спиралей (coiled coil), каждая из которых состоит из 300–400 а.о. Суперспираль плечевого домена имеет дефекты, в которых одна или обе антипараллельных цепи теряют регулярную α-спиральную структуру [19]. Два таких разрыва в суперспирали плечевого домена обладают высокой эволюционной консервативностью и, по всей вероятности, играют важную роль в активности

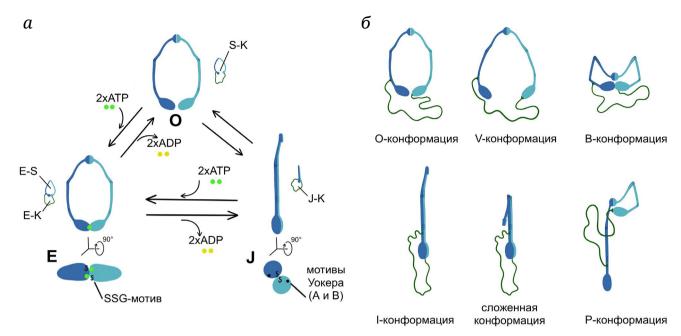


Рис. 3. Разнообразие конформационных состояний когезина. a — 0-, E- и J-конфигурации головных доменов когезина и переходы между ними, RAD21-субъединица не показана для ясности рисунка. На пиктограммах обозначены S-K-кольцо и субкомпартменты (E-S, E-K и J-K), образуемые при взаимодействии головных доменов между собой. b — Основные конформационные состояния когезина, обнаруженные с помощью микроскопических методов

SMC-комплексов. Первый, расположенный около середины плечевого домена, чуть ближе к димеру петлевых доменов, получил название «локоть» (elbow) (рис. 2, a). Эта область обеспечивает механическую гибкость плечевых доменов: одновременное сгибание локтевых регионов обеих SMC-субъединиц комплекса может приводить к сближению петлевых доменов с головными доменами (рис. 3, б). Второй консервативный разрыв суперспирали находится вблизи головного домена, на расстоянии примерно 50 а.о., его принято называть «суставом» (joint) (рис. 2, a). «Суставы» SMC-субъединиц являются важными хабами взаимодействия с дополнительными субъединицами комплекса [25], также они принимают участие в движениях головных доменов друг относительно

Головные домены SMC-белков представляют собой ATPазы ABC-типа [16, 27]. Как и другие ABC-белки, когезин способен гидролизовать ATP исключительно при физическом взаимодействии двух ATPазных доменов в составе димера (рис. 3, а) [28, 29]. Головной домен одной из субъединиц димера связывает ATP, а головной домен другой необходим для гидролиза связанной молекулы. Каждый цикл когезин-зависимого гидролиза ATP включает связывание ATP каждым из головных доменов, в результате чего в каждом цикле гидролиза расходуется две молекулы ATP. Взаимодействие головных доменов SMC-субъединиц прекращается при гидролизе нуклеозидтрифосфата

и вновь устанавливается при связывании новой пары молекул АТР. Таким образом, в отличие от взаимодействия петлевых доменов между собой, димеризация головных доменов зависит от субстрата и носит динамический характер (рис. 3, *a*).

С точки зрения структуры АВС-АТРаза головного домена – это глобула, ядром которой является незамкнутый β-цилиндр с β-цепями, принадлежащими как N-, так и C-концевой части SMC-белка [9, 16, 28]. На одном из полюсов β-цилиндра располагаются две консервативные каталитически значимые последовательности: мотив Уокера А (также называемый Р-петлей или фосфат-связывающей петлей) и мотив Уокера В. Оба этих мотива характерны не только для всех представителей суперсемейства АВС-АТРаз, но и для более обширной монофилетической группы белков, называемых «NTPазами с P-петлей» (P-loop NTPases) [27]. Мотив Уокера A, расположенный в N-концевой части, отвечает за связывание β- и γ-фосфатных групп молекулы АТР. Мотив Уокера В расположен в С-концевой части и отвечает за координацию Mg^{2+} в активном центре. В отличие от других «NTPаз с Р-петлей», для эффективного гидролиза фосфатной связи АВС-АТРазами требуется сближение нуклеозидтрифосфата, связанного мотивами Уокера А и В, с остатком серина в составе так называемого SGG-мотива. SGG-Мотив также расположен в головном домене, но на сравнительно большом расстоянии от АТР-связывающего β-цилиндра, поэтому такое сближение невозможно в рамках головного домена SMC-мономера, оно может реализовываться только между ATP-связывающим участком одного головного домена и SGG-мотивом другого при их димеризации (рис. 3, a). По этой причине ATPазная активность когезина реализуется только при физическом взаимодействии головных доменов двух SMC-субъединиц в составе комплекса.

Структурированные *N-* и *C-*концевые домены RAD21 взаимодействуют с головными доменами двух SMC-белков асимметрично (рис. 2, б) [30]. N-Концевой домен RAD21 связывается с участком плечевой суперспирали, непосредственно выходящей из головного домена SMC3. Участок плечевого домена, с которым связывается *N*-концевой домен клейзина, расположенный между головным доменом и «суставом», называют «шеей» (neck). Фрагмент шейного участка суперспирали SMC3 взаимодействует с двумя N-концевыми α-спиралями RAD21 с образованием четырехспирального α-пучка [30, 31]. С-Концевой глобулярный домен RAD21 имеет укладку типа «крылатая спираль» (winged-helix fold) и взаимодействует с вершиной головного домена SMC1 [32].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ НАWK-БЕЛКОВ С КЛЕЙЗИНОВОЙ СУБЪЕДИНИЦЕЙ

Коровый тример когезина взаимодействует с тремя дополнительными субъединицами: STAG1/2² (Scc3), PDS5A/B (Pds5) и NIPBL (Scc2). Дополнительные субъединицы участвуют в связывании комплекса с ДНК и регуляции его активности [1–3]. В значительной степени неупорядоченная центральная часть RAD21 является основным местом взаимодействия корового тримера с дополнительными субъединицами [33–35].

Все три дополнительные субъединицы когезина относятся к семейству НАWK-белков (НЕАТ proteins Associated With Kleisin, НЕАТ-белок, ассоциированный с клейзином) [15]. Это полностью α-спиральные структуры в форме крюков (рис. 2, в) [33, 36], состоящие из порядка 20 НЕАТ-повторов [37]. Каждый повтор состоит из 30–40 а.о., организованных в пару взаимодействующих антипараллельных амфипатических α-спиралей. α-Спирали каждого из НЕАТ-повторов уложены перпендикулярно оси крюка НАWK-субъединицы. Внутренняя часть изгиба крюка участвует во взаимодействии с клейзином.

STAG1/2 стабильно связывается с клейзином и, таким образом, является конститутивным компонентом комплекса [38]. NIPBL и PDS5A/В взаимодействуют с клейзином транзиентно; кроме того, две эти субъединицы конкурируют между собой за один сайт связывания [35]. Таким образом, в каждый момент времени комплекс может содержать одну (STAG1/2) или две (STAG1/2 + NIPBL или STAG1/2 + PDS5A/B) HAWK-субъединицы (рис. 2, б). Вхождение в состав когезина NIPBL или PDS5A/B кардинально изменяет активность комплекса [35]. NIPBL существенно повышает ATPазную активность комплекса [39, 40]. Эта субъединица абсолютно необходима для экструзионной активности когезина [40, 41]. PDS5A/B-Субъединица подавляет АТРазную активность, в ее присутствии к когезиновому кольцу может привлекаться белок WAPL, катализирующий отделение *N*-концевого участка RAD21 от SMC3-субъединицы [42, 43]. Ацетилирование SMC3-субъединицы, а также взаимодействия комплекса с другими компонентами хроматина, такими как инсуляторный белок СТСГ, регулируют связывание NIPBL и PDS5A/В с когезиновым кольцом [25, 44-46].

КОНФОРМАЦИОННЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ КОГЕЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА

Функционирование всех белков так или иначе связано с лиганд-зависимыми изменениями конформации. SMC-Комплексы демонстрируют способность к радикальным конформационным перестроениям, которые и обеспечивают их моторную активность.

Разнообразные микроскопические техники, рентгеноструктурный анализ, а также непрямые методы определения конформации, такие как анализ ферстеровского переноса энергии (Förster Resonance Energy Transfer, FRET), химическое сшивание и анализ устойчивости ДНК-белковых комплексов к физико-химическим воздействиям, позволили задокументировать широкий спектр различных конформационных состояний когезина (рис. 3, б) [3, 4].

Все многообразие известных конформаций можно в значительной мере описать тремя параметрами: (1) наличием или отсутствием контакта между головными доменами двух SMC-субъединиц, (2) расстоянием между петлевыми и головными доменами, изменяющимся при сгибании «локтей», (3) расстоянием между плечевыми

 $^{^2}$ Геномы позвоночных, как правило, кодируют по паре паралогичных HAWK-субъединиц типа Scc3 и Pds5, экспрессирующихся в соматических клетках: STAG1/STAG2 и PDS5A/PDS5B. Эти паралоги в большинстве случаев структурно и функционально эквивалентны, поэтому далее в тексте мы будем использовать обозначения STAG1/2 и PDS5A/B.

суперспиралями двух SMC-субъединиц. Так, в І-конформации и в сложенной конформации головные домены контактируют между собой, а плечевые суперспирали взаимодействуют по всей длине; отличие заключается в том, что в первой из конформаций плечевые домены находятся в выпрямленном состоянии, тогда как во второй в полностью согнутом. О- и В-конформации отличаются от предыдущей пары отсутствием взаимодействий между плечевыми доменами (рис. 3, б).

Часть конформационных перестроений когезина строго сопряжена со связыванием или гидролизом АТР, другие – происходят спонтанно. Вероятно, направление некоторых спонтанных перестроений может контролироваться прохождением цикла связывания/гидролиза АТР.

Димеризация головных доменов и гидролиз АТР. Связывание АТР индуцирует тесное взаимодействие между двумя головными доменами когезина, называемое E-состоянием (engaged state) [9, 28, 47]. Это короткоживущая структура, распадается при гидролизе АТР (рис. 3, а). За гидролизом АТР следует высвобождение продуктов гидролиза и изменение положения головных доменов друг относительно друга. Ранее считалось, что гидролиз АТР обязательно приводит к полному разобщению головных доменов, обозначаемому как О-состояние (open state). Однако оказалось, что даже при отсутствии АТР головные домены могут взаимодействовать в так называемом наложенном, J-состоянии (juxtaposed state), в котором SGG-мотивы двух SMC-белков оказываются сближены между собой [26, 48] (рис. 3, а). Так как это взаимодействие осуществляется за счет поверхностей, находящихся довольно далеко друг от друга в Е-состоянии, переход из Е-состояния в Ј-состояние и обратно сопряжен со значительным вращением головных доменов друг относительно друга.

Дополнительные конформационные изменения, сопряженные со связыванием и гидролизом АТР. Связывание АТР и взаимодействие головных доменов в Е-состоянии сопряжено с несколькими важными конформационными перестроениями: локальным разобщением плечевых доменов, временной диссоциацией клейзина от SMC3 и формированием между двумя головными доменами дополнительного мостика, образованного NIPBL [25, 44, 49].

В J- и E-состоянии суперспирали плечевого домена, непосредственно отходящие от головных доменов, строго позиционированы друг относительно друга. Несмотря на относительную гибкость плечевых доменов, сравнительно протяженные участки суперспирали, прилегающие к головным доменам, оказываются конститутивно разобщенными в E-состоянии [25, 44, 49]. В то же время в J-состоянии положение головных доме-

нов обеспечивает сближение суперспиральных участков SMC1 и SMC3 [26, 48]. Структурные данные указывают на то, что в J-состоянии плечевые домены контактируют друг с другом на всем протяжении (рис. 3, а). Таким образом, если при отсутствии ATP (в так называемой апо-форме) плечевые домены могут быть как разобщены, так и в разной степени взаимодействовать друг с другом, связывание ATP приводит к разобщению суперспиралей, по крайней мере в регионе, непосредственно прилегающем к головным доменам.

При взаимодействии головных доменов друг с другом в Е- и J-состоянии единый S-К-компартмент разделяется на пару компартментов: S и K, ограниченных соответственно SMC-димером и клейзиновой субъединицей (рис. 3, а). В зависимости от того, какова природа взаимодействия головных доменов, различают следующие субкомпартменты: Е-К, Е-S, J-К и J-S, причем последний в силу плотного контакта между суперспиралями плечевых доменов фактически лишен просвета.

Еще одно изменение конформации когезина, ассоциированное со связыванием ATP в активном центре, – кратковременное открытие так называемых *N*-клейзиновых ворот комплекса. В момент образования Е-состояния *N*-концевой домен RAD21 диссоциирует от своего сайта связывания на SMC3-субъединице [47, 49], что приводит к временному нарушению целостности компартмента Е-К.

Связывание АТР приводит также к изменениям паттерна взаимодействия NIPBL с другими субъединицами. Помимо своего основного сайта связывания в центральной части клейзина, NIPBL имеет дополнительные АТР-регулируемые сайты взаимодействия с SMC-субъединицами. При отсутствии ATP NIPBL взаимодействует с димером петлевых доменов, связывание АТР приводит к диссоциации NIPBL от петлевых доменов и привлечению к головному домену SMC3 [50]. Этот перескок NIPBL, по-видимому, стимулирует образование E-состояния, в котором NIPBL также образует дополнительные контакты с головным доменом SMC1 [25, 44, 49]. Во взаимодействии NIPBL с головным доменом SMC3 важную роль играет пара консервативных остатков лизина SMC3: K105/K106 (K112/K113 - в Smc3 S. cerevisiae), ацетилирование которых ацетилтрансферазой ESCO2 (Eco1) является ключевым фактором стабилизации когезивного связывания. После гидролиза ATP NIPBL теряет связь с головными доменами и восстанавливает свое взаимодействие с петлевыми участками [50].

Спонтанные изменения конформации когезинового комплекса. Микроскопические наблюдения, а также данные FRET указывают на то, что плечевые домены когезина и других SMC-комплексов являются довольно лабильными структурами

главным образом за счет возможности сгибания в локтевых участках [17, 19, 49–51]. Амплитуда этого сгибания достигает 180°, с максимальным сближением головных и петлевых доменов в полностью согнутом состоянии (рис. 3, б).

Обнаружение Ј-состояния и осознание того факта, что переходы между Е- и Ј-состояниями должны сопровождаться значительными изменениями во взаимном расположении плечевых доменов, привели к возникновению гипотезы, согласно которой сгибание и разгибание локтевых доменов может строго контролироваться циклом гидролиза АТР [19]. Однако полученные позже экспериментальные данные указывают на то, что сгибание и разгибание плечевых доменов происходит спонтанно [50].

Важнейшим следствием сгибания локтевых доменов является взаимодействие петлевых доменов с головными в полностью согнутом состоянии. Возможность временного взаимодействия между головными и петлевыми доменами лежит в основе многих механистических моделей, описывающих процесс SMC-зависимой экструзии [19, 50, 52, 53]. Несмотря на то что сгибание плечевых доменов само по себе спонтанно, есть указания на то, что может существовать храповой механизм, сопрягающий сгибание и гидролиз АТР. Так, предполагается, что полное сгибание локтевых доменов может быть необходимо для формирования Е-состояния [25, 44, 49, 50].

Еще одним спонтанным изменением архитектуры когезина является взаимодействие суперспиральных участков плечевых доменов, прилежащих к петлевым доменам. Такое взаимодействие распространяется от петлевых доменов в сторону локтей и, возможно, ассоциировано с закручиванием двух плечевых суперспиралей друг относительно друга [50]. Это закручивание может быть необходимо для сгибания локтевых участков.

РАЗНООБРАЗИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ КОГЕЗИНА С ДНК

Связывание с ДНК – ключевой аспект активности SMC-комплексов. У взаимодействия SMC-комплексов с ДНК есть две характерные черты: (1) изменение аффинности к ДНК разных участков комплекса при изменении конформации и (2) способность комплексов топологически надеваться на ДНК.

В отличие от классического электростатического взаимодействия, характерного для большинства ДНК-связывающих белков, топологическое связывание представляет собой качественно отличную модальность нековалентного взаимодействия, в рамках которой нет необходимости в прямом физическом контакте между ДНК-нитью и белком [1, 44]. При топологическом связывании ДНК оказывается продетой через замкнутое S-K-кольцо комплекса как нить, продетая через бисеринку (рис. 4, a). Таким образом, даже при отсутствии дополнительных электростатических взаимодействий комплекс оказывается стабильно связан с ДНК.

Когезин может взаимодействовать с ДНК и более классическим электростатическим способом: несколько положительно заряженных участков на поверхности комплекса обеспечивают этот тип связывания (рис. 5) [3, 50]. Важным принципом электростатических взаимодействий когезина с ДНК является кооперативность: отдельные небольшие сайты, разбросанные по разным субъединицам, как правило, не способны образовывать стабильные контакты с ДНК, достаточной аффинностью обладают составные поверхности, образованные сближением нескольких ДНК-связывающих участков разных субъединиц. Такие составные поверхности собираются в одних конформациях когезина и разбираются – в других. Динамически образуемые и разрушаемые ДНК-связывающие сайты являются важным компонентом сопряжения процессов гидролиза АТР, изменений конформации комплекса и его движения вдоль нити ДНК при экструзии.

Топологическое надевание когезина на **ДНК.** Когезин, как и едва ли не все другие SMCкомплексы, способен связывать ДНК топологически³. Три наблюдения легли в основу кольцевой гипотезы, согласно которой когезин может связывать ДНК топологически внутри трехчастного S-К-кольца [22, 54]: (1) структура комплекса, предполагающая наличие пространного топологически замкнутого компартмента [17, 55]; (2) способность к исключительно стабильным взаимодействиям с хроматином в G2-фазе [56, 57] и (3) моментальная дестабилизация этих взаимодействий при протеолизе клейзиновой субъединицы в анафазе [21, 58]. После более чем десятилетнего накопления косвенных свидетельств эта гипотеза была подтверждена напрямую, в экспериментах по ковалентному зашиванию когезиновых колец in vivo [7, 30, 48].

³ В определенных конформациях когезин в дополнение к S-K-кольцу способен образовывать топологически замкнутые субкомпартменты, в которых может находиться нить ДНК. К таким структурам относятся NIPBL-SMC3-субкомпартмент, E-S-, E-K- и J-K-субкомпартменты. Целостность таких субкомпартментов, в отличие от целостности S-K-кольца, обычно быстро нарушается. В тексте под топологическим связыванием мы всегда подразумеваем связывание внутри стабильного S-K-кольца.

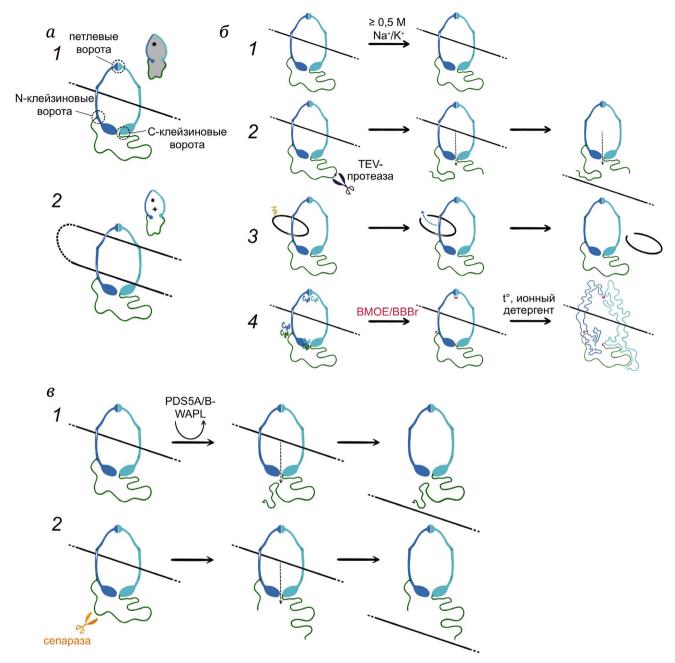


Рис. 4. Топологическое взаимодействие когезинового кольца с ДНК. а – Топологическое (1) и псевдотопологическое (2) взаимодействие когезина с ДНК. На пиктограммах с помощью символов • и + отражено направление прохождения ДНК-нити через плоскость рисунка, серой заливкой обозначено топологическое связывание. б – Методы выявления топологической природы взаимодействия между белковым комплексом и ДНК: анализ устойчивости связывания в буферах с высокой ионной силой (1); анализ чувствительности взаимодействия к протеолитическому расщеплению одной из субъединиц (2); анализ чувствительности к разрыву в молекуле ДНК (3); анализ устойчивости взаимодействия в денатурирующих условиях после ковалентной сшивки белкового кольца при помощи цистеин-специфических сшивающих агентов (ВМОЕ, bВВг) (4). в – Два пути снятия когезинового кольца с ДНК, реализуемые в эукариотических клетках: WAPL-зависимый (1) и протеолитический (2)

Ряд экспериментальных подходов был разработан для подтверждения топологического характера связывания белков и белковых комплексов с ДНК. На топологический характер взаимодействия могут указывать: (1) устойчивость связывания в буферах с высокой ионной силой [39, 56] (рис. 4, б (1)); (2) чувствительность взаимодействия к протео-

литическому расщеплению одной из субъединиц комплекса [22, 39] (рис. 4, б (2)); (3) чувствительность к двухцепочечному разрыву в молекуле ДНК (в тех случаях, когда во взаимодействии участвует кольцевая молекула ДНК) [39, 59] (рис. 4, б (3)); (4) устойчивость взаимодействия в денатурирующих условиях после ковалентной сшивки

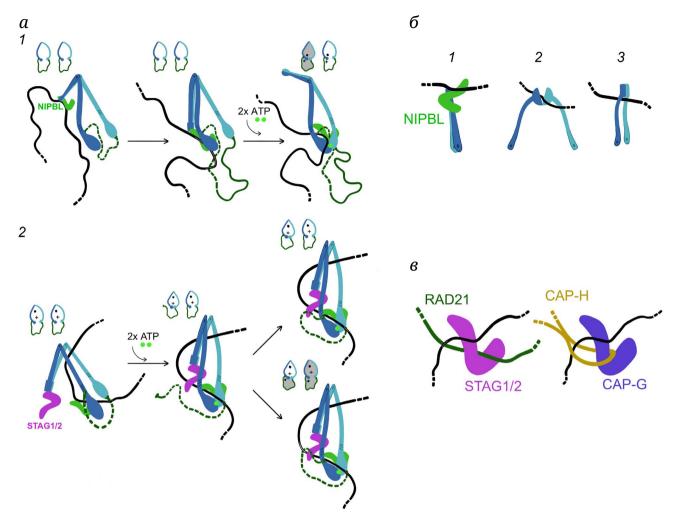


Рис. 5. Электростатические взаимодействия когезина с ДНК. *а* – Два гипотетических пути формирования «ДНК-захвата», предложенных для описания активности когезина *S. cerevisiae* (1) и *Schizosaccharomyces pombe* (2). На пиктограммах с помощью символов ● и + отражено направление прохождения ДНК-нити через плоскость рисунка, серой заливкой обозначено топологическое связывание. В парах пиктограмм, на левой отражено образование Е-S- и Е-К-субкомпартментов и положение ДНК-нитей относительно них, на правой − положение ДНК-нитей относительно S-K-кольца. Пунктирные части RAD21-субъединицы соответствуют областям, в которых путь белковой цепи для ясности рисунка показан условно (в действительности НАWK-субъединицы остаются связанными с RAD21 на всех представленных стадиях). б − Электростатические взаимодействия петлевых доменов когезина с ДНК. Показано три (не взаимоисключающих) сценария: опосредованное NIPBL-субъединицей взаимодействие (1), прямой контакт ДНК с внутренней поверхностью поры петлевых доменов (2) и прямой контакт ДНК с южным полюсом димера петлевых доменов (3). в − Взаимодействие НАWK-В субъединиц когезина (STAG1/2) и конденсина (CAP-G) с ДНК. Пептидная петля, называемая «ремнем безопасности», формируемая клейзиновой субъединицей конденсина (САР-Н), дополнительно стабилизирует связывание НАWK-В субъединицы (САР-G) с ДНК

белкового кольца [30, 60] (рис. 4, δ (4)). Выводы, сделанные на основании результатов, полученных в рамках первых трех из упомянутых экспериментальных подходов, носят в значительной степени предварительный характер, в то время как эксперименты по ковалентной сшивке белковых колец позволяют уверенно делать выводы о модальности связывания комплекса с ДНК.

Наиболее строгие доказательства того, что SMC-комплексы способны топологически взаимодействовать с ДНК, были получены при изучении ковалентно сшитых S-K-колец [7, 60, 61]. Разреше-

ние атомарной структуры трех участков взаимодействия между парами субъединиц S-К-кольца (димера петлевых доменов SMC1 и SMC3, N-концевого домена RAD21, взаимодействующего с шейным участком SMC3, и C-концевого домена RAD21, взаимодействующего с головным доменом SMC1) позволило методами генной инженерии модифицировать когезиновые комплексы так, чтобы S-К-компартменты могли быть ковалентно сшиты бифункциональными тиолспецифическими агентами типа бис-малеимидоэтана (ВМОЕ) или дибромобимана (bBBr). Сшиваемость достигается

за счет размещения трех пар цистеиновых остатков в перечисленных местах взаимодействия трех коровых субъединиц между собой таким образом, чтобы два цистеина в каждой паре были расположены на разных субъединицах комплекса на расстоянии не более 1 нм (рис. 4, δ (4)). Длинные линейные молекулы геномной ДНК и кольцевые плазмиды, топологически взаимодействующие с модифицированными когезиновыми комплексами, после обработки сшивающими агентами не могут быть отделены от белкового тримера даже в жестких денатурирующих условиях, это позволяет легко детектировать такие молекулы ДНК по уменьшению электрофоретической подвижности. Существование топологически взаимодействующих с ДНК когезиновых комплексов не только в искусственных in vitro системах, но и в живых клетках было окончательно подтверждено с помощью подобного подхода [7, 30, 48]. Помимо обнаружения самого факта топологического взаимодействия SMC-комплексов с ДНК, использование тиолспецифического сшивания дополнительных цистеиновых пар позволяет установить, в каких именно субкомпартментах S-K-кольца (E-S, E-K, J-S или Ј-К) удерживается ДНК (рис. 3, а) [44, 48, 62].

Для понимания физиологической активности когезина чрезвычайно важным является изучение механизмов формирования и терминации топологических взаимодействий S-K-кольца с ДНК. Теоретически такое взаимодействие может устанавливаться и разрушаться при временном разобщении одного из трех нековалентных взаимодействий, формирующих S-K-кольцо: контакта петлевых доменов SMC3 и SMC1 (петлевых ворот), контакта между клейзином и SMC3-субъединицей (N-клейзиновых ворот) или контакта между клейзином и SMC1 (С-клейзиновых ворот) (рис. 4, a (1)). Кроме того, топологическое взаимодействие когезина с ДНК может разрушаться при протеолизе одной из коровых субъединиц комплекса.

Механизмы терминации топологического связывания когезина поняты сравнительно хорошо. Установлено, что непротеолитическое снятие комплекса с ДНК (рис. 4, e(1)) осуществляется консервативным ядерным белком WAPL (Wpl1) (wingedapart like) и сопряжено с открытием N-клейзиновых ворот [42, 63, 64]. С-Концевой структурированный домен WAPL состоит из восьми НЕАТ-повторов и может взаимодействовать с головными доменами SMC1 и SMC3, сближенными в E-состоянии. Неструктурированный *N*-концевой домен содержит консервативные YSR- и FGF-мотивы, участвующие во взаимодействии с HAWK-субъединицами PDS5A/B и STAG1/2 [43]. WAPL не является постоянным компонентом когезинового комплекса, но может транзиентно взаимодействовать с PDS5A/Bсодержащими кольцами [42, 65]. Считается, что

связывание WAPL и высвобождение ДНК происходит во время нахождения комплекса в Е-состоянии. Формирование Е-состояния всегда приводит к кратковременному открытию *N*-клейзиновых ворот, однако WAPL стабилизирует комплекс в таком открытом состоянии, что увеличивает вероятность выхода ДНК из кольца [43, 66]. Для выхода из S-К-кольца по этому механизму ДНК-нить должна быть предварительно перемещена в Е-К-суб-компартмент. После высвобождения ДНК из комплекса происходит диссоциация WAPL и закрытие выходных ворот.

Топологическое взаимодействие когезина с ДНК разрушается также при протеолизе клейзиновой субъединицы в анафазе [21, 58, 67]. После прохождения анафазного чекпоинта сериновая протеаза сепараза разрезает центральную неструктурированную часть RAD21-субъединицы и таким образом высвобождает нити сестринских хроматид из топологического связывания с когезиновыми комплексами (рис. 4, 8 (2)).

Значительно меньше известно о том, как устанавливается топологическое связывание когезина с ДНК. В клетках и в *in vitro* системах способность когезина к гидролизу АТР, а также присутствие NIPBL и STAG1/2 необходимы для топологической погрузки комплекса [7, 44]. В то же время другие данные указывают на то, что по крайней мере *in vitro* комплекс PDS5A/B–WAPL может катализировать реакцию погрузки когезина на ДНК при отсутствии NIPBL-субъединицы [39, 68].

Неизвестными остаются не только детали механизма погрузки, но даже и то, какие именно ворота SMC-комплекса пропускают ДНК внутрь кольца. С одной стороны, считается, что образование Е-состояния сопровождается временным открытием *N*-клейзиновых ворот, через которые нить ДНК может проходить внутрь S-K-компартмента [49]. С другой стороны, показано, что комплексы с ковалентно закрытыми N- или C-клейзиновыми воротами могут, несмотря ни на что, эффективно топологически надеваться на ДНК [7]. Кроме того, показано, что положительно заряженные аминокислотные остатки, расположенные внутри поры между петлевыми доменами SMCбелков, необходимы для установления топологического взаимодействия между когезином и ДНК, что указывает на возможную роль петлевых ворот в этом процессе [7, 8].

В рамках гипотезы топологического взаимодействия когезина с ДНК с самого начала предполагалось, что S-К-кольцо может заключать в себе одновременно две нити ДНК, обеспечивая таким образом когезию сестринских хроматид в G2-фазе клеточного цикла [22, 54]. Впоследствии такой механизм когезии был подтвержден экспериментально [7, 48]. Некоторые из обсуждаемых в настоящее время моделей когезин-зависимой экструзии предполагают, что основания растущей петли также представляют собой две нити ДНК, удерживаемые внутри одного S-K-кольца [26, 53, 62]. Такая петля, в ходе формирования которой S-K-компартмент остается постоянно замкнутым, не содержит истинного топологического зацепления между SMC-комплексом и ДНК-нитью и является примером так называемых псевдотопологических взаимодействий (рис. 4, *a* (2)). В отличие от топологического надевания когезина на ДНК, псевдотопологическое взаимодействие пока что является в большей степени умозрительной моделью, нежели наблюдаемым феноменом.

Топологически надетые когезиновые комплексы способны к пассивной одномерной диффузии по ДНК-нити [23, 24]. *In vitro* исследования показали, что размер поры когезина позволяет таким комплексам преодолевать небольшие ДНКсвязанные белки при диффузии, однако нуклеосомные частицы диаметром 10 нм уже являются существенным препятствием, а частицы диаметром 20 нм становятся непреодолимыми барьерами для такого движения [23]. Предполагается, что псевдотопологически надетые когезиновые кольца также способны к диффузии по ДНК-нитям, удерживаемым внутри поры комплекса [40, 53].

«ДНК-захват»: транзиентное АТР-зависимое связывание головных доменов и NIPBL-субъединицы с ДНК. Важнейшим открытием в структурной биологии когезина стало обнаружение связи между образованием Е-состояния в присутствии АТР и связыванием ДНК. Было замечено, что когезиновые комплексы с ЕQ-мутациями в мотиве Уокера В (подавляющими АТРазную активность) в присутствии АТР, а также когезиновые комплексы дикого типа в присутствии негидролизуемых аналогов АТР образуют с ДНК стабильный комплекс, названный конфигурацией «ДНКзахвата» (gripping state/DNA clamping) [25, 44, 49]. Для образования такого комплекса также необходимо присутствие NIPBL, не являющегося постоянным компонентом когезина. Во время «захвата» двойная спираль взаимодействует с димеризованными головными доменами (рис. 5, а), кроме того, ДНК оказывается прижата к головному домену SMC3 при помощи NIPBL, который в присутствии АТР связывается с суставным участком плечевого домена SMC3 и головными доменами обеих SMCсубъединиц.

В конфигурации «захвата» сахарофосфатный остов ДНК образует серию электростатических взаимодействий с разными участками когезина: верхней поверхностью димера головных доменов SMC-субъединиц, ДНК-связывающей поверхностью NIPBL и *N*-концевым доменом RAD21. Все ДНК-связывающие сайты, участвующие в «ДНК-захвате»,

сближаются друг с другом и образуют небольшой канал, комплементарный связываемой двойной спирали ДНК, только на краткое время нахождения комплекса в конфигурации «захвата». После гидролиза АТР Е-состояние распадается, а вместе с ним разбирается составная ДНК-связывающая поверхность. Таким образом, в комплексах дикого типа «захват» является короткоживущим состоянием, образование и разрушение которого сопряжено со связыванием и гидролизом АТР.

В присутствии АТР, ДНК, NIPBL и когезина дикого типа происходит периодическое сближение головных доменов SMC и NIPBL-субъединицы между собой; при замене АТР на негидролизуемый аналог или при внесении ЕQ-мутаций это сближение становится конститутивным [49, 50]. Примечательно также, что при связывании АТР ДНК сначала взаимодействует с головным доменом SMC3 и NIPBL-субъединицей в так называемом «предзахвате» (pre-engaged clamp), и только после этого происходит сближение головных доменов между собой с образованием полноценной конфигурации «захвата» (рис. 5, *a* (1)) [50].

При отсутствии ДНК головные домены SMCбелков способны динамически взаимодействовать между собой с быстрым образованием и разрушением Е-состояния [49, 50]; добавление ДНК в систему не приводит к увеличению частоты таких взаимодействий [49, 50], однако значительно стимулирует АТРазную активность когезина [39, 40]. По всей видимости, ДНК увеличивает продуктивность взаимодействий между головными доменами за счет аллостерического влияния на активный центр и делает гидролиз АТР необходимым условием для разобщения головных доменов [50]. По этой причине каталитически неактивные (содержащие EQ-мутации) SMC-комплексы в присутствии ДНК и АТР оказываются замороженными в конфигурации «захвата» [44, 49].

Предложено два альтернативных сценария формировании «захвата». Данные, полученные с помощью тиолспецифического ковалентного перешивания когезина S. cerevisiae, показывают, что при формировании «захвата» ДНК-нить оказывается заключенной одновременно и в E-K-, и в E-Sсубкомпартментах. В то же время ДНК-нить не обнаруживается внутри S-K-компартмента, таким образом, предполагается, что в этом случае S-Kкольцо псевдотопологически захватывает небольшую петлю ДНК (рис. 5, a(1)) [44]. Предполагается, что образование такого комплекса происходит за счет того, что ДНК подходит к когезину со стороны разомкнутых головных доменов и, проходя через них перед образованием Е-состояния, оказывается одновременно заключенной в E-K- и в E-S-субкомпартментах (рис. 5, a(1)). В результате при формировании «захвата» S-К-кольцо не оказывается топологически надето на ДНК. На такой механизм указывают данные по кинетике входа ДНК в Е-К- и Е-S-субкомпартменты: для прохождения двух этих процессов достаточно очень короткой инкубации ДНК с когезином, и оба процесса при этом происходят с идентичной скоростью.

Результаты, полученные при изучении формирования «ДНК-захвата» когезином Schizosaccharomyces pombe, противоречат описанному выше сценарию [49]. Эти данные указывают на то, что небольшая ДНК-петля продевается внутрь S-Kкольца, после чего ближняя к головным доменам часть петли участвует в формировании «захваченного» состояния (рис. 5, a(2)). В момент образования головными доменами Е-состояния N-клейзиновые ворота временно открываются и могут в редких случаях пропускать ДНК внутрь S-K-кольца. Таким образом, в рамках этой модели «ДНК-захват» может быть одним из интермедиатов реакции топологической погрузки. Однако в рамках этой модели нить ДНК, как правило, не проходит через *N*-клейзиновые ворота при формировании «захвата», и большинство циклов гидролиза АТР не приводят к топологической погрузке комплекса.

Расшифровка механизма формирования «ДНКзахвата» имеет центральное значение для понимания механизмов когезин-зависимой экструзии и связи экструзии с топологическим надеванием S-K-колец на ДНК [4, 5, 53].

Электростатические взаимодействия петлевых доменов с ДНК. Димеризованные петлевые домены SMC-субъединиц когезина взаимодействуют с двухцепочечной ДНК электростатически [50, 69, 70]. При отсутствии АТР (в апо-форме комплекса) петлевые домены взаимодействуют с NIPBL [50], за счет чего, вероятно, образуется еще более сильный сайт, совмещающий ДНК-связывающие поверхности петлевых доменов и НАWК-субъединицы (рис. 5, б (1)). Связывание АТР головными доменами приводит к разрушению этого составного сайта и к уменьшению аффинности петлевых доменов к ДНК.

Достоверно не установлено, какие именно аминокислоты петлевых доменов участвуют в связывании ДНК (рис. 5, б (2 и 3)). Несмотря на то что консервативные положительно заряженные аминокислоты, выстилающие небольшую пору димера петлевых доменов, необходимы для прохода ДНК внутрь S-K-компартмента [7, 8], их физическое взаимодействие с ДНК до сих пор не было продемонстрировано. Пора слишком мала для того, чтобы удерживать внутри себя двухцепочечную ДНК; тем не менее некоторые авторы предполагают, что потеря контактов между петлевыми доменами на одном из полюсов димера может экспонировать внутреннюю поверхность поры для

связывания ДНК [7, 71] (рис. 5, δ (2)). Интересно, что одна из опубликованных структур когезинового комплекса в конфигурации «захвата» содержит петлевые домены с разобщенной северной димеризационной поверхностью [25].

По другим данным, за связывание с ДНК отвечают участки петлевых доменов на южном полюсе димера, смотрящие внутрь S-К-кольца, а также прилегающие к ним участки плечевых суперспиралей [50, 70] (рис. 5, δ (3)).

Участие STAG1/2 во взаимодействии ком**плекса с ДНК.** В отличие от NIPBL, который, по всей видимости, контактирует с ДНК исключительно в рамках составных сайтов, кооперируясь с головными или петлевыми доменами, STAG1/2 является более-менее автономным ДНК-связывающим модулем (что, однако, не исключает участия в кооперативном связывании); так, есть указания на то, что STAG1/2 взаимодействует с ДНК в захваченном состоянии в непосредственной близости от места взаимодействия с ДНК NIPBL-субъединицы [25]. Аминокислотные остатки, отвечающие за взаимодействия STAG1/2 с ДНК, локализуются в областях, гомологичных соответствующим ДНК-связывающим патчам на поверхности NIPBL (рис. 5, в). Основной такой областью является положительно заряженный желоб на боковой поверхности длинного *N*-концевого субдомена крючкообразной молекулы [50, 72]. Интересно, что электростатическое взаимодействие CAP-G/ CAP-G2-субъединицы конденсина – гомолога STAG1/2 – с ДНК дополнительно стабилизировано за счет того, что клейзиновая субъединица САР-Н/ САР-Н2 образует вокруг ДНК-нити, удерживаемой CAP-G/CAP-G2, нековалентно замкнутую пептидную петлю [62, 73, 74] (рис. 5, в). Эта петля, длиной порядка 100 a.o., называемая «ремнем безопасности», образована за счет контактов между двумя короткими гидрофобными фрагментами в срединной неглобулярной части клейзина. У клейзиновой субъединицы когезина, RAD21, по всей вероятности, отсутствует структура, подобная «ремню безопасности».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Некоторые характерные структурные особенности SMC-комплексов, такие как кольцевая архитектура и способность к топологическому надеванию на ДНК-нити, были описаны задолго до открытия процесса экструзии. Изучение способности когезина к топологическому надеванию на ДНК было сопряжено с выяснением молекулярных механизмов установления, поддержания и терминации когезии. Когезия, не связанная напрямую с экструзионной активностью, по всей видимости,

является, скорее, исключением, чем правилом: подавляющее большинство физиологических активностей когезина и других SMC-комплексов зависит от их способности к активному формированию ДНК-петель. Тот факт, что эти белковые комплексы, как оказалось, являются в первую очередь моторными белками, привлек дополнительный интерес к изучению их структуры.

Именно стремление расшифровать молекулярный механизм экструзии мотивирует интерес к структуре когезина в последние годы. Успехи в этой области во многом связаны с развитием экспериментальных техник, позволяющих изучать динамически изменчивую и в известной степени полиморфную структуру массивных мультисубъединичных SMC-комплексов. К таким техникам, внесшим в последнее время наиболее существенный вклад в развитие представлений о структуре когезина, относятся криоэлектронная микроскопия [25, 44, 49], атомно-силовая микроскопия [50], FRET [49, 50] и методы реконструкции процесса экструзии in vitro и микроскопического наблюдения за ним в реальном времени [8, 40]. Эти методы позволили установить множество отдельных молекулярных деталей процесса экструзии. Важнейшими из такого рода открытий являются обнаружение того, что в ходе экструзии происходит периодическое АТР-зависимое образование структуры, названной «ДНК-захватом», а также установление роли NIPBL-субъединицы в формировании этой структуры.

К сожалению, отдельные наблюдения, структурные, биохимические и генетические, все еще не складываются в целостную модель, описывающую процесс экструзии хроматиновых петель когезином (механистические модели этого процесса, базирующиеся на имеющихся данных о структуре и активности SMC-комплексов, представлены во втором обзоре серии [10]). Есть все основания предполагать, что накопление эмпирических данных, в первую очередь структурных, в ближайшие годы приведет к окончательному установлению молекулярного механизма SMC-зависимой экструзии.

Вклад авторов. Голов А.К. – обобщение данных, написание первоначального текста рукописи; Гаврилов А.А. – постановка проблемы, руководство и редактирование текста.

Благодарности. Авторы благодарят Разина С.В. за глубокое и плодотворное обсуждение многих тем, затронутых в этом обзоре. Также авторы выражают признательность Головой А.В. за помощь в подготовке иллюстраций.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00001).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Yatskevich, S., Rhodes, J., and Nasmyth, K. (2019) Organization of chromosomal DNA by SMC complexes, *Annu. Rev. Genet.*, **53**, 445-482, https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043633.
- 2. Gligoris, T., and Löwe, J. (2016) Structural insights into ring formation of cohesin and related Smc complexes, *Trends Cell Biol.*, **26**, 680-693, https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.04.002.
- 3. Lee, H., Noh, H., and Ryu, J.-K. (2021) Structure-function relationships of SMC protein complexes for DNA loop extrusion, *Biodesign*, **9**, 1-13, https://doi.org/10.34184/kssb.2021.9.1.1.
- 4. Davidson, I. F., and Peters, J.-M. (2021) Genome folding through loop extrusion by SMC complexes, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **22**, 445-464, https://doi.org/10.1038/s41580-021-00349-7.
- 5. Oldenkamp, R., and Rowland, B. D. (2022) A walk through the SMC cycle: from catching DNAs to shaping the genome, *Mol. Cell*, **82**, 1616-1630, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.04.006.
- 6. Kabirova, E., Nurislamov, A., Shadskiy, A., Smirnov, A., Popov, A., Salnikov, P., Battulin, N., and Fishman, V. (2023) Function and evolution of the loop extrusion machinery in animals, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 5017, https://doi.org/10.3390/ijms24055017.
- 7. Srinivasan, M., Scheinost, J. C., Petela, N. J., Gligoris, T. G., Wissler, M., Ogushi, S., Collier, J. E., Voulgaris, M., Kurze, A., Chan, K.-L., Hu, B., Costanzo, V., and Nasmyth, K. A. (2018) The cohesin ring uses its hinge to organize DNA using non-topological as well as topological mechanisms, *Cell*, **173**, 1508-1519.e18, https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.015.
- 8. Nagasaka, K., Davidson, I. F., Stocsits, R. R., Tang, W., Wutz, G., Batty, P., Panarotto, M., Litos, G., Schleiffer, A., Gerlich, D. W., and Peters, J.-M. (2023) Cohesin mediates DNA loop extrusion and sister chromatid cohesion by distinct mechanisms, *Mol. Cell*, **83**, 3049-3063.e6, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.07.024.
- 9. Arumugam, P., Nishino, T., Haering, C. H., Gruber, S., and Nasmyth, K. (2006) Cohesin's ATPase activity is stimulated by the C-terminal winged-helix domain of Its kleisin subunit, *Curr. Biol.*, **16**, 1998-2008, https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.002.

- 10. Golov, A. K., and Gavrilov, A. A. (2024) Cohesin-dependent loop extrusion: molecular mechanics and role in cell physiology, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 601-625, https://doi.org/S0006297924040023.
- 11. Nasmyth, K., and Haering, C. H. (2005) The structure and function of SMC and kleisin complexes, *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 595-648, https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133219.
- 12. Cobbe, N., and Heck, M. M. S. (2004) The evolution of SMC proteins: phylogenetic analysis and structural implications, *Mol. Biol. Evol.*, **21**, 332-347, https://doi.org/10.1093/molbev/msh023.
- 13. Schleiffer, A., Kaitna, S., Maurer-Stroh, S., Glotzer, M., Nasmyth, K., and Eisenhaber, F. (2003) Kleisins: a superfamily of bacterial and eukaryotic SMC protein partners, *Mol. Cell*, **11**, 571-575, https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00108-4.
- 14. Harvey, S. H., Krien, M. J. E., and O'Connell, M. J. (2002) Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins, a family of conserved ATPases, *Genome Biol.*, 3, REVIEWS3003, https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-2-reviews3003.
- 15. Wells, J. N., Gligoris, T. G., Nasmyth, K. A., and Marsh, J. A. (2017) Evolution of condensin and cohesin complexes driven by replacement of Kite by Hawk proteins, *Curr. Biol.*, **27**, R17-R18, https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.050.
- 16. Löwe, J., Cordell, S. C., and van den Ent, F. (2001) Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted, *J. Mol. Biol.*, **306**, 25-35, https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4379.
- 17. Haering, C. H., Löwe, J., Hochwagen, A., and Nasmyth, K. (2002) Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex, *Mol. Cell*, **9**, 773-788, https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00515-4.
- 18. Kurze, A., Michie, K. A., Dixon, S. E., Mishra, A., Itoh, T., Khalid, S., Strmecki, L., Shirahige, K., Haering, C. H., Löwe, J., and Nasmyth, K. (2011) A positively charged channel within the Smc1/Smc3 hinge required for sister chromatid cohesion, *EMBO J.*, **30**, 364-378, https://doi.org/10.1038/emboj.2010.315.
- 19. Bürmann, F., Lee, B.-G., Than, T., Sinn, L., O'Reilly, F. J., Yatskevich, S., Rappsilber, J., Hu, B., Nasmyth, K., and Löwe, J. (2019) A folded conformation of MukBEF and cohesin, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 227-236, https://doi.org/10.1038/s41594-019-0196-z.
- 20. Melby, T. E., Ciampaglio, C. N., Briscoe, G., and Erickson, H. P. (1998) The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge, *J. Cell Biol.*, **142**, 1595-1604, https://doi.org/10.1083/jcb.142.6.1595.
- 21. Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M. A., Koonin, E. V., and Nasmyth, K. (2000) Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast, *Cell*, **103**, 375-386, https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00130-6.
- 22. Gruber, S., Haering, C. H., and Nasmyth, K. (2003) Chromosomal cohesin forms a ring, *Cell*, **112**, 765-777, https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00162-4.
- 23. Stigler, J., Çamdere, G. Ö., Koshland, D. E., and Greene, E. C. (2016) Single-molecule imaging reveals a collapsed conformational state for DNA-bound cohesin, *Cell Rep.*, 15, 988-998, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.003.
- 24. Davidson, I. F., Goetz, D., Zaczek, M. P., Molodtsov, M. I., Huis In 't Veld, P. J., Weissmann, F., Litos, G., Cisneros, D. A., Ocampo-Hafalla, M., Ladurner, R., Uhlmann, F., Vaziri, A., and Peters, J.-M. (2016) Rapid movement and transcriptional re-localization of human cohesin on DNA, *EMBO J.*, **35**, 2671-2685, https://doi.org/10.15252/embj. 201695402.
- 25. Shi, Z., Gao, H., Bai, X.-C., and Yu, H. (2020) Cryo-EM structure of the human cohesin-NIPBL-DNA complex, *Science*, **368**, 1454-1459, https://doi.org/10.1126/science.abb0981.
- 26. Diebold-Durand, M.-L., Lee, H., Ruiz Avila, L. B., Noh, H., Shin, H.-C., Im, H., Bock, F. P., Bürmann, F., Durand, A., Basfeld, A., Ham, S., Basquin, J., Oh, B.-H., and Gruber, S. (2017) Structure of full-length SMC and rearrangements required for chromosome organization, *Mol. Cell*, 67, 334-347.e5, https://doi.org/10.1016/j.molcel. 2017.06.010.
- 27. Krishnan, A., Burroughs, A. M., Iyer, L. M., and Aravind, L. (2020) Comprehensive classification of ABC ATPases and their functional radiation in nucleoprotein dynamics and biological conflict systems, *Nucleic Acids Res.*, 48, 10045-10075, https://doi.org/10.1093/nar/gkaa726.
- 28. Lammens, A., Schele, A., and Hopfner, K.-P. (2004) Structural biochemistry of ATP-driven dimerization and DNA-stimulated activation of SMC ATPases, *Curr. Biol.*, **14**, 1778-1782, https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.044.
- 29. Arumugam, P., Gruber, S., Tanaka, K., Haering, C. H., Mechtler, K., and Nasmyth, K. (2003) ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes, *Curr. Biol.*, **13**, 1941-1953, https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.036.
- 30. Gligoris, T. G., Scheinost, J. C., Bürmann, F., Petela, N., Chan, K.-L., Uluocak, P., Beckouët, F., Gruber, S., Nasmyth, K., and Löwe, J. (2014) Closing the cohesin ring: structure and function of its Smc3-kleisin interface, *Science*, **346**, 963-967, https://doi.org/10.1126/science.1256917.
- 31. Bürmann, F., Shin, H.-C., Basquin, J., Soh, Y.-M., Giménez-Oya, V., Kim, Y.-G., Oh, B.-H., and Gruber, S. (2013) An asymmetric SMC-kleisin bridge in prokaryotic condensin, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 371-379, https://doi.org/10.1038/nsmb.2488.
- 32. Haering, C. H., Schoffnegger, D., Nishino, T., Helmhart, W., Nasmyth, K., and Löwe, J. (2004) Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction, *Mol. Cell*, **15**, 951-964, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.030.

- 33. Roig, M. B., Löwe, J., Chan, K.-L., Beckouët, F., Metson, J., and Nasmyth, K. (2014) Structure and function of cohesin's Scc3/SA regulatory subunit, *FEBS Lett.*, **588**, 3692-3702, https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.08.015.
- 34. Lee, B.-G., Roig, M. B., Jansma, M., Petela, N., Metson, J., Nasmyth, K., and Löwe, J. (2016) Crystal structure of the cohesin gatekeeper Pds5 and in complex with kleisin Scc1, *Cell Rep.*, **14**, 2108-2115, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.020.
- 35. Petela, N. J., Gligoris, T. G., Metson, J., Lee, B.-G., Voulgaris, M., Hu, B., Kikuchi, S., Chapard, C., Chen, W., Rajendra, E., Srinivisan, M., Yu, H., Löwe, J., and Nasmyth, K. A. (2018) Scc2 is a potent activator of Cohesin's ATPase that promotes loading by binding Scc1 without Pds5, *Mol. Cell*, 70, 1134-1148.e7, https://doi.org/10.1016/j.molcel. 2018.05.022.
- 36. Ouyang, Z., Zheng, G., Tomchick, D. R., Luo, X., and Yu, H. (2016) Structural basis and IP6 requirement for Pds5-dependent cohesin dynamics, *Mol. Cell*, **62**, 248-259, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.033.
- 37. Neuwald, A. F., and Hirano, T. (2000) HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions, *Genome Res.*, **10**, 1445-1452, https://doi.org/10.1101/gr.147400.
- 38. Losada, A., Yokochi, T., Kobayashi, R., and Hirano, T. (2000) Identification and characterization of SA/Scc3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes, *J. Cell Biol.*, **150**, 405-416, https://doi.org/10.1083/jcb.150.3.405.
- 39. Murayama, Y., and Uhlmann, F. (2014) Biochemical reconstitution of topological DNA binding by the cohesin ring, *Nature*, **505**, 367-371, https://doi.org/10.1038/nature12867.
- 40. Davidson, I. F., Bauer, B., Goetz, D., Tang, W., Wutz, G., and Peters, J.-M. (2019) DNA loop extrusion by human cohesin, *Science*, **366**, 1338-1345, https://doi.org/10.1126/science.aaz3418.
- 41. Kim, Y., Shi, Z., Zhang, H., Finkelstein, I. J., and Yu, H. (2019) Human cohesin compacts DNA by loop extrusion, *Science*, **366**, 1345-1349, https://doi.org/10.1126/science.aaz4475.
- 42. Kueng, S., Hegemann, B., Peters, B. H., Lipp, J. J., Schleiffer, A., Mechtler, K., and Peters, J.-M. (2006) Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin, *Cell*, **127**, 955-967, https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.040.
- 43. Ouyang, Z., Zheng, G., Song, J., Borek, D. M., Otwinowski, Z., Brautigam, C. A., Tomchick, D. R., Rankin, S., and Yu, H. (2013) Structure of the human cohesin inhibitor Wapl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 11355-11360, https://doi.org/10.1073/pnas.1304594110.
- 44. Collier, J. E., Lee, B.-G., Roig, M. B., Yatskevich, S., Petela, N. J., Metson, J., Voulgaris, M., Gonzalez Llamazares, A., Löwe, J., and Nasmyth, K. A. (2020) Transport of DNA within cohesin involves clamping on top of engaged heads by Scc2 and entrapment within the ring by Scc3, *Elife*, **9**, e59560, https://doi.org/10.7554/eLife.59560.
- 45. Nora, E. P., Caccianini, L., Fudenberg, G., So, K., Kameswaran, V., Nagle, A., Uebersohn, A., Hajj, B., Saux, A. L., Coulon, A., Mirny, L. A., Pollard, K. S., Dahan, M., and Bruneau, B. G. (2020) Molecular basis of CTCF binding polarity in genome folding, *Nat. Commun.*, **11**, 5612, https://doi.org/10.1038/s41467-020-19283-x.
- 46. Dauban, L., Montagne, R., Thierry, A., Lazar-Stefanita, L., Bastié, N., Gadal, O., Cournac, A., Koszul, R., and Beckouët, F. (2020) Regulation of cohesin-mediated chromosome folding by Eco1 and other partners, *Mol. Cell*, 77, 1279-1293.e4, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.01.019.
- 47. Muir, K. W., Li, Y., Weis, F., and Panne, D. (2020) The structure of the cohesin ATPase elucidates the mechanism of SMC-kleisin ring opening, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 233-239, https://doi.org/10.1038/s41594-020-0379-7.
- 48. Chapard, C., Jones, R., van Oepen, T., Scheinost, J. C., and Nasmyth, K. (2019) Sister DNA entrapment between Juxtaposed Smc heads and Kleisin of the cohesin complex, *Mol. Cell*, **75**, 224-237.e5, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.023.
- 49. Higashi, T. L., Eickhoff, P., Sousa, J. S., Locke, J., Nans, A., Flynn, H. R., Snijders, A. P., Papageorgiou, G., O'Reilly, N., Chen, Z. A., O'Reilly, F. J., Rappsilber, J., Costa, A., and Uhlmann, F. (2020) A structure-based mechanism for DNA entry into the cohesin ring, *Mol. Cell*, 79, 917-933.e9, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.07.013.
- 50. Bauer, B. W., Davidson, I. F., Canena, D., Wutz, G., Tang, W., Litos, G., Horn, S., Hinterdorfer, P., and Peters, J.-M. (2021) Cohesin mediates DNA loop extrusion by a "swing and clamp" mechanism, *Cell*, **184**, 5448-5464.e22, https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.016.
- 51. Hons, M. T., Huis In 't Veld, P. J., Kaesler, J., Rombaut, P., Schleiffer, A., Herzog, F., Stark, H., and Peters, J.-M. (2016) Topology and structure of an engineered human cohesin complex bound to Pds5B, *Nat. Commun.*, 7, 12523, https://doi.org/10.1038/ncomms12523.
- 52. Ryu, J.-K., Katan, A. J., van der Sluis, E. O., Wisse, T., de Groot, R., Haering, C. H., and Dekker, C. (2020) The condensin holocomplex cycles dynamically between open and collapsed states, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 1134-1141, https://doi.org/10.1038/s41594-020-0508-3.
- 53. Higashi, T. L., Pobegalov, G., Tang, M., Molodtsov, M. I., and Uhlmann, F. (2021) A Brownian ratchet model for DNA loop extrusion by the cohesin complex, *Elife*, **10**, e67530, https://doi.org/10.7554/eLife.67530.
- 54. Huang, C. E., Milutinovich, M., and Koshland, D. (2005) Rings, bracelet or snaps: fashionable alternatives for Smc complexes, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **360**, 537-542, https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1609.

- 55. Anderson, D. E., Losada, A., Erickson, H. P., and Hirano, T. (2002) Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles, *J. Cell Biol.*, **156**, 419-424, https://doi.org/10.1083/jcb.200111002.
- 56. Ciosk, R., Shirayama, M., Shevchenko, A., Tanaka, T., Toth, A., Shevchenko, A., and Nasmyth, K. (2000) Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins, *Mol. Cell*, 5, 243-254, https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80420-7.
- 57. Gerlich, D., Koch, B., Dupeux, F., Peters, J.-M., and Ellenberg, J. (2006) Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication, *Curr. Biol.*, **16**, 1571-1578, https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.068.
- 58. Uhlmann, F., Lottspeich, F., and Nasmyth, K. (1999) Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1, *Nature*, **400**, 37-42, https://doi.org/10.1038/21831.
- 59. Minamino, M., Higashi, T. L., Bouchoux, C., and Uhlmann, F. (2018) Topological *in vitro* loading of the budding yeast cohesin ring onto DNA, *Life Sci. Alliance*, 1, e201800143, https://doi.org/10.26508/lsa.201800143.
- 60. Haering, C. H., Farcas, A.-M., Arumugam, P., Metson, J., and Nasmyth, K. (2008) The cohesin ring concatenates sister DNA molecules, *Nature*, **454**, 297-301, https://doi.org/10.1038/nature07098.
- 61. Wilhelm, L., Bürmann, F., Minnen, A., Shin, H.-C., Toseland, C. P., Oh, B.-H., and Gruber, S. (2015) SMC condensin entraps chromosomal DNA by an ATP hydrolysis dependent loading mechanism in *Bacillus subtilis*, *Elife*, **4**, e06659, https://doi.org/10.7554/eLife.06659.
- 62. Shaltiel, I. A., Datta, S., Lecomte, L., Hassler, M., Kschonsak, M., Bravo, S., Stober, C., Ormanns, J., Eustermann, S., and Haering, C. H. (2022) A hold-and-feed mechanism drives directional DNA loop extrusion by condensin, *Science*, 376, 1087-1094, https://doi.org/10.1126/science.abm4012.
- 63. Chan, K.-L., Roig, M. B., Hu, B., Beckouët, F., Metson, J., and Nasmyth, K. (2012) Cohesin's DNA exit gate is distinct from its entrance gate and is regulated by acetylation, *Cell*, **150**, 961-974, https://doi.org/10.1016/j.cell. 2012.07.028.
- 64. Huis in 't Veld, P. J., Herzog, F., Ladurner, R., Davidson, I. F., Piric, S., Kreidl, E., Bhaskara, V., Aebersold, R., and Peters, J.-M. (2014) Characterization of a DNA exit gate in the human cohesin ring, *Science*, **346**, 968-972, https://doi.org/10.1126/science.1256904.
- 65. Gandhi, R., Gillespie, P. J., and Hirano, T. (2006) Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase, *Curr. Biol.*, **16**, 2406-2417, https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.061.
- 66. Ouyang, Z., and Yu, H. (2017) Releasing the cohesin ring: a rigid scaffold model for opening the DNA exit gate by Pds5 and Wapl, *Bioessays*, **39**, 1600207, https://doi.org/10.1002/bies.201600207.
- 67. Hauf, S., Waizenegger, I. C., and Peters, J. M. (2001) Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells, *Science*, **293**, 1320-1323, https://doi.org/10.1126/science.1061376.
- 68. Murayama, Y., Samora, C. P., Kurokawa, Y., Iwasaki, H., and Uhlmann, F. (2018) Establishment of DNA-DNA interactions by the cohesin ring, *Cell*, **172**, 465-477.e15, https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.021.
- 69. Chiu, A., Revenkova, E., and Jessberger, R. (2004) DNA interaction and dimerization of eukaryotic SMC hinge domains, *J. Biol. Chem.*, **279**, 26233-26242, https://doi.org/10.1074/jbc.M402439200.
- 70. Soh, Y.-M., Bürmann, F., Shin, H.-C., Oda, T., Jin, K. S., Toseland, C. P., Kim, C., Lee, H., Kim, S. J., Kong, M.-S., Durand-Diebold, M.-L., Kim, Y.-G., Kim, H. M., Lee, N. K., Sato, M., Oh, B.-H., and Gruber, S. (2015) Molecular basis for SMC rod formation and its dissolution upon DNA binding, *Mol. Cell*, 57, 290-303, https://doi.org/10.1016/j.molcel. 2014.11.023.
- 71. Griese, J. J., Witte, G., and Hopfner, K.-P. (2010) Structure and DNA binding activity of the mouse condensin hinge domain highlight common and diverse features of SMC proteins, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 3454-3465, https://doi.org/10.1093/nar/gkq038.
- 72. Li, Y., Muir, K. W., Bowler, M. W., Metz, J., Haering, C. H., and Panne, D. (2018) Structural basis for Scc3-dependent cohesin recruitment to chromatin, *Elife*, 7, e38356, https://doi.org/10.7554/eLife.38356.
- 73. Kschonsak, M., Merkel, F., Bisht, S., Metz, J., Rybin, V., Hassler, M., and Haering, C. H. (2017) Structural basis for a safety-belt mechanism that anchors condensin to chromosomes, *Cell*, **171**, 588-600.e24, https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.008.
- 74. Lee, B.-G., Rhodes, J., and Löwe, J. (2022) Clamping of DNA shuts the condensin neck gate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119**, e2120006119, https://doi.org/10.1073/pnas.2120006119.

THE COHESIN COMPLEX: STRUCTURE AND PRINCIPLES OF INTERACTION WITH DNA

Review

A. K. Golov^{1,2*} and A. A. Gavrilov^{1*}

¹ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; e-mail: golovstein@gmail.com; aleksey.a.gavrilov@gmail.com ² Technion – Israel Institute of Technology, 3525433 Haifa, Israel

Accurate duplication and separation of long linear genomic DNA molecules is associated with a number of purely mechanical problems. SMC complexes are key components of the cellular machinery that ensures decatenation of sister chromosomes and compaction of genomic DNA during division. Cohesin, one of the essential eukaryotic SMC complexes, has a typical ring structure with intersubunit pore through which DNA molecules can be threaded. The capacity of cohesin for such topological entrapment of DNA is crucial for the phenomenon of post-replicative association of sister chromatids better known as cohesion. Recently, it became apparent that cohesin and other SMC complexes are in fact motor proteins with a very peculiar movement pattern leading to the formation of DNA loops. This specific process was called loop extrusion. Extrusion underlies multiple cohesin's functions beyond cohesion, but the molecular mechanism of the process remains a mystery. In this review, we have summarized data on the molecular architecture of cohesin, the influence of ATP hydrolysis cycle on this architecture, and the known modes of cohesin–DNA interactions. Many of the seemingly disparate facts presented here will probably be incorporated in a unified mechanistic model of loop extrusion in a not so far future.

Keywords: SMC complexes, cohesin, SMC subunits, kleisin, HAWK subunits, cohesion, topological entrapment, loop extrusion, DNA gripping state

УДК 577.29;576.315.42

КОГЕЗИН-ЗАВИСИМАЯ ЭКСТРУЗИЯ: РОЛЬ В КЛЕТОЧНОЙ ФИЗИОЛОГИИ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕХАНИКА

Обзор

© 2024 А.К. Голов^{1,2*}, А.А. Гаврилов^{1*}

 1 Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия; электронная почта: golovstein@gmail.com; aleksey.a.gavrilov@gmail.com 2 Технион – Израильский технологический институт, 3525433 Хайфа, Израиль

Поступила в редакцию 21.10.2023 После доработки 29.12.2023 Принята к публикации 15.02.2024

Наиболее известные представители группы белковых комплексов, называемых SMC-комплексами, когезин и конденсин, знакомы многим как структурные компоненты митотических хромосом. Как выяснилось, эти комплексы, а также их бактериальные гомологи являются молекулярными машинами, ATP-зависимое движение которых по ДНК-нитям приводит к формированию ДНК-петель. В последние годы мы наблюдаем лавинообразное накопление данных о процессе SMC-зависимого выпетливания ДНК, называемого экструзией. Этот обзор кратко суммирует современные представления о месте и роли когезин-зависимой экструзии в физиологии клетки, в нем также представлены наиболее убедительные модели, предложенные для описания молекулярного механизма экструзии. Мы завершаем обзор обсуждением того, каким образом способность когезина к экструзии может быть механистически взаимосвязана с его участием в когезии сестринских хроматид.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: когезин, SMC-комплексы, экструзия, когезия, «ДНК-захват».

DOI: 10.31857/S0320972524040024 **EDN:** ZGQQPS

ВВЕДЕНИЕ

Когезин – это белковый комплекс, абсолютно необходимый для воспроизведения эукариотических клеток [1, 2]. Белки, входящие в состав когезина, были открыты более 25 лет назад как факторы, участвующие в сцеплении сестринских хроматид между собой в митозе [3–5]. Позже выяснилось, что этот феномен, получивший название «когезия», основан на том, что пары сестринских хромосом после репликации оказываются продетыми сквозь множественные когезиновые комплексы (каждый из которых имеет кольцевую структуру и содержит довольно пространную межсубъединичную пору), подобно двум ниткам,

продетым через серию бисеринок (рис. 1, *a*) [6–8]. Поддержание когезии на протяжении G2-фазы клеточного цикла и ее контролируемое своевременное разрешение в анафазе, происходящее за счет протеолиза RAD21-субъединицы когезина, обеспечивают правильное прикрепление микротрубочек веретена к кинетохорам и равномерное распределение генетического материала между двумя дочерними клетками [9].

Еще одной не менее важной активностью когезина, наряду с когезией, оказалась его способность к формированию ДНК-петель по механизму, названному «экструзия» [2, 10, 11]. Экструзия начинается с того, что когезин связывается с небольшим фрагментом ДНК, после чего реализуется АТР-зави-

Принятые сокращения: ТАД – топологически-ассоциированный домен; т.п.о. – тысячи пар оснований; Э–П – энхансер-промоторные (взаимодействия); CAR (Cohesin Associated Region) – геномная область, ассоциированная с когезином; FRET (Förster Resonance Energy Transfer) – анализ ферстеровского переноса энергии; HAWK (HEAT protein Associated With Kleisin) – HEAT-белок, ассоциированный с клейзином; SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) – белок структурного поддержания хромосом.

^{*} Адресат для корреспонденции.

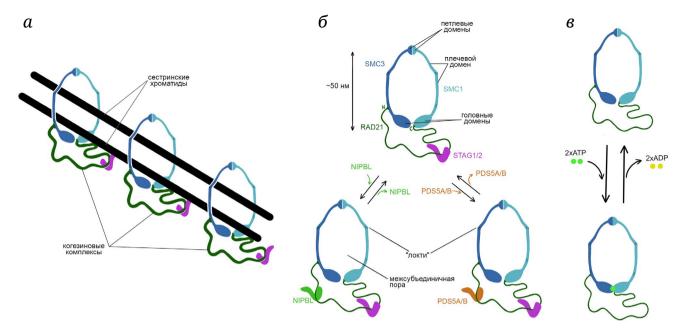


Рис. 1. Структура когезина и его участие в когезии сестринских хроматид. *а* – Топологическое надевание когезиновых колец на сестринские хроматиды при когезии. *б* – Схема корового тримера, формирующего когезиновое кольцо; привлечение дополнительных НАWK-субъединиц к коровому тримеру. *в* – Димеризация головных доменов SMC-субъединиц, необходимая для гидролиза ATP

симое движение комплекса по ДНК, приводящее к процессивному затягиванию фланкирующих комплекс участков ДНК внутрь удерживаемой петли, финальная длина которой может достигать сотен тысяч пар оснований (т.п.о.). Теоретически затягивание может происходить со стороны одного из оснований петли, удерживаемой комплексом (в случае однонаправленной экструзии), или с обеих сторон (в случае двунаправленной экструзии). Экструзия характерна не только для когезина, но для целой группы белковых комплексов, так называемых SMC-комплексов (Structural Maintenance of Chromosomes, белок структурного поддержания хромосом), одним из представителей которых является когезин [12-14]. Совместная активность ДНК-топоизомераз типа II и SMC-зависимой экструзии необходима для пострепликативной индивидуализации сестринских геномов во всех клетках (прокариотических и эукариотических). Экструзия также может обеспечивать упорядоченную компактизацию ДНК; самым ярким примером такой компактизации является формирование митотических хроматид в профазе/метафазе в клетках позвоночных. Хроматиды представляют собой вытянутые структуры, состоящие из плотно упакованных хроматиновых петель, заякоренных на белковом остове. Основным структурным компонентом остова хроматид является конденсин белковый комплекс группы SMC, отвечающий за митотическую экструзию, результатом которой и является формирование хроматид. Когезин-зависимая экструзия участвует в индивидуализации эукариотических хромосом и во многих ситуациях отвечает за компактизацию хроматина, но она также имеет ряд дополнительных функций.

Когезия, в отличие от экструзии, характерна исключительно для когезина и более ни для одного из представителей группы SMC-комплексов [1, 2]. Возникновение когезивной активности у предкового когезина, вероятно, произошло в ходе раннего эукариогенеза [15], это приобретение не привело тем не менее к потере экструзионной активности комплекса [16–18]. Эта общепризнанная точка зрения поднимает целый ряд интересных вопросов о механистических, функциональных и эволюционных взаимоотношениях между феноменом когезии и процессом экструзии.

В данном обзоре мы суммируем современные представления о когезин-зависимой экструзии, ее роли в клеточных процессах и ее молекулярных механизмах. Мы также кратко обсуждаем разрозненные данные, указывающие на возможную механистическую взаимосвязь между экструзией и когезией. Более подробное описание структуры когезинового комплекса и принципов его взаимодействий с хроматином можно найти в первом обзоре серии, опубликованном в этом же номере журнала [19].

СТРУКТУРА КОГЕЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА

Когезин представляет собой белковый комплекс с кольцевой структурой, основой которой

является тример коровых белков: SMC1 (Smc1)¹, SMC3 (Smc3) и RAD21 (Scc1). Все три белка имеют вытянутую форму и взаимодействуют между собой своими концевыми глобулярными доменами (рис. 1, б). Такая организация приводит к тому, что комплекс имеет пространную межсубъединичную пору, способную пропускать глобулярные частицы диаметром около 10 нм [20, 21]. Наличие замкнутой межсубъединичной поры обеспечивает способность комплекса к топологическому надеванию на ДНК, в котором ДНК-нить оказывается продета через белковое кольцо [6–8].

SMC1- и SMC3-субъединицы являются паралогами, принадлежащими к семейству АТРаз, называемых SMC-белками [22]. SMC1 и SMC3 образуют стабильный V-образный гетеродимер за счет гомотипического взаимодействия между петлевыми доменами двух субъединиц [20, 23]. За АТРазную активность отвечают головные домены, расположенные на противоположном от петлевого домена конце каждой из палочковидных молекул. В присутствии АТР происходит периодическая димеризация головных доменов двух SMC-субъединиц между собой, такая димеризация необходима для гидролиза связанных молекул АТР (рис. 1, в). Петлевой и головной домены каждой из SMC-субъединиц соединены между собой длинным и относительно гибким суперспиральным (coiled-coil) плечевым доменом. Гибкость плечевого домена в значительной степени связана с наличием эволюционно консервативного дефекта в регулярной суперспиральной структуре, называемого локтевым участком (рис. 1, б). Сгибание «локтей» имеет довольно большую амплитуду, при одновременном сгибании локтевых участков обеих SMC-субъединиц может происходить сближение петлевых и головных доменов комплекса. Белок RAD21, называемый также клейзиновой субъединицей, образует постоянный мостик между двумя головными доменами SMC-субъединиц и таким образом замыкает кольцевую структуру.

С коровым тримером связываются вспомогательные субъединицы, относящиеся к семейству НАWK-белков (HEAT protein Associated With Kleisin; HEAT-белок, ассоциированный с клейзином): STAG1/2² (Scc3), NIPBL (Scc2), PDS5A/B (Pds5) [16, 20, 23]. Основным местом взаимодействия НАWK-субъединиц с коровым тримером является клейзиновая субъединица, причем только STAG1/2 образует стабильный контакт с RAD21 и, таким образом,

является конститутивным компонентом комплекса. NIPBL и PDS5A/B конкурируют за связывание с общим сайтом посадки на клейзиновой субъединице, и оба эти белка взаимодействуют со стабильным когезиновым тетрамером (SMC3–SMC1–RAD21–STAG1/2) транзиентно [24–26]. Таким образом, в каждый момент времени комплекс может содержать одну (STAG1/2) или две (STAG1/2 + NIPBL или STAG1/2 + PDS5A/B) НАWK-субъединицы (рис. 1, б). Вхождение в состав когезина NIPBL (и присутствие ДНК) необходимо для эффективного гидролиза АТР, замещение NIPBL на PDS5A/B кардинально изменяет активность комплекса [26].

КЛЕТОЧНЫЙ КОНТЕКСТ КОГЕЗИН-ЗАВИСИМОЙ ЭКСТРУЗИИ

Когезин-зависимая экструзия на протяжении клеточного цикла. Когезин-зависимая экструзия реализуется в эукариотических клетках на протяжении интерфазы и митоза (рис. 2, а). Разные оценки указывают на то, что в G1-клетках позвоночных имеется порядка 100 000 когезиновых колец, это число удваивается к G2-фазе [27, 28]. В нуклеоплазме G1-клеток сосуществуют две примерно одинаковые по размеру субпопуляции когезиновых комплексов, находящиеся в динамическом равновесии: (1) свободно-диффундирующие и (2) вовлеченные в экструзию (с характерным временем связывания с хроматином порядка 10-30 мин - в клетках позвоночных и порядка 1 мин - в клетках дрожжей) [28-31]. При установлении когезии в S-фазе появляется третья субпопуляция: стабильно связанные когезивные кольца, выведенные из цикла инициации/терминации экструзии [28, 29, 32]. В митозе происходит полная остановка когезинзависимой экструзии. У позвоночных фосфорилирование HAWK-субъединиц в профазе индуцирует терминацию когезии в плечах хромосом; по всей вероятности, это фосфорилирование также приводит к диссоциации с ДНК когезина, участвующего в экструзии [29, 33]. Возобновление когезин-зависимой экструзии происходит в конце телофазы [34, 35]. У почкующихся дрожжей когезин-зависимая экструзия осуществляется в митотических клетках вплоть до наступления анафазы [36], когда сепаразо-зависимый протеолиз клейзиновых субъединиц приводит к деградации всех без исключения когезиновых колец в клетке, и возобновляется

¹ В основном тексте указаны названия белков человека; в скобках (при первом упоминании) – названия гомологичных белков *Saccharomyces cerevisiae*.

² Геномы позвоночных, как правило, кодируют по паре паралогичных HAWK-субъединиц типа Scc3 и Pds5, экспрессирующихся в соматических клетках: STAG1/STAG2 и PDS5A/PDS5B. Эти паралоги в большинстве случаев структурно и функционально эквивалентны, поэтому далее в тексте мы будем использовать обозначения STAG1/2 и PDS5A/B.

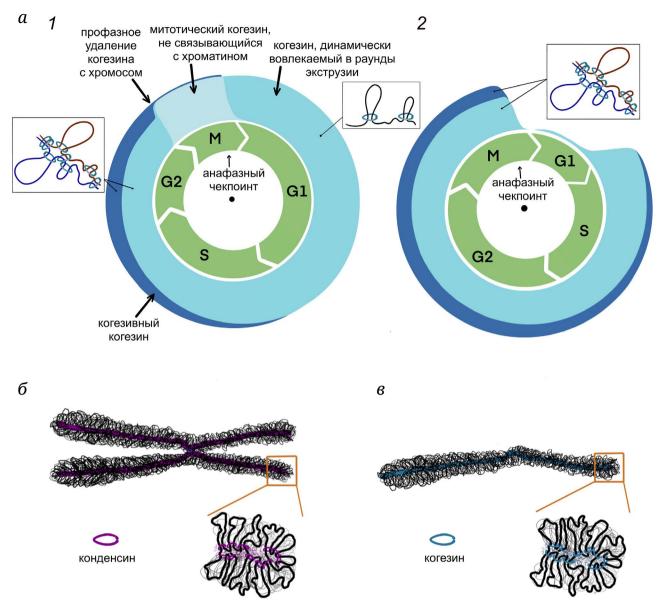


Рис. 2. Активность когезина на протяжении клеточного цикла и результат компактизации хроматина за счет SMC-зависимой экструзии. a – Количество интактных когезиновых комплексов и их активность в течение митотического цикла в клетках позвоночных (1) и S. cerevisiae (2). δ – Метафазные хромосомы позвоночных, формируемые за счет экструзионной активности конденсина, накапливающегося в осевых структурах. Типичная X-образная структура поддерживается при помощи остаточной центромерной когезии двух метацентрических сестринских хромосом. ϵ – Компактные хроматидоподобные структуры типа «вермишели», образующиеся в интерфазных клетках позвоночных за счет когезин-зависимой экструзии при подавлении активности WAPL. Когезин является основным структурным компонентом осевых структур таких хромосом

только к концу G1-фазы с восстановлением пула интактных когезиновых комплексов [4, 36].

Геномная локализация сайтов инициации. Инициация экструзии, осуществляемой когезином, не приурочена строго к конкретным геномным сайтам, однако существуют места предпочтительной посадки экструзионных комплексов на ДНК. Центромеры и прицентромерные области являются примерами сайтов такой предпочтительной посадки [8, 26]. Инициация экструзии, однако, постоянно происходит и вне центромерных обла-

стей. До последнего времени предполагалось, что инициация когезин-зависимой экструзии в плечах хромосом связана в основном с открытым хроматином [37–39]. Однако эта модель подвергается критике. Недавно опубликованные экспериментальные данные о геномном распределении связывания субъединиц когезина, а также результаты компьютерного моделирования указывают на то, что на всех участках хромосом за пределами центромер инициация экструзии происходит с болееменее равной вероятностью [40].

WAPL и PDS5A/В – негативные регуляторы процессивности, NIPBL – позитивный. Длина формирующихся в результате экструзии петель определяется процессивностью когезиновых комплексов и геномным распределением сайтов остановки экструзии [36, 41–45], она варьирует от нескольких десятков т.п.о. у дрожжей [44, 46] до сотен т.п.о. – у позвоночных [41, 42].

Процессивность когезин-зависимой экструзии подавляется HAWK-субъединицей PDS5A/B, а также белком WAPL, привлекаемым этой субъединицей. Деплеция PDS5A/B и WAPL (вместе или по отдельности) существенно увеличивает продолжительность связывания когезина, участвующего в экструзии, с хроматином, а также длину формируемых ДНК-петель [36, 41, 42, 44, 45]. Интересно, что оба этих белка также участвуют в непротеолитической терминации когезии, в рамках так называемого профазного каскада: привлечение белка WAPL к когезивным комплексам, содержащим PDS5A/B-субъединицу в своем составе, приводит к непротеолитическому раскрытию белковых колец на плечах хромосом позвоночных в профазе митоза и их снятию с ДНК [47, 48]. Эта двойная активность PDS5A/B и WAPL косвенно указывает на существование механистического сходства между процессом экструзии и феноменом когезии.

Другая HAWK-субъединица, NIPBL, напротив, является позитивным регулятором процессивности экструзии. NIPBL традиционно считается погрузчиком когезина, однако эта точка зрения, вероятно, требует переосмысления в свете получения новых данных, показывающих, что NIPBL может не участвовать в первичной посадке когезина на хроматин [49]. Твердо установлено, что привлечение NIPBL в состав комплекса необходимо для активной экструзии: функциональная деплеция NIPBL приводит к ослаблению когезин-зависимых петлевых взаимодействий у позвоночных и подавлению транслокации когезина от мест первичной посадки у дрожжей [26, 42, 50]. В течение одного раунда инициации/терминации экструзии NIPBL многократно входит и выходит из состава комплекса: время связывания NIPBL-субъединицы с хроматином в G1-клетках позвоночных составляет около 1 мин - на порядок меньше длительности каждого раунда экструзии [25, 31]. В один из периодов отсутствия NIPBL в комплексе его место может занять PDS5A/B-субъединица, привлекающая WAPL, что, вероятно, приводит к терминации экструзии по пока еще не установленному меха-

Экструзия, осуществляемая когезином в интерфазе, в отличие от митотической конденсинзависимой экструзии, как правило, не приводит к формированию конденсированных хроматидоподобных структур с белковыми остовами и от-

ходящими от них ДНК-петлями. Это может быть связано с низкой процессивностью когезин-зависимой экструзии. Подавление активности PDS5A/В и WAPL приводит в клетках позвоночных к конденсации хроматина в интерфазе с формированием микроскопически видимых вытянутых структур с центральными остовами, содержащими когезин [41, 42, 51]. Такие компактные структуры с характерной формой, напоминающей метафазные хроматиды (рис. 2, 6), получили название «вермишели» (рис. 2, 6).

Интерфазные «вермишели» в структурном смысле аналогичны хроматидам, формируемым в профазе мейоза I [52]. Компактизация мейотических хромосом достигается за счет экструдирующей активности когезина, накапливающегося в осевых структурах, которые впоследствии становятся важной составляющей синаптонемного комплекса. Формирование в профазе мейоза I при участии когезина конденсированных структур, подобных метафазным хроматидам, стало одним из ранних указаний на то, что экструзия ДНК-петель может являться универсальной для всех SMC-комплексов активностью [51, 53].

Сайт-специфическая остановка. Когезинзависимая экструзия отличается от экструзии, осуществляемой другими SMC-комплексами, способностью к регулируемой остановке в специфических геномных локусах. Точно не известно, является ли такая остановка временной паузой или ведет к окончательной терминации экструзии. Как бы то ни было, сформированные ДНК-петли какое-то время удерживаются остановленными экструзионными комплексами до диссоциации комплекса от ДНК [31, 54]. Описано по крайней мере два механизма сайт-специфической остановки экструзионных когезиновых комплексов: CAR-зависимый (Cohesin Associated Region, геномная область, ассоциированная с когезином) и СТСГ-зависимый. Первый, эволюционно более древний и типичный для клеток низших эукариот, связан с протяженными геномными областями накопления когезина, САR-регионами [44, 46, 55]. САR-Регионы предпочтительно иммунопреципитируются антителами против субъединиц когезина и, как правило, расположены в 3'-концах конвергентно транскрибируемых генов [56, 57]. Второй механизм остановки, связанный с активностью инсуляторного белка СТСГ, реализуется в клетках позвоночных [58, 59]. Остановка экструзионных комплексов в СТСГсайтах приводит к тому, что подавляющее большинство сильных сайтов связывания субъединиц когезина с хроматином в клетках позвоночных колокализуется с сайтами связывания СТСГ.

У САR-зависимого и СТСF-зависимого механизмов остановки экструзии много общего как между собой, так и с процессами стабилизации

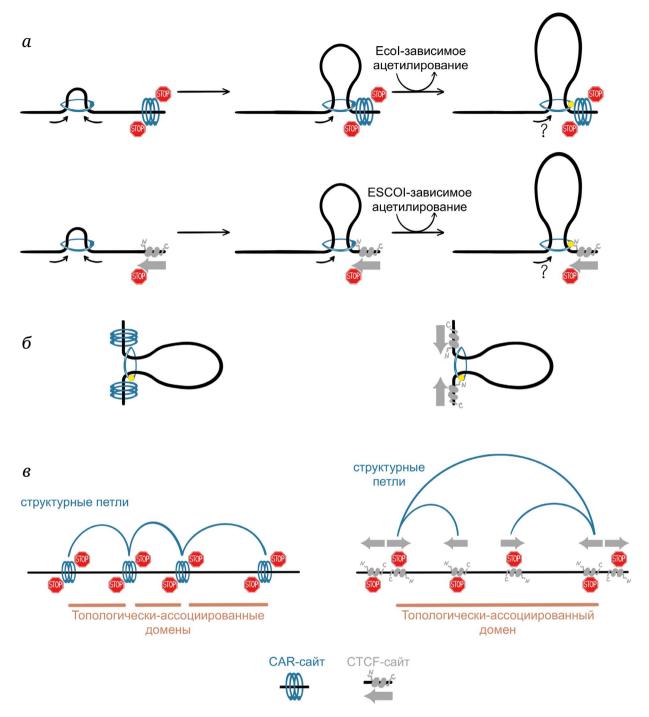


Рис. 3. Механизмы остановки когезин-зависимой экструзии и паттерны укладки хроматина, возникающие в результате блокировки движения и стабилизации экструзионных комплексов. *а* − CAR-зависимая и СТСГ-зависимая остановка экструзии. Столкновение когезина с единичным сайтом, по всей вероятности, превращает двунаправленную когезин-зависимую экструзию в однонаправленную. ESCO1 (Eco1)-зависимое ацетилирование SMC3-субъединицы (ацетилирование SMC3 показано желтой точкой) играет важную роль в остановке экструзии и защите остановленного комплекса от WAPL. *б* − Структурные петли, содержащие CAR- или СТСГ-сайты в основаниях, образуются за счет полной (двусторонней) остановки экструзии. Ацетилирование SMC3 показано желтой точкой. *в* − Положение CAR- и СТСГ-сайтов в геноме предопределяет формирование характерных наднуклеосомных паттернов укладки хроматина: структурных петель и топологически-ассоциированных доменов

связывания когезивных колец с хроматином (рис. 3, *a*). Остановка в обоих случаях осуществляется за счет того, что сайты остановки благопри-

ятствуют замещению NIPBL на PDS5A/B [44, 58]. Такому замещению способствует ESCO1 (Eco1)-зависимое ацетилирование белка SMC3, происходящее

в сайтах остановки [43, 45]. Ацетилирование SMC3субъединицы по консервативным остаткам лизина К105/К106 (К112 и К113 – у дрожжей) подавляет экструзионную активность когезина, предположительно, за счет уменьшения сродства комплекса к NIPBL [60, 61]. Кроме того, ацетилирование препятствует активности белка WAPL [62], которая, как уже было сказано, удаляет с хроматина не только топологически-связанные когезиновые комплексы, но и комплексы, участвующие в экструзии [41, 42, 51]. Интересно, что стабилизация когезивных колец на хроматине в G2-фазе происходит за счет ацетилирования SMC3 по тем же самым аминокислотным остаткам (у многих видов в стабилизации также участвует вспомогательный белок - сорорин). Ацетилирование, обеспечивающее стабилизацию когезии, устанавливается в S-фазе корепликативно за счет активности паралога ESCO1, ацетилтрансферазы ESCO2 (Eco1), и оно также подавляет активность WAPL в отношении ацетилированных комплексов.

Наличие геномных элементов, останавливающих экструзию, приводит к накоплению когезиновых комплексов, взаимодействующих с CAR-элементами и СТСГ-сайтами, а также к образованию характерных паттернов укладки интерфазного хроматина: структурных хроматиновых петель, заякоренных в указанных геномных элементах, и топологически-ассоциированных доменов (ТАД) (рис. 3, би в) [44, 46, 58, 59, 63]. У позвоночных за остановку когезиновых комплексов, участвующих в экструзии, а также за ингибирование активности WAPL-субъединицы отвечает *N*-концевой фрагмент СТСГ [58, 59, 64]. Стерические особенности связывания СТСГ со своими геномными сайтами приводят к тому, что взаимодействие N-концевого фрагмента с когезином эффективно реализуется только при приближении экструзионного комплекса к СТСГ-мотиву со стороны 3'-полюса последнего (N-концевые цинковые пальцы СТСГ связываются с ДНК именно здесь); в такой ситуации происходит остановка экструзии и стабилизации связывания когезина на данном СТСГ-сайте (рис. 3, а). В то же время при приближении экструзионного комплекса к СТСГ-мотиву со стороны 5'-полюса последнего длительной остановки когезина не происходит. Эти особенности белок-белковых взаимодействий приводят к интересной закономерности в расположении СТСГ-мотивов в основаниях структурных петель и в границах топологических доменов позвоночных: пары СТСГ-мотивов, расположенные в основаниях петель, как правило, смотрят навстречу друг другу своими 3'-полюсами (конвергентное расположение); в то же время для границ ТАД характерно наличие нескольких СТСГ-мотивов (по крайней мере пары), каждый из которых смотрит своим 3'-полюсом в направлении ближайшего

к нему топологического домена (дивергентное расположение) (рис. 3, δ и ϵ) [63, 65–67].

Взаимодействие с транскрипционным аппаратом клетки. Почему останавливающие экструзию САR-сайты в клетках дрожжей ассоциированы с 3'-концами конвергентно транскрибирующихся генов? Теоретически это может быть следствием того, что столкновение транскрибирующих полимераз с движущимися навстречу экструзионными когезиновыми комплексами приводит к перемещению последних в концы транскрипционных единиц. Такая модель согласуется с тем, что выключение транскрипции приводит к удалению когезина с САR-сайтов [56].

Механизмы, стоящие за транскрипционнозависимым накоплением когезиновых колец на 3'-концах генов, работают не только в дрожжевых клетках, они носят универсальный характер. Так, несмотря на то что в клетках позвоночных нет классических CAR-сайтов, при одновременной деплеции белков CTCF и WAPL происходит релокализация связанных с хроматином когезиновых комплексов с СТСГ-сайтов на 3'-концы активнотранскрибируемых генов [38, 40]. Новые сайты качественно отличаются от классических СТСГ-ассоциированных геномных пиков; они представляют собой протяженные области размером в несколько т.п.о., названные по этой причине «островками» связывания когезина (cohesin islands). Островки, как и CAR-сайты дрожжей, преимущественно располагаются на 3'-концах конвергентно-транскрибируемых генов, их формирование также блокируется при ингибировании транскрипции [38]. Появление когезиновых островков сопряжено с формированием когезин-зависимых хроматиновых петель между соседними островками, что делает их гомологию с CAR-сайтами еще более явной [40].

Ряд наблюдений противоречит упрощенным представлениям, согласно которым РНК-полимераза взаимодействует с экструзионными комплексами напрямую. Одна из альтернативных гипотез предполагает, что РНК-полимераза перемещает в 3'-концы генов топологически-надетые когезиновые кольца, не участвующие в экструзии, а те, в свою очередь, блокируют процесс экструзии [44, 68]. В пользу такого механизма говорят: (1) предпочтительная локализация CAR-сайтов в 3'-концах конвергентно ориентированных генов (а не всех без исключения активных генов), (2) кинетика накопления когезивных комплексов в CARсайтах в ходе клеточного цикла и отстающая от нее кинетика формирования петель между CARсайтами [44] и (3) способность SMC-комплексов, участвующих в экструзии, преодолевать массивные белковые преграды, в том числе транскрибирующую РНК-полимеразу, in vitro [69].

Вероятно, транскрибирующая РНК-полимераза сама по себе не представляет собой значимого барьера для когезиновых комплексов, принимающих участие в экструзии, однако активные промоторы, на которых, помимо субъединиц РНК-полимеразы, присутствует большое количество белков, вовлеченных в инициацию, такими барьерами являются. О том, что промоторы препятствуют продвижению когезиновых комплексов, приближающихся с обеих сторон, свидетельствует феномен промотор-ассоциированной топологической инсуляции [40, 70, 71]. Промоторы – менее сильные экструзионные барьеры, чем CAR-регионы и СТСFсайты. Кроме того, остановленные в промоторах когезиновые комплексы не стабилизируются за счет ESCO1/2-зависимого ацетилирования, вероятно, поэтому промоторы, как правило, не становятся основаниями метастабильных, удерживаемых когезином, ДНК-петель.

РОЛЬ КОГЕЗИН-ЗАВИСИМОЙ ЭКСТРУЗИИ В ФИЗИОЛОГИИ КЛЕТКИ

Пострепликативная индивидуализация сестринских хромосом и компактизация митотических хромосом. Эволюционно примитивной функцией SMC-комплексов является индивидуализация сестринских хромосом [1, 2]. Механика процесса репликации двуспиральной молекулы ДНК в клетках устроена таким образом, что две новосинтезированные сестринские ДНК-нити оказываются топологически сцепленными в момент окончания реакции репликации [72, 73]. Пострепликативная индивидуализация зависит от экструзии, осуществляемой SMC-комплексами, которая направляет активность топоизомераз II типа в сторону декатенации топологически сцепленных сестринских молекул геномной ДНК после репликации и способствует пространственному разделению разъединенных нитей [1, 2, 74]. В подавляющем большинстве случаев в бактериальных и архейных геномах закодирован единственный SMC-комплекс (относящийся к одному из двух классов: Smc-ScpAB или MukBEF), основной функцией которого является именно пострепликативная индивидуализация сестринских хромосом [1, 2, 75]. В клетках эукариот этот процесс осуществляется за счет взаимодополняющих активностей двух SMC-комплексов: когезина и конденсина. Помимо индивидуализации, эти комплексы также участвуют в компактизации (конденсации) митотических хромосом, которая механически облегчает перемещение хромосом к полюсам веретена деления в анафазе.

В интерфазе экструзионная активность конденсина подавлена [76–79], в то же время на протяжении G2-фазы когезиновые комплексы не только поддерживают когезию, но и принимают участие в экструзии, за счет чего индивидуализация сестринских хромосом достигается (в значительной степени) еще до начала митоза [17, 80, 81]. К моменту снятия основной части когезивных колец (в профазе – у позвоночных и многих других эукариот, в анафазе – у S. cerevisiae) сестринские хроматиды в значительной степени отделены друг от друга, а топологические зацепления, по всей видимости, сохраняются преимущественно в сайтах, ассоциированных с когезией: центромерах, рибосомных повторах, САR-регионах и СТСГсайтах [17, 80, 81]. Снятие остаточных зацеплений и окончательная индивидуализация достигаются за счет митотической экструзионной активности конденсина [17, 82, 83].

Экструзия, осуществляемая конденсином и когезином, также обеспечивает митотическую (и мейотическую) компактизацию хроматина (рис. 2, б и в), однако вклад каждого из комплексов различается в клетках разных организмов [1, 2]. Так, в клетках почкующихся дрожжей, в которых когезин-зависимая экструзия продолжается вплоть до наступления анафазы, когезин вносит больший вклад в конденсацию [44, 84, 85], в то же время у позвоночных, в клетках которых внецентромерное связывание когезина с хроматином прекращается в профазе, формирование компактных митотических хромосом зависит главным образом от конденсина [76, 86]. Высокопроцессивная экструзионная активность конденсина в митотических клетках позвоночных приводит к образованию хроматид – компактных телец вытянутой формы с петлями хроматина, отходящими от центрального белкового остова, основными компонентами которого являются конденсины (геномы позвоночных кодируют два типа конденсиновых комплексов) и топоизомераза II [87].

Примечательно, что процессивная экструзионная активность когезина может приводить к формированию хроматидоподобных структур вне митоза. Так, как было отмечено выше, в интерфазных клетках с подавленной активностью белка WAPL происходит когезин-зависимое формирование хроматидоподобных структур типа «вермишели», белковые остовы которых состоят из когезиновых колец [41, 42, 51] (рис. 2, в). Аналогичным образом мейотические хромосомы, в том числе транскрипционно активные хромосомы типа ламповых щеток, представляют собой вытянутые структуры с хроматиновыми петлями, отходящими от белковых осевых структур, в состав которых входят среди прочего мейотический вариант когезина и топоизомераза II [52].

Поддержание генома в декатенированном состоянии. Интерфазная экструзия, осуществляемая когезином, также обеспечивает особую

неравновесную укладку хромосомной ДНК. Во-первых, постоянно повторяющиеся раунды экструзии увеличивают частоту локальных цис-взаимодействий и до некоторой степени подавляют дальние цис- и транс-взаимодействия [41, 46, 88]. Подавление транс-взаимодействий, отчасти связанное с экструзионной активностью когезина, приводит к формированию более или менее выраженных хромосомных территорий в интерфазных эукариотических клетках [89]. Предпочтительное смещение в сторону локальных ДНК-контактов в интерфазном геноме, как мы обсудим в следующем разделе, благоприятствует правильному прохождению репаративных процессов.

Вторым глобальным следствием когезинзависимой экструзии в интерфазе является поддержка геномной ДНК в декатенированном состоянии [90–92]. Как и при декатенации сестринских хромосом, когезин направляет активность топоизомеразы II в сторону разрешения, а не образования внутри- и межхромосомных зацеплений. Декатенированное состояние хроматина способствует прохождению ДНК-зависимых матричных реакций в интерфазе [93] и индивидуализации несестринских хромосом – в профазе митоза [85].

Репарация двухцепочечных разрывов ДНК. Активность когезина способствует точной репарации ДНК-повреждений, прежде всего репарации двухцепочечных разрывов [94–96]. Наряду с когезией, которая облегчает поиск партнеров для гомологичной рекомбинации в G2-фазе клеточного цикла [94, 97], экструзия также является важной составляющей репаративной активности когезина.

Во-первых, интерфазная когезин-зависимая экструзия создает и активно поддерживает специфическую неравновесную укладку эукариотического хроматина, характерной чертой которой является подавление транс-ДНК-контактов и взаимодействий между удаленными в линейной последовательности участками одной хромосомы [41, 46, 88]. Такое предпочтительное смещение в сторону локальных ДНК-взаимодействий способствует быстрой и безошибочной репарации двухцепочечных разрывов. Оно облегчает поиск партнера при репарации по механизму негомологичного соединения концов (NHEJ) [96], а также уменьшает вероятность эктопической рекомбинации при рекомбинационной репарации [98, 99].

Кроме того, когезин специфически привлекается к двухцепочечным разрывам и принимает участие в их репарации, ограничивая диффузию концов разрыва и блокируя взаимодействия разрыва с другими хромосомами [96, 98, 100, 101]. В последнее время все больше данных указывает на связь между этой функцией когезина и его экс-

трузионной активностью [99]. Предположительно, двухцепочечный ДНК-разрыв блокирует продвижение когезин-содержащего комплекса экструзии, подобно тому, как это делают CAR-регионы и CTCFсайты. Двунаправленная экструзия становится однонаправленной при столкновении с сайтом двухцепочечного разрыва, в такой ситуации по обе стороны от разрыва образуются удерживаемые когезином петли с концами разрыва, расположенными в основании этих петель (рис. 4). Такая конфигурация объясняет то, как именно когезин ограничивает свободную диффузию концов разрыва и привлекает их во внутреннюю часть хромосомной территории [99]. Этот процесс можно сравнить с формированием осевых структур метафазных хромосом за счет конденсин-зависимой экструзии. Несмотря на то что в результате интерфазной экструзии в клетках дикого типа не формируются хроматидоподобные структуры, основания когезинассоциированных петель в среднем чаще находятся во внутренней части хромосомной территории, так же, как и основания конденсин-ассоциированных петель - в митотических хромосомах. Вероятно, сходный эффект экструзия оказывает на сайты двухцепочечных разрывов, которые становятся основаниями когезин-зависимых петель. Ограничение диффузии и транс-взаимодействий способствуют правильному восстановлению нити ДНК как при репарации по механизму NHEJ, так и при репаративной рекомбинации.

Наконец, экструзия важна для сигнальных каскадов, ассоциированных с двухцепочечными разрывами, в частности для распространения ключевой уН2АХ-метки (фосфорилированной вариантной формы гистона Н2АХ), участвующей в привлечении репаративных факторов, по геномному региону, окружающему место разрыва (рис. 4) [102–104]. Однонаправленная экструзия обеспечивает систематическое привлечение концов разрыва к окружающим его участкам генома в рамках одного топологического домена, что, в свою очередь, ведет к распространению уН2АХ-сигнала от места разрыва. Дело в том, что активность ферментов, участвующих в фосфорилировании гистона Н2АХ (в первую очередь киназы АТМ), сосредоточена главным образом непосредственно в месте повреждения ДНК, и для распространения этой модификации на десятки т.п.о. в обе стороны необходимо физическое привлечение этих локусов к точке разрыва. Такое привлечение обеспечивается за счет когезин-зависимой экструзии.

Регуляция транскрипции в клетках позвоночных. Интерфазная когезин-зависимая экструзия также важна для точной настройки транскрипционной активности у позвоночных. Причинно-следственные отношения между наднуклеосомной укладкой ДНК и транскрипционной активностью

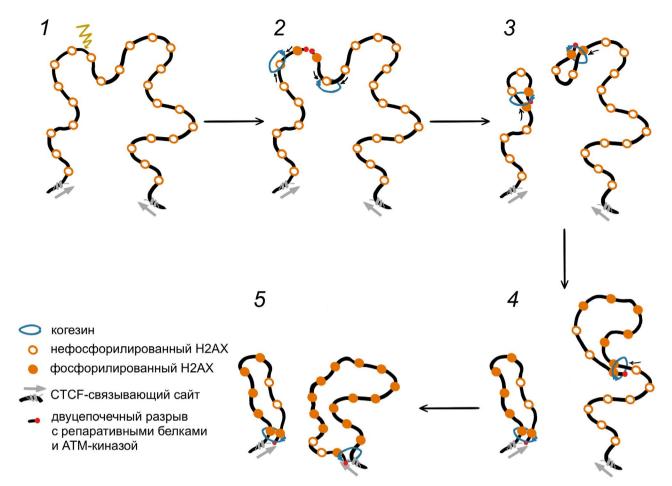


Рис. 4. Особенности когезин-зависимой экструзии в окрестностях двухцепочечного разрыва (согласно Arnould et al. [102]). Появление двухцепочечных разрывов (1, 2) приводит к возникновению новых сайтов остановки когезин-зависимой экструзии в месте разрыва (3), распространению γH2AX-сигнала от места разрыва по топологическому домену за счет однонаправленной экструзии (3–5) и перемещению сайтов разрыва внутрь хромосомной территории (5)

устанавливаются у позвоночных в связи с наличием в их геномах активаторных удаленных регуляторных элементов – энхансеров³ [105, 106]. Общепринятая модель активности энхансеров подразумевает, что энхансер-активируемая инициация транскрипции сопряжена с физическим взаимодействием между энхансером и промотором гена мишени. Наличие физических взаимодействий между энхансерами и промоторами их генов-мишеней, энхансер-промоторных (Э–П) петель, в клетках позвоночных было экспериментально подтверждено на полногеномном уровне в последние годы [107–109].

До недавнего времени доминировало представление, согласно которому когезин-зависимая экструзия играет ключевую роль в формировании Э–П-петель [110, 111]. Новые экспериментальные

данные не согласуются с этим представлением: удаление когезина и подавление экструзии в интерфазе не приводит к разрушению подавляющего большинства Э-П-петель; эти структуры, по всей видимости, образуются по независимому от экструзии механизму [108, 112, 113]. Не исключено, что когезин-зависимая экструзия тем не менее важна для активности некоторых специфических типов энхансеров – главным образом небольшой группы энхансеров, содержащих сайт связывания белка СТСГ [112, 114, 115].

Несмотря на то что подавление когезин-зависимой экструзии в интерфазных клетках позвоночных в общем не отражается на ландшафте Э–П-петель, оно приводит к воспроизводимым изменениям транскрипционной активности. Хотя наблюдаемые эффекты носят по большей части

³ Помимо энхансеров, активирующих транскрипцию генов-мишеней, в геномах позвоночных есть сайленсеры, подавляющие ее; мы будем говорить исключительно об энхансерах, так как информация о сайленсерах чрезвычайно скудна, однако все приведенные закономерности могут быть, по всей вероятности, перенесены и на сайленсеры.

сравнительно мягкий характер, сотни генов меняют свой уровень экспрессии [88, 108]. Обнаруживаемые изменения транскрипции только в очень редких случаях можно связать с СТСГ-ассоциированными энхансерами; по крайней мере два альтернативных механизма могут объяснять наблюдаемые изменения: (1) инсуляторный эффект границ ТАД и (2) когезин-зависимое подавление неспецифических взаимодействий между активными участками генома.

Большая часть топологических доменов и их границ у позвоночных является эпифеноменом когезин-зависимой экструзии. Поэтому подавление экструзии может увеличивать частоту Э-Пвзаимодействий между регуляторными элементами, в норме разделенными инсулирующими границами ТАД. Увеличение интенсивности таких эктопических Э-П-контактов приводит, по всей вероятности, к изменениям транскрипционной активности некоторых генов [88, 112]. Важность регуляторной инсуляции, обеспечиваемой границами ТАД, подтверждается генетическими наблюдениями: геномные перестройки, сопряженные с нарушениями топологической инсуляции, ассоциированы с нарушениями развития и онкогенезом. Для некоторых модельных систем было показано, что медиатором патологических процессов при изменениях структуры ТАД может являться именно эктопическая активация транскрипции [116-118].

Последний потенциальный путь влияния экструзии на транскрипцию связан с тем, что когезин-зависимая экструзия подавляет дальние взаимодействия между активными участками генома. Не до конца понятый с биохимической точки зрения механизм способствует кластеризации активного хроматина в пространстве ядра, такая кластеризация приводит к формированию на уровне клеточной популяции активного ядерного компартмента или А-компартмента [65, 119]. Внутри А-компартмента могут взаимодействовать участки хромосом, разделенные десятками миллионов п.о., а также активные участки разных хромосом. Выключение когезин-зависимой экструзии приводит к бесконтрольному усилению взаимодействий активных участков генома между собой [42, 50, 88]; предполагается, что результатом этого может являться подавление транскрипции одних генов и усиление транскрипции других, в частности за счет установления сверхдальних Э–П-контактов внутри А-компартмента [88].

Таким образом, в клетках позвоночных экструзия вносит вклад в регуляцию транскрипции через участие в топологической инсуляции, в подавлении избыточной компартментализации генома и, в меньшей степени, через прямое участие в процессах формирования Э–П-петель.

ЦИКЛ КОНФОРМАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КОГЕЗИНОВОГО КОМПЛЕКСА ПРИ ЭКСТРУЗИИ

Гипотеза, согласно которой компактизация и индивидуализация митотических хромосом связаны с экструзией ДНК-петель, была предложена более трех десятилетий назад [120]. Чуть позднее Nasmyth [53] предположил, что SMC-комплексы могут являться ключевыми компонентами клеточной машинерии экструзии. За прошедшие годы умозрительная концепция SMC-зависимой экструзии получила поддержку в данных об укладке интерфазного хроматина [65, 66, 88], а также в результатах моделирования митотических и интерфазных хромосом [111, 121]. Наконец, в последнее время способность когезина, конденсина и SMC5/6-комплекса осуществлять экструзию ДНК-петель была продемонстрирована напрямую в реконструированных in vitro системах [12, 13, 122, 123].

Собранные данные позволили определить многие конкретные характеристики экструзии, осуществляемой SMC-комплексами, в частности, когезином. Так, оказалось, что экструзия может осуществляться исключительно когезиновым комплексом, содержащим NIPBL [122, 123]. Скорость когезин-зависимой экструзии in vivo и in vitro coставляет ~1 т.п.о./с (оценки в разных публикациях варьируют от 0,4 до 3 т.п.о./с) [33, 88, 122-124]. В ходе когезин-зависимой экструзии за каждую секунду происходит всего один цикл связывания/гидролиза АТР [123, 124]. Высокая скорость движения по ДНК-нити и размер шага в ~1 т.п.о. (что эквивалентно десяткам нанометров даже для ДНК, упакованной в нуклеосомы) отличает SMC-комплексы от других типов ДНК-транслоказ (полимераз, хеликаз и т.д.), скорость которых на порядки ниже, а размер шага, как правило, составляет 1 п.о. Несмотря на впечатляющую скорость когезин-зависимой экструзии, сравнительно небольшие силы (<1 пН), приложенные к ДНК-нити, могут замедлять или даже полностью останавливать процесс [122, 125].

Наблюдения экструзии *in vitro* показали также, что мономерное когезиновое кольцо осуществляет двунаправленную экструзию (рис. 5, *a* (1)) [33, 123, 125], при том что ближайший гомолог когезина – конденсин – реализует однонаправленную экструзию (рис. 5, *a* (2)) [12, 126]. Направленность является одним из интереснейших параметров процесса экструзии, она тесно связана с молекулярным механизмом процесса. Формируемая ДНК-петля может расти за счет затягивания ДНК-нити с одной из сторон от активного SMC-комплекса, тогда экструзия называется однонаправленной или асимметричной. В этом случае можно различить два полюса петли: закрепленное (стабильное)

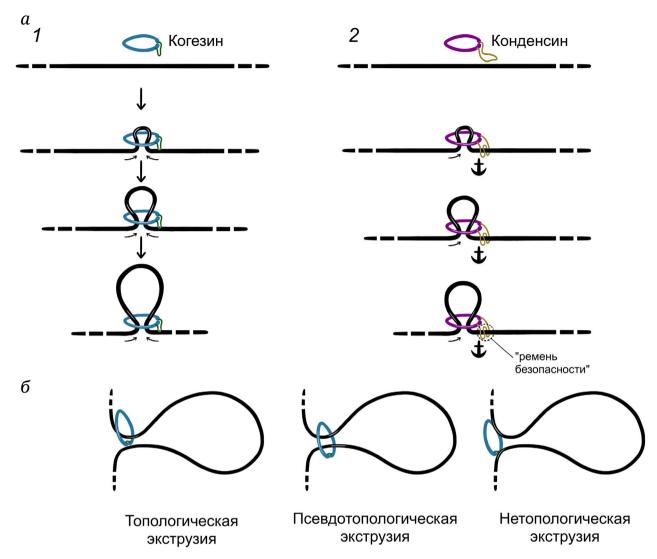


Рис. 5. Молекулярные аспекты SMC-зависимой экструзии. a – Двунаправленная экструзия, осуществляемая когезиновыми мономерами (1), и однонаправленная экструзия, осуществляемая конденсиновыми комплексами (2). «Ремень безопасности», по всей вероятности, принимает непосредственное участие в стабилизации одного из оснований формируемой петли в процессе конденсин-зависимой экструзии. δ – Гипотетические варианты модальности связывания SMC-комплекса с ДНК растущей петли при экструзии

основание, или якорь, и подвижное основание. Другой возможный вариант экструзии – это двунаправленная или симметричная экструзия, в которой петля растет за счет затягивания ДНК с обеих сторон от активного белкового комплекса. В случае когезин-зависимой экструзии реализуется именно двунаправленный вариант процесса. С молекулярной точки зрения двунаправленная экструзия может быть результатом асимметричной активности SMC-комплекса, сопряженной с частым переключением направления движения в отдельных циклах связывания/гидролиза АТР [126-128]. При этом в каждом таком цикле переключающейся двунаправленной экструзии у формируемой петли имеются закрепленное и подвижное основание, но между циклами основания могут меняться ролями.

Ковалентно сшитые SMC-кольца вовлекаются в экструзию in vitro и формируют петли с эффективностью, сопоставимой с комплексами дикого типа [69, 123]. Кроме того, мутантные варианты когезина, не способные обеспечивать когезию и, по всей видимости, не способные к топологическому надеванию на ДНК, вовлекаются в экструзию в клетках [8, 18]. Таким образом, по всей вероятности, открытие SMC-кольца не является необходимым этапом процесса экструзии: когезин (и другие SMC-комплексы) во время экструзии связывается с ДНК нетопологически (не удерживая ни одно из оснований ДНК-петли внутри белкового кольца) или псевдотопологически (удерживая оба основания ДНК-петли внутри белкового кольца, не формируя истинных топологических зацеплений с ДНК) (рис. 5, б).

Неожиданным наблюдением, сделанным при анализе когезин-зависимой экструзии in vitro, стала способность комплекса включать в состав растущей петли ДНК-связанные частицы, в разы превышающие линейные размеры самого комплекса [69]. Когезин при активной экструзии может преодолевать ассоциированные с ДНК частицы диаметром до 200 нм. Интересно, что такое преодоление препятствий происходит с минимальным замедлением движения комплекса по ДНК-нити. Преодоление массивных препятствий косвенно указывает на то, что процесс экструзии носит нетопологический характер [69, 129]. На нетопологическую природу экструзии также косвенно указывает следующее наблюдение: в пермеабилизированных ядрах связывание когезиновых колец с ДНК в основаниях хроматиновых петель, сформированных за счет экструзии, исключительно легко нарушается при повышении ионной силы буфера [130].

Несмотря на то что многие общие характеристики когезин-зависимой экструзии были установлены в последние годы (особенно большой прогресс был достигнут в связи с появлением возможности изучать процесс in vitro), молекулярный механизм экструзии все еще не до конца расшифрован. Мы не знаем наверняка, как именно цикл связывания/гидролиза АТР в ходе экструзии сопряжен с конформационными изменениями комплекса и как эти изменения приводят к росту ДНК-петель. В связи с большим интересом к этой проблеме и за недостатком экспериментальных данных было предложено несколько конкурирующих моделей. Ниже мы кратко опишем три такие модели, находящиеся в наибольшем согласии с имеющимися структурными, генетическими и биохимическими данными: модель коалесценции/прокачивания (pumping/hold-and-feed model), модель броуновского храповика (brownian ratchet model) и модель «гребок-захват» (swing-and-clamp model). Следует подчеркнуть, что, несмотря на элегантность и впечатляющую объяснительную силу каждой из обсуждаемых моделей, ни одна из них не находится в полном согласии со всем массивом экспериментальных данных.

«ДНК-захват» (gripping state/DNA clamping). Несмотря на то что описанные далее модели процесса экструзии отличаются по множеству существенных параметров, все они сходятся в том, что одним из центральных интермедиатов цикла экструзии является так называемое состояние «ДНК-захвата». «Захват» был описан в самые последние годы при изучении криоэлектронной структуры когезина и конденсина [61, 126, 131]. Оказалось, что в присутствии NIPBL, двухцепочечной ДНК и негидролизуемых аналогов АТР (или в том случае, если в составе когезина имеются SMC-субъедини-

цы с мутациями, блокирующими гидролиз АТР) когезин формирует комплексы с ДНК характерной структуры, названной «ДНК-захватом». В «захвате» ДНК электростатически связывается с верхней поверхностью взаимодействующих в присутствии аналога АТР головных доменов (рис. 6, а). NIPBL одновременно взаимодействует с плечевым участком SMC3-субъединицы и с димером головных доменов, таким образом, формируя белковый мостик, прижимающий ДНК-нить сверху. NIPBL в описанной структуре также образует серию электростатических контактов с ДНК. Данные FRET (Förster Resonance Energy Transfer, анализ ферстеровского переноса энергии) указывают на то, что в присутствии гидролизуемого ATP структуры «захвата» быстро формируются и разбираются [124]. По всей вероятности, цикл образования и разрушения строго связан с циклом гидролиза АТР: гидролиз АТР приводит к разбору той конфигурации димера головных доменов, в которой формируется протяженный ДНК-связывающий желоб на их поверхности. Это, по всей вероятности, также приводит к диссоциации NIPBL и высвобождению ДНК. Связывание головными доменами новой пары молекул ATP вновь приводит к сборке «захвата». Описанное сопряжение цикла гидролиза АТР и связывания ДНК с когезином в состоянии «захвата» явно указывает на то, что эта структура играет важную роль в движении когезина по ДНК во время экструзии. Однако статическая структура, описанная как «ДНК-захват», не говорит ничего о том, какие механические перестроения приводят к направленному движению когезина и связыванию в каждом следующем цикле гидролиза АТР все новых фрагментов ДНК-нити в «захвате».

Модель коалесценции/прокачивания. Одна из существенных структурных характеристик «ДНК-захвата» – разобщение плечевых доменов SMC-субъединиц [61, 132]. Известно, что при гидролизе ATP головные домены SMC-субъединиц могут переходить в так называемое наложенное или J (от англ. juxtaposed) состояние, что приводит к закрытию межсубъединичной поры и установлению взаимодействий между плечевыми доменами двух субъединиц по всей их длине [133, 134]. Есть указания на то, что закрытие межсубъединичной поры при переходе в Ј-состояние происходит процессивно сверху вниз, подобно застегиванию молнии [135, 136]. Модель коалесценции/прокачивания предполагает, что движение когезинового комплекса по ДНК осуществляется за счет повторяющихся циклов «застегивания» плечевых доменов, сопряженных с циклами гидролиза АТР (рис. 6, *a*) [136, 137]. Наиболее проработанная версия этой модели, недавно представленная группой Hearing [126], базируется на криоэлектронных данных, а также на данных об удерживании

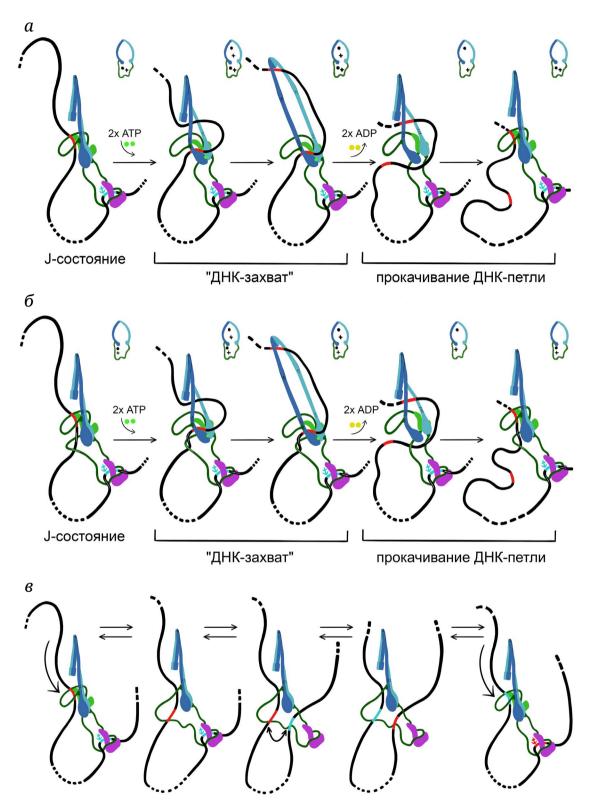


Рис. 6. Когезин-зависимая экструзия по механизму «коалесценции/прокачивания». а — Псевдотопологическая экструзия по механизму «коалесценции/прокачивания» (по данным группы Hearing [126]). б — Нетопологическая экструзия по механизму «коалесценции/прокачивания» (по данным Oldenkamp и Rowland [10]). в — Обмен двух оснований растущей петли при псевдотопологической экструзии может обеспечивать частое переключение направления движения и проявляться в виде кажущейся двунаправленности процесса. На всех панелях пиктограммы отражают путь ДНК-нити, с помощью символов ● и + отражено направление прохождения ДНК-нити сквозь плоскость когезинового кольца. Участки ДНК, являющиеся или являвшиеся на предыдущих этапах динамическими основаниями петли, показаны красным, якорные участки — голубым. Пунктирные участки в середине ДНК-нити отражают принципиально неограниченный размер растущих петель

ДНК-нитей внутри различных субкомпартментов SMC-кольца, полученных с помощью тиол-специфического сшивания.

В рамках модели предполагается, что якорем растущей петли является фрагмент ДНК, взаимодействующий с STAG1/2 (рис. 6, a). ДНК динамического основания петли удерживается NIPBL поблизости от головных доменов SMC-белков. Движение комплекса вдоль ДНК происходит за счет того, что формирование «захвата» механически сопряжено с продеванием ДНК-микропетли через межсубъединичную пору. При гидролизе АТР эта петля сливается (коалесцирует) с основной петлей, удерживаемой в районе головных доменов комплекса. При слиянии новым динамическим основанием петли становится участок захваченного в микропетле фрагмента ДНК, электростатически связанный с внутренней стороны поры димером петлевых доменов. Этот участок прокачивается к NIPBL-субъединице в ходе «застегивания» плечевых доменов. После «застегивания» комплекс возвращается в исходное Ј-состояние, в то время как удерживаемая петля оказывается длиннее изначальной за счет поглощения захваченной в ходе цикла микропетли.

Модель коалесценции/прокачивания существует в двух вариантах: псевдотопологическом, в рамках которого основания растущей петли дважды продеты через пору когезина, в то время как комплекс находится в J-состоянии (рис. 6, *a*), и нетопологическом, в котором растущая петля как целое удерживается комплексом нетопологически (рис. 6, б).

Псевдотопологический вариант модели согласуется со многими наблюдениями, сделанными в реконструированных in vitro системах экструзии. Во-первых, возможность захвата микропетли зависит от механического натяжения ДНК-нити. Это объясняет, как даже небольшие механические силы (~ 1 пН) способны блокировать формирование микропетли и таким образом останавливать экструзию [122, 125]. Во-вторых, когезиновые комплексы в in vitro системах осуществляют двунаправленную экструзию [123, 125]. В рамках модели коалесценции/прокачивания диссоциация NIPBLсубъединицы от комплекса (периодически происходящая во время экструзии) может приводить к формированию единого субкомпартмента, удерживающего оба основания растущей петли. Предполагается, что взаимодействие STAG1/2-субъединицы с якорем петли также может периодически нарушаться (рис. 6, в). Восстановление связывания оснований петли с HAWK-субъединицами может приводить к обмену двух нитей ДНК, что эквивалентно изменению направления экструзии. Таким образом, наблюдаемая симметричная когезинзависимая экструзия объясняется как результат

периодически происходящей смены направления асимметричного процесса. Модель также объясняет, почему в конденсине дикого типа экструзия носит строго однонаправленный характер [12, 126]. Предполагается, что это связано с дополнительной прочностью связывания якоря петли с комплексом, которая обеспечивается «ремнем безопасности» – уникальной структурой в составе клейзиновой субъединицы конденсина (рис. 5, *a*). Мутации, дестабилизирующие «ремень безопасности», могут приводить к конверсии конденсина в комплекс, осуществляющий, подобно когезину, двунаправленную экструзию [126].

Псевдотопологический вариант модели не согласуется, однако, с другим важным эмпирическим наблюдением, а именно со способностью, образуемой во время in vitro экструзии, петли включать внутрь себя массивные ДНК-связанные частицы [69]. Чтобы разрешить это противоречие был предложен нетопологический вариант модели [10]. Оказалось, что большинство эмпирических наблюдений, на которых базировалась изначальная псевдотопологическая модель, могут быть в равной степени объяснены, если предположить, что растущая при экструзии ДНК-петля не продета через комплекс (рис. 6, б). При этом связывание подвижного основания петли в отдельности осуществляется за счет небольшой псевдотопологической петли, образованной за счет взаимодействия NIPBL-субъединицы с наложенными головными доменами SMC-белков. При гидролизе ATP эта небольшая петля сливается с микропетлей, захватываемой внутри межсубъединичной поры, а затем затягивается до своего изначального состояния за счет «застегивания» плечевых доменов. Такой процесс, в отличие от экструзии, предполагаемой в рамках псевдотопологической модели, согласуется с наблюдаемым явлением прохождения когезинового комплекса через массивные преграды в ходе экструзии.

Парадоксальным образом, нетопологический вариант модели коалесценции/прокачивания, объясняющий способность когезина преодолевать препятствия, едва ли может объяснить двунаправленность когезин-зависимой экструзии: гипотетический обмен ДНК-нитями возможен только внутри общего псевдотопологического компартмента, удерживающего оба основания растущей петли. Большинство попыток описать молекулярные детали экструзии, осуществляемой когезином, сталкиваются с этой принципиальной проблемой: невозможностью в рамках одной модели согласовать двунаправленный характер экструзии и способность комплекса преодолевать массивные барьеры. При этом псевдотопологические модели, как правило, не могут быть удовлетворительно согласованы с преодолением массивных барьеров,

а нетопологические модели – с двунаправленным характером процесса. Некоторые авторы, однако, предполагают, что определенные варианты нетопологических моделей могут при определенных допущениях объяснять обмен ДНК-цепей, переключение направления экструзии и в конечном итоге двунаправленность процесса [128].

Модель броуновского храповика. Две другие модели, которые мы опишем далее, относятся к группе моделей экструзии за счет сгибания «локтей» (scrunching models). В них предполагается, что сгибание «локтей» и происходящее в этот момент сближение петлевых доменов с головными сопряжено с передачей подвижного основания петли от одной пары доменов другой [134, 138]. В отличие от модели коалесценции/прокачивания, в которой ключевым конформационным изменением, сопряженным с циклом связывания/гидролиза АТР, является «застегивание» межсубъединичной поры, в моделях экструзии за счет сгибания «локтей» центральным элементом рабочего хода комплекса является сгибание и разгибание «локтей».

В основе моделей этого типа лежит тот факт, что когезин и другие SMC-комплексы могут находиться в конформациях, в которых «локти» полностью согнуты, а головные и петлевые домены сближены между собой [134, 139]. Криоэлектронные данные, полученные при изучении комплексов в состоянии «захвата», показали, что такое сгибание потенциально может быть синхронизировано со связыванием АТР и формированием «ДНК-захвата» [60, 61, 131]. Дополнительные структурные данные, полученные с помощью атомносиловой микроскопии, FRET, ковалентного сшивания комплексов и наблюдений за способностью мутантных комплексов формировать петли in vitro привели к созданию двух наиболее детальных моделей экструзии за счет сгибания «локтей»: модели броуновского храповика [127, 131] и модели «гребок-захват» [124].

Модель броуновского храповика представляет собой модель экструзии за счет сгибания «локтей» с протягиванием псевдотопологической ДНК-петли через когезиновое кольцо. Модель была предложена группой Uhlmann [127, 131] одновременно с публикацией одной из первых структур когезина в состоянии «захвата». Авторы обратили внимание на то, что в полученных криоструктурах STAG1/2 связывается с ДНК по соседству с сайтом «захвата» и что за счет сгибания «локтей» димер петлевых доменов находится в непосредственной близости от STAG1/2 (рис. 7, a). Дополнительные FRET-эксперименты (не получившие подтверждения в других работах) показали, что взаимодействие между петлевыми доменами и STAG1/2 в комплексе носят конститутивный характер. Таким образом, в рамках модели броуновского храповика когезин имеет

два ДНК-связывающих модуля: головной, ассоциированный с NIPBL, и петлевой, ассоциированный со STAG1/2. В отличие от модели коалесценции/прокачивания и модели «гребок-захват», в модели броуновского храповика обе HAWK-субъединицы связываются с подвижным основанием петли, а удерживание якоря петли происходит пассивно – за счет псевдотопологического характера взаимодействия комплекса с ДНК.

Предполагается, что разрушение «ДНК-захвата», сопряженное с гидролизом АТР, приводит к разгибанию «локтей» и дестабилизации взаимодействия STAG1/2-петлевого модуля с ДНК. Эта дестабилизация в конечном итоге ведет к потере взаимодействия, однако прежде чем связь между STAG1/2-петлевым модулем и ДНК окончательно разрушается, «локти» успевают в большей или меньшей степени разогнуться (рис. 7, а). Разгибание приводит к увеличению захваченной псевдотопологической ДНК-петли за счет движения комплекса вдоль одной из нитей ДНК - однонаправленной экструзии. Псевдотопологическое взаимодействие комплекса с ДНК позволяет комплексу удерживать образованную петлю даже после потери электростатических взаимодействий. Растущая ДНК-петля удерживается псевдотопологически внутри межсубъединичной поры до связывания АТР и формирования нового «ДНКзахвата».

Предполагается, что разгибание «локтей» – равновесный процесс, реализуемый обратимо за счет теплового движения; направленный характер экструзия приобретает за счет своеобразного храпового механизма: движение рабочего хода всегда начинается в состоянии «захвата» в полностью согнутом состоянии «локтей». Эти две особенности движения когезина, описываемого моделью броуновского храповика, отражены в ее названии.

Как и псевдотопологический вариант модели коалесценции/прокачивания, модель броуновского храповика объясняет двунаправленный характер когезин-зависимой экструзии обменом ДНК-нитей в растущей петле, который потенциально возможен на каждом из циклов связывания/гидролиза АТР на этапе пассивного удерживания псевдотопологической петли внутри когезинового кольца. Равновесный характер разгибания «локтей» объясняет то, почему слабые внешние силы полностью останавливают SMC-зависимую экструзию *in vitro*.

Существенными недостатками модели броуновского храповика являются: (1) невозможность согласования псевдотопологической экструзии с экспериментально наблюдаемой способностью когезина преодолевать массивные барьеры [69] и (2) отсутствие независимых подтверждений существования STAG1/2-петлевого ДНК-связывающего модуля.

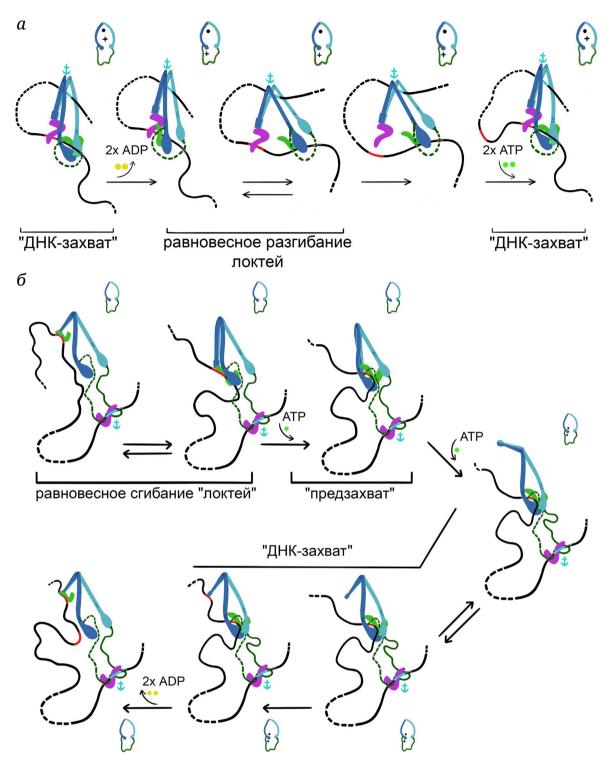


Рис. 7. Когезин-зависимая экструзия за счет сгибания «локтей». a – Экструзия по механизму броуновского храповика (по данным Higashi et al. [127]). δ – Экструзия по механизму «гребок-захват» (по данным Bauer et al. [124]). Пунктирные части RAD21-субъединицы соответствуют областям, в которых путь белковой цепи для ясности рисунка показан условно (в действительности HAWK-субъединицы остаются связанными с RAD21 на всех представленных стадиях). Остальные обозначения – как на рис. 6

Модель «гребок-захват». Другая модель экструзии за счет сгибания «локтей», предложенная группой Peters [123], предполагает, что связывание ДНК петлевыми доменами и сгибание «локтей»

(«гребок») предваряют формирование конфигурации «захвата», поэтому эта модель получила название «гребок-захват» [124]. Модель основана на двух ключевых наблюдениях, сделанных с помощью

техники FRET: 1) белок NIPBL, конститутивно взаимодействующий с RAD21, может образовывать АТР-зависимые временные контакты с другими субъединицами комплекса и 2) несмотря на относительно свободный характер сгибания/ разгибания плечевых доменов, в состоянии «захвата» никогда не происходит непосредственного взаимодействия между петлевыми и головными доменами, а значит «локти» находятся в более или менее разогнутом состоянии. Эта модель предполагает нетопологический характер экструзии со стабильным основанием петли, заякоренным на STAG1/2 (как и в модели коалесценции/прокачивания). Перемещение подвижного основания петли относительно SMC-комплекса происходит за счет передачи ДНК от петлевых доменов к головным при образовании «ДНК-захвата» и последующего разгибания «локтей» (рис. 7, б). Такая передача происходит в ходе формирования «ДНК-захвата» и сопряжена с изменением типа взаимодействий NIPBL с SMC-субъединицами комплекса. До формирования «захвата» NIPBL ассоциирован с петлевыми доменами, и вместе они удерживают ДНК подвижного основания петли. При формировании «захвата» происходит передача подвижного основания петли и удерживающей его NIPBL-субъединицы от петлевых доменов головным, при этом петлевые домены теряют связь с NIPBL; также за счет аллостерических эффектов формирования «ДНК-захвата» происходит разгибание локтевых участков плечевых доменов. Предполагается, что еще до гидролиза АТР и последующего разбора «захвата» петлевые домены могут связывать новый участок ДНК, становящийся новым подвижным основанием растущей петли. Разбор захвата приводит к диссоциации NIPBL от головных доменов, его обратному перескоку на петлевые домены и началу нового цикла конформационных изменений. Таким образом, в отличие от модели броуновского храповика, в модели «гребок-захват» подвижное основание петли на протяжении всего цикла электростатически связано с той или иной ДНК-связывающей поверхностью когезина. Такой постоянный контакт необходим для удерживания нетопологической ДНК-петли.

Помимо того, что модель «гребок-захват» согласуется со множеством структурных данных, она дает внятное объяснение того, как именно согласованы процессы сгибания/разгибания «локтей» с циклом связывания/гидролиза АТР и с передачей ДНК-нити от петлевых доменов головным. Сгибание плечевых доменов в рамках этой модели необходимо для формирования «ДНК-захвата» и гидролиза АТР, что, в свою очередь, приводит к передаче подвижного ДНК-якоря от одного участка связывания другому. По меньшей мере частичное разгибание «локтей», непременно предшествующее

связыванию нового подвижного основания растущей петли петлевыми доменами, обеспечивает направленный характер движения экструзионного комплекса. Следует отметить, что в модели «гребок-захват» разгибание плечевых доменов, обеспечивающее движение когезинового комплекса относительно ДНК, так же как и в модели броуновского храповика, носит равновесный характер, что объясняет высокую чувствительность скорости экструзии к внешним силам [122, 125]. Нетопологическая природа экструзии в рамках этой модели согласуется со способностью экструзионного комплекса преодолевать массивные ДНК-связанные частицы [69]. В то же время модель «гребок-захват» предсказывает однонаправленный характер экструзии, что противоречит наблюдениям, сделанным в реконструированных in vitro системах [123, 125].

КОГЕЗИЯ И КОГЕЗИН-ЗАВИСИМАЯ ЭКСТРУЗИЯ МОГУТ БЫТЬ МЕХАНИСТИЧЕСКИ СВЯЗАНЫ МЕЖДУ СОБОЙ

Со времени своего открытия и до настоящего момента когезин более известен как комплекс, обеспечивающий когезию сестринских хроматид за счет своей способности к топологическому надеванию на ДНК. Тот факт, что когезин также является ДНК-транслоказой, способной к формированию ДНК-петель по механизму экструзии, зачастую воспринимается как второстепенная деталь, необязательное дополнение к его основной когезивной функции. Обнаружение вовлеченности когезин-зависимой экструзии во все большее число клеточных процессов все убедительнее указывает на ложность такого представления: экструзия является одной из базовых активностей когезина, наряду с когезией. Такая точка зрения хорошо согласуется с эволюционной примитивностью экструзии, реализуемой едва ли не всеми известными SMCкомплексами [12-14, 123]. Когезивное связывание сестринских хроматид в филогенетическом плане, вероятно, возникло как адаптация предшественника когезина к выполнению дополнительной, не характерной для других гомологичных комплексов, функции [15-17]. В этой связи еще большее внимание привлекает одна из нерешенных загадок биологии когезинового комплекса, а именно вопрос о том, являются ли когезия и экструзия частью единого молекулярного каскада?

Многие авторы склоняются к интуитивно более естественному положительному ответу на этот вопрос [61, 127]. Тем не менее даже самая общая схема этого каскада до сих пор является предметом споров. Эволюция представлений о природе этого каскада оказалась тесно переплетена с изучением

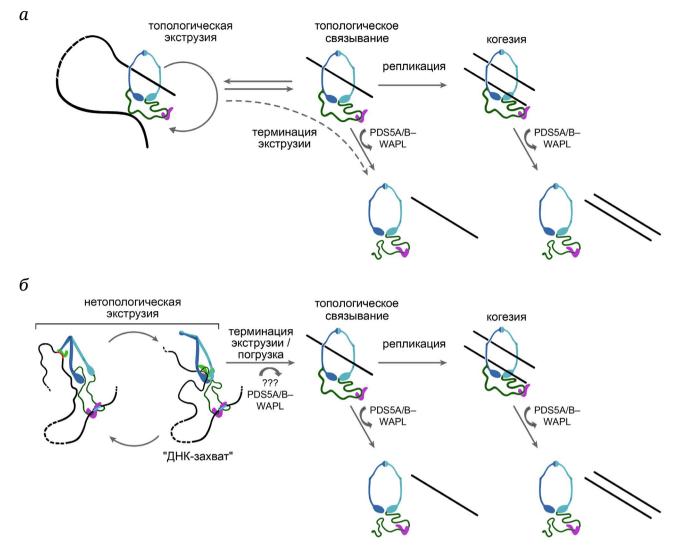


Рис. 8. Схема гипотетического молекулярного каскада, связывающего процесс когезин-зависимой экструзии и установление когезии. a – Первоначально предложенная схема каскада: сопряжение топологической погрузки когезина на ДНК с инициацией экструзии. b – Модифицированная схема каскада, учитывающая накопленные структурные данные о процессе экструзии: сопряжение топологической погрузки когезина с терминацией экструзии. Центральное место в переключении между экструзией и топологическим надеванием занимает конфигурация «ДНК-захвата»

модальности связывания когезина с ДНК при экструзии. Самым общим указанием на наличие механистической связи между экструзией и когезией является тот факт, что PDS5A/B-субъединица и белок WAPL участвуют одновременно и в снятии когезивных колец с ДНК [47, 48], и в терминации экструзии [41, 42, 44, 51]. Первоначально это наблюдение привело к формированию гипотетической схемы, связывающей две активности когезина, в которой экструзия осуществляется топологически-надетыми когезиновыми кольцами, и такие кольца могут быть конвертированы в когезивные комплексы в ходе репликации (рис. 8, *a*).

Однако накопление новых данных привело к вытеснению этой наивной модели. В первую очередь речь идет о структурных данных, указываю-

щих на то, что экструзия осуществляется когезиновыми комплексами, не надетыми топологически на ДНК-нить [69, 123, 130]. Эти структурные данные получили генетическое подтверждение: были обнаружены мутации в SMC-субъединицах, которые подавляют способность комплекса к топологическому надеванию и почти не влияют на его способность к экструзии [8, 18]. Теперь, когда можно с достаточной уверенностью утверждать, что экструзия осуществляется по нетопологическому или псевдотопологическому механизму, доминирующей стала концепция, согласно которой топологическое надевание когезина (и последующее установление когезии) является одним из возможных вариантов завершения экструзионного цикла гидролиза АТР. Многие авторы обращают внимание на возможную роль «ДНК-захвата» в качестве узлового звена, в котором может происходить выбор между продолжением цикла экструзии и топологическим надеванием, приводящим к завершению экструзии (рис. 8, б) [61, 127]. Роль тандема PDS5A/B–WAPL может заключаться в направлении реакции в сторону завершения цикла экструзии и формирования топологического связывания [130]. Такой гипотетический сценарий предполагает, что PDS5A/B–WAPL за счет своей способности к раскрытию когезинового кольца катализирует сразу две реакции в клетке: реакцию топологической погрузки/терминации экструзии для комплексов, участвующих в экструзии, и реакцию снятия топологически надетых когезивных колец.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На протяжении многих лет экструзия ДНКпетель была по большей части умозрительной концепцией; некоторые авторы в это время указывали на то, что экструзия может объяснять ряд клеточных процессов, например декатенацию сестринских геномных молекул [53]. Последнее десятилетие стало временем накопления сначала косвенных, а затем и прямых экспериментальных подтверждений того, что этот процесс в клетке действительно реализуется, и главными действующими лицами в нем являются SMC-комплексы [12, 66, 111, 123]. Можно сказать, что мы стали свидетелями исключительно редкого явления: подтверждения теоретического предсказания в биологии.

Изучение архитектуры SMC-комплексов, анализ молекулярных факторов, влияющих на SMCзависимую экструзию и микроскопические наблюдения за экструзией в in vitro системах существенным образом конкретизировали наши представления о природе экструзии. Перечислим наиболее существенные наблюдения, касающиеся когезин-зависимой экструзии, сделанные в последние годы: 1) двунаправленный характер процесса [122, 123]; 2) нетопологическая или псевдотопологическая природа связывания экструзионного комплекса с ДНК [8, 18, 69, 123, 130]; 3) высокая скорость роста петли, достигающая нескольких т.п.о. за секунду [33, 88, 122-124]; 4) ключевая роль NIPBLсубъединицы в процессе активной экструзии [42, 122, 123]; 5) периодическое АТР-зависимое формирование структуры «ДНК-захвата» при прохождении цикла конформационных изменений, ассоциированных с экструзией [60, 61, 131]; 6) участие PDS5A/В и привлекаемого им белка WAPL в терминации [41, 42, 44, 51]; 7) блокировка движения экструзионных комплексов в специальных геномных областях, СТСF-сайтах и CAR-регионах, приводящая к формированию метастабильных петель, заякоренных в этих областях [44, 58, 59]. Перечисленные результаты, несмотря на исключительную значимость, представляют набор более-менее разрозненных фактов, не складывающийся в единую стройную картину. Попытки обрисовать общий контур такой универсальной картины уже предпринимаются [140]. Важнейшим компонентом такой картины должно стать детальное описание молекулярных перестроений комплекса во время экструзии. В данном обзоре мы среди прочего описали три наиболее убедительных на данный момент молекулярных модели экструзии, каждая из них пока носит более или менее спекулятивный характер и может быть согласована только с частью имеющихся экспериментальных данных. Мы также затронули вопрос о механистических взаимоотношениях между экструзией и когезией, от понимания которого мы также все еще очень далеки. Дополнительные данные в самом ближайшем будущем могут заполнить имеющиеся пробелы в наших представлениях о механике экструзии и позволят создать единую стройную экспериментально обоснованную модель процесса, что, как кажется, является необходимым условием для решения этой интригующей загадки когезина, двуликого Януса биологии эукариотических хромосом.

Вклад авторов. Голов А.К. – обобщение данных, написание первоначального текста рукописи; Гаврилов А.А. – постановка проблемы, руководство и редактирование текста.

Благодарности. Авторы благодарят Разина С.В. за глубокое и плодотворное обсуждение многих тем, затронутых в этом обзоре. Также авторы выражают признательность Головой А.В. за помощь в подготовке иллюстраций.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00001).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yatskevich, S., Rhodes, J., and Nasmyth, K. (2019) Organization of chromosomal DNA by SMC complexes, *Annu. Rev. Genet.*, **53**, 445-482, https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043633.

- 2. Davidson, I. F., and Peters, J.-M. (2021) Genome folding through loop extrusion by SMC complexes, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **22**, 445-464, https://doi.org/10.1038/s41580-021-00349-7.
- 3. Strunnikov, A. V., Larionov, V. L., and Koshland, D. (1993) SMC1: an essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family, *J. Cell Biol.*, **123**, 1635-1648, https://doi.org/10.1083/jcb.123.6.1635.
- 4. Michaelis, C., Ciosk, R., and Nasmyth, K. (1997) Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids, *Cell*, **91**, 35-45, https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)80007-6.
- 5. Guacci, V., Koshland, D., and Strunnikov, A. (1997) A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*, *Cell*, **91**, 47-57, https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)80008-8.
- 6. Gruber, S., Haering, C. H., and Nasmyth, K. (2003) Chromosomal cohesin forms a ring, *Cell*, **112**, 765-777, https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00162-4.
- 7. Gligoris, T. G., Scheinost, J. C., Bürmann, F., Petela, N., Chan, K.-L., Uluocak, P., Beckouët, F., Gruber, S., Nasmyth, K., and Löwe, J. (2014) Closing the cohesin ring: structure and function of its Smc3-kleisin interface, *Science*, **346**, 963-967, https://doi.org/10.1126/science.1256917.
- 8. Srinivasan, M., Scheinost, J. C., Petela, N. J., Gligoris, T. G., Wissler, M., Ogushi, S., Collier, J. E., Voulgaris, M., Kurze, A., Chan, K.-L., Hu, B., Costanzo, V., and Nasmyth, K. A. (2018) The cohesin ring uses its hinge to organize DNA using non-topological as well as topological mechanisms, *Cell*, 173, 1508-1519.e18, https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.015.
- 9. Peters, J.-M., Tedeschi, A., and Schmitz, J. (2008) The cohesin complex and its roles in chromosome biology, *Genes Dev.*, 22, 3089-3114, https://doi.org/10.1101/gad.1724308.
- 10. Oldenkamp, R., and Rowland, B. D. (2022) A walk through the SMC cycle: from catching DNAs to shaping the genome, *Mol. Cell*, **82**, 1616-1630, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.04.006.
- 11. Kabirova, E., Nurislamov, A., Shadskiy, A., Smirnov, A., Popov, A., Salnikov, P., Battulin, N., and Fishman, V. (2023) Function and evolution of the loop extrusion machinery in animals, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 5017, https://doi.org/10.3390/ijms24055017.
- 12. Ganji, M., Shaltiel, I. A., Bisht, S., Kim, E., Kalichava, A., Haering, C. H., and Dekker, C. (2018) Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensin, *Science*, **360**, 102-105, https://doi.org/10.1126/science.aar7831.
- 13. Pradhan, B., Kanno, T., Umeda Igarashi, M., Loke, M. S., Baaske, M. D., Wong, J. S. K., Jeppsson, K., Björkegren, C., and Kim, E. (2023) The Smc5/6 complex is a DNA loop-extruding motor, *Nature*, **616**, 843-848, https://doi.org/10.1038/s41586-023-05963-3.
- 14. Wang, X., Hughes, A. C., Brandão, H. B., Walker, B., Lierz, C., Cochran, J. C., Oakley, M. G., Kruse, A. C., and Rudner, D. Z. (2018) *In vivo* evidence for ATPase-dependent DNA translocation by the *Bacillus subtilis* SMC condensin complex, *Mol. Cell*, **71**, 841-847.e5, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.006.
- 15. Yoshinaga, M., and Inagaki, Y. (2021) Ubiquity and origins of structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins in eukaryotes, *Genome Biol. Evol.*, **13**, evab256, https://doi.org/10.1093/gbe/evab256.
- 16. Wells, J. N., Gligoris, T. G., Nasmyth, K. A., and Marsh, J. A. (2017) Evolution of condensin and cohesin complexes driven by replacement of Kite by Hawk proteins, *Curr. Biol.*, **27**, R17-R18, https://doi.org/10.1016/j.cub. 2016.11.050.
- 17. Batty, P., Langer, C. C. H., Takács, Z., Tang, W., Blaukopf, C., Peters, J.-M., and Gerlich, D. W. (2023) Cohesin-mediated DNA loop extrusion resolves sister chromatids in G2 phase, *EMBO J.*, **42**, e113475, https://doi.org/10.15252/embj.2023113475.
- 18. Nagasaka, K., Davidson, I. F., Stocsits, R. R., Tang, W., Wutz, G., Batty, P., Panarotto, M., Litos, G., Schleiffer, A., Gerlich, D. W., and Peters, J.-M. (2023) Cohesin mediates DNA loop extrusion and sister chromatid cohesion by distinct mechanisms, *Mol. Cell*, **83**, 3049-3063.e6, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.07.024.
- 19. Golov, A. K., and Gavrilov, A. A. (2024) Cohesin complex: structure and principles of interaction with DNA, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 585-600, https://doi.org/S0006297924040011.
- 20. Gligoris, T., and Löwe, J. (2016) Structural insights into ring formation of cohesin and related Smc complexes, *Trends Cell Biol.*, **26**, 680-693, https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.04.002.
- 21. Stigler, J., Çamdere, G. Ö., Koshland, D. E., and Greene, E. C. (2016) Single-molecule imaging reveals a collapsed conformational state for DNA-bound cohesin, *Cell Rep.*, **15**, 988-998, https://doi.org/10.1016/j.celrep. 2016.04.003.
- 22. Krishnan, A., Burroughs, A. M., Iyer, L. M., and Aravind, L. (2020) Comprehensive classification of ABC ATPases and their functional radiation in nucleoprotein dynamics and biological conflict systems, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 10045-10075, https://doi.org/10.1093/nar/gkaa726.
- 23. Lee, H., Noh, H., and Ryu, J.-K. (2021) Structure-function relationships of SMC protein complexes for DNA loop extrusion, *Biodesign*, **9**, 1-13, https://doi.org/10.34184/kssb.2021.9.1.1.

- 24. Ladurner, R., Kreidl, E., Ivanov, M. P., Ekker, H., Idarraga-Amado, M. H., Busslinger, G. A., Wutz, G., Cisneros, D. A., and Peters, J.-M. (2016) Sororin actively maintains sister chromatid cohesion, *EMBO J.*, **35**, 635-653, https://doi.org/10.15252/embj.201592532.
- 25. Rhodes, J. D. P., Haarhuis, J. H. I., Grimm, J. B., Rowland, B. D., Lavis, L. D., and Nasmyth, K. A. (2017) Cohesin can remain associated with chromosomes during DNA replication, *Cell Rep.*, **20**, 2749-2755, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.092.
- 26. Petela, N. J., Gligoris, T. G., Metson, J., Lee, B.-G., Voulgaris, M., Hu, B., Kikuchi, S., Chapard, C., Chen, W., Rajendra, E., Srinivisan, M., Yu, H., Löwe, J., and Nasmyth, K. A. (2018) Scc2 is a potent activator of cohesin's ATPase that promotes loading by binding Scc1 without Pds5, *Mol. Cell*, 70, 1134-1148.e7, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.022.
- 27. Cattoglio, C., Pustova, I., Walther, N., Ho, J. J., Hantsche-Grininger, M., Inouye, C. J., Hossain, M. J., Dailey, G. M., Ellenberg, J., Darzacq, X., Tjian, R., and Hansen, A. S. (2019) Determining cellular CTCF and cohesin abundances to constrain 3D genome models, *Elife*, **8**, e40164, https://doi.org/10.7554/eLife.40164.
- 28. Holzmann, J., Politi, A. Z., Nagasaka, K., Hantsche-Grininger, M., Walther, N., Koch, B., Fuchs, J., Dürnberger, G., Tang, W., Ladurner, R., Stocsits, R. R., Busslinger, G. A., Novák, B., Mechtler, K., Davidson, I. F., Ellenberg, J., and Peters, J.-M. (2019) Absolute quantification of cohesin, CTCF and their regulators in human cells, *Elife*, 8, e46269, https://doi.org/10.7554/eLife.46269.
- 29. Gerlich, D., Koch, B., Dupeux, F., Peters, J.-M., and Ellenberg, J. (2006) Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication, *Curr. Biol.*, **16**, 1571-1578, https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.068.
- 30. McNairn, A. J., and Gerton, J. L. (2009) Intersection of ChIP and FLIP, genomic methods to study the dynamics of the cohesin proteins, *Chromosome Res.*, 17, 155-163, https://doi.org/10.1007/s10577-008-9007-9.
- 31. Hansen, A. S., Pustova, I., Cattoglio, C., Tjian, R., and Darzacq, X. (2017) CTCF and cohesin regulate chromatin loop stability with distinct dynamics, *Elife*, **6**, e25776, https://doi.org/10.7554/eLife.25776.
- 32. Mishra, A., Hu, B., Kurze, A., Beckouët, F., Farcas, A.-M., Dixon, S. E., Katou, Y., Khalid, S., Shirahige, K., and Nasmyth, K. (2010) Both interaction surfaces within cohesin's hinge domain are essential for its stable chromosomal association, *Curr. Biol.*, **20**, 279-289, https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.059.
- 33. Golfier, S., Quail, T., Kimura, H., and Brugués, J. (2020) Cohesin and condensin extrude DNA loops in a cell cycle-dependent manner, *Elife*, **9**, e53885, https://doi.org/10.7554/eLife.53885.
- 34. Abramo, K., Valton, A.-L., Venev, S. V., Ozadam, H., Fox, A. N., and Dekker, J. (2019) A chromosome folding intermediate at the condensin-to-cohesin transition during telophase, *Nat. Cell Biol.*, **21**, 1393-1402, https://doi.org/10.1038/s41556-019-0406-2.
- 35. Zhang, H., Emerson, D. J., Gilgenast, T. G., Titus, K. R., Lan, Y., Huang, P., Zhang, D., Wang, H., Keller, C. A., Giardine, B., Hardison, R. C., Phillips-Cremins, J. E., and Blobel, G. A. (2019) Chromatin structure dynamics during the mitosis-to-G1 phase transition, *Nature*, **576**, 158-162, https://doi.org/10.1038/s41586-019-1778-y.
- 36. Dauban, L., Montagne, R., Thierry, A., Lazar-Stefanita, L., Bastié, N., Gadal, O., Cournac, A., Koszul, R., and Beckouët, F. (2020) Regulation of cohesin-mediated chromosome folding by Eco1 and other partners, *Mol. Cell*, 77, 1279-1293.e4, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.01.019.
- 37. Zuin, J., Dixon, J. R., van der Reijden, M. I. J. A., Ye, Z., Kolovos, P., Brouwer, R. W. W., van de Corput, M. P. C., van de Werken, H. J. G., Knoch, T. A., van Ijcken, W. F. J., Grosveld, F. G., Ren, B., and Wendt, K. S. (2014) Cohesin and CTCF differentially affect chromatin architecture and gene expression in human cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 996-1001, https://doi.org/10.1073/pnas.1317788111.
- 38. Busslinger, G. A., Stocsits, R. R., van der Lelij, P., Axelsson, E., Tedeschi, A., Galjart, N., and Peters, J.-M. (2017) Cohesin is positioned in mammalian genomes by transcription, CTCF and Wapl, *Nature*, **544**, 503-507, https://doi.org/10.1038/nature22063.
- 39. Vian, L., Pękowska, A., Rao, S. S. P., Kieffer-Kwon, K.-R., Jung, S., Baranello, L., Huang, S.-C., El Khattabi, L., Dose, M., Pruett, N., Sanborn, A. L., Canela, A., Maman, Y., Oksanen, A., Resch, W., Li, X., Lee, B., Kovalchuk, A. L., Tang, Z., Nelson, S., Di Pierro, M., Cheng, R. R., Machol, I., St Hilaire, B. G., Durand, N. C., et al. (2018) The energetics and physiological impact of cohesin extrusion, *Cell*, 173, 1165-1178.e20, https://doi.org/10.1016/j.cell. 2018.03.072.
- 40. Banigan, E. J., Tang, W., van den Berg, A. A., Stocsits, R. R., Wutz, G., Brandão, H. B., Busslinger, G. A., Peters, J.-M., and Mirny, L. A. (2023) Transcription shapes 3D chromatin organization by interacting with loop extrusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **120**, e2210480120, https://doi.org/10.1073/pnas.2210480120.
- 41. Wutz, G., Várnai, C., Nagasaka, K., Cisneros, D. A., Stocsits, R. R., Tang, W., Schoenfelder, S., Jessberger, G., Muhar, M., Hossain, M. J., Walther, N., Koch, B., Kueblbeck, M., Ellenberg, J., Zuber, J., Fraser, P., and Peters, J.-M. (2017) Topologically associating domains and chromatin loops depend on cohesin and are regulated by CTCF, WAPL, and PDS5 proteins, *EMBO J.*, **36**, 3573-3599, https://doi.org/10.15252/embj.201798004.

- 42. Haarhuis, J. H. I., van der Weide, R. H., Blomen, V. A., Omar Yáñez-Cuna, J., Amendola, M., van Ruiten, M. S., Krijger, P. H. L., Teunissen, H., Medema, R. H., van Steensel, B., Brummelkamp, T. R., de Wit, E., and Rowland, B. D. (2017) The cohesin release factor WAPL restricts chromatin loop extension, *Cell*, **169**, 693-707.e14, https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.013.
- 43. Wutz, G., Ladurner, R., St Hilaire, B. G., Stocsits, R. R., Nagasaka, K., Pignard, B., Sanborn, A., Tang, W., Várnai, C., Ivanov, M. P., Schoenfelder, S., van der Lelij, P., Huang, X., Dürnberger, G., Roitinger, E., Mechtler, K., Davidson, I. F., Fraser, P., Lieberman-Aiden, E., and Peters, J.-M. (2020) ESCO1 and CTCF enable formation of long chromatin loops by protecting cohesinSTAG1 from WAPL, *Elife*, 9, e52091, https://doi.org/10.7554/eLife.52091.
- 44. Costantino, L., Hsieh, T.-H. S., Lamothe, R., Darzacq, X., and Koshland, D. (2020) Cohesin residency determines chromatin loop patterns, *Elife*, **9**, e59889, https://doi.org/10.7554/eLife.59889.
- 45. Bastié, N., Chapard, C., Dauban, L., Gadal, O., Beckouët, F., and Koszul, R. (2022) Smc3 acetylation, Pds5 and Scc2 control the translocase activity that establishes cohesin-dependent chromatin loops, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **29**, 575-585, https://doi.org/10.1038/s41594-022-00780-0.
- 46. Mizuguchi, T., Fudenberg, G., Mehta, S., Belton, J.-M., Taneja, N., Folco, H. D., FitzGerald, P., Dekker, J., Mirny, L., Barrowman, J., and Grewal, S. I. S. (2014) Cohesin-dependent globules and heterochromatin shape 3D genome architecture in *S. pombe, Nature*, **516**, 432-435, https://doi.org/10.1038/nature13833.
- 47. Gandhi, R., Gillespie, P. J., and Hirano, T. (2006) Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase, *Curr. Biol.*, **16**, 2406-2417, https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.061.
- 48. Huis in 't Veld, P. J., Herzog, F., Ladurner, R., Davidson, I. F., Piric, S., Kreidl, E., Bhaskara, V., Aebersold, R., and Peters, J.-M. (2014) Characterization of a DNA exit gate in the human cohesin ring, *Science*, **346**, 968-972, https://doi.org/10.1126/science.1256904.
- 49. Alonso-Gil, D., and Losada, A. (2023) NIPBL and cohesin: new take on a classic tale, *Trends Cell Biol.*, **33**, 860-871, https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.03.006.
- 50. Schwarzer, W., Abdennur, N., Goloborodko, A., Pekowska, A., Fudenberg, G., Loe-Mie, Y., Fonseca, N. A., Huber, W., Haering, C. H., Mirny, L., and Spitz, F. (2017) Two independent modes of chromatin organization revealed by cohesin removal, *Nature*, 551, 51-56, https://doi.org/10.1038/nature24281.
- 51. Tedeschi, A., Wutz, G., Huet, S., Jaritz, M., Wuensche, A., Schirghuber, E., Davidson, I. F., Tang, W., Cisneros, D. A., Bhaskara, V., Nishiyama, T., Vaziri, A., Wutz, A., Ellenberg, J., and Peters, J.-M. (2013) Wapl is an essential regulator of chromatin structure and chromosome segregation, *Nature*, **501**, 564-568, https://doi.org/10.1038/nature12471.
- 52. Ur, S. N., and Corbett, K. D. (2021) Architecture and dynamics of meiotic chromosomes, *Annu. Rev. Genet.*, **55**, 497-526, https://doi.org/10.1146/annurev-genet-071719-020235.
- 53. Nasmyth, K. (2001) Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis, *Annu. Rev. Genet.*, **35**, 673-745, https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.091334.
- 54. Mach, P., Kos, P. I., Zhan, Y., Cramard, J., Gaudin, S., Tünnermann, J., Marchi, E., Eglinger, J., Zuin, J., Kryzhanovska, M., Smallwood, S., Gelman, L., Roth, G., Nora, E. P., Tiana, G., and Giorgetti, L. (2022) Cohesin and CTCF control the dynamics of chromosome folding, *Nat. Genet.*, 54, 1907-1918, https://doi.org/10.1038/s41588-022-01232-7.
- 55. Schalbetter, S. A., Fudenberg, G., Baxter, J., Pollard, K. S., and Neale, M. J. (2019) Principles of meiotic chromosome assembly revealed in *S. cerevisiae*, *Nat. Commun.*, **10**, 4795, https://doi.org/10.1038/s41467-019-12629-0.
- 56. Lengronne, A., Katou, Y., Mori, S., Yokobayashi, S., Kelly, G. P., Itoh, T., Watanabe, Y., Shirahige, K., and Uhlmann, F. (2004) Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription, *Nature*, **430**, 573-578, https://doi.org/10.1038/nature02742.
- 57. Schmidt, C. K., Brookes, N., and Uhlmann, F. (2009) Conserved features of cohesin binding along fission yeast chromosomes, *Genome Biol.*, **10**, R52, https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-5-r52.
- 58. Nora, E. P., Caccianini, L., Fudenberg, G., So, K., Kameswaran, V., Nagle, A., Uebersohn, A., Hajj, B., Saux, A. L., Coulon, A., Mirny, L. A., Pollard, K. S., Dahan, M., and Bruneau, B. G. (2020) Molecular basis of CTCF binding polarity in genome folding, *Nat. Commun.*, **11**, 5612, https://doi.org/10.1038/s41467-020-19283-x.
- 59. Li, Y., Haarhuis, J. H. I., Sedeño Cacciatore, Á., Oldenkamp, R., van Ruiten, M. S., Willems, L., Teunissen, H., Muir, K. W., de Wit, E., Rowland, B. D., and Panne, D. (2020) The structural basis for cohesin-CTCF-anchored loops, *Nature*, 578, 472-476, https://doi.org/10.1038/s41586-019-1910-z.
- 60. Shi, Z., Gao, H., Bai, X.-C., and Yu, H. (2020) Cryo-EM structure of the human cohesin-NIPBL-DNA complex, *Science*, **368**, 1454-1459, https://doi.org/10.1126/science.abb0981.
- 61. Collier, J. E., Lee, B.-G., Roig, M. B., Yatskevich, S., Petela, N. J., Metson, J., Voulgaris, M., Gonzalez Llamazares, A., Löwe, J., and Nasmyth, K. A. (2020) Transport of DNA within cohesin involves clamping on top of engaged heads by Scc2 and entrapment within the ring by Scc3, *Elife*, **9**, e59560, https://doi.org/10.7554/eLife.59560.
- 62. Beckouët, F., Srinivasan, M., Roig, M. B., Chan, K.-L., Scheinost, J. C., Batty, P., Hu, B., Petela, N., Gligoris, T., Smith, A. C., Strmecki, L., Rowland, B. D., and Nasmyth, K. (2016) Releasing activity disengages cohesin's Smc3/Scc1 interface in a process blocked by acetylation, *Mol. Cell*, 61, 563-574, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.026.

- 63. Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J. S., and Ren, B. (2012) Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions, *Nature*, **485**, 376-380, https://doi.org/10.1038/nature11082.
- 64. Pugacheva, E. M., Kubo, N., Loukinov, D., Tajmul, M., Kang, S., Kovalchuk, A. L., Strunnikov, A. V., Zentner, G. E., Ren, B., and Lobanenkov, V. V. (2020) CTCF mediates chromatin looping via N-terminal domain-dependent cohesin retention, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 2020-2031, https://doi.org/10.1073/pnas.1911708117.
- 65. Rao, S. S. P., Huntley, M. H., Durand, N. C., Stamenova, E. K., Bochkov, I. D., Robinson, J. T., Sanborn, A. L., Machol, I., Omer, A. D., Lander, E. S., and Aiden, E. L. (2014) A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping, *Cell*, 159, 1665-1680, https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.021.
- 66. Sanborn, A. L., Rao, S. S. P., Huang, S.-C., Durand, N. C., Huntley, M. H., Jewett, A. I., Bochkov, I. D., Chinnappan, D., Cutkosky, A., Li, J., Geeting, K. P., Gnirke, A., Melnikov, A., McKenna, D., Stamenova, E. K., Lander, E. S., and Aiden, E. L. (2015) Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E6456-E6465, https://doi.org/10.1073/pnas.1518552112.
- 67. Gómez-Marín, C., Tena, J. J., Acemel, R. D., López-Mayorga, M., Naranjo, S., de la Calle-Mustienes, E., Maeso, I., Beccari, L., Aneas, I., Vielmas, E., Bovolenta, P., Nobrega, M. A., Carvajal, J., and Gómez-Skarmeta, J. L. (2015) Evolutionary comparison reveals that diverging CTCF sites are signatures of ancestral topological associating domains borders, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112, 7542-7547, https://doi.org/10.1073/pnas.1505463112.
- 68. Davidson, I. F., Goetz, D., Zaczek, M. P., Molodtsov, M. I., Huis In 't Veld, P. J., Weissmann, F., Litos, G., Cisneros, D. A., Ocampo-Hafalla, M., Ladurner, R., Uhlmann, F., Vaziri, A., and Peters, J.-M. (2016) Rapid movement and transcriptional re-localization of human cohesin on DNA, *EMBO J.*, **35**, 2671-2685, https://doi.org/10.15252/embj.201695402.
- 69. Pradhan, B., Barth, R., Kim, E., Davidson, I. F., Bauer, B., van Laar, T., Yang, W., Ryu, J.-K., van der Torre, J., Peters, J.-M., and Dekker, C. (2022) SMC complexes can traverse physical roadblocks bigger than their ring size, *Cell Rep.*, 41, 111491, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111491.
- 70. Hsieh, T.-H. S., Fudenberg, G., Goloborodko, A., and Rando, O. J. (2016) Micro-C XL: assaying chromosome conformation from the nucleosome to the entire genome, *Nat. Methods*, **13**, 1009-1011, https://doi.org/10.1038/nmeth.4025.
- 71. Valton, A.-L., Venev, S. V., Mair, B., Khokhar, E. S., Tong, A. H. Y., Usaj, M., Chan, K., Pai, A. A., Moffat, J., and Dekker, J. (2022) A cohesin traffic pattern genetically linked to gene regulation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **29**, 1239-1251, https://doi.org/10.1038/s41594-022-00890-9.
- 72. Sundin, O., and Varshavsky, A. (1980) Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers, *Cell*, 21, 103-114, https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90118-x.
- 73. Wang, J. C. (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 430-440, https://doi.org/10.1038/nrm831.
- 74. Orlandini, E., Marenduzzo, D., and Michieletto, D. (2019) Synergy of topoisomerase and structural-maintenance-of-chromosomes proteins creates a universal pathway to simplify genome topology, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 8149-8154, https://doi.org/10.1073/pnas.1815394116.
- 75. Nolivos, S., and Sherratt, D. (2014) The bacterial chromosome: architecture and action of bacterial SMC and SMC-like complexes, *FEMS Microbiol. Rev.*, **38**, 380-392, https://doi.org/10.1111/1574-6976.12045.
- 76. Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M. P., Neuwald, A. F., and Hirano, T. (2003) Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells, *Cell*, 115, 109-121, https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00724-4.
- 77. Ono, T., Fang, Y., Spector, D. L., and Hirano, T. (2004) Spatial and temporal regulation of condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells, *Mol. Biol. Cell*, **15**, 3296-3308, https://doi.org/10.1091/mbc.e04-03-0242.
- 78. Piazza, I., Haering, C. H., and Rutkowska, A. (2013) Condensin: crafting the chromosome landscape, *Chromosoma*, **122**, 175-190, https://doi.org/10.1007/s00412-013-0405-1.
- 79. Houlard, M., Cutts, E. E., Shamim, M. S., Godwin, J., Weisz, D., Presser Aiden, A., Lieberman Aiden, E., Schermelleh, L., Vannini, A., and Nasmyth, K. (2021) MCPH1 inhibits condensin II during interphase by regulating its SMC2-Kleisin interface, *Elife*, **10**, e73348, https://doi.org/10.7554/eLife.73348.
- 80. Oomen, M. E., Hedger, A. K., Watts, J. K., and Dekker, J. (2020) Detecting chromatin interactions between and along sister chromatids with SisterC, *Nat. Methods*, **17**, 1002-1009, https://doi.org/10.1038/s41592-020-0930-9.
- 81. Mitter, M., Gasser, C., Takacs, Z., Langer, C. C. H., Tang, W., Jessberger, G., Beales, C. T., Neuner, E., Ameres, S. L., Peters, J.-M., Goloborodko, A., Micura, R., and Gerlich, D. W. (2020) Conformation of sister chromatids in the replicated human genome, *Nature*, **586**, 139-144, https://doi.org/10.1038/s41586-020-2744-4.
- 82. Freeman, L., Aragon-Alcaide, L., and Strunnikov, A. (2000) The condensin complex governs chromosome condensation and mitotic transmission of rDNA, *J. Cell Biol.*, **149**, 811-824, https://doi.org/10.1083/jcb.149.4.811.
- 83. Nagasaka, K., Hossain, M. J., Roberti, M. J., Ellenberg, J., and Hirota, T. (2016) Sister chromatid resolution is an intrinsic part of chromosome organization in prophase, *Nat. Cell Biol.*, **18**, 692-699, https://doi.org/10.1038/ncb3353.

- 84. Renshaw, M. J., Ward, J. J., Kanemaki, M., Natsume, K., Nédélec, F. J., and Tanaka, T. U. (2010) Condensins promote chromosome recoiling during early anaphase to complete sister chromatid separation, *Dev. Cell*, **19**, 232-244, https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.07.013.
- 85. Schalbetter, S. A., Goloborodko, A., Fudenberg, G., Belton, J.-M., Miles, C., Yu, M., Dekker, J., Mirny, L., and Baxter, J. (2017) SMC complexes differentially compact mitotic chromosomes according to genomic context, *Nat. Cell Biol.*, 19, 1071-1080, https://doi.org/10.1038/ncb3594.
- 86. Gibcus, J. H., Samejima, K., Goloborodko, A., Samejima, I., Naumova, N., Nuebler, J., Kanemaki, M. T., Xie, L., Paulson, J. R., Earnshaw, W. C., Mirny, L. A., and Dekker, J. (2018) A pathway for mitotic chromosome formation, *Science*, https://doi.org/10.1126/science.aao6135.
- 87. Hirano, T. (2012) Condensins: universal organizers of chromosomes with diverse functions, *Genes Dev.*, **26**, 1659-1678, https://doi.org/10.1101/gad.194746.112.
- 88. Rao, S. S. P., Huang, S.-C., Glenn St Hilaire, B., Engreitz, J. M., Perez, E. M., Kieffer-Kwon, K.-R., Sanborn, A. L., Johnstone, S. E., Bascom, G. D., Bochkov, I. D., Huang, X., Shamim, M. S., Shin, J., Turner, D., Ye, Z., Omer, A. D., Robinson, J. T., Schlick, T., Bernstein, B. E., Casellas, R., Lander, E. S., and Aiden, E. L. (2017) Cohesin loss eliminates all loop domains, *Cell*, 171, 305-320.e24, https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.026.
- 89. Hoencamp, C., Dudchenko, O., Elbatsh, A. M. O., Brahmachari, S., Raaijmakers, J. A., van Schaik, T., Sedeño Cacciatore, Á., Contessoto, V. G., van Heesbeen, R. G. H. P., van den Broek, B., Mhaskar, A. N., Teunissen, H., St Hilaire, B. G., Weisz, D., Omer, A. D., Pham, M., Colaric, Z., Yang, Z., Rao, S. S. P., Mitra, N., Lui, C., Yao, W., Khan, R., Moroz, L. L., Kohn, A., et al. (2021) 3D genomics across the tree of life reveals condensin II as a determinant of architecture type, *Science*, 372, 984-989, https://doi.org/10.1126/science.abe2218.
- 90. Tavares-Cadete, F., Norouzi, D., Dekker, B., Liu, Y., and Dekker, J. (2020) Multi-contact 3C reveals that the human genome during interphase is largely not entangled, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 1105-1114, https://doi.org/10.1038/s41594-020-0506-5.
- 91. Goundaroulis, D., Lieberman Aiden, E., and Stasiak, A. (2020) Chromatin is frequently unknotted at the megabase scale, *Biophys. J.*, **118**, 2268-2279, https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.11.002.
- 92. Hildebrand, E. M., Polovnikov, K., Dekker, B., Liu, Y., Lafontaine, D. L., Nicole Fox, A., Li, Y., Venev, S. V., Mirny, L., and Dekker, J. (2022) Chromosome decompaction and cohesin direct Topoisomerase II activity to establish and maintain an unentangled interphase genome, *bioRxiv*, https://doi.org/10.1101/2022.10.15.511838.
- 93. Portugal, J., and Rodríguez-Campos, A. (1996) T7 RNA polymerase cannot transcribe through a highly knotted DNA template, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4890-4894, https://doi.org/10.1093/nar/24.24.4890.
- 94. Sjögren, C., and Nasmyth, K. (2001) Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Biol.*, **11**, 991-995, https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00271-8.
- 95. Watrin, E., and Peters, J.-M. (2006) Cohesin and DNA damage repair, *Exp. Cell Res.*, **312**, 2687-2693, https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.06.024.
- 96. Gelot, C., Guirouilh-Barbat, J., Le Guen, T., Dardillac, E., Chailleux, C., Canitrot, Y., and Lopez, B. S. (2016) The cohesin complex prevents the end joining of distant DNA double-strand ends, *Mol. Cell*, **61**, 15-26, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.11.002.
- 97. Covo, S., Westmoreland, J. W., Gordenin, D. A., and Resnick, M. A. (2010) Cohesin is limiting for the suppression of DNA damage-induced recombination between homologous chromosomes, *PLoS Genet.*, **6**, e1001006, https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001006.
- 98. Dion, V., Kalck, V., Seeber, A., Schleker, T., and Gasser, S. M. (2013) Cohesin and the nucleolus constrain the mobility of spontaneous repair foci, *EMBO Rep.*, **14**, 984-991, https://doi.org/10.1038/embor.2013.142.
- 99. Piazza, A., Bordelet, H., Dumont, A., Thierry, A., Savocco, J., Girard, F., and Koszul, R. (2021) Cohesin regulates homology search during recombinational DNA repair, *Nat. Cell Biol.*, **23**, 1176-1186, https://doi.org/10.1038/s41556-021-00783-x.
- 100. Ström, L., Lindroos, H. B., Shirahige, K., and Sjögren, C. (2004) Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair, *Mol. Cell*, **16**, 1003-1015, https://doi.org/10.1016/j.molcel. 2004.11.026.
- 101. Unal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., Shroff, R., Lichten, M., Haber, J. E., and Koshland, D. (2004) DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain, *Mol. Cell*, **16**, 991-1002, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.027.
- 102. Arnould, C., Rocher, V., Finoux, A.-L., Clouaire, T., Li, K., Zhou, F., Caron, P., Mangeot, P. E., Ricci, E. P., Mourad, R., Haber, J. E., Noordermeer, D., and Legube, G. (2021) Loop extrusion as a mechanism for formation of DNA damage repair foci, *Nature*, **590**, 660-665, https://doi.org/10.1038/s41586-021-03193-z.
- 103. Collins, P. L., Purman, C., Porter, S. I., Nganga, V., Saini, A., Hayer, K. E., Gurewitz, G. L., Sleckman, B. P., Bednarski, J. J., Bassing, C. H., and Oltz, E. M. (2020) DNA double-strand breaks induce H2Ax phosphorylation domains in a contact-dependent manner, *Nat. Commun.*, 11, 3158, https://doi.org/10.1038/s41467-020-16926-x.

- 104. Arnould, C., Rocher, V., Saur, F., Bader, A. S., Muzzopappa, F., Collins, S., Lesage, E., Le Bozec, B., Puget, N., Clouaire, T., Mangeat, T., Mourad, R., Ahituv, N., Noordermeer, D., Erdel, F., Bushell, M., Marnef, A., and Legube, G. (2023) Chromatin compartmentalization regulates the response to DNA damage, *Nature*, **623**, 183-192, https://doi.org/10.1038/s41586-023-06635-y.
- 105. Gasperini, M., Tome, J. M., and Shendure, J. (2020) Towards a comprehensive catalogue of validated and target-linked human enhancers, *Nat. Rev. Genet.*, **21**, 292-310, https://doi.org/10.1038/s41576-019-0209-0.
- 106. Karr, J. P., Ferrie, J. J., Tjian, R., and Darzacq, X. (2022) The transcription factor activity gradient (TAG) model: contemplating a contact-independent mechanism for enhancer-promoter communication, *Genes Dev.*, **36**, 7-16, https://doi.org/10.1101/gad.349160.121.
- 107. Hsieh, T.-H. S., Cattoglio, C., Slobodyanyuk, E., Hansen, A. S., Rando, O. J., Tjian, R., and Darzacq, X. (2020) Resolving the 3D landscape of transcription-linked mammalian chromatin folding, *Mol. Cell*, 78, 539-553.e8, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.002.
- 108. Hsieh, T.-H. S., Cattoglio, C., Slobodyanyuk, E., Hansen, A. S., Darzacq, X., and Tjian, R. (2022) Enhancer-promoter interactions and transcription are largely maintained upon acute loss of CTCF, cohesin, WAPL or YY1, *Nat. Genet.*, 54, 1919-1932, https://doi.org/10.1038/s41588-022-01223-8.
- 109. Golov, A. K., Gavrilov, A. A., Kaplan, N., and Razin, S. V. (2023) A genome-wide nucleosome-resolution map of promoter-centered interactions in human cells corroborates the enhancer-promoter looping model, *bioRxiv*, https://doi.org/10.1101/2023.02.12.528105.
- 110. Kagey, M. H., Newman, J. J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. A., van Berkum, N. L., Ebmeier, C. C., Goossens, J., Rahl, P. B., Levine, S. S., Taatjes, D. J., Dekker, J., and Young, R. A. (2010) Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture, *Nature*, **467**, 430-435, https://doi.org/10.1038/nature09380.
- 111. Fudenberg, G., Imakaev, M., Lu, C., Goloborodko, A., Abdennur, N., and Mirny, L. A. (2016) Formation of chromosomal domains by loop extrusion, *Cell Rep.*, 15, 2038-2049, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.085.
- 112. Thiecke, M. J., Wutz, G., Muhar, M., Tang, W., Bevan, S., Malysheva, V., Stocsits, R., Neumann, T., Zuber, J., Fraser, P., Schoenfelder, S., Peters, J.-M., and Spivakov, M. (2020) Cohesin-dependent and -independent mechanisms mediate chromosomal contacts between promoters and enhancers, *Cell Rep.*, **32**, 107929, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107929.
- 113. Aljahani, A., Hua, P., Karpinska, M. A., Quililan, K., Davies, J. O. J., and Oudelaar, A. M. (2022) Analysis of sub-kilobase chromatin topology reveals nano-scale regulatory interactions with variable dependence on cohesin and CTCF, *Nat. Commun.*, **13**, 2139, https://doi.org/10.1038/s41467-022-29696-5.
- 114. Song, W., Sharan, R., and Ovcharenko, I. (2019) The first enhancer in an enhancer chain safeguards subsequent enhancer-promoter contacts from a distance, *Genome Biol.*, **20**, 197, https://doi.org/10.1186/s13059-019-1808-y.
- 115. Chakraborty, S., Kopitchinski, N., Zuo, Z., Eraso, A., Awasthi, P., Chari, R., Mitra, A., Tobias, I. C., Moorthy, S. D., Dale, R. K., Mitchell, J. A., Petros, T. J., and Rocha, P. P. (2023) Enhancer-promoter interactions can bypass CTCF-mediated boundaries and contribute to phenotypic robustness, *Nat. Genet.*, **55**, 280-290, https://doi.org/10.1038/s41588-022-01295-6.
- 116. Northcott, P. A., Lee, C., Zichner, T., Stütz, A. M., Erkek, S., Kawauchi, D., Shih, D. J. H., Hovestadt, V., Zapatka, M., Sturm, D., Jones, D. T. W., Kool, M., Remke, M., Cavalli, F. M. G., Zuyderduyn, S., Bader, G. D., VandenBerg, S., Esparza, L. A., Ryzhova, M., Wang, W., Wittmann, A., Stark, S., Sieber, L., Seker-Cin, H., Linke, L., et al. (2014) Enhancer hijacking activates GFI1 family oncogenes in medulloblastoma, *Nature*, 511, 428-434, https://doi.org/10.1038/nature13379.
- 117. Lupiáñez, D. G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., Klopocki, E., Horn, D., Kayserili, H., Opitz, J. M., Laxova, R., Santos-Simarro, F., Gilbert-Dussardier, B., Wittler, L., Borschiwer, M., Haas, S. A., Osterwalder, M., Franke, M., Timmermann, B., Hecht, J., Spielmann, M., Visel, A., and Mundlos, S. (2015) Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions, *Cell*, 161, 1012-1025, https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.004.
- 118. Franke, M., Ibrahim, D. M., Andrey, G., Schwarzer, W., Heinrich, V., Schöpflin, R., Kraft, K., Kempfer, R., Jerković, I., Chan, W.-L., Spielmann, M., Timmermann, B., Wittler, L., Kurth, I., Cambiaso, P., Zuffardi, O., Houge, G., Lambie, L., Brancati, F., Pombo, A., Vingron, M., Spitz, F., and Mundlos, S. (2016) Formation of new chromatin domains determines pathogenicity of genomic duplications, *Nature*, **538**, 265-269, https://doi.org/10.1038/nature19800.
- 119. Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N. L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B. R., Sabo, P. J., Dorschner, M. O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M. A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L. A., Lander, E. S., and Dekker, J. (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome, *Science*, **326**, 289-293, https://doi.org/10.1126/science.1181369.
- 120. Riggs, A. D. (1990) DNA methylation and late replication probably aid cell memory, and type I DNA reeling could aid chromosome folding and enhancer function, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **326**, 285-297, https://doi.org/10.1098/rstb.1990.0012.

- 121. Alipour, E., and Marko, J. F. (2012) Self-organization of domain structures by DNA-loop-extruding enzymes, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 11202-11212, https://doi.org/10.1093/nar/gks925.
- 122. Kim, Y., Shi, Z., Zhang, H., Finkelstein, I. J., and Yu, H. (2019) Human cohesin compacts DNA by loop extrusion, *Science*, **366**, 1345-1349, https://doi.org/10.1126/science.aaz4475.
- 123. Davidson, I. F., Bauer, B., Goetz, D., Tang, W., Wutz, G., and Peters, J.-M. (2019) DNA loop extrusion by human cohesin, *Science*, **366**, 1338-1345, https://doi.org/10.1126/science.aaz3418.
- 124. Bauer, B. W., Davidson, I. F., Canena, D., Wutz, G., Tang, W., Litos, G., Horn, S., Hinterdorfer, P., and Peters, J.-M. (2021) Cohesin mediates DNA loop extrusion by a "swing and clamp" mechanism, *Cell*, **184**, 5448-5464.e22, https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.016.
- 125. Davidson, I. F., Barth, R., Zaczek, M., van der Torre, J., Tang, W., Nagasaka, K., Janissen, R., Kerssemakers, J., Wutz, G., Dekker, C., and Peters, J.-M. (2023) CTCF is a DNA-tension-dependent barrier to cohesin-mediated loop extrusion, *Nature*, **616**, 822-827, https://doi.org/10.1038/s41586-023-05961-5.
- 126. Shaltiel, I. A., Datta, S., Lecomte, L., Hassler, M., Kschonsak, M., Bravo, S., Stober, C., Ormanns, J., Eustermann, S., and Haering, C. H. (2022) A hold-and-feed mechanism drives directional DNA loop extrusion by condensin, *Science*, **376**, 1087-1094, https://doi.org/10.1126/science.abm4012.
- 127. Higashi, T. L., Pobegalov, G., Tang, M., Molodtsov, M. I., and Uhlmann, F. (2021) A Brownian ratchet model for DNA loop extrusion by the cohesin complex, *Elife*, **10**, e67530, https://doi.org/10.7554/eLife.67530.
- 128. Barth, R., Davidson, I., van der Torre, J., Taschner, M., Gruber, S., Peters, J.-M., and Dekker, C. (2023) SMC motor proteins extrude DNA asymmetrically and contain a direction switch, *bioRxiv*, https://doi.org/10.1101/2023.12.21. 572892.
- 129. Barth, R., Pradhan, B., Kim, E., Davidson, I. F., van der Torre, J., Peters, J.-M., and Dekker, C. (2023) Testing pseudoto-pological and nontopological models for SMC-driven DNA loop extrusion against roadblock-traversal experiments, *Sci. Rep.*, **13**, 8100, https://doi.org/10.1038/s41598-023-35359-2.
- 130. Golov, A. K., Golova, A. V., Gavrilov, A. A., and Razin, S. V. (2021) Sensitivity of cohesin-chromatin association to high-salt treatment corroborates non-topological mode of loop extrusion, *Epigenetics Chromatin*, **14**, 36, https://doi.org/10.1186/s13072-021-00411-w.
- 131. Higashi, T. L., Eickhoff, P., Sousa, J. S., Locke, J., Nans, A., Flynn, H. R., Snijders, A. P., Papageorgiou, G., O'Reilly, N., Chen, Z. A., O'Reilly, F. J., Rappsilber, J., Costa, A., and Uhlmann, F. (2020) A structure-based mechanism for DNA entry into the cohesin ring, *Mol. Cell*, **79**, 917-933.e9, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.07.013.
- 132. Muir, K. W., Li, Y., Weis, F., and Panne, D. (2020) The structure of the cohesin ATPase elucidates the mechanism of SMC-kleisin ring opening, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 233-239, https://doi.org/10.1038/s41594-020-0379-7.
- 133. Chapard, C., Jones, R., van Oepen, T., Scheinost, J. C., and Nasmyth, K. (2019) Sister DNA entrapment between juxtaposed Smc heads and Kleisin of the cohesin complex, *Mol. Cell*, 75, 224-237.e5, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.023.
- 134. Bürmann, F., Lee, B.-G., Than, T., Sinn, L., O'Reilly, F. J., Yatskevich, S., Rappsilber, J., Hu, B., Nasmyth, K., and Löwe, J. (2019) A folded conformation of MukBEF and cohesin, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 227-236, https://doi.org/10.1038/s41594-019-0196-z.
- 135. Bürmann, F., Basfeld, A., Vazquez Nunez, R., Diebold-Durand, M.-L., Wilhelm, L., and Gruber, S. (2017) Tuned SMC arms drive chromosomal loading of prokaryotic condensin, *Mol. Cell*, **65**, 861-872.e9, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.026.
- 136. Diebold-Durand, M.-L., Lee, H., Ruiz Avila, L. B., Noh, H., Shin, H.-C., Im, H., Bock, F. P., Bürmann, F., Durand, A., Basfeld, A., Ham, S., Basquin, J., Oh, B.-H., and Gruber, S. (2017) Structure of full-length SMC and rearrangements required for chromosome organization, *Mol. Cell*, 67, 334-347.e5, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.06.010.
- 137. Marko, J. F., De Los Rios, P., Barducci, A., and Gruber, S. (2019) DNA-segment-capture model for loop extrusion by structural maintenance of chromosome (SMC) protein complexes, *Nucleic Acids Res.*, 47, 6956-6972, https://doi.org/10.1093/nar/gkz497.
- 138. Terakawa, T., Bisht, S., Eeftens, J. M., Dekker, C., Haering, C. H., and Greene, E. C. (2017) The condensin complex is a mechanochemical motor that translocates along DNA, *Science*, **358**, 672-676, https://doi.org/10.1126/science. aan6516.
- 139. Ryu, J.-K., Katan, A. J., van der Sluis, E. O., Wisse, T., de Groot, R., Haering, C. H., and Dekker, C. (2020) The condensin holocomplex cycles dynamically between open and collapsed states, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **27**, 1134-1141, https://doi.org/10.1038/s41594-020-0508-3.
- 140. Dekker, C., Haering, C. H., Peters, J.-M., and Rowland, B. D. (2023) How do molecular motors fold the genome, *Science*, **382**, 646-648, https://doi.org/10.1126/science.adi8308.

COHESIN-DEPENDENT LOOP EXTRUSION: MOLECULAR MECHANICS AND ROLE IN CELL PHYSIOLOGY

Review

A. K. Golov^{1,2*} and A. A. Gavrilov^{1*}

¹ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; e-mail: golovstein@gmail.com; aleksey.a.gavrilov@gmail.com ² Technion – Israel Institute of Technology, 3525433 Haifa, Israel

The most prominent representatives of multisubunit SMC-complexes, cohesin and condensin, are best known as structural components of mitotic chromosomes. It turned out that these complexes, as well as their bacterial homologues, are molecular motors, the ATP-dependent movement of these complexes along DNA threads leads to the formation of DNA loops. In recent years, we have witnessed an avalanche-like accumulation of data on the process of SMC-dependent DNA looping, also known as loop extrusion. This review briefly summarizes the current understanding of the place and role of cohesin-dependent extrusion in cell physiology and presents a number of models describing the potential molecular mechanism of extrusion in a most compelling way. We conclude the review with a discussion of how the capacity of cohesin to extrude DNA loops may be mechanistically linked to its involvement in sister chromatid cohesion.

Keywords: cohesin, SMC complexes, loop extrusion, cohesion, DNA gripping state

УДК 577.218

РОЛЬ БЕЛКА Mod(mdg4)-67.2 ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ МЕЖДУ Su(Hw)-ЗАВИСИМЫМИ КОМПЛЕКСАМИ И ИХ РЕКРУТИРОВАНИИ НА ХРОМАТИН

© 2024 Л.С. Мельникова*, В.В. Молодина, П.Г. Георгиев, А.К. Головнин

Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), 119334 Москва, Россия; электронная почта: lsm73@mail.ru

> Поступила в редакцию 25.09.2023 После доработки 24.10.2023 Принята к публикации 24.10.2023

Белок Su(Hw) (Suppressor of Hairy-wing) принадлежит к классу белков, которые организуют архитектуру хромосом, определяют активность промоторов и участвуют в формировании границ/инсуляторов между регуляторными доменами. Этот белок содержит кластер из 12 цинковых пальцев типа C2H2, часть из которых отвечает за связывание с консенсусным сайтом. Su(Hw) образует комплекс с белком Mod(mdg4)-67.2 и белком CP190 (Centrosomal protein 190kD), связывающимся со всеми известными инсуляторами дрозофилы. Для дальнейшего изучения функционирования Su(Hw)-зависимых комплексов мы использовали ранее описанную мутацию su(Hw)^{E8}, которая инактивирует седьмой цинковый палец, в результате чего мутантный белок теряет способность связываться с консенсусным сайтом. В представленной работе показано, что белок Su(Hw)^{E8} продолжает напрямую взаимодействовать с белками CP190 и Mod(mdg4)-67.2. Через взаимодействие с Mod(mdg4)-67.2 белок Su(Hw)^{E8} может привлекаться в состав формирующихся на хроматине Su(Hw)-зависимых комплексов и усиливать их инсуляторную активность. Результаты работы демонстрируют, что не связанные с ДНК Su(Hw)-зависимые комплексы могут рекрутироваться на Su(Hw)-связывающие сайты через специфичные белок-белковые взаимодействия, которые стабилизируются Mod(mdg4)-67.2.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: регуляция транскрипции, Su(Hw), Mod(mdg4), белок-белковые взаимодействия, хроматиновые инсуляторы.

DOI: 10.31857/S0320972524040033 **EDN:** ZGKHCS

ВВЕДЕНИЕ

У высших эукариот регуляция экспрессии генов усложняется вследствие дифференцировки клеток в процессе эмбрионального развития. Специализация клеток определяется экспрессией различных комбинаций транскрипционных факторов, которые кодируются обширной группой генов развития, контролирующих дифференцировку [1]. Другая большая группа генов кодирует белки «домашнего хозяйства», которые необходимы для функционирования всех клеток. У Drosophila гены домашнего хозяйства группируются в кластерах, и

Принятые сокращения: ДДС – дрожжевая двугибридная система; CP190 – Centrosomal protein 190kD; Mod(mdg4) – Modifier of mdg4; SBS – Su(Hw) binding sites, сайты связывания белка Su(Hw); Su(Hw) – Suppressor of Hairy-wing; ZF – zinc fingers, цинковые пальцы.

* Адресат для корреспонденции.

от него на дистанциях, достигающих в некоторых случаях сотен тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.). Регуляция взаимодействий между энхансерами и промоторами осуществляется особой группой регуляторных элементов, названных инсуляторами [5–7]. Определённые комбинации инсуляторов могут взаимодействовать между собой, формируя хроматиновые домены, которые усиливают/блокируют дистанционные взаимодействия между энхансерами и промоторами [5, 8, 9].

все их регуляторные элементы обычно находятся в непосредственной близости от регулируемых

ими промоторов. В отличие от генов домашнего

хозяйства гены развития обычно имеют сложные

протяжённые регуляторные системы, состоящие

из большого количества энхансеров, каждый из

которых определяет экспрессию гена в конкрет-

ной группе клеток и на протяжении определён-

ного временного промежутка [2-4]. Энхансеры

могут стимулировать работу промотора, находясь

У Drosophila с промоторами генов и инсуляторами связываются архитектурные белки, характерной особенностью которых являются кластеры, состоящие из пяти и более цинковых пальцев (zinc fingers, ZF) типа C2H2 [10, 11]. Показано, что с помощью 4-5 С2Н2-доменов архитектурные белки специфично связываются с протяжёнными мотивами 12-15 п.н. У дрозофилы наиболее хорошо описан архитектурный белок Su(Hw) (Suppressor of Hairy-wing), который имеет около 2000 геномных сайтов связывания [12-15]. Исходно Su(Hw) был открыт как инсуляторный белок, который блокирует взаимодействия между энхансерами и промоторами генов, связываясь с 12 сайтами в составе ретротранспозона дурку [12-14]. В дальнейшем было показано, что Su(Hw) участвует в формировании промоторов и способен репрессировать транскрипцию с некоторых из них [15, 16]. В центре белка Su(Hw) локализован кластер, состоящий из 12 ZF C2H2, которые связываются с консенсусной последовательностью [17]. На N-конце белка Su(Hw) находятся два консервативных участка, взаимодействующих с BTB-доменом (BTB – bric-abrac, tramtrack, and broad complex) белка СР190, который участвует в формировании активных инсуляторов и промоторов генов домашнего хозяйства [18, 19]. На С-конце белка картирован домен, взаимодействующий с одной из 30 изоформ белка Mod(mdg4) (Modifier of mdg4) [20-22]. Все изоформы Mod(mdg4) имеют на N-конце ВТВ-домен типа ТТК (Tramtrack group), способный формировать гексамеры [23, 24]. Изоформа Mod(mdg4)-67.2 имеет уникальный С-конец, взаимодействующий исключительно с С-концевым доменом белка Su(Hw). Кроме того, обнаружено, что в состав Su(Hw)-зависимых комплексов могут входить и другие белки: НІРР1 (HP1 and insulator partner protein 1), который взаимодействует с тем же C-концевым районом Su(Hw), что и Mod(mdg4)-67.2 [25-27], ENY2 (Enhancer of yellow 2), взаимодействующий с 11-м и 12-м ZF белка Su(Hw) [28], и РНК-связывающие белки [29, 30]. Все изоформы белка Mod(mdg4), как и белок CP190, сумолируются и в результате множественных белокбелковых взаимодействий формируют в ядре спеклы [31–33]. Предполагается, что мультимеризация ВТВ-доменов и взаимодействие между белками SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) формируют ядро спеклов, к которым присоединяются белки-«пассажиры», такие как Su(Hw) и другие архитектурные белки. Согласно предложенной модели, спеклы функционируют как резервуары архитектурных белков, которые связываются с новой ДНК в процессе её репликации [32, 33].

В представленной работе мы исследовали способность мутантного белка Su(Hw)^{E8}, который самостоятельно не связывается с ДНК, рекрутироваться на Su(Hw)-зависимые сайты хроматина. Точечная замена гистидина в положении 459 на тирозин в мутанте Su(Hw)^{E8} [34] приводит к разрушению седьмого домена C2H2, необходимого для связывания белка с хроматином [17]. В результате Su(Hw)^{E8} не может связаться с Su(Hw)-связывающими сайтами *in vitro* и не обнаруживается на политенных хромосомах [17]. Однако мы продемонстрировали, что в присутствии связывающегося с хроматином мутантного варианта Su(Hw) с делетированным *N*-концом (Su(Hw)ΔN) белок Su(Hw)^{E8} рекрутируется на Su(Hw)-зависимые инсуляторные сайты. Эффективное связывание Su(Hw)^{E8} опосредовано белком Mod(mdg4)-67.2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание рекомбинантных генетических конструкций. Все конструкции для работы в дрожжевой двугибридной системе (ДДС) были созданы на основе вектора pGBT9, содержащего ДНК-связывающий домен дрожжевого белка GAL4 («Clontech», Пало-Альто, Калифорния, США).

Для создания конструкции pGBTSu(Hw)^{E8} продукт ПЦР 5'-ggaacagcacaagtcacgtg-3'/5'-caccaatgcagaa-aacttcttgtc-3' обрабатывали эндонуклеазой BglII, а продукт ПЦР 5'-gcccttaaaaagTatcgacgct-3'/5'-aatccgtgcgttccataat-3' – эндонуклеазой EagI. В качестве матрицы для ПЦР использовали кДНК Su(Hw). Полученные фрагменты ДНК совместно клонировали в плазмиду pGBTSu(Hw), обработанную BglII и EagI.

Для создания конструкции pGBTSu(Hw)^{E8}Δ114 фрагмент XhoI-Afl II, содержащий делецию 114 а.о., из pGBTSu(Hw)∆114 клонировали в плазмиду pGBTSu(Hw)^{E8}, обработанную XhoI и Afl II.

Для создания конструкции pGBTSu(Hw)^{E8}∆283 фрагмент EagI-SalI, содержащий делецию 17 а.о., из pGBTSu(Hw)∆283 клонировали в плазмиду pGBTSu(Hw)^{E8}, обработанную EagI и SalI.

Плазмиды pGBTSu(Hw), pGBTSu(Hw) Δ 283, pGADMod(mdg4)-67.2 и pGADCP190 были получены и описаны ранее [18, 20].

Дрожжевая двугибридная система. Анализ взаимодействий между белками в ДДС проводили с использованием плазмид и протоколов от «Clontech». Плазмиды трансформировали в штамм дрожжей рЈ69-4А литий-ацетатным методом, как описано производителем, и высевали на среду без триптофана и лейцина. Через 3 дня роста при 30 °С клетки пересевали на селективные среды без триптофана, лейцина, гистидина и аденина и сравнивали рост дрожжевых колоний ещё через 2–3 дня. В качестве отрицательного контроля тестировали взаимодействие производных белка Su(Hw), экспрессировавшихся в векторе рGВТ9, с вектором рGAD24. Положительным контролем служили взаимодействия полноразмерного белка

Su(Hw) с белками Mod(mdg4)-67.2 или CP190, описанные ранее [18, 20]. Каждый эксперимент повторяли трижды.

Фенотипический анализ в трансгенных линиях дрозофил. Всех мух содержали при температуре 25 °C на стандартной дрожжевой среде (Bloomington Drosophila Stock Center). Эффекты различных комбинаций мутаций оценивались двумя исследователями независимо. Уровень выраженности фенотипов yellow и cut оценивали в возрасте 3-5 дней у самцов, развивающихся при 25 °C. Изменения в экспрессии гена yellow (в теле и в крыльях) оценивали по пятибалльной шкале, где 5 соответствует пигментации дикого типа; 2 – уровню пигментации, ассоциированному с мутацией y²; 3 и 4 – частичной активации базовой транскрипции; 1 – отсутствию экспрессии. В качестве эталона использовали мух, у которых экспрессия аллеля yellow была охарактеризована ранее. Изменения в экспрессии гена cut оценивали, подсчитывая количество вырезок, возникающих по краю крыловой пластины. В качестве эталона использовали мух дикого типа и мух, несущих аллель ct^6 . Репрезентативные формы крыльев, представленные на рис. 2, б, были выбраны как «средние» из серии крыльев, расположенных в порядке возрастания выраженности их мутантного фенотипа. В каждой трансгенной линии оценивали фенотип не менее чем 50 мух.

Трансгенные линии Su(Hw)+, $Su(Hw)\Delta62$, $Su(Hw)\Delta52$, $Su(Hw)\Delta114$ и Su(Hw)J, тагетированные эпитопом 3xFLAG, были получены и описаны ранее [18, 35]. Введение в трансгенные линии мутации $mod(mdg4)^{u1}$ или комбинаций мутаций $su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$ проводили в соответствии со схемой, описанной ранее [36]. Все детали генетических скрещиваний могут быть предоставлены по запросу.

Иммуноокрашивание политенных хромосом. Личинок дрозофилы 3-го возраста выращивали при 18°C в стандартных условиях. Окрашивание политенных хромосом проводили в соответствии с ранее описанной методикой [37]. Использовали следующие первичные антитела: анти-Su(Hw) (кролик) 1:300 и анти-FLAG (мышь) 1:50. Применяемыми вторичными антителами были FITC-AffiniPure Donkey Anti-Rabbit 1:200 и Cy5-AffiniPure Donkey Anti-Mouse 1:200 («Jackson ImmunoResearch», США). Анализ проводился с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Observer.Z1 («Zeiss», Германия), в который встроена система микроскопии со структурированным освещением OptiGrid («Qioptiq», Великобритания). Для обработки изображений использовали программу Гіјі.

Иммунопреципитация хроматина. Выделение хроматина из дрозофил на куколочной стадии

развития и последующую иммунопреципитацию хроматина проводили в соответствии с методикой, описанной ранее [35]. Для иммунопреципитации использовали следующие антитела: анти-Su(Hw) (кролик) 1:200 и анти-FLAG (мышь) 1:300. Количество иммунопреципитированной ДНК определяли с помощью количественной ПЦР с использованием красителя SYBR green («Віо-Rad», США, Саt# 170-8882). Последовательности праймеров, использованных в ПЦР:

62D fw – 5'-TTTGGGCTTGGTGAGAACAG-3'
62D rev – 5'-TGATACCAGGCGAACAGAAATC-3'
50A fw – 5'-ATACAAAGTGGTTTCAGCCAAGAAG-3'
50A rev – 5'-TTGATAAATAGTCCAGCACGCATAC-3'
87E fw – 5'-GGATGTTACA TTGAGAGTGCTTAGG-3'
87E rev – 5'-TTTGCGTTTCGGCTGCTGTC-3'
1A2 fw – 5'-ACCACACATCAGTCATCGTGT-3'
1A2 rev – 5'-CTTCGTCTACCGTTGTGC-3'
gypsy fw – 5'-TTCTCTAAAAAGTATGCAGCACTT-3'
gypsy rev – 5'-CACGTAATAAGTGTGCGTTGA-3'
ras fw – 5'-GAGGGATTCCTGCTCGTCTTCG-3'
каждый эксперимент выполняли в трёх биологических повторах.

Антитела. В работе использовали поликлональные антитела к *N*-концевому домену белка Su(Hw), полученные и описанные ранее [32, 33], и моноклональные антитела к эпитопу FLAG («Sigma-Aldrich», Cat# F 1804).

Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Белок Su(Hw)^{E8} способен напрямую взаимодействовать с белками Mod(mdg4)-67.2 и СР190. Ранее мы показали, что мутантный белок Su(Hw)^f, в котором инактивирован десятый ZF, утрачивает способность взаимодействовать с белком СР190 (Centrosomal protein 190kD) in vitro [35]. Чтобы проверить, как мутация в седьмом ZF белка Su(Hw)^{E8} влияет на взаимодействие с двумя другими компонентами Su(Hw)-зависимого комплекса, белками CP190 и Mod(mdg4)-67.2, мы использовали ДДС. На основе вектора pGBT9 были созданы 3 конструкции. Первая экспрессировала в дрожжах полноразмерный белок Su(Hw)^{E8}, вторая – его производную Su(Hw)^{E8}Δ114 с делецией района 88–202 а.о., взаимодействующего с белком СР190, и третья - производную Su(Hw)^{E8}∆283, в которой делетирован район взаимодействия с белком Mod(mdg4)-67.2 от 760 до 778 а.о. (рис. 1, а). Затем мы протестировали прямые взаимодействия вариантов Su(Hw)^{E8} с полноразмерными белками CP190 и Mod(mdg4)-67.2, которые экспрессировались в векторе pGAD24. Белок Su(Hw)^{E8} взаимодействовал со всеми инсу-

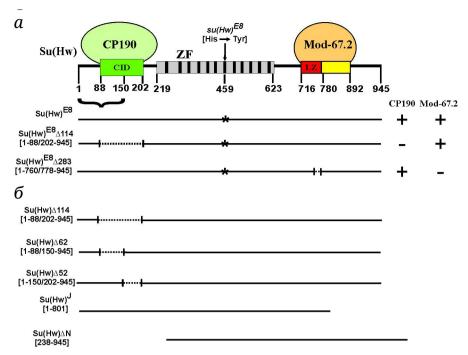


Рис. 1. Производные белка Su(Hw), использованные в работе. *а* – Схематичное изображение полноразмерного белка Su(Hw). Обозначения доменов: CID – домен, взаимодействующий с CP190; ZF – цинковые пальцы; LZ – лейциновая молния. На схеме показаны районы взаимодействия с белками Mod(mdg4)-67.2 (Mod-67.2) и CP190, которые изображены в виде овалов. Вертикальная стрелка указывает на мутацию *su(Hw)*^{E8}. Скобкой под схемой указан район белка, к которому были получены антитела. Цифрами обозначены аминокислотные остатки, ограничивающие домены и производные формы. Слева указаны названия производных, размер производных обозначен отрезками, пунктирные линии обозначают внутренние делеции, звёздочкой обозначена мутация *su(Hw)*^{E8}. Справа от схем приведены результаты, полученные в ДДС. «+» – наличие взаимодействия, «-» – отсутствие взаимодействия. б – Делеционные производные, использованные в генетических экспериментах и в иммуноокрашивании политенных хромосом

ляторными белками так же, как белок дикого типа. Белок $Su(Hw)^{E8}\Delta 114$ утрачивал способность взаимодействовать с CP190, а белок $Su(Hw)^{E8}\Delta 283$ – с Mod(mdg4)-67.2 (рис. 1, a). Следовательно, мутация в седьмом ZF не влияет на взаимодействие белка $Su(Hw)^{E8}$ с остальными компонентами инсуляторного комплекса. Поэтому через взаимодействие с белками CP190 и Mod(mdg4)-67.2 белок $Su(Hw)^{E8}$ может рекрутироваться на хроматин.

Белок Su(Hw)^{E8} восстанавливает инсуляторную функцию мутантных белков Su(Hw), взаимодействие которых с CP190 нарушено. Для исследования Su(Hw)-зависимой инсуляции обычно используют две модельные системы, которые получены в результате интеграции мобильного элемента gypsy в локусы yellow (y²) и cut (ct6).

Ген yellow отвечает за пигментацию кутикулярных структур дрозофилы [38]. В диком типе тело, крылья и щетинки мух окрашены в тёмный цвет. В аллеле y² ретротранспозон gypsy встроился между энхансерами тела и крыльев и промотором гена yellow (рис. 2, a). В этом случае инсулятор Su(Hw) полностью блокирует активацию экспрессии yellow в теле и крыльях, в результате чего тело и крылья мутантных мух приобретают жёлтую окраску (рис. 2, б). Однако щетинки мух остаются

пигментированными, т.к. энхансер щетинок расположен в интроне гена [39].

В аллеле ct^6 (рис. 2, a) gypsy находится между энхансером крыловой пластины и промотором гена cut, отвечающим за развитие края крыла, которые дистанцированы друг от друга на расстояние более 70 т.п.н. В этом случае инсулятор полностью блокирует крыловой энхансер, вследствие чего край крыла практически целиком обрезан и крыловые щетинки отсутствуют (рис. 2, δ) [22, 40].

Белок СР190 связывается с двумя районами, 88–150 а.о. и 150–202 а.о., на N-конце белка Su(Hw) (рис. 1, a) [18]. С помощью генетических скрещиваний во вторую хромосому линии y^2ct^6 ; $su(Hw)^v/su(Hw)^2$ были интегрированы трансгены, экспрессирующие полноразмерный белок Su(Hw)+ и его производные: Su(Hw) Δ 62 (делеция района 88–150 а.о.), Su(Hw) Δ 52 (делеция района 150–202 а.о.) и Su(Hw) Δ 114 (делеция обоих районов, взаимодействующих с СР190) (рис. 1, δ). Сочетание мутаций $su(Hw)^v/su(Hw)^2$ инактивирует нативный белок Su(Hw), поэтому мы смогли проанализировать влияние мутантных белков на фенотип y^2ct^6 (рис. 2, δ) [18].

Инактивация белка Su(Hw) в линии y^2ct^6 ; $su(Hw)^v/su(Hw)^2$ восстанавливала экспрессию yellow

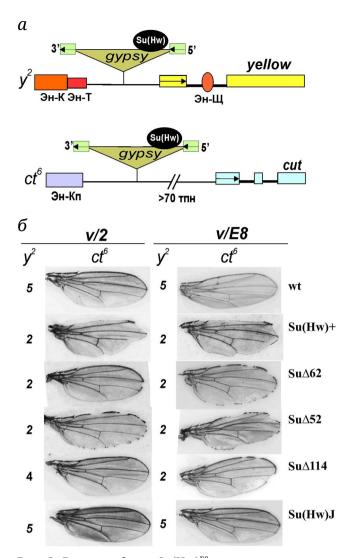


Рис. 2. Влияние белка Su(Hw)^{E8} на *gypsy*-зависимую инсуляцию. a – Схематичное изображение аллелей y^2 и ct^6 . Экзоны генов yellow и cut изображены в виде прямоугольников. Сайты инициации транскрипции генов указаны стрелками. Ретротранспозон дурку изображён в виде треугольника. Прямоугольники на его концах обозначают длинные концевые повторы (ДКП), ориентация которых указана стрелками. Обозначения: Su(Hw) – инсулятор Su(Hw); Эн-К – энхансер крыльев, Эн-Т – энхансер тела; Эн-Щ – энхансер щетинок; Эн-Кп – энхансер крыловой пластины. б – Влияние производных белка Su(Hw) на активность инсулятора gypsy в аллелях y^2 и ct^6 на фоне мутаций $su(Hw)^v/$ $su(Hw)^2$ (v/2) и $su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$ (v/E8). Названия линий, использованных для фенотипического анализа, указаны в правой колонке: wt – y^2ct^6 , Su(Hw)+ – трансген экспрессировал полноразмерный белок. Схемы и названия остальных производных приведены на рис. 1. Цифры в колонке y^2 показывают уровень экспрессии гена yellow в кутикуле тела и крыльев. На фотографиях показаны изменения крылового фенотипа гена cut на различных мутантных фонах

в аллеле y^2 и экспрессию cut в аллеле ct^6 , демонстрируя, что связывание белка Su(Hw) имеет решающее значение для инсуляции. Введение транс-

гена Su(Hw)+ приводит к полному восстановлению инсуляции (рис. 2, б). Ранее мы показали, что белок CP190 также необходим для Su(Hw)-зависимой инсуляции [18]. В линиях с экспрессией белков Su(Hw)Δ62 и Su(Hw)Δ52, где связывание белка СР190 с Su(Hw)-зависимым комплексом было ослаблено, инсулятор полностью блокировал энхансеры тела и крыльев гена yellow (фенотип y^2). Однако фенотип cut гораздо сильнее реагировал на недостаток СР190. В случае экспрессии белка Su(Hw)Δ52 инсуляция в аллеле ct^6 ослабевала: по краю крыла присутствовали многочисленные, но отдельные вырезки, и часть щетинок развивалась. Белок Su(Hw)Δ62 демонстрировал лишь слабую инсуляторную активность: по краю крыла возникали 1-2 вырезки. В линии Su(Hw)Δ114 белок CP190 не связывался с инсуляторным комплексом. В результате инсуляторная активность не проявлялась: мухи имели крылья дикого типа, окраска кутикулярных структур также была близка к норме (рис. 2, б).

Затем мы изучили инсуляцию в линии y^2ct^6 ; $su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$ (рис. 2, б). В этом случае экспрессия белка Su(Hw)^{E8} не восстанавливала инсуляцию. Неожиданно оказалось, что инсуляция частично восстанавливается при введении в линию y^2ct^6 ; $su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$ трансгенов, экспрессирующих производные Su(Hw). В линии Su(Hw)Δ62 количество крыловых вырезок существенно возрастало, а в линии Su(Hw)Δ52 мухи имели крыловой фенотип, близкий к ct^6 . Даже в линии $Su(Hw)\Delta 114$ в аллеле ct6 проявлялась слабая инсуляция: появлялись отдельные крыловые вырезки. При этом инсуляция в аллеле у² восстанавливалась практически полностью (рис. 2, б). Анализ полученных результатов позволяет предположить, что делеционные производные Su(Hw) рекрутируют на сайты инсулятора gypsy белок Su(Hw)^{E8}, способный связывать белок СР190, что приводит к восстановлению инсуляции.

Поскольку белок Su(Hw)Δ114 не взаимодействует с белком CP190, то привлечение Su(Hw)^{E8} на Su(Hw)-зависимые сайты хроматина может осуществляться через белок Mod(mdg4)-67.2, который связывается с С-концевым районом Su(Hw) (716-892 а.о.), необходимым для инсуляции и репрессии транскрипции [20, 21]. Чтобы протестировать роль Mod(mdg4)-67.2 в рекрутировании белка Su(Hw)^{E8}, мы использовали трансген Su(Hw)J, экспрессирующий мутантный белок с делецией 144 С-концевых a.o. [16]. В мутантном белке Su(Hw)J (1-801 a.o.) делетирован район взаимодействия с Mod(mdg4)-67.2, поэтому Su(Hw)] связывается только с CP190 (рис. 1, б). На мутантном фоне y^2ct^6 ; $su(Hw)^v/su(Hw)^2$ фенотипы мух из линий, экспрессирующих белки Su(Hw)J и Su(Hw)Δ114, схожи: экспрессия yellow и cut восстанавливается (рис. 2, б). Однако в линии Su(Hw)J на фоне $su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$ восстановления

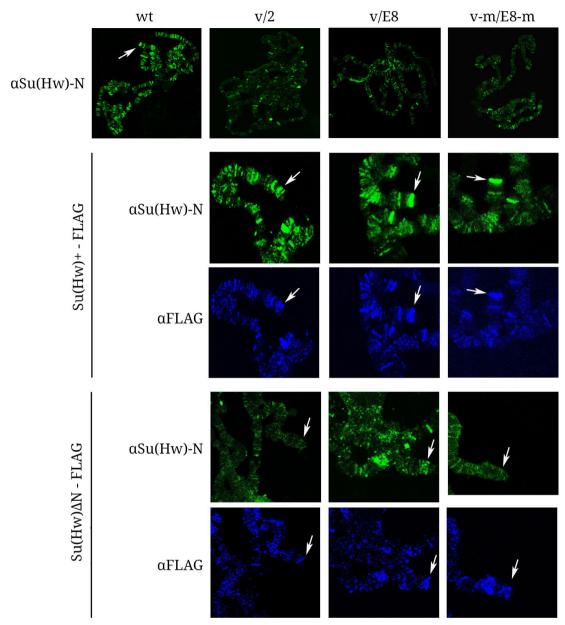


Рис. 3. Связывание белка $Su(Hw)^{E8}$ с политенными хромосомами. Иммуноокрашивание политенных хромосом слюнных желёз личинок третьего возраста из линий y^2ct^6 (wt), y^2ct^6 $su(Hw)^v/su(Hw)^2$ (v/2), y^2ct^6 ; $su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$ (v/E8), y^2ct^6 ; $su(Hw)^2/su(Hw)^2/su(Hw)^{E8}$ (v/E8), y^2ct^6 ; $su(Hw)^2/su(H$

инсуляции не происходило. Полученные данные согласуются с предполагаемой ролью белка Mod(mdg4)-67.2 в привлечении белка Su(Hw)^{E8} на Su(Hw)-зависимые сайты хроматина.

Белок Mod(mdg4)-67.2 опосредует рекрутирование белка $Su(Hw)^{E8}$ на сайты связывания белка $Su(Hw)\Delta N$ с политенными хромосомами.

Чтобы подтвердить рекрутирование белка $Su(Hw)^{E8}$ на сайты хроматина через белок Mod(mdg4)-67.2, мы использовали трансгенные линии, экспрессирующие производную $Su(Hw)\Delta N$ с делецией N-концевого домена Su(Hw) от 1 до 238 а.о., тагетированную эпитопом 3xFLAG (рис. 1, δ) [20].

Производная Su(Hw) Δ N, как и Su(Hw) Δ 114, взаимодействует только с белком Mod(mdg4)-67.2. На политенных хромосомах личинок дрозофилы из линии y^2ct^6 ; $Su(Hw)\Delta N$ - $FLAG/Su(Hw)\Delta N$ -FLAG; $su(Hw)^v/su(Hw)^2$ белок Su(Hw) Δ N можно идентифицировать с помощью антител к FLAG, но не с помощью антител к N-концевому домену (1–150 а.о.) белка Su(Hw) (рис. 1, рис. 3). В линии y^2ct^6 сайты инсерции ретротранспозона gypsy находятся на дистальном по отношению к хромоцентру конце хромосомы X. Иммуноокрашивание антителами к FLAG показало, что, в сравнении с полноразмерным белком Su(Hw)+, белок Su(Hw) Δ N связывается с хрома-

тином менее эффективно, так как стабильность связывания Su(Hw) опосредуется белком CP190 (рис. 3) [18].

В линии y^2ct^6 ; $su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$, как и в линии y^2ct^6 ; $su(Hw)^v/su(Hw)^2$, антитела к N-концевому домену Su(Hw) не окрашивали Su(Hw)-связывающие сайты. Однако на мутантном фоне $su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$ при экспрессии производной Su(Hw) ΔN эти антитела эффективно окрашивали многочисленные сайты связывания Su(Hw), в том числе сайты gypsy на конце хромосомы X (рис. 3). Следовательно, антитела к N-концевому домену идентифицировали полноразмерный белок Su(Hw)E8, который рекрутировался на хроматин через взаимодействие с белком Su(Hw) ΔN .

Введение мутации $mod(mdg4)^{u1}$, полностью инактивирующей белок Mod(mdg4)-67.2, не изменило окрашивание антителами к FLAG в линиях, экспрессирующих $Su(Hw)\Delta N$. Тем не менее в линии y^2ct^6 ; $Su(Hw)\Delta N$ -FLAG/ $Su(Hw)\Delta N$ -FLAG; $Su(Hw)^v mod(mdg4)^{u1}/Su(Hw)^{E8} mod(mdg4)^{u1}$ окрашивание антителами к N-концевому домену Su(Hw) полностью исчезло (рис. 3). Таким образом, в отсутствии белка Mod(mdg4)-67.2 белок $Su(Hw)\Delta N$ утрачивал способность взаимодействовать с $Su(Hw)^{E8}$ и рекрутировать его на свои сайты связывания.

Белок Mod(mdg4)-67.2 опосредует ассоциацию белка Su(Hw)^{E8} с сайтами связывания белка Su(Hw) Δ N. Для дальнейшего подтверждения полученных результатов с помощью иммунопреципитации хроматина мы протестировали уровень связывания белка Su(Hw)^{E8} в линии y^2ct^6 ; $su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$ с пятью наиболее исследованными Su(Hw)зависимыми инсуляторами [41, 42]. Для детекции белка Su(Hw)^{E8} использовали антитела к N-концевому домену Su(Hw). Как ожидалось, белок Su(Hw) не детектировался на тестируемых сайтах ни на мутантном фоне $su(Hw)^v/su(Hw)^2$, ни на фоне $su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$ (рис. 4, a).

Затем, используя антитела к FLAG, мы продемонстрировали, что в линиях, экспрессирующих производную Su(Hw) Δ N-FLAG, белок Su(Hw) Δ N связывается со всеми SBS (Su(Hw) binding sites, сайты связывания белка Su(Hw)) как в присутствии, так и в отсутствии белка Mod(mdg4)-67.2 (рис. 4, δ). Введение мутации $mod(mdg4)^{u1}$ несколько снижало уровень связывания Su(Hw), поскольку Mod(mdg4)-67.2, так же как и CP190, стабилизирует ассоциацию инсуляторного комплекса с SBS [20].

Анализ уровня связывания Su(Hw) в линии y^2ct^6 ; $Su(Hw)\Delta N$ - $FLAG/Su(Hw)\Delta N$ -FLAG; $Su(Hw)^v/Su(Hw)^2$ показал, что белок отсутствует на четырёх из пяти сайтов (рис. 4, θ). Введение в эту линию мутации $mod(mdg4)^{u1}$ не влияло на связывание Su(Hw). Присутствие некоторого количества Su(Hw) на наиболее эффективно связывающем сайте θ 0 объясняется остаточной экспрессией в аллеле $Su(Hw)^2$ [34].

Это ещё раз подтверждает, что антитела к N-концевому домену Su(Hw) способны узнавать нативный белок, но не мутантную производную Su(Hw) Δ N.

В линии y^2ct^6 ; $Su(Hw)\Delta N$ - $FLAG/Su(Hw)\Delta N$ - $FLAG/Su(Hw)^v/Su(Hw)^{E8}$ уровень связывания белка Su(Hw) на всех тестируемых сайтах возрастал в сравнении с мутантным фоном $su(Hw)^v/Su(Hw)^2$ в 1,5–3 раза (рис. 4, θ). При введении мутации $mod(mdg4)^{u1}$ Su(Hw)^{E8} переставал связываться с четырьмя сайтами, а на сайте 62D его связывание снижалось до уровня мутантного фона $su(Hw)^v/Su(Hw)^2$. Полученные данные полностью подтверждают, что белок Mod(mdg4)-67.2 играет решающую роль во взаимодействиях между комплексом, формирующимся на Su(Hw)-зависимых сайтах, и белком Su(Hw)^{E8}.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты демонстрируют, что через взаимодействие с белком Mod(mdg4)-67.2 мутантный белок Su(Hw)^{E8}, не способный связываться с консенсусной последовательностью ДНК, может не только рекрутироваться на SBS, но и усиливать инсуляторную активность Su(Hw)-зависимых комплексов. Согласно предложенной ранее модели [33], спеклы являются местом формирования белковых комплексов, которые в дальнейшем связываются с ДНК. Изоформы Mod(mdg4) и белок СР190 принимают участие в формировании спеклов и привлекают в их состав архитектурные белки, в том числе белок Su(Hw). Можно предположить, что в спеклах происходит образование комплекса Su(Hw)∆N-Su(Hw)^{E8}/CP190, который стабилизируется мультимеризацией белка Mod(mdg4)-67.2, взаимодействующего со всеми компонентами этого комплекса. В результате последующего связывания комплекса с SBS белки Su(Hw)^{E8}/CP190 также рекрутируются на них, что приводит к частичному восстановлению активности инсулятора gypsy, зависящей от белка СР190.

Полученные результаты позволяют предположить, что белок Su(Hw) способен рекрутироваться на хроматиновые Su(Hw)-связывающие сайты без непосредственного взаимодействия с консенсусной последовательностью ДНК. Необходимо отметить, что почти во всех регуляторных элементах SBS представлены в единичном количестве [41]. Рекрутирование на единичные SBS не связанного с хроматином белка Su(Hw) может увеличивать эффективность привлечения белков-партнёров, тем самым повышая функциональную активность Su(Hw)-зависимого инсулятора. Также белки Su(Hw), не ассоциированные с ДНК, в процессе репликации могут связываться со вновь синтезируемой ДНК, конкурируя с нуклеосомами, и таким образом эффективно воспроизводить инсуляторы

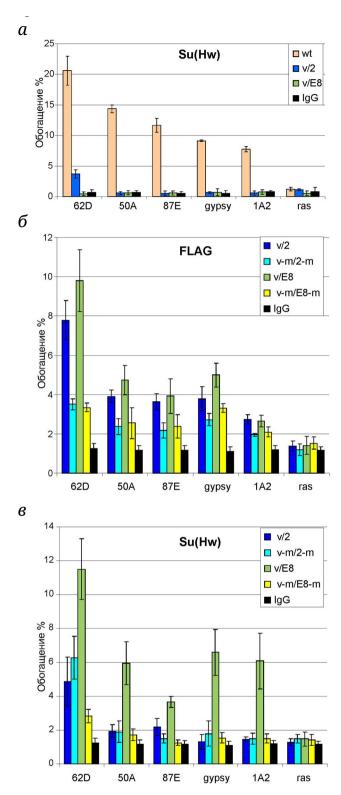


Рис. 4. Связывание белка $Su(Hw)^{E8}$ с SBS. a – Тестирование связывания белка Su(Hw) в линиях y^2ct^6 с помощью антител к N-концевому домену Su(Hw). δ – Тестирование связывания белка $Su(Hw)\Delta N$ в линиях y^2ct^6 ; $Su(Hw)\Delta N$ - $FLAG/Su(Hw)\Delta N$ - $FLAG/Su(Hw)\Delta$

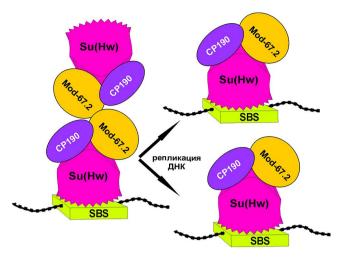


Рис. 5. Модель рекрутирования Su(Hw)-зависимых комплексов на SBS в процессе репликации ДНК

в процессе деления клетки (рис. 5). Для экспериментального подтверждения предложенной модели необходимы дальнейшие исследования механизмов формирования инсуляторных комплексов в спеклах и на хроматине.

Вклад авторов. А.К. Головнин – концепция и руководство работой; Л.С. Мельникова, В.В. Молодина, А.К. Головнин, П.Г. Георгиев – проведение экспериментов; Л.С. Мельникова, А.К. Головнин, П.Г. Георгиев – обсуждение результатов исследования; А.К. Головнин, Л.С. Мельникова, П.Г. Георгиев – написание текста; А.К. Головнин, П.Г. Георгиев – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда. Все эксперименты, за исключением фенотипического анализа трансгенных линий, выполнены за счёт гранта № 21-14-00205. Фенотипический анализ выполнен за счёт гранта № 19-74-30026-Р.

Благодарности. В работе использовали оборудование Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Cavalheiro, G. R., Pollex, T., and Furlong, E. E. (2021) To loop or not to loop: what is the role of TADs in enhancer function and gene regulation? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **67**, 119-129, https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.12.015.
- 2. Kim, J., and Dean, A. (2021) Enhancers navigate the three-dimensional genome to direct cell fate decisions, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 71, 101-109, https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.06.005.
- 3. Kyrchanova, O., Sokolov, V., and Georgiev, P. (2023) Mechanisms of interaction between enhancers and promoters in three *Drosophila* model systems, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 2855, https://doi.org/10.3390/ijms24032855.
- 4. Furlong, E. E. M., and Levine, M. (2018) Developmental enhancers and chromosome topology, *Science*, **361**, 1341-1345, https://doi.org/10.1126/science.aau0320.
- 5. Melnikova, L. S., Georgiev, P. G., and Golovnin, A. K. (2020) The functions and mechanisms of action of insulators in the genomes of higher eukaryotes, *Acta Naturae*, **12**, 15-33, https://doi.org/10.32607/actanaturae.11144.
- 6. Schoborg, T., and Labrador, M. (2014) Expanding the roles of chromatin insulators in nuclear architecture, chromatin organization and genome function, *Cell. Mol. Life Sci.*, 71, 4089-4113, https://doi.org/10.1007/s00018-014-1672-6.
- 7. Chen, D., and Lei, E. P. (2019) Function and regulation of chromatin insulators in dynamic genome organization, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **58**, 61-68, https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.02.001.
- 8. Kyrchanova, O., Maksimenko, O., Stakhov, V., Ivlieva, T., Parshikov, A., Studitsky, V. M., and Georgiev, P. (2013) Effective blocking of the white enhancer requires cooperation between two main mechanisms suggested for the insulator function, *PLoS Genet.*, **9**, e1003606, https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003606.
- 9. Savitskaya, E., Melnikova, L., Kostuchenko, M., Kravchenko, E., Pomerantseva, E., Boikova, T., Chetverina, D., Parshikov, A., Zobacheva, P., Gracheva, E., et al. (2006) Study of long-distance functional interactions between Su(Hw) insulators that can regulate enhancer-promoter communication in *Drosophila melanogaster*, *Mol. Cell Biol.*, 26, 754-761, https://doi.org/10.1128/MCB.26.3.754-761.2006.
- 10. Maksimenko, O. G., Fursenko, D. V., Belova, E. V., and Georgiev, P. G. (2021) CTCF as an example of DNA-binding transcription factors containing clusters of C2H2-type zinc fingers, *Acta Naturae*, **13**, 31-46, https://doi.org/10.32607/actanaturae.11206.
- 11. Kyrchanova, O. V., Bylino, O. V., and Georgiev, P. G. (2022) Mechanisms of enhancer-promoter communication and chromosomal architecture in mammals and *Drosophila*, *Front. Genet.*, **13**, 1081088, https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1081088.
- 12. Roseman, R. R., Pirrotta, V., and Geyer, P. K. (1993) The su(Hw) protein insulates expression of the *Drosophila melanogaster white* gene from chromosomal position-effects, *EMBO J.*, **12**, 435-442, https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05675.x.

- 13. Holdridge, C., and Dorsett, D. (1991) Repression of *hsp70* heat shock gene transcription by the suppressor of hairy-wing protein of *Drosophila melanogaster*, *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1894-1900, https://doi.org/10.1128/mcb.11.4.1894-1900.1991.
- 14. Geyer, P. K., and Corces, V. G. (1992) DNA position-specific repression of transcription by a Drosophila zinc finger protein, *Genes Dev.*, **6**, 1865-1873, https://doi.org/10.1101/gad.6.10.1865.
- 15. Soshnev, A. A., Baxley, R. M., Manak, J. R., Tan, K., and Geyer, P. K. (2013) The insulator protein Suppressor of Hairy-wing is an essential transcriptional repressor in the *Drosophila* ovary, *Development*, **140**, 3613-3623, https://doi.org/10.1242/dev.094953.
- 16. Melnikova, L., Elizar'ev, P., Erokhin, M., Molodina, V., Chetverina, D., Kostyuchenko, M., Georgiev, P., and Golovnin, A. (2019) The same domain of Su(Hw) is required for enhancer blocking and direct promoter repression, *Sci. Rep.*, 9, 5314, https://doi.org/10.1038/s41598-019-41761-6.
- 17. Baxley, R. M., Bullard, J. D., Klein, M. W., Fell, A. G., Morales-Rosado, J. A., Duan, T., and Geyer, P. K. (2017) Deciphering the DNA code for the function of the *Drosophila* polydactyl zinc finger protein suppressor of Hairy-wing, *Nucleic Acids Res.*, 45, 4463-4478, https://doi.org/10.1093/nar/gkx040.
- 18. Melnikova, L., Kostyuchenko, M., Molodina, V., Parshikov, A., Georgiev, P., and Golovnin, A. (2018) Interactions between BTB domain of CP190 and two adjacent regions in Su(Hw) are required for the insulator complex formation, *Chromosoma*, **127**, 59-71, https://doi.org/10.1007/s00412-017-0645-6.
- 19. Pai, C. Y., Lei, E. P., Ghosh, D., and Corces, V. G. (2004) The centrosomal protein CP190 is a component of the gypsy chromatin insulator, *Mol. Cell*, **16**, 737-748, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.004.
- 20. Melnikova, L., Kostyuchenko, M., Molodina, V., Parshikov, A., Georgiev, P., and Golovnin, A. (2017) Multiple interactions are involved in a highly specific association of the Mod(mdg4)-67.2 isoform with the Su(Hw) sites in *Drosophila*, Open Biol., 7, 170150, https://doi.org/10.1098/rsob.170150.
- 21. Ghosh, D., Gerasimova, T. I., and Corces, V. G. (2001) Interactions between the Su(Hw) and Mod(mdg4) proteins required for gypsy insulator function, *EMBO J.*, **20**, 2518-2527, https://doi.org/10.1093/emboj/20.10.2518.
- 22. Gause, M., Morcillo, P., and Dorsett, D. (2001) Insulation of enhancer-promoter communication by a gypsy transposon insert in the *Drosophila cut* gene: cooperation between suppressor of hairy-wing and modifier of mdg4 proteins, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 4807-4817, https://doi.org/10.1128/MCB.21.14.4807-4817.2001.
- 23. Bonchuk, A., Balagurov, K., and Georgiev, P. (2023) BTB domains: A structural view of evolution, multimerization, and protein-protein interactions, *Bioessays*, **45**, e2200179, https://doi.org/10.1002/bies.202200179.
- 24. Bonchuk, A., Denisov, S., Georgiev, P., and Maksimenko, O. (2011) *Drosophila* BTB/POZ domains of "ttk group" can form multimers and selectively interact with each other, *J. Mol. Biol.*, **412**, 423-436, https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.052.
- 25. Glenn, S. E., and Geyer, P. K. (2019) Investigation of the developmental requirements of Drosophila HP1 and insulator protein partner, HIPP1, *G3* (*Bethesda*), **9**, 345-357, https://doi.org/10.1534/g3.118.200705.
- 26. Melnikova, L., Molodina, V., Erokhin, M., Georgiev, P., and Golovnin, A. (2019) HIPP1 stabilizes the interaction between CP190 and Su(Hw) in the *Drosophila* insulator complex, *Sci. Rep.*, **9**, 19102, https://doi.org/10.1038/s41598-019-55617-6.
- 27. Stow, E. C., Simmons, J. R., An, R., Schoborg, T. A., Davenport, N. M., and Labrador, M. (2022) A *Drosophila* insulator interacting protein suppresses enhancer-blocking function and modulates replication timing, *Gene*, **819**, 146208, https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146208.
- 28. Kurshakova, M., Maksimenko, O., Golovnin, A., Pulina, M., Georgieva, S., Georgiev, P., and Krasnov, A. (2007) Evolutionarily conserved E(y)2/Sus1 protein is essential for the barrier activity of Su(Hw)-dependent insulators in *Drosophila, Mol. Cell*, 27, 332-338, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.035.
- 29. Matzat, L. H., Dale, R. K., Moshkovich, N., and Lei, E. P. (2012) Tissue-specific regulation of chromatin insulator function, *PLoS Genet.*, **8**, e1003069, https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003069.
- 30. King, M. R., Matzat, L. H., Dale, R. K., Lim, S. J., and Lei, E. P. (2014) The RNA-binding protein Rumpelstiltskin antagonizes gypsy chromatin insulator function in a tissue-specific manner, *J. Cell. Sci.*, **127**, 2956-2966, https://doi.org/10.1242/jcs.151126.
- 31. Schoborg, T., Rickels, R., Barrios, J., and Labrador, M. (2013) Chromatin insulator bodies are nuclear structures that form in response to osmotic stress and cell death, *J. Cell Biol.*, **202**, 261-276, https://doi.org/10.1083/jcb.201304181.
- 32. Golovnin, A., Melnikova, L., Volkov, I., Kostuchenko, M., Galkin, A. V., and Georgiev, P. (2008) "Insulator bodies" are aggregates of proteins but not of insulators, *EMBO Rep.*, **9**, 440-445, https://doi.org/10.1038/embor.2008.32.
- 33. Golovnin, A., Volkov, I., and Georgiev, P. (2012) SUMO conjugation is required for the assembly of *Drosophila* Su(Hw) and Mod(mdg4) into insulator bodies that facilitate insulator complex formation, *J. Cell Sci.*, 125, 2064-2074, https://doi.org/10.1242/jcs.100172.
- 34. Harrison, D. A., Gdula, D. A., Coyne, R. S., and Corces, V. G. (1993) A leucine zipper domain of the suppressor of Hairy-wing protein mediates its repressive effect on enhancer function, *Genes Dev.*, 7, 1966-1978, https://doi.org/10.1101/gad.7.10.1966.

- 35. Melnikova, L., Kostyuchenko, M., Parshikov, A., Georgiev, P., and Golovnin, A. (2018) Role of Su(Hw) zinc finger 10 and interaction with CP190 and Mod(mdg4) proteins in recruiting the Su(Hw) complex to chromatin sites in *Drosophila*, *PLoS One*, **13**, e0193497, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193497.
- 36. Georgiev, P., and Kozycina, M. (1996) Interaction between mutations in the *suppressor of Hairy wing* and *modifier of mdg4* genes of *Drosophila melanogaster* affecting the phenotype of *gypsy*-induced mutations, *Genetics*, **142**, 425-436, https://doi.org/10.1093/genetics/142.2.425.
- 37. Murawska, M., and Brehm, A. (2012) Immunostaining of *Drosophila* polytene chromosomes to investigate recruitment of chromatin-binding proteins, *Methods Mol. Biol.*, **809**, 267-277, https://doi.org/10.1007/978-1-61779-376-9_18.
- 38. Geyer, P. K., and Corces, V. G. (1987) Separate regulatory elements are responsible for the complex pattern of tissue-specific and developmental transcription of the *yellow* locus in *Drosophila melanogaster*, *Genes Dev.*, 1, 996-1004, https://doi.org/10.1101/gad.1.9.996.
- 39. Geyer, P. K., Spana, C., and Corces, V. G. (1986) On the molecular mechanism of gypsy-induced mutations at the *yellow* locus of *Drosophila melanogaster*, *EMBO J.*, 5, 2657-2662, https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04548.x.
- 40. Jack, J., Dorsett, D., Delotto, Y., and Liu, S. (1991) Expression of the *cut* locus in the *Drosophila* wing margin is required for cell type specification and is regulated by a distant enhancer, *Development*, **113**, 735-747, https://doi.org/10.1242/dev.113.3.735.
- 41. Parnell, T. J., Kuhn, E. J., Gilmore, B. L., Helou, C., Wold, M. S., and Geyer, P. K. (2006) Identification of genomic sites that bind the *Drosophila* suppressor of Hairy-wing insulator protein, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 5983-5993, https://doi.org/10.1128/MCB.00698-06.
- 42. Kuhn-Parnell, E. J., Helou, C., Marion, D. J., Gilmore, B. L., Parnell, T. J., Wold, M. S., and Geyer, P. K. (2008) Investigation of the properties of non-*gypsy* suppressor of hairy-wing-binding sites, *Genetics*, **179**, 1263-1273, https://doi.org/10.1534/genetics.108.087254.

ROLE OF Mod(mdg4)-67.2 PROTEIN IN INTERACTIONS BETWEEN Su(Hw)-DEPENDENT COMPLEXES AND THEIR RECRUITMENT TO CHROMATIN

L. S. Melnikova*, V. V. Molodina, P. G. Georgiev, and A. K. Golovnin

Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; e-mail: lsm73@mail.ru

Su(Hw) belongs to a class of proteins that organize chromosome architecture, determine promoter activity, and participate in the formation of boundaries/insulators between regulatory domains. This protein contains a cluster of 12 zinc fingers of the C2H2 type, some of which are responsible for binding to the consensus site. The Su(Hw) protein forms a complex with the Mod(mdg4)-67.2 and the CP190 proteins, where the last one binds to all known *Drosophila* insulators. To further study the functioning of Su(Hw)-dependent complexes, we used the previously described $su(Hw)^{E8}$ mutation, with inactive seventh zinc finger, which produced the mutant protein losing the ability to bind to the consensus site. The present work shows that the Su(Hw)^{E8} protein continues to directly interact with the CP190 and Mod(mdg4)-67.2 proteins. Through interaction with Mod(mdg4)-67.2, the Su(Hw)^{E8} protein can be recruited into Su(Hw)-dependent complexes formed on chromatin and enhance their insulator activity. Our results demonstrate that DNA-unbound Su(Hw)-dependent complexes can be recruited to Su(Hw)-binding sites through specific protein-protein interactions that are stabilized by Mod(mdg4)-67.2.

Keywords: transcription regulation, Su(Hw), Mod(mdg4), protein-protein interactions, chromatin insulators

УДК 575.224.23:616-006

МОДИФИКАЦИЯ ПРОТОКОЛА НІ-С ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПАРАФИНОВЫХ СРЕЗОВ ОПУХОЛЕЙ

© 2024 М.М. Гридина^{1,2*}, Я.К. Степанчук^{1,2}, М.А. Нуриддинов^{1,2}, Т.А. Лагунов^{1,2}, Н.Ю. Торгунаков^{1,2}, А.А. Шадский^{1,2}, А.И. Рябова³, Н.В. Васильев³, С.В. Вторушин^{3,4}, Т.С. Геращенко³, Е.В. Денисов³, М.А. Травин⁵, М.А. Королев⁵, В.С. Фишман^{1,2}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: gridinam@gmail.com

² Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

³ Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634009 Томск, Россия

⁴ Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, 634050 Томск, Россия ⁵ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии − филиал ИЦиГ СО РАН, 630117 Новосибирск, Россия

> Поступила в редакцию 05.09.2023 После доработки 31.10.2023 Принята к публикации 31.10.2023

Молекулярно-генетический анализ опухолевых тканей является важнейшим этапом на пути к пониманию механизмов развития онкологического заболевания, а также необходим для выбора таргетной терапии при лечении больного. Технология Hi-C (высокопроизводительный захват конформации хроматина) может использоваться для детекции различных типов геномных вариантов, включая сбалансированные хромосомные перестройки – инверсии и транслокации. В этой работе мы предлагаем модификацию метода Hi-C для анализа контактов хроматина в парафиновых срезах опухолевых тканей. Мы показали, что полученные с помощью этой методики данные позволяют обнаружить различные типы хромосомных перестроек. Мы составили список клинически значимых транслокаций и на основе моделирования Hi-C-контактов показали, что как минимум часть из них может быть обнаружена с использованием технологии Hi-C. Таким образом, мы продемонстрировали перспективы модифицированного метода Hi-C в качестве инструмента онкогенетической диагностики.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хромосомные перестройки, трёхмерная архитектура ядра, Ні-С, онкология, FFPE-срезы.

DOI: 10.31857/S0320972524040042 **EDN:** ZFXUFQ

ВВЕДЕНИЕ

Хромосомные перестройки, наряду с точечными мутациями, являются причиной развития онкологических заболеваний. Современные методы диагностики позволяют хорошо детектировать точечные мутации и изменения числа копий на полногеномном уровне. Однако на данный

момент нет удовлетворительного решения для поиска сбалансированных хромосомных перестроек (транслокаций и инверсий). В то же время эти типы структурных вариантов были обнаружены практически во всех типах онкологических заболеваний. Более того, при некоторых типах опухолей детекция сбалансированных хромосомных перестроек критически важна для постановки

Принятые сокращения: ХЛЛ – хронический лимфоцитарный лейкоз; FFPE-блоки – блоки, фиксированные формалином и залитые в парафин; Hi-C – высокопроизводительный захват конформации хроматина.

^{*} Адресат для корреспонденции.

корректного диагноза, уточнения прогноза, а также выбора терапии.

Описано множество опухолей, для которых хромосомные перестройки не просто сопровождают процесс их развития, но и являются основной причиной (драйвером) онкологической трансформации клетки. Реципрокные транслокации приводят к развитию лимфомы Беркитта. При этом происходит перенос гена МҮС с хромосомы 8 на хромосому 14 под воздействием энхансера тяжёлой цепи иммуноглобулинов, что приводит к постоянной, увеличенной экспрессии гена МҮС [1]. Если места разрывов хромосомной перестройки оказываются внутри генов, это может привести к их слиянию и образованию химерных белков. Как правило, одним из партнёров по слиянию являются транскрипционные факторы (ERG, MYB и др.) или протеинкиназы (ABL1, ALK, BRAF, EGFR, JAK2, RET и др.). Слияние генов может приводить к малигнизации клеток за счёт увеличения экспрессии гена, как в случае слияния генов TMPRSS2 и *ERG*, которое обнаруживают в большинстве аденокарцином предстательной железы и примерно в 20% предшественников интраэпителиальных неоплазий предстательной железы высокой степени злокачественности [2]. TMPRSS2 - это сериновая протеаза, а работа её гена контролируется андроген-зависимым промотором. ERG - транскрипционный фактор, считающийся онкогеном. Слияние 1–2 экзонов *TMPRSS2* и гена *ERG* приводит к смене промотора у последнего и, таким образом, к его сверхэкспрессии в тканях простаты. Вероятно, по похожему механизму происходит развитие других типов онкологических заболеваний при слиянии ERG с другими партнёрами, такими как NDRG1, EWS и FUS [3-5].

Если в результате слияния двух генов один из партнёров оказывается усечённым, это может приводить к его сверхэкспрессии из-за потери негативных регуляторных сайтов связывания микроРНК или сайтов, регулирующих продолжительность жизни белка. Транслокации t(6;9) приводят к слиянию генов МҮВ (транскрипционный фактор) и NFIB и развитию аденоидно-кистозной карциномы [6]. В образующемся в результате транслокаций химерном транскрипте происходит частичное разрушение или полная потеря участка, кодирующего регуляторный С-концевой домен, содержащий сайты посттрансляционных модификаций, а также некодирующего участка, содержащего сайты связывания регуляторных микроРНК, с сохранением остальных участков, кодирующих функциональные домены МҮВ. В результате увеличивается экспрессия этого белка и продолжительность его жизни [7].

При слиянии генов могут образовываться химерные белки с изменёнными функциональны-

ми доменами. В норме тирозинкиназа рецептора FGFR3 временно активируется гомо/гетеродимеризацией с участием FGF в качестве лиганда [8]. Транслокация хромосом 4 и 7 приводит к слиянию генов FGFR3 и BAIAP2L1, химерный белок получает способность к конститутивной, независимой от лиганда, гомодимеризации, используя для этого BAR-домены BAIAP2L1. В результате происходит активация киназы FGFR3 и наблюдается мощная онкогенная активность [9].

Для проведения диагностики и долгосрочного хранения образцы опухоли в рутинной практике фиксируют в формалине, а затем заливают в парафин для изготовления фиксированных формалином и залитых в парафин (FFPE) тканевых блоков. Хранение образцов в виде FFPE-блоков имеет множество преимуществ, включая стабильность при комнатной температуре, долгий срок хранения и пригодность для иммуногистохимического анализа (IHC). Однако такой способ сохранения образцов приводит к деградации нуклеиновых кислот и появлению артефактов, что требует дополнительной оптимизации молекулярных методов анализа [10] и усложняет использование секвенирования РНК для обнаружения биомаркеров [11].

Для поиска хромосомных перестроек в опухоли в рутинном анализе используют следующие методы: FISH (флуоресцентная гибридизация in situ), IHC и RT-PCR (ПЦР с обратной транскрипцией). Эти подходы имеют очевидные ограничения, касающиеся обнаружения новых или комплексных хромосомных перестроек. Основанные на высокопроизводительном секвенировании методы определённо совершили переворот в клинической генетике. Полногеномное и полноэкзомное секвенирование короткими прочтениями отлично справляется с задачей поиска точечных мутаций и несбалансированных хромосомных перестроек, но их точность ограничена в повторяющихся областях генома. Обнаружение ими сбалансированных перестроек зависит от присутствия химерных чтений, включающих точку перестройки, а следовательно, требует большой глубины секвенирования. Методы секвенирования длинными ридами (PacBio и Oxford Nanopore) эффективны для детекции сбалансированных хромосомных перестроек, однако лишаются своих преимуществ при анализе материала FFPE-блоков, так как в них ДНК подвергается деградации. Основными механизмами, через которые сбалансированные хромосомные перестройки инициируют канцерогенез, являются слияние генов и/или нарушение их экспрессии за счёт изменения регуляторного окружения, поэтому секвенирование РНК является одним из инструментов анализа образцов опухоли [12–14]. Однако эти методы предъявляют высокие требования к качеству РНК - соответствующих показателей качества не всегда можно добиться – особенно при работе с FFPE-блоками [11-16]. Как следствие, фрагменты деградированной РНК могут не содержать информации о месте слияния. Более того, методы РНК-секвенирования имеют низкую чувствительность в случаях слабой экспрессии слитого транскрипта [13] и слияний с некодирующими районами [17] и требуют секвенирования с относительно высокой глубиной (20-30 миллионов пар прочтений) или процедуры обогащения целевыми генами [11]. Метод Ні-С (высокопроизводительного захвата конформации хроматина) в последние годы всё более активно используется в качестве альтернативного подхода для детекции разнообразных типов хромосомных перестроек. Преимуществом метода является возможность детектировать сбалансированные перестройки при меньшей глубине секвенирования, поскольку информативными являются не только прочтения, содержащие точку разрыва, но и прочтения некоторой области вокруг этой точки, частота контактов которых меняется [18–27].

В данной работе мы предлагаем протокол Ні-С для проведения анализа материала FFPE-срезов опухоли. Мы ввели существенные модификации в существующие протоколы [28, 29], результатом чего стал хорошо воспроизводимый метод, позволяющий получать качественные Ні-С-данные и детектировать все типы хромосомных перестроек. Кроме того, важным отличием предложенного нами протокола обработки FFPE-срезов от использованных ранее на этом материале 3С-методов (захвата конформации хромосомы, chromosome conformation capture) является возможность случайно (независимо от сайта рестрикции) фрагментировать хроматин. Такой подход, в отличие от «классического» метода Hi-C, может позволить обнаруживать, помимо хромосомных перестроек, и однонуклеотидные варианты замены в клинически значимых локусах. Нами проведён анализ существующих баз данных и составлен список транслокаций, для которых молекулярно-генетическое тестирование имеет клиническое значение с точки зрения выбора таргетной терапии. Результаты моделирования, приведённые в нашей работе, показывают, что разработанный метод имеет перспективы использования в клинической практике для поиска таких клинически значимых геномных вариантов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы, использованные в анализе. В исследование вошли образцы, полученные от пациентов различных клинических центров РФ: 3 пациентов с опухолями головного мозга с мор-

фологически верифицированными диагнозами – глиобластома, гигантоклеточная глиобластома и диффузная астроцитома (возраст 43,6 ± 8,62 лет, G4), проходивших лечение на базе НИИ онкологии Томского НИМЦ; 5 пациентов с морфологически верифицированным диагнозом «хондросаркома» различных локализаций: плечевая, бедренная, большеберцовая, тазовые кости и грудина (28-65 лет, средний возраст 50,4 ± 12,9 лет, G2-3), проходивших лечение на базе НИИ онкологии Томского НИМЦ; 3 пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ) и 3 пациентов с крупноклеточной лимфомой (КЛ), проходивших лечение на базе Кемеровской областной клинической больницы, диагностированных на основе патоморфологического исследования эксцизионной биопсии лимфоузла с иммуногистохимической верификацией с использованием специализированной панели антител.

Образцы опухолевой ткани пациентов были получены в ходе оперативного вмешательства, фиксированы 24 ч в 10%-ном (v/v) нейтральном формалине и залиты в парафин по стандартной методике. Из формалин-фиксированных парафинзалитых опухолевых образцов были подготовлены срезы толщиной 10 мкм.

Протокол приготовления Ні-С-библиотек из FFPE-срезов (FFPE Hi-C). Протокол, основанный на ранее предложенном нами методе Ні-С S1-опосредованной фрагментации хроматина [30], включает следующие этапы:

- 1. Депарафинизация:
- 1.1. Срез FFPE-блока помещали в пробирку объёмом 1,5 мл и добавляли 1 мл лизирующего буфера У (150 мМ Tris, pH 8,0; 140 мМ NaCl, 0,5%-ный Igepal (ν/ν), 1%-ный Triton X-100 (ν/ν)).
 - 1.2. Инкубировали при 80 °C в течение 3 мин.
- 1.3. Центрифугировали при 2500 g в течение 5 мин.
- 1.4. С поверхности раствора удаляли слой парафина.
- 1.5. Шаги 1.2–1.4 повторяли (т.е. общее количество инкубаций две).
 - 2. Лизис:
- 2.1. После второго центрифугирования супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл лизирующего буфера Н (10 мМ Tris, рН 8,0; 10 мМ NaCl, 1%-ный Triton X-100 (v/v), 0,1%-ный SDC (m/v), 20%-ный EtOH (v/v)).
 - 2.2. Инкубировали при 45 °C в течение ночи.
- 2.3. Центрифугировали при 2500 g в течение 5 мин
- 2.4. Осадок однократно промывали 1 мл лизирующего буфера У.
- 2.5. Образец инкубировали в 1 мл лизирующего буфера У 1 ч при комнатной температуре на орбитальном шейкере.

- 2.6. Центрифугировали при 2500 g в течение 5 мин.
- 2.7. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 500 мкл лизирующего буфера Д (50 мМ Tris, pH 7,5; 0,5 мМ CaCl₂, 0,3%-ный SDS (m/v)).
 - 2.8. Инкубировали при 37 °C в течение 1 ч.
- 2.9. SDS ингибировали добавлением 91 мкл 10%-ного Triton X-100 (v/v) в течение 10 мин при комнатной температуре.
- 2.10. Центрифугировали при 2500 g в течение 5 мин.
- 2.11. Осадок однократно промывали 500 мкл $1 \times$ буфера для S1-нуклеазы («Thermo Fisher Scientific», США), содержащего 1%-ный Triton X-100 (v/v).
 - 3. Фрагментация хроматина:
- 3.1. Осадок после центрифугирования ресуспендировали в 80 мкл $1\times$ буфера S1 («Thermo Fisher Scientific»).
- 3.2. Добавляли 200 U нуклеазы S1 («Thermo Fisher Scientific») и инкубировали при $37\,^{\circ}$ С в течение $1\,$ ч.
- 3.3. Реакцию останавливали добавлением 5 мкл 500 мМ ЭДТА и очищали с помощью 1 объёма магнитных частиц AMPure в соответствии с рекомендациями производителя.
- 3.4. Связанный с магнитными частицами хроматин ресуспендировали в 100 мкл H_2O , магнитные частицы оставались в дальнейших реакциях вплоть до выделения ДНК.
- 4. Дальнейшие этапы, которые включали введение биотиновой метки, лигирование, выделение ДНК, обогащение фрагментами лигирования и подготовку библиотек для NGS-секвенирования, мы проводили согласно протоколу, описанному в работе Gridina et al. [31]. Количество ДНК определяли при помощи набора Qubit dsDNA HS Assay Kit.

Библиотеки секвенировали на платформе BGI, используя парные чтения длиной 150 п.о. Глубина секвенирования составляла 10–100 тыс. ридов на образец для неглубокого секвенирования и ~80 млн пар ридов – для глубокого.

Моделирование хромосомных перестроек. Моделирование хромосомных перестроек проводилось с помощью программного обеспечения Charm (https://github.com/genomech/Charm/). Для построения референсной базы контактов использовались публично доступные результаты полногеномных Ні-С-экспериментов на клеточной линии IMR90 [32] (идентификаторы: SRR1658675, SRR1658676, SRR1658679). Каждая хромосомная перестройка моделировалась как гетерозиготная с общим числом контактов на карте Ні-С около 30 миллионов. Значения координат для границ смоделированных хромосомных перестроек (Приложение 1) округляли до 5 тысяч п.н. Перестройки размером менее 25 тысяч п.н. увеличивались до данной величины.

Построение карт контактов и анализ показателей качества Hi-C-библиотек. Анализ данных Hi-C и построение карт контактов проведены согласно методу, описанному в работе Gridina et al. [31]. Для подсчёта показателей качества использована модифицированная версия программного обеспечения Juicer версии 1.6, доступная на GitHub: https://github.com/genomech/juicer1.6_compact.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка протокола Ні-С-анализа парафиновых срезов образцов опухолей с использованием S1-нуклеазы. Большинство опубликованных протоколов Ні-С в качестве исходного материала предлагает использовать живые клетки или ткани [19, 31-33], реже - замороженные образцы [34]. Поэтому для этого типа исходного материала протоколы хорошо проверены, известны многие нюансы и критические точки [35-37]. Использование Ні-С на материале FFPE-срезов опухоли описано в двух работах [28, 29]. Сравнение этих протоколов, приведённое в табл. 1, показывает ряд существенных различий между ними. Наиболее существенные отличия касаются этапа депарафинизации и лизиса образцов. Для депарафинизации Troll et al. [28] предлагают использовать ксилол с последующей отмывкой спиртом, a Allahyar et al. [29] инкубацию в течение трёх минут при 80°C с последующим центрифугированием и удалением образовавшегося слоя парафина. После депарафинизации, для того чтобы обеспечить доступность хроматина для ферментов рестрикции, Troll et al. предлагают обрабатывать образцы протеиназой К (0,5 мг/мл в течение часа при 37 °C), a Allahyar et al. предлагают сонифицировать образцы, после чего инкубировать 2 ч при 80 °C. Как обработка протеиназой, так и продолжительное инкубирование при 80 °С может приводить к разрушению сшивок, образованных формальдегидом [38], и освобождению ДНК из хроматина. Наконец, следует отметить, что обе работы предлагают использование эндонуклеаз рестрикции с четырёхбуквенным сайтом узнавания для фрагментации хроматина. В этом случае участки генома, расположенные далеко от сайтов узнавания фермента, будут иметь крайне низкое покрытие, что ограничивает применение опубликованных методов для задач детекции некоторых геномных вариантов. Например, точковые геномные варианты в экзонах онкогенов, расположенные далеко от сайтов рестрикции, не могут быть проанализированы на основе данных секвенирования таких Ні-С-библиотек.

Мы разработали модификацию протокола Hi-C для приготовления геномных библиотек из FFPE-срезов (табл. 1), в которой, с одной стороны,

	Краткое описание условий				
Этап	Этап Troll et al. [28]		Предлагаемый нами метод FFPE Hi-C		
Депарафинизация	ксилол	3 мин при 80°C, центрифугирование	3 мин при 80°C, центрифугирование		
Лизис	протеиназа К, 1 ч при 37°C	0,6%-ный SDS, сонификация, инкубация 2 ч при 80°C	лизис в присутствии ионных и неионных детергентов		
Фрагментация хроматина	MboI, 1 ч при 37°C	NlaIII, 1 ч при 37°C	S1-нуклеаза, 1 ч при 37 °C		
Включение биотина	+	_	+		
Лигирование	2 ч, комнатная температура	1 ч, 16 °C	ночь, 16 °С		
Обогащение продуктами лигирования	+	-	+		

Таблица 1. Сравнение основных этапов протоколов Hi-C для FFPE-срезов

смягчили условия лизиса, с другой стороны, использовали S1-нуклеазу вместо рестриктаз (см. Материалы и методы). Использование S1-нуклеазы, в отличие от использованных ранее эндонуклеаз рестрикции, позволяет получить равномерное геномное покрытие [30].

В ходе приготовления Hi-C-библиотек из живых клеток или тканей стандартом является анализ фрагментов ДНК, полученных после ключевых этапов эксперимента:

- после лизиса, до фрагментации;
- после фрагментации, перед лигированием;
- после лигирования.

На основании распределения длин фрагментов ДНК в контролях можно оценить качество приготовленных библиотек (рис. 1, а и б), а именно: до фрагментации должен детектироваться бэнд, соответствующий высокомолекулярной ДНК; после фрагментации этот бэнд исчезает и образуется множество низкомолекулярных фрагментов различной длины; после лигирования распределение длин фрагментов смещается в более высокомолекулярную область.

Мы обнаружили, что в случае приготовления Ні-С-библиотек из образцов FFPE-срезов данные контроли не являются показательными. Продолжительная фиксация материала опухоли в формальдегиде и последующее заключение в парафиновый блок приводит к существенной деградации ДНК [39, 40], поэтому выделенная из FFPE-блока ДНК уже сильно фрагментирована, и, согласно нашим данным, дальнейшая обработка нуклеазой и лигирование не приводит к столь контрастным изменениям распределения длин фрагментов (рис. 1, в). При этом, несмотря на отсутствие контрастных изменений в длинах продуктов, анализ качества данных секвенирования Ні-С-библиотек и визуальный анализ полученных карт Ні-С-контактов говорит об успешном прохождении основных этапов Ні-С-эксперимента. Так, например, показанные на рис. 1, в образцы были просеквенированы и имели приемлемые показатели статистик качества, как и другие библиотеки, приготовленные по нашему протоколу (Приложение 2, образцы s11–15). Таким образом, мы считаем, что в случае FFPE Ні-С не имеет смысла делать описанные контроли, а следует оценивать качество библиотек по результатам неглубоких секвенирований.

В отличие от Hi-C-анализа живых клеток с использованием рестриктазы DpnII или S1-нуклеазы, где исследователь в большинстве случаев может легко варьировать количество материала в эксперименте, при анализе FFPE-срезов не всегда есть возможность оценить количество клеток, попавших на срез. Мы обратили внимание, что количество ДНК Ні-С-библиотеки, которое можно было выделить из образца, сильно варьировало как в зависимости от типа опухоли, так и от образца к образцу (рис. 1, г). При этом минимальный выход наблюдался для FFPE-срезов сарком. Это заставило нас в случае с саркомами использовать по три FFPE-среза от одного блока в анализе. В связи с этим мы рекомендуем для каждого типа опухоли определять необходимое количество срезов для получения достаточного выхода библиотек ДНК.

Мы собрали Hi-C-библиотеки по разработанному нами протоколу из FFPE-срезов: хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), крупноклеточных лимфом (КЛ), глиом и сарком, а также по протоколам Troll и Allahyar из образцов FFPE-срезов ХЛЛ.

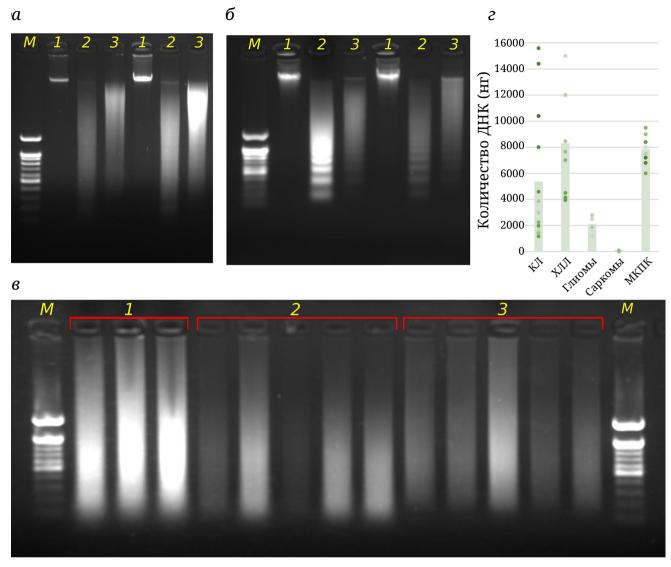


Рис. 1. Контроли этапов фрагментации и лигирования хроматина в Hi-C-экспериментах на свежих клетках и тканях с использованием DpnII (*a*), S1-нуклеазы (*б*) или полученные с использованием разработанного протокола Hi-C-анализа FFPE-срезов (*в*). 1 – Образец до фрагментации, 2 – после фрагментации, 3 – после лигирования. *М* – маркер длины 100 п.н. («SibEnzyme», M24). *г* – Количество выделенной ДНК (нг) в Hi-C-библиотеках, полученных из FFPE-срезов разных типов опухоли. Число проанализированных библиотек из мононуклеаров крови (МКПК) – 16, из FFPE-срезов: КЛ – 13, ХЛЛ – 9, глиомы – 4, саркомы – 5

После секвенирования полученных библиотек мы оценили их качество. Все библиотеки имели низкие доли невыровненных прочтений и ПЦР-дубликатов (рис. 2, а и б соответственно). Одним из критериев оценки качества Hi-C-библиотек является доля DE (dangling ends – это неинформативные фрагменты, не являющиеся продуктами лигирования). Для Hi-C-библиотек, приготовленных с использованием S1-нуклеазы из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), доля DE составляет в среднем 40%. Для FFPE-библиотек, приготовленных по нашему протоколу, она была выше и, вероятно, зависит от типа анализируемой опухоли; максимальное число DE выявлялось в библиотеках, приготовленных по протоколам

Troll и Allahyar (рис. 2, в). Ранее нами было показано [31], что наиболее важным показателем для оценки качества библиотек является доля сіз-контактов (соотношение сіз/all (FF and RR orient)). Этот показатель отражает долю Ні-С-прочтений, попадающих на одну хромосому, среди всех Ні-С-прочтений. Низкая доля сіз-контактов может быть следствием разрушения связей, образованных при фиксации, и выхода ДНК в раствор, где в дальнейшем лигирование происходит случайным образом. Для всех библиотек, приготовленных по нашему протоколу, доля сіз-контактов была выше 70%, тогда как для библиотек, приготовленных по протоколам Troll и Allahyar, она составляла 20% и 15% соответственно (рис. 2, г).

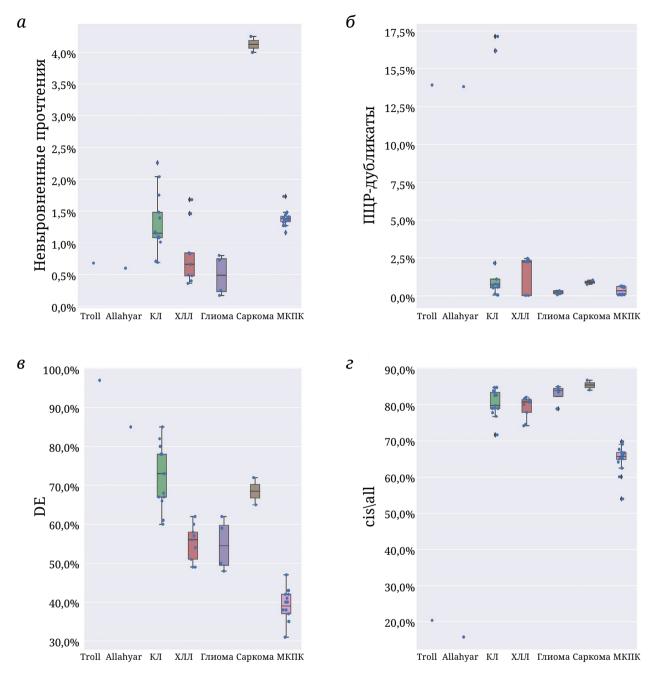


Рис. 2. Показатели качества Hi-C библиотек: доля невыровненных прочтений (*a*), доля ПЦР-дубликатов (*б*), доля DE (*в*), доля cis-контактов среди Hi-C-контактов (*г*). Число проанализированных библиотек из монону-клеаров крови (МКПК) – 16, из FFPE-срезов: КЛ – 13, ХЛЛ – 9, глиомы – 4, саркомы – 2

Следует отметить, что целью данной работы не является сравнение разработанного протокола с подходами Troll и Allahyar, т.к. последние используют ферменты с фиксированным сайтом узнавания [28, 29] и поэтому в любом случае не могут быть применены для детекции геномных вариантов столь же эффективно, как разработанный нами протокол [31, 41]. По этой причине мы не проводили дополнительные эксперименты по протоколам Troll и Allahyar на большем количестве образцов или разнообразных типах опухолей.

Таким образом, полученные данные не позволяют нам сделать статистическое сравнение качества Hi-C-данных, полученных разными протоколами, но мы можем констатировать тренд, свидетельствующий о более высоком качестве Hi-C-библиотек, полученных по протоколу с S1-нуклеазой.

Для двух библиотек было проведено глубокое секвенирование и построены тепловые карты Hi-C-контактов, на которых были отчётливо видны паттерны, соответствующие разным типам хромосомных перестроек (рис. 3, *a*–*д*). Следует от-

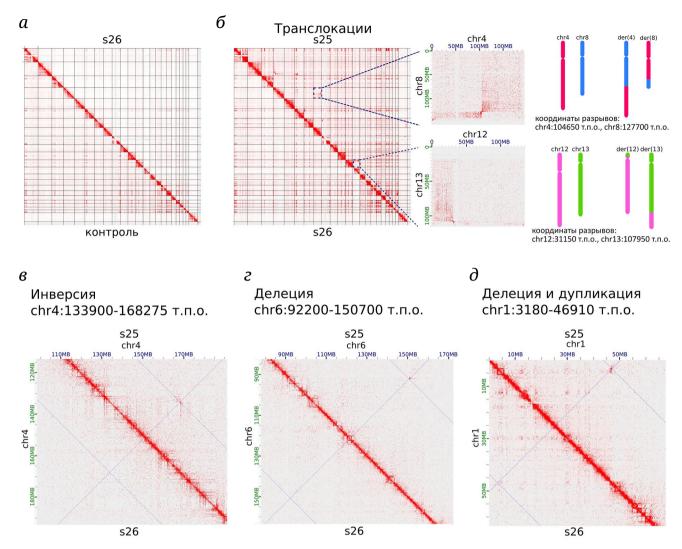


Рис. 3. Тепловые карты контактов для Hi-C из FFPE-срезов. *а* − Изображение тепловой карты геномных Hi-C контактов в масштабе хромосом для образца s26 (выше диагонали), в качестве контроля (ниже диагонали) приведена карта, полученная для лимфоцитов крови [30]. *б* − Примеры паттернов контактов на картах Hi-C, соответствующих реципрокным транслокациям, и их схематичное изображение. Примеры паттернов контактов на картах Hi-C для: инверсии (*в*), гетерозиготной делеции (*г*), гетерозиготных делеции и дупликации (∂). Выше диагонали – карта контактов для образца s25, ниже − s26, который использовали в качестве контроля

метить, что среди обнаруженных нами мутаций присутствуют все типы структурных перестроек: делеции, дупликации, инверсии и транслокации. Таким образом, мы можем заключить, что разработанный нами подход Hi-C-анализа FFPE-срезов с использованием S1-нуклеазы позволяет получать карты трёхмерных контактов хроматина из образцов парафиновых срезов опухолей и, на основе этих данных, детектировать хромосомные перестройки.

Перспективы Hi-C-анализа парафиновых срезов опухолевых тканей для выбора таргетной терапии онкологических заболеваний. Разработанный нами протокол Hi-C-анализа парафиновых срезов может в перспективе позволить детектировать хромосомные перестройки в клинической практике. Наибольший интерес при этом пред-

ставляют сбалансированные события, транслокации и инверсии, которые труднее всего детектировать стандартными методами секвенирования. Кроме того, практическая ценность молекулярногенетического теста определяется возможностью скорректировать тактику лечения больного или, по крайней мере, дать прогноз развития онкологического заболевания в случае детекции хромосомной перестройки. Чтобы понять область применения разработанного метода, мы проанализировали базы данных National Cancer Institute (https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/ cancer-type), CIViC (https://civicdb.org/welcome) и MyCancerGenome (https://www.mycancergenome.org/). По результатам анализа были выбраны сбалансированные хромосомные перестройки, которые приводят к слиянию генов, причём образовавшийся

Таблица 2. Список сбалансированных хромосомных перестроек и слияний генов, для которых применяется таргетная терапия

Перестройка		артнёры иянию	Препараты	Тип заболевания
перестроика	А	Б	таргетной терапии	
t(9;22)(q34;q11)	.22)(q34;q11)		Dasatinib, Imatinib, Nilotinib, Bosutinib, Bafetinib, Asciminib	острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз
t(9;12)(q34;p13)	ABL1	ETV6	Imatinib, Dasatinib, Nilotinib	В-лимфобластный лейкоз/лимфома
t(3;9)(p13;q34)		FOXP1	Dasatinib	В-лимфобластный лейкоз/лимфома
t(2;9)(q12;q34)		RANBP2	Dasatinib	В-лимфобластный лейкоз/лимфома
t(1;9)(q24;q34)		RCSD1	Dasatinib, Imatinib, Ponatinib	В-лимфобластный лейкоз/лимфома
t(1;9)(p34;q34)		SFPQ	Dasatinib, Imatinib	острый лимфоцитарный лейкоз, В-лимфобластный лейкоз/лимфома
t(5;9)(q23;q34)		SNX2	Dasatinib, Imatinib	В-лимфобластный лейкоз/лимфома
inv(1)(q24q25)	ABL2	RCSD1	Imatinib	В-лимфобластный лейкоз/лимфома
t(1;7)(q25;q34)		ZC3HAV1	Imatinib	В-лимфобластный лейкоз/лимфома
		разные	блокаторы ALK- сигнального пути, HSP90-ингибиторы, EGFR-TKIs, Crizotinib, Brigatinib, Alectinib, Ceritinib, Entrectinib, Pemetrexed, 17-AAG*	рак молочной железы, колоректальная аденокарцинома, эпителиоидное воспаление, миофибробластная саркома, воспалительная миофибробластная опухоль, аденокарцинома лёгких, немелкоклеточный рак лёгких, карцинома щитовидной железы, саркома влагалища, анапластическая крупноклеточная лимфома, диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома
inv(2)(p23;p23)	ALK	CAD	Entrectinib	колоректальный рак
t(2;17)(p23;q23)		CLTC	Crizotinib	диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома
inv(2)(p23;p21)		EML4	17-AAG*, Alectinib (CH5424802), AUY922*, Ceritinib, Crizotinib, Brigatinib, IPI-504*, Erlotinib, Lorlatinib	ацинарная аденокарцинома лёгких, немелкоклеточный рак лёгких, почечно-клеточная карцинома
t(2;7)(p23;q11)		HIP1	Crizotinib, Alectinib	немелкоклеточный рак лёгких
t(2;5)(p23;q35)		NPM	Crizotinib	анапластическая крупноклеточная лимфома
inv(2)(p23;q13)		RANBP2	Crizotinib	воспалительная миофибробластическая опухоль
inv(2)(q21;q22)	ASNS	KMT2E	Asparaginase	Т-клеточный лимфобластный лейкоз
t(X;17)(p11;q25)	TFE3	ASPL	Cabozantinib, Dasatinib	альвеолярная мягкотканная саркома

Таблица 2 (продолжение)

	1			таолица 2 (прооолжени
Перестройка	Гены-партнёры по слиянию		Препараты таргетной терапии	Тип заболевания
	A	Б	Tupicinon repulling	
	1 34)	разные	Cobimetinib, Trametinib	меланома, рак яичников
inv(7)(q34;q34)		AGK	Sorafenib, Vemurafenib	меланома
inv(7)(q21;q34)		AKAP9	МЕК-ингибиторы	папиллярный рак щитовидной железы
inv(7)(q34;q36)		CUL1	МЕК-ингибиторы	серозная карцинома яичника
inv(7)(q22;q34)		CUX1	Vemurafenib	рак поджелудочной железы
t(1;7)(p31;q34)	BRAF	MIGA1	BRAF-ингибитор, HL-085	лангергансклеточный гистиоцитоз
inv(7)(q32;q34)		NRF1	Trametinib	переходно-клеточная карцинома
inv(7)(q33;q34)		TRIM24	Vemurafenib	меланома
inv(7)(q22;q34)		ZKSCAN1	Trametinib	меланома
t(7;11)(q34;p15)		PPFIBP2	Trametinib	меланома
t(4;7)(q25;q34)		PAPSS1	Trametinib, Vemurafenib	меланома
t(15;19)(q14;p13)	BRD4	NUTM1	Birabresib	NUT Midline Carcinoma
t(X;14)(p22;q32)	CRLF2	IGH	Ruxolitinib	детский В-клеточный острый лимфобластный лейкоз, В-клеточный острый лимфобластный лейкоз взрослых
t(1;5)(q22;q32)	CSF1R	MEF2D	Imatinib	острый лимфоцитарный лейкоз
t(X;6)(q28;p22)	DEK	AFF2	Pembrolizumab	рак головы и шеи
t(7;15)(p11;q15)	EGFR	RAD51	Erlotinib, Osimertinib, Icotinib, Afatinib	аденокарцинома лёгких
		разные	TK216*	саркома мягких тканей
t(12;22)(q13;q12)	EWSR1	ATF1	Crizotinib	светлоклеточная саркома
t(11;22)(q24;q12)		FLI1	генотоксическая химиотерапия	саркома Юинга
t(9;22)(q22;q12)		NR4A3	Pazopanib, Sunitinib	внескелетная миксоидная хондросаркома
inv(8)(p11;p11)	FGFR1	BAG4	AZD4547*	карцинома
t(8;12)(p11;p11)		FGFR10P2	Ponatinib	острый миелоидный лейкоз
t(8;13)(p11;q11)		ZNF198	Midostaurin	хроническое миелопролиферативное заболевание

Таблица 2 (продолжение)

				Таолица 2 (продолжение	
Перестройка	Гены-партнёры по слиянию		Препараты	Тип заболевания	
1	A	Б	таргетной терапии		
		разные	BGJ-398 (Infigratinib), AZD4575*, JNJ-42756493 (Balversa), Debio1347*, Futibatinib, Erdafitinib, Infigratinib Phosphate, Pemigatinib	холангиокарцинома, рак мочевого пузыря	
t(1;10)(p13;q26)	FGFR2	AHCYL1	BGJ398	холангиокарцинома	
inv(10)(q21;q26)		BICC1	BGJ398, JNJ-42756493	холангиокарцинома, рак эндометрия, уротелиальная карцинома	
t(4;10)(p16;q26)		TACC3	Pazopanib, Ponatinib	холангиокарцинома	
	FGFR3	разные	блокаторы FGFR- сигнального пути, TORC1/2-ингибиторы, AZD4547*, JNJ-42756493, BGJ398, Debio1347*, Erdafitinib	рак мочевого пузыря	
	FLT3	разные	блокаторы FLT3-сигнального пути, Sorafenib, полностью транс-ретиноевая кислота, Anthracycline*, Daunorubicin*, Lestaurtinib, Selumetinib (AZD6244)	острый миелоидный лейкоз	
t(2;13)(q36;q14)	FOXO1	PAX3	Thapsigargin	альвеолярная рабдомиосаркома	
t(9;22)(p24;q11)		BCR	Ruxolitinib	миелоидное новообразование	
t(9;14)(p24;q32)	14770	GOLGA5	Ruxolitinib	В-лимфобластный лейкоз/лимфома	
t(8;9)(p22;p24)	JAK2	PCM1	Ruxolitinib	лейкемия	
t(5;9)(q14;p24)		SSBP2	Ruxolitinib	В-лимфобластный лейкоз/лимфома	
	KIT	разные	Imatinib	злокачественная меланома ануса	
inv(7)(q22;q31)		ATXN7L1	Crizotinib	немелкоклеточный рак лёгких	
t(7;10)(q31;p11)	MET	KIF5B	Crizotinib	немелкоклеточный рак лёгких	
t(7;8)(q31;p12)		RBPMS	Cabozantinib	врождённая фибросаркома	
t(8;21)(q24;p12)		APP	Afatinib		
t(1;8)(q24;p12)		ATP1B1	Afatinib	холангиокарцинома, аденокарцинома протоков поджелудочной железы	
t(5;8)(q33;p12)	NRG1	CD74	Afatinib	муцинозная аденокарцинома	
t(8;11)(p12;q12)		SLC3A2	Afatinib, Erlotinib, Lumretuzumab	аденокарцинома лёгких, муцинозная аденокарцинома	
t(8;20)(p12;q13)		SDC4	Afatinib	аденокарцинома лёгких	

Таблица 2 (продолжение)

				Ιασπημία 2 (προσοπικέτταε)	
Перестройка	Гены-партнёры по слиянию		Препараты	Тип заболевания	
r	A	Б	таргетной терапии		
		разные	ARRY-470, Entrectinib, Larotrectinib (LOXO-101), LESTAURTINIB*, Crizotinib	колоректальный рак, саркома, все солидные опухоли, аденокарцинома лёгких	
t(1;12)(q23;p13)	NTRK1	ETV6	Entrectinib	все типы опухолей	
t(1;5)(q23;q35)		SQSTM1	Entrectinib	немелкоклеточный рак лёгких	
inv(1)(q21;q23)		ТРМ3	Larotrectinib, Entrectinib	саркома, папиллярный рак щитовидной железы	
inv(1)(q23;q31)		TPR	Larotrectinib	все солидные опухоли	
	NTRK2	разные	Larotrectinib, Entrectinib	все солидные опухоли	
	NTDVO	разные	Entrectinib, Larotrectinib, блокаторы сигнальных путей: PI3K, SRC и IGF1	все солидные опухоли	
t(12;15)(p13;q25)	NTRK3	ETV6	Entrectinib, Etoposide, Larotrectinib, Crizotinib	карцинома слюнной железы, рак молочной железы, врождённая мезобластная нефрома, В-лимфобластный лейкоз/лимфома	
	DDCED4	разные	Imatinib	миелодисплазия, миелопролиферативные новообразования	
t(4;22)(q12;q11)	PDGFRA	BCR	Imatinib	В-клеточный острый лимфобластный лейкоз	
		разные	Imatinib	хроническое миелопролиферативное заболевание, дерматофибросаркома, миелодисплазия, миелопролиферативное новообразование, острый лимфоцитарный лейкоз	
t(12;17)(p13;q21)	PDGFRB	ATF7IP	Dasatinib, Imatinib, Nilotinib, Ponatinib, Bafetinib, Rebastinib	детский В-клеточный острый лимфобластный лейкоз	
t(17;22)(q21;q13)		COL1A1	Sunitinib	дерматофибросаркома	
t(15;17)(q22;q21)	PML	RARA	Третиноин, мышьяка триоксид, полностью транс-ретиноевая кислота и мышьяка триоксид	острый промиелоцитарный лейкоз	
		разные	Cabozantinib, Vandetanib, Pralsetinib, Selpercatinib	немелкоклеточный рак лёгких, рак щитовидной железы	
inv(10)(q11;q21)	RET	CCDC6	Nintedanib, Agerafenib, Pralsetinib	немелкоклеточный рак лёгких, колоректальный рак, солидные опухоли	
inv(10)(p11;q11)		KIF5B	Vandetanib, Selpercatinib, Everolimus, Pralsetinib	аденокарцинома лёгких, солидные опухоли	

Таблица 2 (окончание)

Перестройка	Гены-партнёры по слиянию		Препараты	Тип заболевания
	A	Б	таргетной терапии	
		разные	Ceritinib, Entrectinib, Erlotinib, Gefitinib	аденокарцинома лёгких, бронхиоло- альвеолярная аденокарцинома, колоректальная аденокарцинома, немелкоклеточный рак лёгких
t(5;6)(q33;q22)	ROS1	CD74	Cabozantinib, Crizotinib, Brigatinib, Ceritinib, Foretinib, Lorlatinib	немелкоклеточная карцинома лёгких, аденокарцинома лёгких
t(3;6)(q12;q22)		TFG	Crizotinib	воспалительная миофибробластическая опухоль
	RSPO2	разные	блокаторы Wnt-сигнального пути, CGX1321	рак пищеварительной системы

Примечание. Партнёром «А» по слиянию мы называем ген, изменение активности которого приводит к развитию заболевания.

химерный продукт является мишенью для разрабатываемого или уже используемого в клинической практике таргетного препарата (табл. 2). Согласно приведённым данным, наибольшее число вариантов слияния генов, для которых применяется таргетная терапия, описано для гематологических онкологических заболеваний, а в случае солидных опухолей – для разных типов сарком и для рака лёгкого. Кроме того, для этих типов заболеваний наблюдается ещё и наибольшее разнообразие партнёров по слиянию. Для меланомы и холангиокарциномы также описано несколько вариантов слияний, однако в обоих случаях один из партнёров по слиянию повторяется: BRAF - общий партнёр по слиянию в клетках меланомы и FGFR2 – холангиокарциномы.

Помимо транслокаций, представленных в табл. 2, существуют и другие, важные для постановки диагноза и/или определения прогнозов, однако не имеющие на данный момент одобренных препаратов таргетной терапии. Один из примеров – слияния гена КМТ2А/MLL, которые встречаются у пациентов с диагнозом «острая лейкемия» и ассоциированы с неблагоприятным прогнозом [42]. Таким образом, наша таблица будет расширяться по мере добавления информации о новых слияниях генов и лицензирования препаратов, разработанных для их лечения.

Для того чтобы оценить возможность детекции хромосомных перестроек, описанных в табл. 2, мы провели моделирование результата Hi-C-эксперимента при помощи инструмента Charm (https://github.com/NuriddinovMA/Charm) для генотипов, соответствующих 5 вариантам инверсий и 7 вариантам транслокаций из табл. 2 (Приложение 1).

Модели соответствовали прочтению Ні-С-библиотек с глубиной около 30 миллионов парных ридов. Для каждой транслокации мы построили две модели: одна показывает реципрокную транслокацию, другая – транслокацию минимального фрагмента, достаточного для образования химерного белка, то есть транслокацию участка от 3'-конца слившегося гена до точки разрыва (рис. 4, а). Размер смоделированных инверсий составил от 2,3 млн п.о. до 79,9 млн п.о., а транслокаций – от 7,9 т.п.о. до 109 т.п.о. Все смоделированные хромосомные перестройки были хорошо видны на тепловых картах контактов (рис. 4, б-е, Приложение 3). Этот результат говорит о том, что метод Ні-С-анализа FFPE-образцов имеет потенциал для диагностики известных клинически значимых хромосомных перестроек.

обсуждение

В этой работе мы предложили протокол Hi-C-анализа парафиновых срезов, основанный на использовании S1-нуклеазы, и показали перспективу этого метода в качестве инструмента для детекции различных типов хромосомных перестроек. Перспективы использования предлагаемого метода зависят от его преимуществ и недостатков по сравнению с другими высокопроизводительными методами диагностики. Важно сравнить сроки, сложность, стоимость и точность анализа. Для проведения Hi-C на FFPE-срезах достаточно стандартного оборудования лаборатории, выполняющей полногеномное секвенирование. Процесс пробоподготовки увеличивается на 2 дня по сравнению

^{*} Препараты, находящиеся на стадии клинических испытаний.

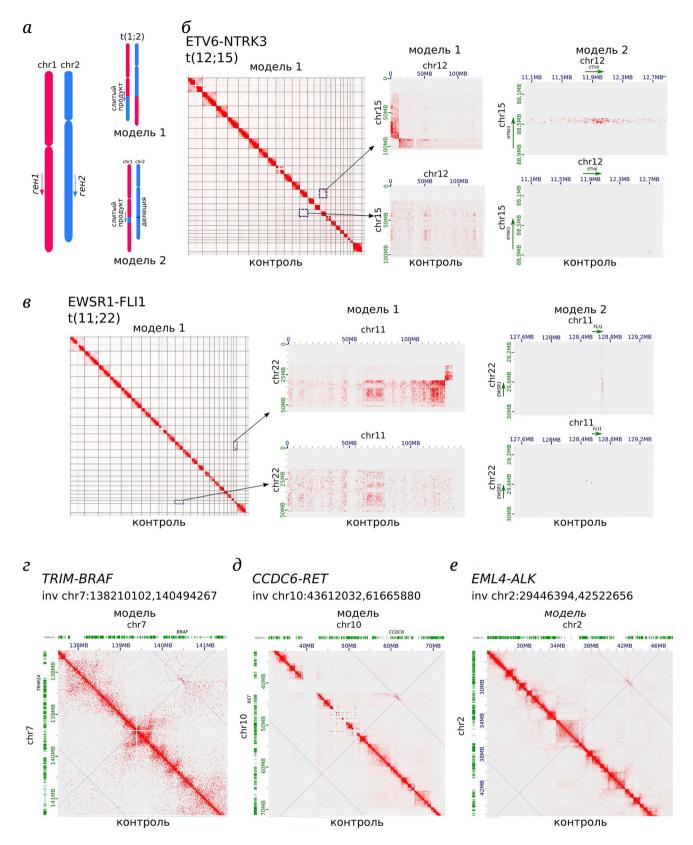


Рис. 4. Моделирование хромосомных перестроек. a — Схематичное изображение двух вариантов транслокации, приводящей к слиянию генов. б, b — Тепловые карты контактов, построенные на основании смоделированных данных Ні-С для транслокаций. c-e — Тепловые карты контактов, построенные на основании смоделированных данных Ні-С для инверсий. Выше диагонали — карта контактов для смоделированной перестройки, ниже — контроль. В качестве контроля выступает модель Ні-С-карты без перестроек с таким же количеством контактов, как и у модели с перестройками

с полногеномным секвенированием, однако стоит отметить, что большую часть времени в таких анализах занимает не столько сам процесс пробоподготовки, сколько, скорее, проведение правильной логистики образцов для того, чтобы собрать пул и провести секвенирование. По нашим оценкам, себестоимость Hi-C на FFPE-срезах превышает таковую для полногеномного секвенирования не более чем на 20%. Важнейшим направлением наших будущих исследований является дальнейшее изучение характеристик и ограничений метода Hi-C на FFPE-срезах. Очевидно, что нам ещё предстоит оценить следующее: чувствительность и специфичность метода, способность метода определять долю опухолевых клеток в образце, количество требуемого материала для разных типов опухолей. После этого можно будет сделать полноценное сравнение предложенного метода Ні-С на FFPE-срезах с существующими высокопроизводительными методами диагностики.

Развитие технологии высокопроизводительного секвенирования позволило начать процесс индивидуализации терапии онкологических больных. Однако до сих пор нет однозначного ответа на вопрос о том, в каких случаях и какие именно методы секвенирования следует использовать в клинике. В 2020 году Европейское общество медицинской онкологии рекомендовало рутинное использование методов высокопроизводительного секвенирования для ряда опухолей: неплоскоклеточного немелкоклеточного рака лёгкого, аденокарциномы простаты, карциномы яичников и холангиокарциномы [43]. Несмотря на такой ограниченный список, следует понимать, что применение методов высокопроизводительного секвенирования может быть обосновано и в других случаях онкологических заболеваний, когда они способны уточнить диагноз и даже изменить схему лечения.

Один из примеров успешного применения в клинической практике методов NGS, направленных на детекцию хромосомных перестроек, был опубликован в прошлом году в статье Hehir-Kwa et al. [44]. На основе гистологического анализа опухоли головного мозга годовалому ребёнку был поставлен диагноз «глиобластома». В соответствии с диагнозом было начато лечение по протоколу HGG НІТ для младенцев, через 6 недель активного роста опухоли протокол изменили на BBSFOP HGG. Анализ метилирования ДНК позволил классифицировать опухоль как глиому, а секвенирование РНК выявило слияние генов ZCCHC8 и ROS1, которое происходит в результате транслокаций хромосом 6 и 12. Через пятнадцать месяцев лечения опухоль продолжала расти и появились метастазы. После обсуждения с родителями было дано согласие на использование ингибитора тирозинкиназы ROS1 -

энтректиниба. Через месяц после начала терапии размер опухоли уменьшился [44].

Необходимо учитывать, что приведённый выше пример - скорее исключительный случай, поскольку на данный момент таргетная терапия разработана главным образом для лечения небольшого числа заболеваний, вызванных точечными мутациями или слияниями генов, приводящими к образованию химерных белков. Это связано в первую очередь с возможностями методов детекции, которые с трудом обнаруживают сбалансированные хромосомные перестройки, особенно происходящие вне генов. Анализ FFPE-образцов с помощью Ні-С позволит обнаружить как хромосомные перестройки, приводящие к слиянию генов, так и произошедшие в некодирующих областях, которые могут изменять экспрессию онкогенов [45]. В результате применения этого метода можно не только получать клинически значимые данные, но и выстраивать гипотезы относительно механизмов развития опухоли.

Вклад авторов. М.М. Гридина и В.С. Фишман – концепция и руководство работой; М.М. Гридина, Я.К. Степанчук, М.А. Нурридинов, Т.А. Лагунов, Н.Ю. Торгунаков, А.А. Шадский, А.И. Рябова, Н.В. Васильев, С.В. Вторушин, Т.С. Геращенко, Е.В. Денисов, М.А. Травин – проведение экспериментов; М.М. Гридина, В.С. Фишман, Е.В. Денисов, М.А. Королев – обсуждение результатов исследования; М.М. Гридина, Я.К. Степанчук – написание текста; В.С. Фишман – редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-24-00190.

Благодарности. Выражаем благодарность Министерству науки и высшего образования Российской Федерации (госпроект ФЗНР-2022-0019) за предоставление доступа к вычислительным мощностям. Доступ к публичным ресурсам и датасетам предоставлен Новосибирским государственным университетом при поддержке Министерства образования и науки РФ, грант № 2019-0546 (FSUS-2024-0018).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Данное исследование было проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации. Одобрение получено локальным комитетом по этике научных исследований НИИ медицинской генетики Томского национального исследовательского медицинского центра (дата − 27.07.2017/№ 106). Все участники исследования предоставили информированное согласие.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (https://biochemistrymoscow.com).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Schmitz, R., Ceribelli, M., Pittaluga, S., Wright, G., and Staudt, L. M. (2014) Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **4**, a014282, https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014282.
- 2. Kumar-Sinha, C., Tomlins, S. A., and Chinnaiyan, A. M. (2008) Recurrent gene fusions in prostate cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 497-511, https://doi.org/10.1038/nrc2402.
- 3. Pflueger, D., Rickman, D. S., Sboner, A., Perner, S., LaFargue, C. J., Svensson, M. A., Moss, B. J., Kitabayashi, N., Pan, Y., de la Taille, A., Kuefer, R., Tewari, A. K., Demichelis, F., Chee, M. S., Gerstein, M. B., and Rubin, M. A. (2009) N-Myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) is fused to ERG in prostate cancer, *Neoplasia*, 11, 804-W18, https://doi.org/10.1593/neo.09572.
- 4. Sorensen, P. H., Lessnick, S. L., Lopez-Terrada, D., Liu, X. F., Triche, T. J., and Denny, C. T. (1994) A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG, *Nat. Genet.*, **6**, 146-151, https://doi.org/10.1038/ng0294-146.
- 5. Sotoca, A. M., Prange, K. H. M., Reijnders, B., Mandoli, A., Nguyen, L. N., Stunnenberg, H. G., and Martens, J. H. A. (2016) The oncofusion protein FUS-ERG targets key hematopoietic regulators and modulates the all-trans retinoic acid signaling pathway in t(16;21) acute myeloid leukemia, *Oncogene*, **35**, 1965-1976, https://doi.org/10.1038/onc.2015.261.
- 6. Persson, M., Andrén, Y., Mark, J., Horlings, H. M., Persson, F., and Stenman, G. (2009) Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 18740-18744, https://doi.org/10.1073/pnas.0909114106.
- 7. Humtsoe, J. O., Kim, H.-S., Jones, L., Cevallos, J., Boileau, P., Kuo, F., Morris, L. G. T., and Ha, P. (2022) Development and characterization of MYB-NFIB fusion expression in adenoid cystic carcinoma, *Cancers*, **14**, 2263, https://doi.org/10.3390/cancers14092263.
- 8. Turner, N., and Grose, R. (2010) Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **10**, 116-129, https://doi.org/10.1038/nrc2780.
- 9. Nakanishi, Y., Akiyama, N., Tsukaguchi, T., Fujii, T., Satoh, Y., Ishii, N., and Aoki, M. (2015) Mechanism of oncogenic signal activation by the novel fusion kinase FGFR3-BAIAP2L1, *Mol. Cancer Ther.*, **14**, 704-712, https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0927-T.
- 10. Guo, Q., Lakatos, E., Bakir, I. A., Curtius, K., Graham, T. A., and Mustonen, V. (2022) The mutational signatures of formalin fixation on the human genome, *Nat. Commun.*, **13**, 4487, https://doi.org/10.1038/s41467-022-32041-5.
- 11. Scolnick, J. A., Dimon, M., Wang, I.-C., Huelga, S. C., and Amorese, D. A. (2015) An efficient method for identifying gene fusions by targeted RNA sequencing from fresh frozen and FFPE samples, *PLoS One*, **10**, e0128916, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128916.
- 12. Mardis, E. R., and Wilson, R. K. (2009) Cancer genome sequencing: a review, *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 163-168, https://doi.org/10.1093/hmg/ddp396.
- 13. Maher, C. A., Kumar-Sinha, C., Cao, X., Kalyana-Sundaram, S., Han, B., Jing, X., Sam, L., Barrette, T., Palanisamy, N., and Chinnaiyan, A. M. (2009) Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer, *Nature*, **458**, 97-101, https://doi.org/10.1038/nature07638.
- 14. Peng, H., Huang, R., Wang, K., Wang, C., Li, B., Guo, Y., Li, M., Zhang, D., Dong, H., Chen, H., Chen, C., Xu, Q., Li, F., Tian, L., and Wu, J. (2021) Development and validation of an RNA sequencing assay for gene fusion detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tumors, *J. Mol. Diagn.*, 23, 223-233, https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.11.005.
- 15. Ahlfen, S. von, Missel, A., Bendrat, K., and Schlumpberger, M. (2007) Determinants of RNA quality from FFPE samples, *PLoS One*, **2**, e1261, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001261.
- 16. Groelz, D., Sobin, L., Branton, P., Compton, C., Wyrich, R., and Rainen, L. (2013) Non-formalin fixative versus formalin-fixed tissue: a comparison of histology and RNA quality, *Exp. Mol. Pathol.*, **94**, 188-194, https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2012.07.002.
- 17. Wang, X., Xu, J., Zhang, B., Hou, Y., Song, F., Lyu, H., and Yue, F. (2021) Genome-wide detection of enhancer-hijacking events from chromatin interaction data in re-arranged genomes, *Nat. Methods*, **18**, 661-668, https://doi.org/10.1038/s41592-021-01164-w.
- 18. Engreitz, J. M., Agarwala, V., and Mirny, L. A. (2012) Three-dimensional genome architecture influences partner selection for chromosomal translocations in human disease, *PLoS One*, 7, e44196, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044196.
- 19. Harewood, L., Kishore, K., Eldridge, M. D., Wingett, S., Pearson, D., Schoenfelder, S., Collins, V. P., and Fraser, P. (2017) Hi-C as a tool for precise detection and characterisation of chromosomal rearrangements and copy number variation in human tumours, *Genome Biol.*, **18**, 125, https://doi.org/10.1186/s13059-017-1253-8.
- 20. Chakraborty, A., and Ay, F. (2017) Identification of copy number variations and translocations in cancer cells from Hi-C data, *Bioinformatics*, **34**, 338-345, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx664.

- 21. Dixon, J. R., Xu, J., Dileep, V., Zhan, Y., Song, F., Le, V. T., Yardımcı, G. G., Chakraborty, A., Bann, D. V., Wang, Y., Clark, R., Zhang, L., Yang, H., Liu, T., Iyyanki, S., An, L., Pool, C., Sasaki, T., Rivera-Mulia, J. C., Ozadam, H., Lajoie, B. R., Kaul, R., Buckley, M., Lee, K., Diegel, M., Pezic, D., Ernst, C., Hadjur, S., Odom, D. T., Stamatoyannopoulos, J. A., Broach, J. R., Hardison, R. C., Ay, F., Noble, W. S., Dekker, J., Gilbert, D. M., and Yue, F. (2018) Integrative detection and analysis of structural variation in cancer genomes, *Nat. Genet.*, 50, 1388-1398, https://doi.org/10.1038/s41588-018-0195-8.
- 22. Melo, U. S., Schöpflin, R., Acuna-Hidalgo, R., Mensah, M. A., Fischer-Zirnsak, B., Holtgrewe, M., Klever, M.-K., Türkmen, S., Heinrich, V., Pluym, I. D., Matoso, E., Bernardo de Sousa, S., Louro, P., Hülsemann, W., Cohen, M., Dufke, A., Latos-Bieleńska, A., Vingron, M., Kalscheuer, V., Quintero-Rivera, F., Spielmann, M., and Mundlos, S. (2020) Hi-C identifies complex genomic rearrangements and TAD-shuffling in developmental diseases, *Am. J. Hum. Genet.*, **106**, 872-884, https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.04.016.
- 23. Adeel, M. M., Rehman, K., Zhang, Y., Arega, Y., and Li, G. (2022) Chromosomal translocations detection in cancer cells using chromosomal conformation capture data, *Genes*, **13**, 1170, https://doi.org/10.3390/genes13071170.
- 24. Du, Y., Gu, Z., Li, Z., Yuan, Z., Zhao, Y., Zheng, X., Bo, X., Chen, H., and Wang, C. (2022) Dynamic interplay between structural variations and 3D genome organization in pancreatic cancer, *Adv. Sci.*, **9**, https://doi.org/10.1002/advs.202200818.
- 25. Kim, K., Kim, M., Kim, Y., Lee, D., and Jung, I. (2022) Hi-C as a molecular rangefinder to examine genomic rearrangements, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **121**, 161-170, https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.04.024.
- 26. Song, F., Xu, J., Dixon, J., and Yue, F. (2022) Analysis of Hi-C data for discovery of structural variations in cancer, *Methods Mol. Biol.*, **2301**, 143-161, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1390-0_7.
- 27. Sidiropoulos, N., Mardin, B. R., Rodríguez-González, F. G., Bochkov, I. D., Garg, S., Stütz, A. M., Korbel, J. O., Aiden, E. L., and Weischenfeldt, J. (2022) Somatic structural variant formation is guided by and influences genome architecture, *Genome Res.*, **32**, 643-655, https://doi.org/10.1101/gr.275790.121.
- 28. Troll, C. J., Putnam, N. H., Hartley, P. D., Rice, B., Blanchette, M., Siddiqui, S., Ganbat, J.-O., Powers, M. P., Ramakrishnan, R., Kunder, C. A., Bustamante, C. D., Zehnder, J. L., Green, R. E., and Costa, H. A. (2019) Structural variation detection by proximity ligation from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue, *J. Mol. Diagn.*, 21, 375-383, https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.11.003.
- 29. Allahyar, A., Pieterse, M., Swennenhuis, J., Los-de Vries, G. T., Yilmaz, M., Leguit, R., Meijers, R. W. J., van der Geize, R., Vermaat, J., Cleven, A., van Wezel, T., Diepstra, A., van Kempen, L. C., Hijmering, N. J., Stathi, P., Sharma, M., Melquiond, A. S. J., de Vree, P. J. P., Verstegen, M. J. A. M., Krijger, P. H. L., Hajo, K., Simonis, M., Rakszewska, A., van Min, M., de Jong, D., Ylstra, B., Feitsma, H., Splinter, E., and de Laat, W. (2021) Robust detection of translocations in lymphoma FFPE samples using targeted locus capture-based sequencing, *Nat. Commun.*, 12, 3361, https://doi.org/10.1038/s41467-021-23695-8.
- 30. Gridina, M., Popov, A., Shadskiy, A., Torgunakov, N., Kechin, A., Khrapov, E., Ryzhkova, O., Filipenko, M., and Fishman, V. (2023) Expanding the list of sequence-agnostic enzymes for chromatin conformation capture assays with S1 nuclease, https://doi.org/10.1101/2023.06.15.545138.
- 31. Gridina, M., Mozheiko, E., Valeev, E., Nazarenko, L. P., Lopatkina, M. E., Markova, Z. G., Yablonskaya, M. I., Voinova, V. Y., Shilova, N. V., Lebedev, I. N., and Fishman, V. (2021) A cookbook for DNase Hi-C, *Epigenet. Chromatin*, 14, 15, https://doi.org/10.1186/s13072-021-00389-5.
- 32. Rao, S. S. P., Huntley, M. H., Durand, N. C., Stamenova, E. K., Bochkov, I. D., Robinson, J. T., Sanborn, A. L., Machol, I., Omer, A. D., Lander, E. S., and Aiden, E. L. (2014) A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping, *Cell*, 159, 1665-1680, https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.021.
- 33. Belaghzal, H., Dekker, J., and Gibcus, J. H. (2017) Hi-C 2.0: An optimized Hi-C procedure for high-resolution genome-wide mapping of chromosome conformation, *Methods*, **123**, 56-65, https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.04.004.
- 34. Zheng, W., Yang, Z., Ge, X., Feng, Y., Wang, Y., Liu, C., Luan, Y., Cai, K., Vakal, S., You, F., Guo, W., Wang, W., Feng, Z., and Li, F. (2021) Freeze substitution Hi-C, a convenient and cost-effective method for capturing the natural 3D chromatin conformation from frozen samples, *J. Genet. Genomics*, 48, 237-247, https://doi.org/10.1016/j.jgg.2020.11.002.
- 35. Golloshi, R., Sanders, J. T., and McCord, R. P. (2018) Iteratively improving Hi-C experiments one step at a time, *Methods*, **142**, 47-58, https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.04.033.
- 36. Lafontaine, D. L., Yang, L., Dekker, J., and Gibcus, J. H. (2021) Hi-C 3.0: improved protocol for genome-wide chromosome conformation capture, *Curr. Protoc.*, **1**, e198, https://doi.org/10.1002/cpz1.198.
- 37. Akgol Oksuz, B., Yang, L., Abraham, S., Venev, S. V., Krietenstein, N., Parsi, K. M., Ozadam, H., Oomen, M. E., Nand, A., Mao, H., Genga, R. M. J., Maehr, R., Rando, O. J., Mirny, L. A., Gibcus, J. H., and Dekker, J. (2021) Systematic evaluation of chromosome conformation capture assays, *Nat. Methods*, 18, 1046-1055, https://doi.org/10.1038/s41592-021-01248-7.
- 38. Kennedy-Darling, J., and Smith, L. M. (2014) Measuring the formaldehyde protein-DNA cross-link reversal rate, *Anal. Chem.*, **86**, 5678-5681, https://doi.org/10.1021/ac501354y.
- 39. Einaga, N., Yoshida, A., Noda, H., Suemitsu, M., Nakayama, Y., Sakurada, A., Kawaji, Y., Yamaguchi, H., Sasaki, Y., Tokino, T., and Esumi, M. (2017) Assessment of the quality of DNA from various formalin-fixed paraffin-embedded

- (FFPE) tissues and the use of this DNA for next-generation sequencing (NGS) with no artifactual mutation, *PLoS One*, **12**, e0176280, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176280.
- 40. Kuwata, T., Wakabayashi, M., Hatanaka, Y., Morii, E., Oda, Y., Taguchi, K., Noguchi, M., Ishikawa, Y., Nakajima, T., Sekine, S., Nomura, S., Okamoto, W., Fujii, S., and Yoshino, T. (2020) Impact of DNA integrity on the success rate of tissue-based next-generation sequencing: lessons from nationwide cancer genome screening project SCRUM-Japan GI-SCREEN, *Pathol. Int.*, **70**, 932-942, https://doi.org/10.1111/pin.13029.
- 41. Ma, W., Ay, F., Lee, C., Gulsoy, G., Deng, X., Cook, S., Hesson, J., Cavanaugh, C., Ware, C. B., Krumm, A., Shendure, J., Blau, C. A., Disteche, C. M., Noble, W. S., and Duan, Z. (2018) Using DNase Hi-C techniques to map global and local three-dimensional genome architecture at high resolution, *Methods*, **142**, 59-73, https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.01.014.
- 42. Lomov, N., Zerkalenkova, E., Lebedeva, S., Viushkov, V., and Rubtsov, M. A. (2021) Cytogenetic and molecular genetic methods for chromosomal translocations detection with reference to the *KMT2A/MLL* gene, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **58**, 180-206, https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1844135.
- 43. Mosele, F., Remon, J., Mateo, J., Westphalen, C. B., Barlesi, F., Lolkema, M. P., Normanno, N., Scarpa, A., Robson, M., Meric-Bernstam, F., Wagle, N., Stenzinger, A., Bonastre, J., Bayle, A., Michiels, S., Bièche, I., Rouleau, E., Jezdic, S., Douillard, J.-Y., Reis-Filho, J. S., Dienstmann, R., and André, F. (2020) Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO precision medicine working group, *Ann. Oncol.*, 31, 1491-1505, https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.014.
- 44. Hehir-Kwa, J. Y., Koudijs, M. J., Verwiel, E. T. P., Kester, L. A., van Tuil, M., Strengman, E., Buijs, A., Kranendonk, M. E. G., Hiemcke-Jiwa, L. S., de Haas, V., van de Geer, E., de Leng, W., van der Lugt, J., Lijnzaad, P., Holstege, F. C. P., Kemmeren, P., and Tops, B. B. J. (2022) Improved gene fusion detection in childhood cancer diagnostics using RNA sequencing, *JCO Precis. Oncol.*, 6, e2000504, https://doi.org/10.1200/PO.20.00504.
- 45. Zhang, Y., Chen, F., and Creighton, C. J. (2021) SVExpress: identifying gene features altered recurrently in expression with nearby structural variant breakpoints, *BMC Bioinformatics*, **22**, 135, https://doi.org/10.1186/s12859-021-04072-0.

MODIFICATION OF THE Hi-C TECHNOLOGY FOR MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF FORMALIN-FIXED PARAFFIN-EMBEDDED SECTIONS OF TUMOR TISSUES

M. M. Gridina^{1,2,*}, Ya. K. Stepanchuk^{1,2}, M. A. Nuriddinov^{1,2}, T. A. Lagunov^{1,2}, N. Yu. Torgunakov^{1,2}, A. A. Shadsky^{1,2}, A. I. Ryabova³, N. V. Vasiliev³, S. V. Vtorushin^{3,4}, T. S. Gerashchenko³, E. V. Denisov³, M. A. Travin⁵, M. A. Korolev⁵, and V. S. Fishman^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: gridinam@gmail.com

² Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia

³ Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, 634009, Tomsk, Russia

Siberian State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 634050 Tomsk, Russia
 Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute of Cytology and Genetics,
 Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630117 Novosibirsk, Russia

Molecular genetic analysis of tumor tissues is the most important step towards understanding the mechanisms of cancer development, and it is also necessary for the choice of targeted therapy. Hi-C (high-throughput chromatin conformation capture) technology can be used to detect various types of genomic variants, including balanced chromosomal rearrangements: inversions and translocations. In this work, we propose a modification of the Hi-C method for the analysis of chromatin contacts in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) sections of tumor tissues. Our results demonstrate that this protocol allow to generate high-quality Hi-C data and detect all types of chromosomal rearrangements. We have analyzed various databases to compile a comprehensive list of translocations that hold clinical importance for targeted therapy selection. The practical value of molecular genetic testing is its ability to influence patient treatment strategies and provide prognostic insights. Detecting specific chromosomal rearrangements can guide the choice of targeted therapies, which is a critical aspect of personalized medicine in oncology.

Keywords: chromosomal rearrangements, 3D nuclear architecture, Hi-C, oncology, FFPE sections

УДК 577.218

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ДЕТЕКЦИИ ПРОСТРАНСТВЕННЫХ КОНТАКТОВ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК С ГЕНОМОМ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2024 А.П Ян^{1,2*}, П.А Сальников^{1,2}, М.М Гридина^{1,2}, П.С. Белокопытова^{1,2}, В.С. Фишман^{1,2*}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: a.yan@g.nsu.ru; minja-f@yandex.ru ² Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

> Поступила в редакцию 11.10.2023 После доработки 01.02.2024 Принята к публикации 02.03.2024

Развитие методов захвата конформации хромосом кардинально изменило наше представление об архитектуре и динамике хроматина. Применение этих технологий для исследования разных организмов позволило раскрыть основные принципы организации хромосом. Однако структурная организация внехромосомных элементов, таких как вирусные геномы или плазмиды, и их взаимодействия с геномом хозяина остаются недостаточно исследованными. В данной работе мы представляем усовершенствованный протокол 4С, предназначенный для изучения взаимодействий ДНК плазмиды с ядерной ДНК. Мы разработали специфический плазмидный вектор и оптимизировали протокол для обеспечения высокой эффективности детекции контактов между плазмидой и ДНК хозяина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: организация хроматина, 4С, плазмида, экстрахромосомные последовательности, взаимодействия плазмида–геном, захват конформации хромосом, трансфекция.

DOI: 10.31857/S0320972524040051 **EDN:** ZFUCFV

ВВЕДЕНИЕ

Недавние достижения в области биохимии и молекулярной биологии, а также появление и развитие секвенирования нового поколения способствовали разработке высокоэффективных методов исследования архитектуры хроматина интерфазного ядра. Установлено, что организация геномов позвоночных реализуется посредством по меньшей мере двух различных механизмов. Первый из них включает в себя взаимодействие между белковыми факторами СТСF и когезином в cis-положении [1], в то время как второй связан с организацией геномных компартментов через фазовую сепарацию, опосредованную взаимодействиями белков хроматина в cis- и trans-положениях [2]. Существуют некоторые исключения [3, 4], однако в большинстве клеток позвоночных эти механизмы действуют совместно, что затрудняет разделение независимых факторов, присущих каждому механизму в отдельности. Изучение формирования компартментов через фазовую сепарацию представляет особую проблему, поскольку общим термином «компартмент» могут быть названы различные ядерные структуры, каждая из которых характеризуется уникальным составом хроматина. Таким образом, в настоящий момент актуальна проблема полного выявления генетических детерминант, участвующих белков и дополнительных аспектов компартментализации хроматина [5, 6].

Еще одним важным направлением современной 3D-геномики является исследование разнообразия форм архитектуры хроматина в филогенетическом аспекте. Хотя эволюция архитектуры генома у позвоночных [7] и отдельных групп беспозвоночных [8] была относительно хорошо изучена, понимание этого процесса для других видов остается ограниченным. Кроме того, пока недостаточно информации о ядерной организации внеядерной и экзогенной ДНК, включая митохондриальные, пластидные и вирусные геномы, плазмиды, мобильные элементы и так далее. Тем не менее существующие данные указывают на то, что пространственная упаковка этих молекул ДНК

^{*} Адресат для корреспонденции.

играет ключевую роль в их функционировании, и их изучение позволит получить важные знания об общих принципах биологии хроматина.

Вирусные геномы служат наиболее частым примером экзогенной последовательности ДНК. Было установлено, что ДНК вируса гепатита В (HBV), характеризующаяся как эписомальная кольцевая ДНК, преимущественно контактирует с А-компартментом генома. Эти контакты охватывают промоторы, энхансеры и СрG-островки высокоэкспрессирующихся генов, включая те, которые участвуют в клеточном ответе на инфекцию [9]. При этом транскрипционно подавленный HBV ассоциируется с регионами В-компартмента генома хозяина [10]. Кроме того, вирусная ДНК может быть интегрирована в геном хозяина, где она устанавливает новые контакты с соседними участками генома в cis-положении. Это может приводить к активации ранее молчавших генов [11] или изменениям нативной 3D-организации генома: либо за счет интеграции в существующие сайты связывания архитектурных белков, либо путем внесения новых сайтов в составе вирусной последовательности. Впоследствии эти изменения могут способствовать нарушению регуляции активности генов и развитию рака [9, 12].

Другой пример пространственных контактов экзогенной ДНК связан с ядерными тельцами промиелоцитной лейкемии (PML). Эти тельца способствуют репликации и транскрипции вирусов, что было продемонстрировано для вируса простого герпеса, обезьяньего вируса 40 (SV40), аденовирусов и вируса папилломы человека [13, 14]. Работа Rai et al. [15] посвящена изучению шаперона HIRA, включающего гистон Н3.3 в состав нуклеосом. Их исследование показало, что комплекс HIRA связывает в РМL-тельцах чужеродную ДНК (в том числе очищенную плазмидную и вирусную) и таким образом участвует в подавлении ее транскрипции. В то же время другие работы указывают на формирование вирусных репликационных компартментов рядом с РМL-тельцами, где происходят процессы репликации и транскрипции [16, 17]. В целом, существующие данные подчеркивают функциональную важность пространственных контактов между экзогенной ДНК и геномом. Тем не менее биология экстрахромосомной ДНК внутри ядра, особенно в отношении плазмид, требует дальнейших исследований.

Сведения о биологии экстрахромосомной ДНК, в частности, о ее взаимодействии с белками и формировании вирус-ассоциированных компартментов, в основном получают методами микроскопии. Однако этот подход имеет ряд серьезных ограничений. В первую очередь разрешение, которое он предлагает, часто недостаточно для небольших структур, таких как некоторые вирусные геномы

и плазмиды, размер которых составляет не более нескольких сотен тысяч пар нуклеотидов (п.н.). Альтернативным подходом к изучению укладки хроматина являются технологии захвата конформации хромосом (3C) [18], разрешение которых может достичь, в случае использования метода Ні-С, сотен или тысяч п.н. и уровня сотен п.н. для кольцевого захвата конформации хроматина (4C). Исследования, выполненные с применением этих методов, предоставляют более детальную картину пространственной организации ДНК, чем в случае микроскопического анализа.

Данная работа посвящена разработке нового метода исследования закономерностей локализации плазмидной ДНК и, в дальнейшей перспективе, других экзогенных молекул ДНК. Этот подход основан на 4С-эксперименте с использованием плазмиды как целевого вектора. Заметное преимущество применения метода 4С с плазмидой заключается в возможности, как мы предполагаем, проводить дальнейшие скрининговые эксперименты – доставлять плазмиды с произвольными вставками последовательностей ДНК в клетку (активные и неактивные регионы генома, GC-богатые и GC-бедные регионы, сайты связывания белков группы Polycomb и т.д.). Это даст возможность наблюдать влияние этих специфических нуклеотидных последовательностей на распределение плазмид по компартментам внутри ядра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмидные векторы. Модифицированный вектор рUC19 был сконструирован на основе оригинального вектора рUC19 («Addgene», CIIIA) путем изменения двух сайтов рестрикции NlaIII путем ПЦР плазмиды с праймерами, содержащими целевую замену, и последующего лигирования продуктов ПЦР в кольцевую молекулу по методу Гибсона. Вектор р4СSCS был синтезирован компанией «Cloning Facility», Россия в виде двух последовательностей (991 п.н. и 975 п.н.), фланкированных гомологичными участками. Эти последовательности были соединены в кольцевую молекулу с помощью метода Гибсона. Карты и последовательности плазмид приведены в Приложении (рис. П1–П3; текст 1).

Плазмиды нарабатывали в клетках TOP10 Escherichia coli. Мы заметили, что для размножения вектора p4CSCS потребовалось снизить концентрацию хлорамфеникола до 0,02 мкг на 1 мл среды.

Культивирование клеток человека и трансфекция. Для экспериментов использовали клетки НЕК293Т, которые культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% Pen Strep (все материалы – «Thermo Fisher

Scientific», США). Клетки поддерживали при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO_2 .

614

За день до трансфекции клетки пересаживали в культуральный флакон площадью 75 см² для достижения примерно 70% конфлюэнтности клеток. Трансфекцию проводили в бессывороточной среде DMEM без добавления антибиотиков. При приготовлении смеси для трансфекции смешивали 2,4 мкл Opti-MEM («Thermo Fisher Scientific»), 18 мкг плазмидной ДНК и 36 мкг (2 мкг/мкл) реагента PEI («Sigma», США). Мы убедились, что эти условия обеспечивают эффективную трансфекцию клеток НЕК293Т (>50% трансфицированных клеток), поставив контрольные эксперименты с плазмидой, кодирующей GFP (eGFP-n1), трансфецированной вместе с целевым вектором.

Протокол 4С. Через 24 ч после трансфекции клетки собирали с помощью 0,05%-ного раствора трипсин-ЭДТА и фиксировали 1%-ным формальдегидом, в соответствии с ранее опубликованным протоколом [19]. Клетки подсчитывали, аликвотировали по 3 млн и замораживали. Основные этапы эксперимента, а именно: лизис клеток, гидролиз хроматина, лигирование хроматина, удаление формальдегидных сшивок и очистка ДНК, проводили согласно ранее опубликованному протоколу [19] с небольшими изменениями:

- для переваривания хроматина использовали 50 ед. NlaIII («NEB», США);
- были пропущены этапы биотинилирования и «удаления висящих концов».

Гидролиз очищенной ДНК. Условия гидролиза очищенной ДНК варьировали в зависимости от того, с каким вектором готовили 4С-библиотеки: образцам с векторами на основе р4CSCS требуется гидролиз эндонуклеазой рестрикции MseI; образцам с векторами на основе рUC19 – TaiI.

Гидролиз в случае использования векторов на основе p4CSCS. Для гидролиза очищенной ДНК на льду смешивали следующие компоненты: 5 мкл $10 \times \text{CutSmart Buffer («NEB»)}$, $30 \, \text{ед. MseI}$, $2 \, \text{мкг ДНК}$, ddH_2O до $50 \, \text{мкл}$. Смесь инкубировали при $37 \, ^{\circ}\text{C}$ при встряхивании в течение ночи. После инактивации MseI путем инкубации при $65 \, ^{\circ}\text{C}$ в течение $20 \, \text{мин образец очищали с помощью KAPA Pure Beads (1×) в соответствии с рекомендациями производителя («Roche», Швейцария) и добавляли в реакцию лигирования.$

Гидролиз в случае использования векторов на основе pUC19. В 4С-экспериментах с модифицированным pUC19 мы проводили гидролиз очищенной ДНК ферментом Tail: к 250 нг ДНК добавляли 1 мкл 10^{\times} рестрикционного буфера («Sibenzyme», Россия), 5 ед. Tail, ddH_2O до 10 мкл. Рестрикционную смесь инкубировали при 37 °C при постоянном встряхивании в течение ночи, после чего гидролиз останавливали тепловой инактивацией

фермента при 65 °C в течение 20 мин. Весь объем реакционной смеси (10 мкл) добавляли в реакцию лигирования.

Лигирование очищенной ДНК. Для лигирования очищенной ДНК на льду смешивали следующие компоненты: 10 мкл 10%-ного Triton X-100, 10 мкл 10× реакционного буфера для лигазы ДНК Т4 («NEB»), 10 мкл 25%-ного ПЭГ, 1 мкл бычьего сывороточного альбумина (10 мг/мл), 1 мкл 100 мМ АТР, 800 ед. лигазы Т4, 0,5−2 мкг ДНК, ddH₂O до 100 мкл (конечная концентрация ДНК составляла ~5−20 нг/мкл). Смесь инкубировали при 16 °С в течение ночи, затем очищали с помощью КАРА Риге Beads (0,8×).

Дополнительный гидролиз ферментом DrdI (опционально). В наших первых экспериментах, которые проводились с векторами на основе pUC19 и с гидролизом ферментом Tail, мы предположили, что доля неинформативных продуктов лигирования может быть уменьшена обработкой эндонуклеазой рестрикции DrdI. Хотя позже мы обнаружили, что это предположение неверно, следует отметить, что в первых экспериментах после лигирования продукты обрабатывали ферментом DrdI в следующих условиях: к смеси после лигирования добавляли 12 ед. эндонуклеазы DrdI и 100 мкл ddH₂O; инкубировали при 37 °C в течение ночи, затем фермент инактивировали инкубацией при 80 °C в течение 20 мин, и очищали ДНК с помощью KAPA Pure Beads (0,8×).При использовании векторов на основе p4CSCS этот этап был пропушен.

Подготовка 4С-библиотек для высокопроизводительного секвенирования (NGS). ПЦР с праймерами, содержащими адаптерные последовательности Illumina, проводили в течение 15–20 циклов. Последовательности праймеров приведены в Приложении (текст 2). Продукты ПЦР очищали с помощью КАРА Pure Beads (0,8×). Распределение ДНК-фрагментов в полученных 4С-библиотеках оценивали визуализацией с помощью гель-электрофореза в 1%-ной агарозе.

Концентрацию ДНК измеряли с помощью флуорометра Qubit («Invitrogen», США).

Для экспериментов с модифицированной плазмидой рUC19 мы готовили 4С-библиотеки для NGS методом вложенной ПЦР: проводили первый раунд ПЦР с праймерами i_F1, i_R1 (см. текст 2 в Приложении), затем продукты ПЦР очищали с помощью KAPA Pure Beads (0,8×), и треть от количества продуктов ПЦР служила ДНК-матрицей для второго раунда ПЦР с праймерами F2 и R2 для секвенирования Illumina (текст 2 в Приложении).

Эксперименты с контрольным хроматином и контрольными плазмидами. Клетки НЕК293Т трансфицировали модифицированным вектором pUC19 с использованием PEI и фиксировали

через 24 ч после трансфекции, как описано выше. К фиксированным трансфицированным клеткам НЕК293Т добавляли равное количество фиксированных фибробластов *Mus musculus* и проводили лизис, как описано в 4С-протоколе выше. 200 нг контрольной плазмиды (модифицированная рUC19 с промотором цитомегаловируса (CMV) (рис. П2 в Приложении) добавляли к образцу перед гидролизом NlaIII. Далее, мы провели 4С-эксперимент для всех этих компонент вместе.

4С-Библиотеки с обработкой фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I. Чтобы отличить продукты, образовавшиеся в результате неполного гидролиза ферментом NlaIII от гидролизованных молекул, восстановивших исходную структуру на этапе лигирования, мы включили в описанный выше 4С-протокол этап обработки фрагментом Кленова ДНК-полимеразы І. Для этого после инактивации NlaIII, центрифугирования и удаления супернатанта смешивали на льду следующие компоненты: 20 мкл ×10 NEBuffer 3.1 («NEB»), 1,5 мкл каждого 10 мМ dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 50 ед. фрагмента Кленова, ddH₂O до 200 мкл. Смесь добавляли к осадку, ресуспендировали и инкубировали при 16 °C в течение 4 ч. Затем эксперимент продолжали с этапа «Лигирование тупых концов» протокола Ні-С 2.0 [19] до этапа очистки ДНК включительно и далее - в соответствии с описанным выше протоколом 4С с плазмидой.

Обработка и анализ 4С-данных. Прочтения обрабатывали с помощью сиtadapt, а затем выравнивали на референсную последовательность, включающую геном человека версии hg38 и последовательности плазмидных векторов (модифицированный рUС19 или р4СSCS). Для экспериментов с контрольным хроматином в качестве референса использовали геном человека hg38, геном мыши mm10, последовательности модифицированного вектора рUС19 и модифицированного вектора рUС19 и модифицированного вектора рUС19 к модифицированивание проводилось программой ВWA mem. Статистику выравнивания анализировали с помощью samtools idxstats. Для визуализации результатов выравнивания использовали программу IGV 2.16.1.

В нашем протоколе должно происходить два события лигирования: первое лигирование по рестрикционному сайту NlaIII в условиях фиксированного хроматина и второе лигирование «в кольцо» по рестрикционному сайту MseI или TaiI. Продукты первой реакции лигирования позволяют получить информацию о пространственной колокализации фрагментов ДНК в ядре, в то время как второе лигирование может происходить либо внутримолекулярно с образованием кольцевой ДНК, либо межмолекулярно между случайными концами ДНК. Таким образом, часть продуктов второго лигирования не несет инфор-

мации о пространственных контактах плазмиды, а отражает случайные столкновения молекул, возникающие в результате процессов диффузии. Поэтому мы не включали в анализ последовательности, лигированные со стороны сайта MseI или TaiI, а использовали только последовательности, лигированные по сайту NlaIII. В соответствии с дизайном плазмидного вектора, эти последовательности всегда начинаются с последовательности праймера R2 (рис. П1–П3 и текст 2 в Приложении).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн 4С-эксперимента с плазмидой. Цель наших экспериментов заключается в разработке подхода для выявления контактов плазмидной ДНК и генома клетки. Предложенный подход основан на использовании метода 4С и схематично представлен на рис. 1, а. Первоначально клетки трансфицируют плазмидным вектором. Мы предполагаем, что белки хроматина связываются с плазмидной ДНК и обусловливают ее распределение внутри ядра (I). Затем пространственные контакты в хроматине, включая взаимодействия между плазмидой и ДНК, фиксируются формальдегидом (II). В соответствии с 4С-протоколом (подробно описан в разделе «Материалы и методы») образцы фиксированного хроматина последовательно подвергают гидролизу и лигированию, что приводит к образованию химерных молекул между близкорасположенными фрагментами ДНК (III-IV). После этого формальдегидные сшивки удаляют, ДНК гидролизуют вторым ферментом рестрикции и лигируют в растворе (V). В результате образуются кольцевые молекулы, содержащие фрагмент плазмидной ДНК и участок генома, с которым контактировала плазмида (VI). Амплификация и секвенирование этих кольцевых молекул с помощью технологии NGS позволяет обнаружить взаимодействие между плазмидной ДНК и геномом.

Согласно описанному дизайну, необходимо, чтобы вектор, используемый в 4С-эксперименте, включал два разных сайта рестрикции: первый гидролизуется в фиксированном хроматине (Е1; рис. 1, а), второй – после удаления формальдегидных сшивок (Е2; рис. 1, а). Принципиально важно разместить области отжига ПЦР-праймеров между этими двумя сайтами рестрикции и как можно ближе к ним. Кроме того, между участками отжига праймеров не должно быть сайтов рестрикции Е1и Е2. Также в качестве Е1 и Е2 следует использовать мелкощепящие (т.е. с 4-буквенным сайтом узнавания) эндонуклеазы рестрикции, чтобы обеспечить высокое разрешение 4С-метода (определяется частотой встречаемости сайтов Е1),

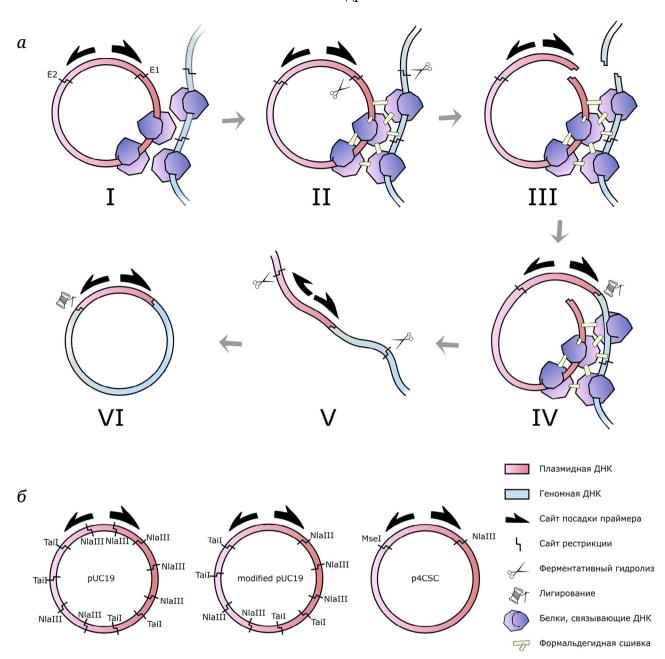


Рис. 1. Дизайн 4С-эксперимента с плазмидным вектором. a – Общий дизайн эксперимента (I–VI). δ – Схема расположения сайтов рестрикции плазмидных векторов, используемых в данной работе. Карты и последовательности плазмид представлены на рис. П1–П3 и в тексте 2 в Приложении

и эффективную амплификацию 4С-фрагментов (определяется частотой сайтов E2). Наконец, необходимо, чтобы фермент E1 был способен гидролизовать хроматин, фиксированный формальдегидом.

Для проверки предложенного дизайна мы провели 4С-эксперименты с плазмидным вектором pUC19. В качестве целевых сайтов Е1 и Е2 в эксперименте использовали сайты рестрикции NlaIII и Tail соответственно. Помимо двух указанных сайтов рестрикции, вектор pUC19 содержит дополнительные сайты NlaIII и Tail (девять и три соответственно), включая те сайты NlaIII, которые

присутствуют в области отжига ПЦР-праймеров (рис. 1, б). Мы ожидали, что дополнительные сайты NlaIII и Tail за пределами области связывания праймеров, используемых для амплификации библиотеки, не будут мешать проведению 4С-эксперимента, в отличие от сайтов, расположенных между праймерами. Поэтому мы сконструировали модифицированный вектор на основе рUС19, в котором были удалены сайты рестрикции NlaIII (-CATG-), расположенные между праймерами (рис. 1, б).

Оценка количества неспецифических продуктов, образующихся в 4С-протоколе с плазмидой. Дизайн 4С-эксперимента с плазмидой пред-

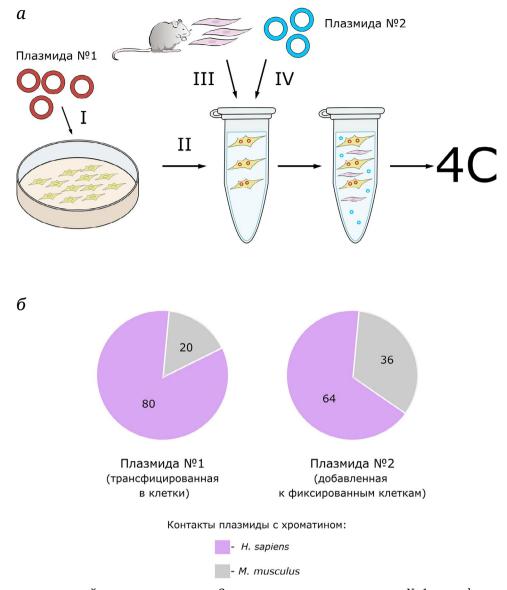


Рис. 2. Оценка доли «случайных» контактов. *а* – Схема эксперимента: плазмиду № 1 трансфицировали в клетки НЕК293Т (I), затем пространственные контакты ДНК и белков в ядре фиксировали формальдегидом (II). К полученному образцу добавляли фиксированные фибробласты *Mus musculus* (III), плазмиду № 2 (IV) и выполняли 4С-эксперимент. *б* – Плазмида № 1 и плазмида № 2 различаются по соотношению количества контактов с хроматином *H. sapiens* и *M. musculus*. На диаграммах показано процентное соотношение контактов плазмиды с соответствующим хроматином, усредненное по трем независимым экспериментам. Результаты по отдельным репликам представлены на рис. П4 в Приложении. Общее количество контактов принято за 100%

полагает, что этапы рестрикции и лигирования близкорасположенных фрагментов ДНК происходят в условиях фиксированного хроматина, поэтому образующиеся продукты отражают пространственную колокализацию плазмидной и геномной ДНК внутри ядра. Однако не исключено, что часть контактов образуется не внутри ядра, а в растворе в результате диффузионных процессов после фиксации хроматина, приводящих к случайным столкновениям и лигированию фрагментов плазмидной и геномной ДНК. Такие контакты не будут отражать биологических предпочтений распределения плазмид в ядре.

Чтобы оценить частоту таких событий, мы провели контрольный эксперимент, представленный на рис. 2, а. К фиксированным клеткам человека НЕК293Т, трансфицированным модифицированным вектором рUС19, добавляли контрольный хроматин (фиксированный хроматин другого вида) и контрольную плазмиду (плазмиду с последовательностью, отличной от вектора рUС19). Используя полученный образец, мы подготовили 4С-библиотеки, как описано выше (рис. 1, а). (Детали см. в разделе «Материалы и методы»; «Эксперименты с контрольным хроматином и контрольными плазмидами».)

618 ЯН и др.

Учитывая, что контрольный хроматин из клеток отличных от человека видов был добавлен после фиксации, любые лигирования вектора рUC19 (который был трансфицирован в клетки человека НЕК293Т до фиксации) с хроматином других видов представляют собой случайные столкновения молекул. Аналогично лигирование контрольной плазмиды (добавленной после фиксации) с хроматином НЕК293Т и с хроматином других видов также обусловлены диффузией в растворе.

Таким образом, контакты плазмиды № 1 (модифицированной рUC19, трансфицированной в НЕК293Т) отражают как пространственную локализацию плазмиды в живых клетках (при лигировании с хроматином человека), так и возможные случайные процессы диффузии (при лигировании с хроматином человека и других видов). Контакты плазмиды № 2, добавленной в клетки после фиксации с хроматином, не обусловлены биологическими закономерностями и определяются только случайными процессами диффузии (при лигировании с хроматином человека и с хроматином другого вида).

Мы сравнили, как часто плазмида № 1, трансфицированная в клетки человека, и плазмида № 2, добавленная к клеткам после фиксации, контактируют с хроматином человека и хроматином другого вида. Наши результаты, представленные на рис. 2, б, показывают, что 80% контактов плазмиды № 1 происходит с хроматином человека, в то время как плазмида № 2 взаимодействует с хроматином человека только в 64% случаев (представленные значения являются средними для трех повторностей эксперимента; для всех повторностей разница в частоте контактов была статистически значимой, согласно точному тесту Фишера, р-значение пренебрежимо мало; подробности см. в Примечании). Эти наблюдения позволяют предположить, что часть обнаруженных в эксперименте контактов между трансфицированной плазмидой и хроматином обусловлена пространственной близостью в ядре, т.е. не может быть объяснена случайными столкновениями плазмидной ДНК с геномной ДНК в растворе. Мы также количественно оценили долю случайных столкновений (см. Примечание).

Оптимизация 4С-вектора. Анализируя данные, полученные в 4С-эксперименте с модифицированным вектором рUC19, мы столкнулись с проблемой: большинство (~90%) прочтений не содержали последовательности генома человека. Вместо этого прочтения выравнивались на разные участки плазмиды. Эта проблема наблюдалась не только при использовании контрольного хроматина и контрольной плазмиды, но и в 4С-экспериментах с клетками НЕК293Т, трансфицированными модифицированными вектором рUC19 без

контроля. Детальный анализ распределения и структуры прочтений показал, что это явление может быть связано с лигированием различных фрагментов плазмиды на этапе внутрихроматинового лигирования. Это происходит потому, что плазмидная ДНК гидролизуется не только в предполагаемых сайтах рестрикции NlaIII и Tail, но и в других сайтах NlaIII и TaiI, присутствующих в плазмиде. В условиях, способствующих лигированию близкорасположенных участков ДНК, фрагменты, происходящие из одной молекулы плазмиды, с большей вероятностью подвергаются лигированию в cis-положении, и это явление мы назвали «самолигированием». В соответствии со значительным преобладанием cis-взаимодействий над trans-, характерным для 3С-данных [20], прочтения, содержащие только плазмидные последовательности, составляют ~90% от общего количества данных.

Высокая частота лигирования между фрагментами плазмидной ДНК, как описано выше, может быть объяснена преобладанием cis- (внутри плазмиды) над trans- (плазмида-геном) пространственными контактами и поэтому неизбежна в 3С-эксперименте. Однако эта проблема может быть решена, если в плазмидном векторе будут отсутствовать множественные сайты гидролиза. В этом случае *cis*-лигирование восстановит исходную молекулу плазмиды, которая из-за своей длины (>1000 п.н.) будет исключена из 4С-библиотеки на этапах ПЦР и секвенирования NGS. Поэтому для решения проблемы самолигирования плазмиды мы стремились модифицировать последовательность плазмиды таким образом, чтобы она содержала только один сайт рестрикции NlaIII и MseI (в данной конструкции вектора мы используем MseI вместо TaiI на этапе гидролиза очищенной ДНК). Трудность этой задачи в том, что оба фермента являются мелкощепящими эндонуклеазами рестрикции (что важно для разрешения метода, см. выше), и поэтому во всех функциональных элементах доступных плазмидных векторов присутствуют многочисленные сайты узнавания этих ферментов.

Чтобы преодолеть это ограничение, мы заменили ген устойчивости к ампициллину геном устойчивости к хлорамфениколу, лишенным сайтов рестрикции в промоторной области. Однако ориджин репликации и тело гена хлорамфеникола по-прежнему содержали сайты рестрикции NlaIII и MseI. Мы внесли однонуклеотидные замены в кодирующую часть гена устойчивости к хлорамфениколу таким образом, чтобы сохранить аминокислотную последовательность неизменной. Выбор альтернативных нуклеотидов основывался на частоте встречаемости кодонов у E. coli [21]. В ориджине репликации замены производились

случайным образом, поскольку у нас отсутствовала возможость предсказать их функциональные последствия. В результате мы разработали новую последовательность плазмиды, адаптированную для 4С-эксперимента, содержащую только два целевых сайта рестрикции р4СSCS: (plasmid for 4C with Single Cutter Sites), схематично изображенную на рис. 1, б (карта плазмиды и ее последовательность представлены на рис. ПЗ и в тексте 1 в Приложении). Она содержит регионы связывания праймеров и необходимые для размножения E. coli элементы, такие как ориджин репликации и ген устойчивости к хлорамфениколу. Общая длина вектора составляет 1826 п.н.

Мы использовали этот улучшенный плазмидный вектор в 4С-эксперименте на клетках НЕК293Т. Полученные 4С-библиотеки содержали значительную долю контактов между плазмидой и геномом – около 81%. Таким образом, мы получили подтверждение того, что наблюдавшаяся в предыдущих экспериментах высокая частота прочтений, соответствующих плазмидной последовательности, была обусловлена наличием в векторе нескольких сайтов рестрикции. Полученные результаты наглядно демонстрируют преимущество разработанной последовательности плазмиды для 4С-экспериментов.

Хотя контакты между плазмидой и геномом хорошо представлены, в 4С-библиотеках сохраняются прочтения, включающие в себя только плазмидные последовательности. Такие продукты составляют ~20% данных. Согласно визуализации в IGV, большинство таких прочтений затрагивает область, включающую сайт рестрикции NlaIII. Это наблюдение поднимает вопрос о происхождении таких прочтений: образуются ли они в результате неполного гидролиза ферментом NlaIII, или же молекулы плазмиды были гидролизованы, но затем лигированы обратно с восстановлением молекулы плазмиды?

Чтобы проверить эти гипотезы, мы подготовили 4С-библиотеки, в которых хроматин после гидролиза ферментом NlaIII обрабатывали фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I E. coli. В результате гидролиза ферментом NlaIII образуются 3'-концы, которые удаляются 3'→5' экзонуклеазной активностью фрагмента Кленова. Последующее лигирование концов плазмиды создает специфическую последовательность, отличную от последовательности непереваренной плазмиды. Таким образом, при секвенировании продуктов лигирования становится возможным различать молекулы, происходящие из негидролизованной плазмиды (содержащие последовательность 5'...TCTGAC-CATG-AGGAGA...3', включающую сайт рестрикции NlaIII 5'...<u>-CATG-</u>...3') и молекулы, которые были гидролизованы NlaIII, но затем лигированы обратно

(содержащие укороченную последовательность, после удаления 3'-концов фрагментом Кленова 5'... ТСТGAC-AGGAGA...3', без сайта рестрикции NlaIII). Данные секвенирования, полученные в шести независимых экспериментах, показали, что количество негидролизованных продуктов (со средней долей 4,82% от всех прочтений) почти в 30 раз превышало количество молекул, которые были гидролизованы и лигированы обратно (средняя доля – 0,17% от всех прочтений). Это указывает на то, что молекулы, содержащие неповрежденную последовательность плазмиды, в основном обусловлены неэффективным гидролизом ферментом NlaIII.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы представляем метод, позволяющий выявлять пространственные контакты между плазмидной ДНК, введенной в клетку, и геномом клетки. Наши эксперименты показали многообещающие результаты: 4С-протокол позволяет эффективно детектировать контакты между плазмидной и геномной ДНК. Хотя взаимодействия, представляющие собой контакты между геномными локусами, происходят примерно в миллион раз чаще, чем между геномом и плазмидой (согласно соотношению длины генома человека и приблизительной длины используемых в эксперименте плазмид), значительная часть контактов, обнаруживаемых в 4С-эксперименте, представляет собой взаимодействие геномной и плазмидной ДНК. Оптимизировав дизайн плазмидного вектора, мы добились снижения доли cis-контактов, уровень которых высок для 3С-методов из-за внутримолекулярного лигирования молекул, в том числе плазмиды. В перспективе специфичность и информативность этого метода могут быть повышены за счет более эффективного гидролиза хроматина. Это подтверждается нашим наблюдением о том, что часть неинформативных продуктов происходит из негидролизованных плазмидных молекул.

Следует отметить, что в 3С данные, не отражающие смысловые контакты (или «шум»), как ожидается, распределены равномерно и поэтому не должны препятствовать выявлению повышенной частоты контактов между плазмидой и конкретными геномными локусами. Однако высокий уровень «шума» может потребовать более глубокого секвенирования для детектирования специфических взаимодействий.

Мы предлагаем несколько вариантов применения разработанного метода.

• Во-первых, предложенный подход может быть использован для исследования локализации

самих плазмидных молекул. В настоящее время, несмотря на широкое применение плазмид в качестве векторов для экзогенной экспрессии генов в генной инженерии и научных исследованиях, распределение трансфицированных плазмид в ядре клетки остается во многом неясным [22–24].

- Во-вторых, предлагаемый дизайн эксперимента позволяет проверить, как встроенные в плазмиду последовательности ДНК с различными эпигенетическими свойствами (активные и неактивные участки генома, GC-богатые и GC-бедные регионы, сайты связывания белков Polycomb и HP1 и т.д.) будут влиять на локализацию плазмиды. Это может быть применимо в изучении компартментов, образующихся в результате фазовой сепарации ядра. Хотя известно, что в ядре происходит пространственное разделение активного и неактивного хроматина, вопрос о том, сколько всего образуется фаз (или субкомпартментов), остается открытым [25, 26]. Компартментализация ядра активно изучается с точки зрения белков. В то же время это явление может быть рассмотрено и с точки зрения роли мотивов ДНК, с которыми связываются белки, участвующие в фазовом разделении. Несколько таких последовательностей ДНК, необходимых для формирования специфического паттерна контактов локуса, уже обнаружено. Например, с помощью методов Hi-C и ChIP-seq были идентифицированы последовательности ДНК, определяющие профиль контактов для Polycombрепрессированных локусов в эмбрионах дрозофилы [27]. В остальном генетические детерминанты компартментализации остаются неизвестными. Для их выявления мы предлагаем 4С-метод с плазмидой, применяя его для оценки влияния различных последовательностей ДНК на паттерн контактов плазмиды с геномом. В перспективе метод может быть использован в качестве основы для крупномасштабных скрининговых исследований.
- Метилирование ДНК изменяет трехмерную организацию генома и доступность хроматина, привлекая белки, такие как НР1, которые в результате фазового разделения формируют блоки гетерохроматина [25, 28, 29]. Метилирование сайтов связывания СТСГ нарушает его ассоциацию с ДНК, приводя к изменениям в архитектуре генома [30]. В целом, метилирование влияет на способность транскрипционных факторов связываться с ДНК, причем в зависимости от фактора транскрипции метилирование может приводить как к увеличению, так и к уменьшению аффинности связывания *in vitro* [31]. Однако это не было подтверждено *in vivo* [28]. Мы предлагаем использование метода 4С с *in vitro* 5mС-метилированной плазмидной

ДНК как стратегический подход для локализации метилированных локусов ДНК *in vivo* и выяснения, объединяются ли они в отдельные субкомпартменты.

• Метод 4С с плазмидой может быть использован для изучения репарации ДНК. Плазмида с модифицированными нуклеотидами, такими как включения 8-оксогуанина, или другими модификациями, вероятно, будет локализована в специфических компартментах репарации ДНК, сборка которых инициируется активированными PARP1 и FUS [32]. 4С-Эксперимент может быть использован для захвата локусов, привлеченных к компартменту репарации ДНК, а также для отслеживания динамики его формирования.

Полученные результаты дают основания полагать, что усовершенствованный эксперимент 4С с плазмидой будет полезен в областях 3D-геномики, регуляции транскрипции и эпигенетики.

Вклад авторов. В.Ф., П.С. и А.Я. разработали концепцию исследования; А.Я. провела эксперименты при участии П.С. и М.Г.; П.Б. разработала алгоритмы для вычислительного анализа данных; А.Я. выполнила анализ данных при участии П.Б., П.С. и В.Ф.; В.Ф руководил исследованием и анализировал данные; А.Я., П.С. и В.Ф. написали текст. Все авторы редактировали рукопись и одобрили ее окончательный вариант.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № FSUS-2024-0018).

Благодарности. Мы выражаем признательность центру коллективного пользования Института цитологии и генетики СО РАН, 121031800061-7 (Механизмы генетического контроля развития, физиологических процессов и поведения животных) за проведение экспериментов с использованием технологий секвенирования нового поколения. Вычислительный анализ данных был выполнен на высокопроизводительных кластерах Новосибирского государственного университета (поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (грант № FSUS-2024-0018)).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (https://biochemistrymoscow.com).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Kabirova, E., Nurislamov, A., Shadskiy, A., Smirnov, A., Popov, A., Salnikov, P., Battulin, N., and Fishman, V. (2023) Function and evolution of the loop extrusion machinery in animals, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 5017, https://doi.org/10.3390/ijms24055017.
- 2. Nuebler, J., Fudenberg, G., Imakaev, M., Abdennur, N., and Mirny, L. A. (2018) Chromatin organization by an interplay of loop extrusion and compartmental segregation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E6697-E6706, https://doi.org/10.1073/pnas.1717730115.
- 3. Fishman, V., Battulin, N., Nuriddinov, M., Maslova, A., Zlotina, A., Strunov, A., Chervyakova, D., Korablev, A., Serov, O., and Krasikova, A. (2019) 3D organization of chicken genome demonstrates evolutionary conservation of topologically associated domains and highlights unique architecture of erythrocytes' chromatin, *Nucleic Acids Res.*, 47, 648-665, https://doi.org/10.1093/nar/gky1103.
- 4. Ryzhkova, A., Taskina, A., Khabarova, A., Fishman, V., and Battulin, N. (2021) Erythrocytes 3D genome organization in vertebrates, *Sci. Rep.*, **11**, 4414, https://doi.org/10.1038/s41598-021-83903-9.
- 5. Razin, S. V., and Gavrilov, A. A. (2020) The role of liquid-liquid phase separation in the compartmentalization of cell nucleus and spatial genome organization, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 643-650, https://doi.org/10.1134/S0006297920060012.
- 6. Kantidze, O. L., and Razin, S. V. (2020) Weak interactions in higher-order chromatin organization, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 4614-4626, https://doi.org/10.1093/nar/gkaa261.
- 7. Nuriddinov, M., and Fishman, V. (2019) C-InterSecture-a computational tool for interspecies comparison of genome architecture, *Bioinformatics (Oxford, England)*, **35**, 4912-4921, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz415.
- 8. Lukyanchikova, V., Nuriddinov, M., Belokopytova, P., Taskina, A., Liang, J., Reijnders, J. M. F., Ruzzante, L., Feron, R., Waterhouse, R. M., Wu, Y., Mao, C., Tu, Z., and Sharakhov, I. V. (2022) Anopheles mosquitoes reveal new principles of 3D genome organization in insects, *Nat. Commun.*, 13, 1960, https://doi.org/10.1038/s41467-022-29599-5.
- 9. Dias, J. D., Sarica, N., Cournac, A., Koszul, R., and Neuveut, C. (2022) Crosstalk between hepatitis B virus and the 3D genome structure, *Viruses*, 14, 445, https://doi.org/10.3390/v14020445.
- 10. Tang, D., Zhao, H., Wu, Y., Peng, B., Gao, Z., Sun, Y., Duan, J., Qi, Y., Li, Y., Zhou, Z., Guo, G., Zhang, Y., Li, C., Sui, J., and Li, W. (2021) Transcriptionally inactive hepatitis B virus episome DNA preferentially resides in the vicinity of chromosome 19 in 3D host genome upon infection, *Cell Rep.*, **35**, 109288, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109288.
- 11. Sokol, M., Wabl, M., Ruiz, I. R., and Pedersen, F. S. (2014) Novel principles of gamma-retroviral insertional transcription activation in murine leukemia virus-induced end-stage tumors, *Retrovirology*, **11**, 36, https://doi.org/10.1186/1742-4690-11-36.
- 12. Razin, S. V., Gavrilov, A. A., and Iarovaia, O. V. (2020) Modification of nuclear compartments and the 3D genome in the course of a viral infection, *Acta Naturae*, **12**, 34-46, https://doi.org/10.32607/actanaturae.11041.
- 13. Everett, R. D. (2013) The spatial organization of DNA virus genomes in the nucleus, *PLoS Pathog.*, **9**, e1003386, https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003386.
- 14. Corpet, A., Kleijwegt, C., Roubille, S., Juillard, F., Jacquet, K., Texier, P., and Lomonte, P. (2020) PML nuclear bodies and chromatin dynamics: catch me if you can! *Nucleic Acids Res.*, **48**, 11890-11912, https://doi.org/10.1093/nar/gkaa828.
- 15. Rai, T. S., Glass, M., Cole, J. J., Rather, M. I., Marsden, M., Neilson, M., Brock, C., Humphreys, I., Everett, R., and Adams, P. (2017) Histone chaperone HIRA deposits histone H3.3 onto foreign viral DNA and contributes to anti-viral intrinsic immunity, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 11673-11683, https://doi.org/10.1093/nar/gkx771.
- 16. Schmid, M., Speiseder, T., Dobner, T., and Gonzalez, R. A. (2014) DNA virus replication compartments, *J. Virol.*, **88**, 1404-1420, https://doi.org/10.1128/JVI.02046-13.
- 17. Charman, M., and Weitzman, M. D. (2020) Replication compartments of DNA viruses in the nucleus: location, location, location, *Viruses*, **12**, 151, https://doi.org/10.3390/v12020151.
- 18. Kempfer, R., and Pombo, A. (2020) Methods for mapping 3D chromosome architecture, *Nat. Rev. Genet.*, **21**, 207-226, https://doi.org/10.1038/s41576-019-0195-2.
- 19. Belaghzal, H., Dekker, J., and Gibcus, J. H. (2017) Hi-C 2.0: an optimized Hi-C procedure for high-resolution genome-wide mapping of chromosome conformation, *Methods*, **123**, 56-65, https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.04.004.
- 20. Gridina, M., Mozheiko, E., Valeev, E., Nazarenko, L. P., Lopatkina, M. E., Markova, Z. G., Yablonskaya, M. I., Voinova, V. Y., Shilova, N. V., Lebedev, I. N., and Fishman, V. (2021) A cookbook for DNase Hi-C, *Epigenet. Chromatin*, 14, 15, https://doi.org/10.1186/s13072-021-00389-5.
- 21. Gvritishvili, A. G., Leung, K. W., and Tombran-Tink, J. (2010) Codon preference optimization increases heterologous PEDF expression, *PLoS One*, **5**, e15056, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015056.
- 22. Prajapati, H. K., Kumar, D., Yang, X.-M., Ma, C.-H., Mittal, P., Jayaram, M., and Ghosh, S. (2020) Hitchhiking on condensed chromatin promotes plasmid persistence in yeast without perturbing chromosome function, *bioRxiv*, https://doi.org/10.1101/2020.06.08.139568.

- 23. Gracey Maniar, L. E., Maniar, J. M., Chen, Z.-Y., Lu, J., Fire, A. Z., and Kay, M. A. (2013) Minicircle DNA vectors achieve sustained expression reflected by active chromatin and transcriptional level, *Mol. Ther.*, **21**, 131-138, https://doi.org/10.1038/mt.2012.244.
- 24. Dean, D. A. (1997) Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific, *Exp. Cell Res.*, **230**, 293-302, https://doi.org/10.1006/excr.1996.3427.
- 25. Mladenova, V., Mladenov, E., and Russev, G. (2009) Organization of plasmid DNA into nucleosome-like structures after transfection in eukaryotic cells, *Biotechnol. Biotechnolog. Equip.*, **23**, 1044-1047, https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10817609.
- 26. Hildebrand, E. M., and Dekker, J. (2020) Mechanisms and functions of chromosome compartmentalization, *Trends Biochem. Sci.*, **45**, 385-396, https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.01.002.
- 27. Erdel, F., and Rippe, K. (2018) Formation of chromatin subcompartments by phase separation, *Biophys. J.*, **114**, 2262-2270, https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.03.011.
- 28. Ogiyama, Y., Schuettengruber, B., Papadopoulos, G. L., Chang, J.-M., and Cavalli, G. (2018) Polycomb-dependent chromatin looping contributes to gene silencing during *Drosophila* development, *Mol. Cell*, 71, 73-88.e5, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.032.
- 29. Mattei, A. L., Bailly, N., and Meissner, A. (2022) DNA methylation: a historical perspective, *Trends Genet.*, **38**, 676-707, https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.03.010.
- 30. Rountree, M. R., and Selker, E. U. (2010) DNA methylation and the formation of heterochromatin in *Neurospora crassa*, *Heredity*, **105**, 38-44, https://doi.org/10.1038/hdy.2010.44.
- 31. Phillips, J. E., and Corces, V. G. (2009) CTCF: master weaver of the genome, *Cell*, **13**7, 1194-1211, https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.001.
- 32. Singatulina, A. S., Hamon, L., Sukhanova, M. V., Desforges, B., Joshi, V., Bouhss, A., Lavrik, O. V., and 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, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.031.

TOWARDS DEVELOPMENT OF THE 4C-BASED METHOD DETECTING INTERACTIONS OF PLASMID DNA WITH HOST GENOME

A. P. Yan^{1,2*}, P. A. Salnikov^{1,2}, M. M. Gridina^{1,2}, P. S. Belokopytova^{1,2}, and V. S. Fishman^{1,2*}

¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: a.yan@g.nsu.ru; minja-f@yandex.ru

² Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia

Chromosome conformation capture techniques have revolutionized our understanding of chromatin architecture and dynamics at the genome-wide scale. In recent years, these methods have been applied to a diverse array of species, revealing fundamental principles of chromosomal organization. However, structural organization of the extrachromosomal entities, like viral genomes or plasmids, and their interactions with the host genome, remain relatively underexplored. In this work, we introduce an enhanced 4C-protocol tailored for probing plasmid DNA interactions. We design specific plasmid vector and optimize protocol to allow high detection rate of contacts between the plasmid and host DNA.

Keywords: chromatin interactions, 4C, plasmid, extrachromosomal sequences, plasmid-genome interactions, chromosome conformation capture, transfection

УДК 577.218

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ C-КОНЦЕВЫХ ДОМЕНОВ БЕЛКА MSL2 Drosophila melanogaster

© 2024 Е.А. Тихонова, П.Г. Георгиев, О.Г. Максименко*

ФГБУН Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия; электронная почта: maksog@mail.ru

> Поступила в редакцию 30.09.2023 После доработки 11.12.2023 Принята к публикации 12.12.2023

Комплекс дозовой компенсации, состоящий из пяти белков и двух некодирующих РНК roX, специфично связывается с X-хромосомой самцов, обеспечивая более высокий уровень экспрессии генов, что необходимо для компенсации моносомии половой хромосомы у самцов дрозофилы по сравнению с двумя X-хромосомами самок. Белок MSL2 содержит N-концевой RING-домен, выполняющий роль Е3-лигазы при убиквитинировании белков, и является единственной субъединицей комплекса, которая экспрессируется только у самцов. В работе проведено исследование функциональной роли двух C-концевых доменов белка MSL2, обогащенных пролином (Р-домен) и основными аминокислотами (В-домен). В результате было показано, что В-домен дестабилизирует белок MSL2, что связано с наличием двух лизинов, убиквитинирование которых находится под контролем RING-домена MSL2. Неструктурированный пролин-богатый домен стимулирует транскрипцию гена roX2, что необходимо для эффективного формирования комплекса дозовой компенсации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дозовая компенсация, длинные некодирующие РНК, MSL1, *roX*, MSL-комплекс, убиквитинирование.

DOI: 10.31857/S0320972524040069 **EDN:** ZFLNSA

ВВЕДЕНИЕ

Дозовая компенсация – это явление выравнивания уровней экспрессии генов у организмов с разным числом половых хромосом. Механизмы дозовой компенсации у насекомых были исследованы на примере модельного объекта Drosophila melanogaster [1–4]. В основе дозовой компенсации у дрозофилы лежит формирование РНК-белкового комплекса, привлекаемого на X-хромосому самцов и повышающего экспрессию генов на ней примерно в 2 раза. В состав комплекса дозовой компенсации (КДК) дрозофилы входит пять белков (MSL1, MSL2, MSL3, MOF и MLE) и две длинные некодирующие РНК (roX1 и roX2). Субъединицы комплекса дозовой компенсации являются высококонсервативными среди животных, и комплекс, состоящий из белков MSL1, MSL2, MSL3 и MOF, играет важную роль в регуляции транскрипции, но не дозовой компенсации у человека [5, 6].

Принятые сокращения: КДК – комплекс дозовой компенсации; НТО – нетранслируемая область; СПП – сайты первичной посадки; U – ген Ubiquitin-63E.

Белок MSL2 экспрессируется исключительно у самцов и считается ключевым компонентом комплекса дозовой компенсации [1, 2]. В составе MSL2 (рис. 1, а), состоящего из 773 а.о., можно выделить два высококонсервативных домена: N-концевой RING-домен и СХС-домен [4, 7]. RING-Домен является консервативным доменом в MSL2 белках человека и дрозофилы, выполняет функцию убиквитин-Е3-лигазы, которая обеспечивает убиквитинирование специфичных субстратов, включая основные субъединицы КДК [8, 9]. Одновременно RING-домен участвует во взаимодействии MSL2 с N-концевым двухспиральным доменом белка MSL1, который организует гомодимер [10-13]. MSL1 и MSL2 формируют коровую часть комплекса, которая может специфично связываться с некоторыми сайтами Х-хромосомы самцов независимо от других субъединиц КДК [10]. Белки MSL3 и ацетилтрансфераза МОГ взаимодействуют с С-концевым доменом MSL1, получившим название РЕНЕ [14, 15]. Хеликаза MLE, принадлежащая к семейству АТР-зависимых РНК/ДНК-хеликаз, специфично ремоделирует вторичную структуру РНК roX, что увеличивает эффективность их участия в формировании комплекса дозовой компенсации [16-18]. Второй кон-

^{*} Адресат для корреспонденции.

сервативный домен MSL2, CXC-домен (Zn3Cys9), является единственным найденным ДНК-связывающим доменом в составе белков КДК дрозофилы [19]. Структурный анализ показал, что два СХС-домена способны специфично связывать GA-повторы [20].

Неполный комплекс дозовой компенсации, включающий коровую часть комплекса MSL1-MSL2, связывается примерно с 200 сайтами на X-хромосоме, названными сайтами первичной посадки, СПП (в англоязычной литературе – первичные сайты входа в хроматин (CES) [21] или сайты высокого сродства (HAS) [22]). В районе СПП были найдены богатые GA-повторами ДНК-элементы, с которыми может связываться СХС-домен белка MSL2 [23]. Также с СПП связывается транскрипционный фактор CLAMP [24], у которого N-концевой цинковый палец С2Н2-типа взаимодействует с неструктурированным участком (618-655 a.o.) белка MSL2 [25-27]. CLAMP имеет N-концевой гомодимеризующийся домен [28] и участвует в организации дистанционных контактов между сайтами связывания КДК [29]. Было показано, что СХС- и CLAMP-взаимодействующий домены MSL2 совместно участвуют в связывании КДК с Х-хромосомой самцов [25].

Неструктурированный С-конец белка MSL2 содержит два участка: богатый пролином (Prolinrich, Р-домен) и обогащенный основными аминокислотными остатками (Basic, B-домен). В составе В-домена был найден один из многочисленных сайтов, по которому происходит самоубиквитинирование белка MSL2 в системе in vitro [8]. Предполагается, что С-конец специфично связывается с РНК *roX*, что обеспечивает эффективную сборку КДК и включение в него белка МLЕ [30]. Некоторые экспериментальные данные предполагают, что С-конец участвует в специфичном узнавании СХС-доменом GA-участков на X-хромосоме самцов [23]. Целью настоящего исследования стало выяснение функциональной роли С-концевых участков белка MSL2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка конструкций. Для экспрессии 3xFLAG-тагированного MSL2 полноразмерные варианты MSL2 (дикого типа и с делециями участков, соответствующих P- и B-доменам белка) были объединены с 3xFLAG на C-конце и клонированы в экспрессионный вектор. Данный вектор содержит сайт attB для $\phi C31$ -зависимой интеграции, сильный промотор гена Ubiquitin-63E с его 5'-нетранслируемой областью (HTO), последний интрон гена dctcf с его 3'-HTO и сигналом полиаденилирования, а также сигнал полиаденилирования вируса SV40; безинтронный ген yellow использовался

в качестве репортера для поиска трансформантов. Подробности процедур клонирования, последовательности праймеров и плазмид доступны по запросу.

Скрещивание мух, поддержание трансген**ных линий.** Линии D. melanogaster содержали при 25 °C на стандартной дрожжевой среде. Трансгенные конструкции инъецировали в пребластодермальные эмбрионы. Встройка конструкций в геном осуществлялась с помощью φС31-опосредованной сайт-специфической интеграции в локусе 86F8 в соответствующую линию со встроенным сайтом attP [31]. Полученные после инъекции мухи скрещивались с мухами лабораторной линии $y^1 w^{1118}$, и трансгенное потомство идентифицировали по пигментации кутикулярных структур. Гомозиготные линии получали путем серии скрещиваний через балансерные хромосомы. Линии, летальные в гомозиготном состоянии, поддерживали на балансерных хромосомах. Подробности скрещиваний доступны по запросу.

Антитела. Антитела против MSL1 [423–1030], MSL2 [421–540], CLAMP [222–350] были получены у кроликов и очищены из сыворотки методом фракционирования сульфатом аммония с последующей аффинной очисткой на CNBr-активированной сефарозе («GE Healthcare», США) или Aminolink Resin («ThermoFisher Scientific», США) в соответствии со стандартными протоколами. Использовали мышиные моноклональные антитела против эпитопа FLAG (клон M2) («Sigma», США).

Подготовка экстракта мух. 20 взрослых мух гомогенизировали пестиком в 200 мкл 1× PBS, содержащем 1% β-меркаптоэтанола, 10 мМ PMSF и коктейль (1:100) ингибиторов протеаз Calbiochem Complete Protease Inhibitor Cocktail VII («Merck», Германия). Суспензию обрабатывали ультразвуком 3 раза по 5 с при 5 Вт. Затем добавляли 200 мкл буфера для нанесения образцов 4×SDS-PAGE, смесь инкубировали в течение 10 мин при 100 °С и центрифугировали при 16 000 g в течение 10 мин.

Иммуноокрашивание политенных хромо**сом.** Личинки 3-го возраста D. melanogaster выращивали при 18°C в стандартных условиях. Окрашивание политенных хромосом проводили, как описано ранее [32]. Использовались следующие первичные антитела: кроличьи анти-MSL1 в разведении 1:100, кроличьи анти-MSL2 в разведении 1:100 и моноклональные мышиные анти-FLAG в разведении 1:100. Вторичные антитела – слитые с Alexa Fluor 488 козьи анти-мышиные в разведении 1:2000 и слитые с Alexa Fluor 555 козьи антикроличьи в разведении 1:2000 («Invitrogen», США). Политенные хромосомы параллельно окрашивали DAPI («AppliChem», Германия). Изображения получали на флуоресцентном микроскопе Nikon Elclipse Ti с использованием цифровой камеры

Nikon DS-Qi2 («Nikon», Япония), обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ 1.50c4 и Fiji bundle 2.0.0-rc-46. Было выполнено 3–4 независимых окрашивания и получено по 4–5 образцов политенных хромосом для каждой трансгенной линии, экспрессирующей MSL2.

Иммунопреципитация хроматина. Подготовку хроматина проводили, как описано ранее [33, 34] с некоторыми модификациями. 500 мг взрослых 2-3-дневных мух замораживали в жидком азоте и измельчали в гомогенизаторе Поттера в 10 мл буфера A (15 мМ HEPES-КОН (рН 7,6); 60 MM KCl; 15 MM NaCl; 13 MM EDTA; 0,1 MM EGTA; 0,15 мМ спермина; 0,5 мМ спермидина; 0,5% NP-40; 0,5 мМ DTT; 0,5 мМ PMSF и коктейль ингибиторов протеаз (1:100) Calbiochem Complete Protease Inhibitor Cocktail V («Merck»)). Затем суспензию гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса и фильтровали через 70-мкм найлоновую сеточку («BD Biosciences», США). Ядра осаждали центрифугированием (4000 g, 4°C) в течение 5 мин в буфере A с добавлением 10% сахарозы, ресуспендировали в буфере для промывки (15 мМ HEPES-КОН (рН 7,6); 60 MM KCl; 15 MM NaCl; 1 MM EDTA; 0,1 MM EGTA; 0,1% NP-40; коктейль (1:100) ингибиторов протеаз Calbiochem Complete Protease Inhibitor Cocktail V) и сшивали в 1%-ном формальдегиде в течение 15 мин при комнатной температуре. Сшивку останавливали путем добавления глицина до конечной концентрации 125 мМ. Ядра промывали тремя порциями по 10 мл буфера для промывки и ресуспендировали в 1 мл лизис-буфера (15 мМ HEPES (pH 7,6); 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1% Triton X-100; 0,5 мМ DTT, 0,1% натрия деоксихолата; 0,1% SDS, коктейль (1:100) ингибиторов протеаз Calbiochem Complete Protease Inhibitor Cocktail V). Суспензию обрабатывали ультразвуком 20 × 30 с (с интервалами в 60 с) на льду, аликвоту (50 мкл) использовали для проверки эффективности обработки хроматина и измерения концентрации ДНК. Остатки мембран удаляли центрифугированием при 14 000 g, 4 °C в течение 10 мин, хроматин предварительно очищали с помощью Protein A-агарозы («ThermoFisher Scientific»), блокированной БСА и ДНК спермы лосося. Образцы, содержащие 10-20 мкг эквивалента ДНК в 1 мл лизис-буфера, инкубировали на протяжении ночи при 4°C с антителами против MSL1 (1:500), MSL2 (1:200) и CLAMP (1:200) либо с неспецифическими IgG кролика (контроль). Затем к смеси лизата с антителами добавляли блокированную Protein A-агарозу и инкубировали при 4 °C в течение 5 ч. После трех раундов промывки лизис-буфером, содержащим 500 мМ NaCl, и однократной промывкой ТЕ-буфером (10 мМ Tris-HCl (рН 8,0); 1 мМ EDTA) ДНК элюировали, проводя инкубацию в буфере для элюции (50 мМ Tris-HCl (рН 8,0);

1 мМ EDTA; 1% SDS) при 65 °С; белки и РНК удаляли путем добавления протеиназы К и РНКазы А. ДНК очищали при помощи фенол-хлороформной экстракции с последующим переосаждением. Обогащение специфических фрагментов ДНК анализировали методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени на QuantStudio 12K Flex Cycler («Applied Biosystems», США).

Для каждой линии мух было получено три независимых образца хроматина. Результаты иммунопреципитации хроматина представлены в виде процента обогащения ДНК тестируемого района после иммунопреципитации по отношению к ДНК хроматина до иммунопреципитации, нормализованного относительно положительного контроля (геномный сайт вне СПП, с которым связывается изучаемый белок). Кодирующий участок гена тубулина-ү37С (не содержащий участков связывания для тестируемых белков) использовался в качестве отрицательного контроля; аутосомный MSL1-связывающий район 26E3, MSL2-связывающий район 25A3 и CLAMP-связывающий район 39А1 использовались в качестве положительных контролей.

Выделение РНК и количественный анализ. РНК выделяли из взрослых 2-3-дневных самцов и самок при помощи реагента TRI («Molecular Research Center», США) в соответствии с инструкциями производителя. РНК обрабатывали двумя единицами ДНКазы I Turbo («ThermoFisher Scientific») в течение 30 мин при 37°C для удаления геномной ДНК. Для синтеза кДНК брали 2 мкг выделенной РНК, 50 ед. обратной транскриптазы ArrayScript («ThermoFisher Scientific») и 1 мкМ олиго(dT) в качестве праймера. Количество специфических фрагментов кДНК, соответствующих roX1 и roX2, определяли методом ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Для каждого образца РНК было проведено не менее трех независимых измерений. Относительный уровень экспрессии мРНК был рассчитан по стандартной кривой, построенной путем разведения геномной ДНК, что позволило учитывать различия в эффективности разных пар праймеров. Индивидуальные значения экспрессии были нормированы относительно мРНК *RpL32*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование функциональной роли В- и Р-доменов белка MSL2. Неструктурированный С-конец MSL2 (рис. 1, а) содержит богатую пролином область (Proline-rich, Р-домен; 685–713 а.о.) и район, богатый основными аминокислотами (Basic-rich, В-домен; 715–728 а.о.). Оба района имеют умеренный уровень консервативности среди

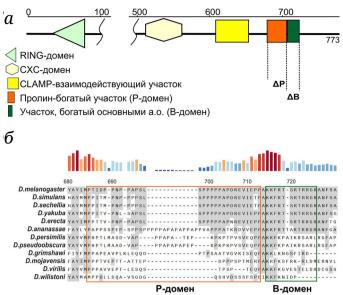


Рис. 1. Структурная организация белка MSL2. *а* – Схема белка MSL2. Показаны основные домены: RING, СХС, СLAMP-взаимодействующий, Р и В. *б* – Выравнивание (Clustal Omega) последовательности *С*-концевой части белка MSL2 у хорошо исследованных видов Drosophilidae. Р-Домен выделен оранжевой рамкой, В-домен – зеленой

разных видов дрозофилы (рис. 1, б). Однако в нескольких исследованиях [30, 35–37] были получены экспериментальные данные, согласно которым С-концевая область MSL2 взаимодействует с РНК roX. Более того, взаимодействие MSL2 с roX важно для специфического рекрутирования КДК на X-хромосому самцов [36, 37]. Ранее было показано, что делеция участка 743–773 а.о. не влияет на функции белка MSL2 in vivo [30]. Вследствие этого мы исследовали в данной работе функциональную роль прилегающих P- и B-доменов белка MSL2.

С этой целью были получены варианты кДНК MSL2 с делециями последовательностей, кодирующих участки 685-713 а.о. (MSL2 $^{\Delta P}$) или 715-728 а.о. (MSL2 $^{\Delta B}$). Для экспрессии целевых белков кДНК встраивали в экспрессирующий вектор (рис. 2, a) под контроль сильного промотора гена Ubiquitin-63E (U). кДНК для белка MSL2 не содержала некодирующих частей мРНК гена msl-2, в которых находятся мотивы связывания для репрессора трансляции Sxl у самок [38]. В результате трансген U:msl- 2^{WT} на одинаковом уровне экспрессируется у самцов и самок.

Клонируемые кДНК были слиты в единой рамке с последовательностью, кодирующей 3 копии FLAG-эпитопа. Полученные трансгены ($U:msl-2^{AP}$ и $U:msl-2^{AB}$) были интегрированы в область 86F8 на 3-й хромосоме с использованием системы рекомбинации, основанной на интегразе ϕ C31 [31]. В качестве контроля использовали полученную ранее линию $U:msl-2^{WT}$ (86Fb), экспрессирующую белок MSL2 дикого типа, MSL2^{WT}-FLAG [25]. Для определения уровня экспрессии мутантных вариантов MSL2 по отношению к контролю количество белка

детектировали при помощи иммуноблот-анализа экстрактов, полученных из взрослых мух (рис. 2, δ). Оказалось, что белок MSL2^{ΔP}-FLAG экспрессируется на сравнимом с MSL2^{WT}-FLAG уровне, в то же время экспрессия MSL2^{ΔB}-FLAG оказалась увеличена по сравнению с MSL2^{WT}-FLAG в 2–3 раза.

На участке 715-728 а.о. находятся два последовательно расположенных лизина (К715К716), убиквитинирование которых in vitro катализируется RING-доменом белка MSL2 [8]. Остальные лизины, убиквитинирующиеся in vitro RING-доменом, были локализованы в районе 420-510 а.о. [8]. Для выяснения вклада лизинов К715К716 в стабильность белка MSL2 были получены конструкции под контролем *Ubiquitin-63E*-промотора для транзиентной экспрессии в культуре клеток S2 (рис. 2, в): $MSL2^{WT}$ -FLAG (контроль), $MSL2^{\Delta RING}$ -FLAG (делеция RING-домена в белке MSL2) и MSL2^{ΔB}-FLAG. Уровень экспрессии вариантов MSL2 был детектирован при помощи иммуноблот-анализа. Белки MSL2^{AB}-FLAG и MSL2^{ARING}-FLAG экспрессировались на примерно одинаковом уровне, превышающем в несколько раз экспрессию MSL2^{WT}-FLAG. Таким образом, можно предположить, что аминокислоты К715К716 являются основными мишенями для самоубиквитинирования, снижающими стабильность белка MSL2.

Для выяснения функциональной роли Р- и В-доменов в дозовой компенсации была исследована способность мутантных вариантов белка восстанавливать выживаемость самцов, гомозиготных по нуль-мутации $msl2^{\gamma227}$ (2-я хромосома), которая приводит к полной инактивации гена msl-2 [7]. Мутация $msl2^{\gamma227}$ вызывает гибель

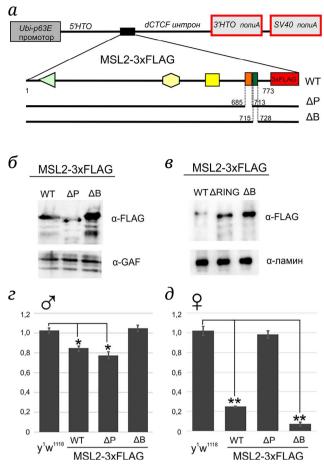


Рис. 2. Получение трансгенных линий, экспрессирующих мутантные белки MSL2. а – Схема используемого экспрессирующего вектора. Показаны промотор и 5'-HTO reнa Ubiquitin-63E, последний интрон, 3'-HTO и сигнал полиаденилирования (полиА) гена dctcf, а также сигнал полиаденилирования из вируса SV40. Под схемой вектора представлены варианты MSL2, штрих-линиями указаны места вносимых делеций. б – Иммуноблотанализ белковых экстрактов, полученных из взрослых мух, экспрессирующих различные варианты MSL2, тагированные FLAG-эпитопом (WT, ΔP , ΔB). Иммуноблот-анализ проводили с использованием антител, специфично узнающих FLAG и GAF (контроль нанесения материала). в – Сравнение экспрессии в S2-клетках белков $^{ ilde{ ext{MSL2}} ext{WT}}$ -FLAG, $^{ ilde{ ext{MSL2}} ext{}^{ ilde{ ext{ARING}}} ext{-FLAG}$ и $^{ ilde{ ext{MSL2}} ext{}^{ ilde{ ext{AB}}} ext{-FLAG}$. Иммуноблот-анализ проводили с использованием антител, специфично узнающих FLAG и ламин (контроль нанесения материала). г – Сравнение жизнеспособности (в относительных единицах) взрослых самцов $msl2^{y227}/msl2^{y227}$, в которых были экспрессированы варианты MSL2-3xFLAG (WT, ΔP , ΔB). Соотношение самцов $msl2^{\gamma 227}/CyO$, экспрессирующих варианты MSL2, использовали в качестве внутреннего контроля, демонстрирующего нормальную жизнеспособность. Отношение взрослых самцов линии y^1w^{1118} ; +/+ к самцам y^1w^{1118} ; +/СуО использовали как показатель выживаемости линии дикого типа. На гистограмме показаны средние значения со стандартными отклонениями, полученными по результатам трех независимых экспериментов; * p-value < 0,05. ∂ – Жизнеспособность (в относительных единицах) самок, гомозиготных по трансгену, по отношению к взрослым самцам, экспрессирующим варианты MSL2. На гистограмме показаны средние значения со стандартными отклонениями, полученными по результатам трех независимых экспериментов; ** *p*-value < 0,01

100% самцов преимущественно на эмбриональной и ранней личиночной стадии и не влияет на выживаемость самок. Для исследования были получены трансгенные линии $msl2^{\gamma227}/CyO$; U:msl-2*/TM6, Tb, в которых $msl2^{\gamma227}$ и трансгены U:msl-2* были выведены соответственно на балансерах CyO (2-я хромосома) и TM6, Tb (3-я хромосома). Экспрессия вариантов MSL2 была исследована только у самцов, которые имеют одну копию трансгена (U:msl-2*/TM6, Tb). При этом проводилось сравнение выживаемости самцов, гомозиготных по нульмутации $(msl2^{\gamma227}/msl2^{\gamma227})$, по отношению к самцам

 $msl2^{\gamma 227}/CyO$ (контроль), имеющим нормальную выживаемость. В результате было показано, что выживаемость самцов, экспрессирующих $MSL2^{\Delta P}$ и $MSL2^{WT}$ на фоне нуль-мутации в гомозиготе, немного ниже, чем у контрольных самцов, в то время как у $MSL2^{\Delta B}$ – является сравнимой с контрольными самцами (рис. 2, ε ; табл. 1). Таким образом, делеция P-домена не оказывает видимый эффект на активность MSL2 в дозовой компенсации, в то же время $MSL2^{\Delta B}$ функционирует эффективней $MSL2^{WT}$, что, вероятно, связано с большей стабильностью данного варианта MSL2.

Таблица 1. Исследование выживаемости самцов (позитивная функция дозовой компенсации)

Трансгенная линия	msl2 ^{y227} / msl2 ^{y227}	msl2 ^{γ227} / CyO
U:msl-2 ^{WT} /TM6, Tb	138 ± 3,2	163 ± 1,1
U:msl-2⁴P/TM6, Tb	112 ± 5,2	145 ± 3,1
$U:msl-2^{\Delta B}/TM6$, Tb	90 ± 1,2	86 ± 2,3

Примечание. Анализ соотношения самцов с генотипом $msl2^{y227}/msl2^{y227}$; U:msl-2*/TM6 к самцам с генотипом $msl2^{y227}/CyO$; U:msl-2*/TM6, которые были получены в результате скрещивания (F0) самцов с генотипом $msl2^{y227}/CyO$; $U:msl-2^{wT}/TM6$ с самками с генотипом $msl2^{y227}/msl2^{y227}$; $U:msl-2^{wT}/TM6$.

Ранее была описана чувствительная модельная система для исследования дозовой компенсации, которая основана на эктопической экспрессии MSL2 у самок, в результате которой происходит сборка функционального КДК [39, 40]. Чем эффективнее собирается КДК на X-хромосоме, тем сильнее увеличивается транскрипция генов, что прямо коррелирует со снижением жизнеспособности самок в результате разбалансировки профиля экспрессии генов. Как и ожидалось (рис. 2, ∂ ; табл. 2), самки, несущие гомозиготный транстен $U:msl-2^{wT}$, характеризуются сниженной жизнеспособностью (около 25% относительно самцов).

У самок, гомозиготных по трансгену $U:msl-2^{\Delta B}$, происходит дальнейшее снижение выживаемости. Неожиданно у самок, гомозиготных по трансгену $U:msl-2^{\Delta P}$, выживаемость близка к норме. Таким образом, делеция Р-домена у белка MSL2 приводит к частичному нарушению дозовой компенсации только в более чувствительной модельной системе.

Сравнение связывания MSL1 и MSL2 у самцов и самок, экспрессирующих варианты MSL2. Для исследования эффективности связывания КДК с Х-хромосомой самцов наиболее часто используют иммуноокрашивание политенных хромосом, выделенных из слюнных желез личинок дрозофилы, что позволяет визуализировать белки на интерфазном хроматине [10, 41–43]. В линии $msl2^{\gamma 227}$; U:msl-2^{WT} белки MSL1 и MSL2 эффективно связываются только с Х-хромосомой (рис. 3, а). Аналогичные результаты были получены на политенных хромосомах самцов линии, экспрессирующей $MSL2^{\Delta P}$. Таким образом, результаты связывания белков MSL1 и MSL2 с политенными хромосомами полностью подтверждают результаты функционального теста (рис. 2, г), согласно которому у самцов, экспрессирующих MSL2^{дР}, не происходит нарушений в процессе формирования комплекса дозовой компенсации.

Аналогичное исследование было проведено на политенных хромосомах из слюнных желез личи-

Таблица 2. Исследование выживаемости самок (негативная функция дозовой компенсации)

Трансгенная линия	MSL2/MSL2 самцы	MSL2/MSL2 самки
U:msl-2 ^{WT} /TM6, Tb	141,0 ± 2,2	35,0 ± 0,6
$U:msl-2^{{\it \Delta P}}/U:msl-2^{{\it \Delta P}}$	162,0 ± 5,2	159,0 ± 3,1
$U:msl-2^{\Delta B}/U:msl-2^{\Delta B}$	114,0 ± 2,8	8 ± 2

Примечание. Анализ соотношения самок *U:msl-2*/U:msl-2** по отношению к самцам *U:msl-2*/U:msl-2** или *U:msl-2*/TM6*, *Tb*.

нок самок (рис. 3, б и в), экспрессирующих варианты белка MSL2. В личинках, экспрессирующих MSL2^{WT}, белки MSL1 и MSL2 покрывают всю X-хромосому, за исключением нескольких небольших районов. Однако связывание MSL-белков с X-хромосомой у самок менее интенсивно по сравнению с самцами. Это объясняется тем, что у самок значительно слабей экспрессируются белок MSL1 и РНК *roX*. Связывание MSL-белков визуально усиливается на X-хромосоме личинок, экспрессирующих MSL2^{ΔB}, что можно объяснить значительным увеличением стабильности мутантного белка. Полученные результаты согласуются с функциональным тестом, согласно которому выживаемость самок, экспрессирующих $MSL2^{\Delta B}$, значительно ниже по сравнению с самками MSL2^{WT} (рис. 2, д). Связывание MSL2^{ΔP} и MSL1 с X-хромосомой самок линии $U:msl-2^{\Delta P}$ значительно снижается. Интенсивное окрашивание антителами к MSL1 и FLAG (MSL2) наблюдается только в отдельных участках хромосомы, которые, по всей видимости, совпадают с наиболее сильными СПП. Таким образом, $MSL2^{\Delta P}$ нарушает эффективное связывание КДК с Х-хромосомой самок.

Предыдущие исследования [10, 21, 22, 41, 44] показали, что инактивация MSL3, или MLE, или PHK *roX* приводила к привлечению КДК только к небольшой части районов, соответствующих основным СПП, включая области генов *roX1* (3F) и *roX2* (10C). Таким образом, вариант MSL2^{ΔP} аналогичным образом приводит к снижению эффективности формирования КДК, что визуализируется сохранением связывания белков MSL1 и MSL2 с наиболее сильными СПП на X-хромосоме и снижением связывания со вторичными сайтами привлечения КДК.

Для подтверждения данного предположения было проведено сравнение связывания белков MSL1, MSL2 и CLAMP с наиболее хорошо исследованными СПП на X-хромосоме 2–3-дневных самцов с помощью иммунопреципитации хроматина (рис. 3, 2). Для сравнения связывания КДК в линиях, экспрессирующих MSL2^{WT} и MSL2^{ΔP},

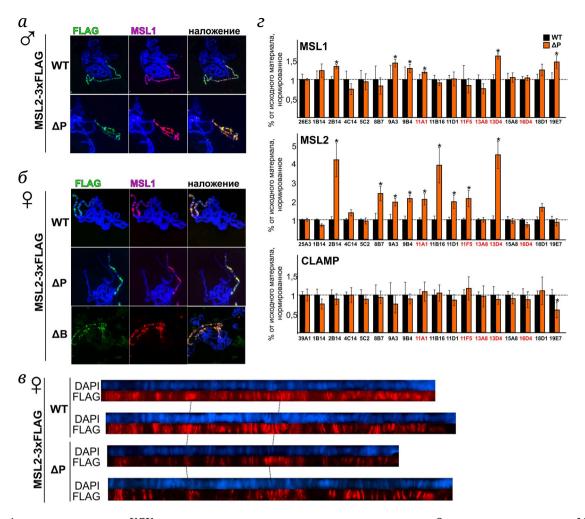


Рис. 3. Анализ связывания КДК с хроматином в трансгенных линиях мух. a – Сравнение связывания MSL1 и MSL2 с политенными хромосомами личинок самцов $msl2^{\gamma 227}$, экспрессирующих различные варианты MSL2 $(MSL2^{WT}, MSL2^{\Delta P})$. δ – Сравнение связывания MSL1 и MSL2 с политенными хромосомами личинок самок, гетерозиготных по трансгену, экспрессирующему один из вариантов MSL2 ($MSL2^{MT}$, $MSL2^{\Delta B}$). На фотографиях показано иммунное окрашивание с мышиными анти-FLAG-антителами (MSL2, зеленый) и кроличьими анти-MSL1-антителами (красный). Окрашивание ДНК – DAPI (синий). в – Сравнение распределения белка MSL2 вдоль политенной X-хромосомы у самок, гетерозиготных по трансгену, экспрессирующему один из вариантов MSL2 (MSL 2^{MT} , MSL $2^{\mathrm{\Delta P}}$). Показаны по два независимых окрашивания; окрашивание MSL2 – мышиные анти-FLAG-антитела (красный), ДНК – DAPI (синий). г – Сравнение связывания белков MSL1, MSL2 и CLAMP на СПП у самцов, экспрессирующих варианты MSL2 (WT и ΔP) на фоне $msl2^{\gamma 227}$. Красными буквами отмечены участки, с которыми MSL2 способен связываться напрямую, согласно данным Villa et al. [23]. Результаты представлены в процентах обогащения ДНК после иммунопреципитации к исходной ДНК (% от исходного материала), нормированных относительно соответствующих положительных контрольных участков связывания MSL1 (26E3), MSL2 (25A3) и CLAMP (39A1) на аутосомах. На гистограммах показано сравнение уровня связывания белка $MSL2^{DP}$ с уровнем связывания $MSL2^{WT}$ (на шкале приведен к «1»). Усы показывают стандартные отклонения для трех независимых экспериментов; *p < 0.05

были выбраны ранее охарактеризованные репрезентативные СПП комплекса: сайты PionX [23], сайты HAS/CES [21, 22]. В результате было обнаружено, что MSL2 $^{\rm AP}$ и MSL2 $^{\rm WT}$ связываются со всеми сайтами с примерно одинаковой эффективностью. При этом на части сайтов наблюдается избыточное накопление белка MSL2 $^{\rm AP}$, что может объясняться частичным перераспределением комплекса в линии, экспрессирующей MSL2 $^{\rm AP}$. Аналогичные результаты были получены для MSL1. Белок CLAMP во всех линиях связывается с тестируемыми СПП

с одинаковой эффективностью. Таким образом, полученные результаты подтверждают, что MSL2^{др} продолжает достаточно эффективно связываться с СПП на X-хромосоме.

Р-Домен определяет способность MSL2 активировать транскрипцию. Для более детального изучения функциональной роли Р-домена в процессе дозовой компенсации мы исследовали экспрессию РНК *roX*, которые являются необходимыми для дозовой компенсации. У самок дикого типа РНК *roX* не экспрессируются из-за отсутствия

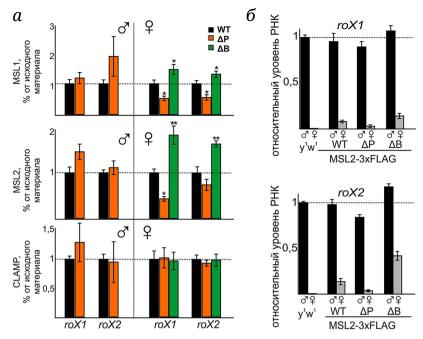


Рис. 4. Сравнение roX1 и roX2 у самок, экспрессирующих MSL2^{WT}, MSL2^{ΔP}, MSL2^{ΔP}, MSL2^{ΔB}. a – Сравнение связывания белков MSL1, MSL2, CLAMP в линиях, экспрессирующих MSL2^{WT}, MSL2^{ΔB} MSL2^{ΔP}, в районах генов roX1 и roX2; * p < 0,05; ** p < 0,01. 6 – Уровни экспрессии PHK roX1 и roX2 в личинках самцов и самок мух линии y^1w^{1118} (дикого типа) и мух, экспрессирующих MSL2^{WT}, MSL2^{ΔP}, MSL2^{ΔB}, на фоне нуль-мутации $msl2^{y227}$. Гистограммы показывают изменение уровня мРНК тестируемых генов roX в линиях, экспрессирующих MSL2^{WT}, MSL2^{ΔP}, MSL2^{ΔB}, по сравнению с уровнем экспрессии у самцов линии y^1w^{1118} (соответствует отметке «1» на шкале). Усы показывают стандартные отклонения по трем независимым измерениям; * p < 0,05

MSL-содержащего комплекса, активирующего их транскрипцию [45]. Экспрессия MSL2 дикого типа у самок приводит к значительной активации РНК roX2 и в меньшей степени - РНК roX1 [46]. СПП, расположенные рядом с генами гоХ, необходимы для стимуляции их транскрипции у самцов и репрессии - у самок [47, 48]. Иммунопреципитация хроматина показала, что MSL2 и MSL1 эффективно связываются с этими сайтами у личинок самок, экспрессирующих белки MSL2WT, MSL2AB и $MSL2^{\Delta P}$ (рис. 4, a). При этом в самках линии $MSL2^{\Delta B}$ белок MSL1 связывается примерно в 1,5 раза сильней с СПП roX1 и в 1,2 раза сильней – с СПП roX2 по сравнению с контрольной линией MSL2^{WT}. Более выраженное усиление связывания с исследуемыми СПП детектировалось для белка MSL2 (для СПП roX1 - в 1,8 раз и для СПП roX2 - в 1,6 раз сильней по сравнению с контрольной линией $MSL2^{WT}$). В случае самок линии MSL2^{ДР} белок MSL1 связывается с СПП гоХ примерно в 1,8-2 раза слабей, по сравнению с контрольной линией MSL2WT, а белок MSL2 также в 2 раза слабей – с СПП roX1 и примерно в 1,2 раза - с СПП гоХ2. При этом связывание белка CLAMP во всех линиях остается одинаковым. У самцов линии $MSL2^{\Delta P}$ также не удалось детектировать статистически значимые изменения в силе связывания белков MSL1, MSL2, СLAMP с СПП roX по сравнению с контрольной линией MSL2^{WT}.

В последней части работы мы подтвердили, что экспрессия MSL2 у самок индуцирует транскрипцию РНК roX (рис. 4, б). Однако уровень экспрессии roX у таких самок воспроизводимо ниже по сравнению с самцами таких же линий. Экспрессия $MSL2^{\Delta B}$ у самок приводит к усилению экспрессии РНК *roX* примерно в 2 раза по сравнению с контрольной линией MSL2^{WT}. Так как с СПП roX у самок данной линии наблюдалось и усиление связывания белков MSL1 и MSL2, можно сделать вывод, что существует прямая корреляция между эффективностью связывания MSL1/MSL2 с СПП и активацией транскрипции генов *roX*. Данный результат согласуется с данными для roX1, полученными для линии $MSL2^{\Delta P}$: примерно 2-кратное снижение связывания белков MSL1/MSL2 сопровождается пропорциональным снижением уровня экспрессии roX1. Однако в случае *roX2* в линии MSL2^{∆Р} наблюдается несколько другая картина: уровень экспрессии roX2 падает в 3,7 раз при незначительном снижении уровня связывания MSL2 (1,2 раза) по сравнению с контрольной линией MSL2^{WT}. Полученная разница может объясняться условной точностью метода qChIP при измерении количества белка на хроматине. Однако полученная значительная разница между количеством связанного с СПП MSL2 и уровнем экспрессии roX2 дает основания предположить, что Р-домен в составе белка MSL2 участвует в активации транскрипции гена roX2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе было проведено исследование функциональной роли двух доменов (обогащенных пролинами и основными а.о.) на *С*-конце белка MSL2. В результате не было показано, что данные домены имеют видимое влияние на активность функционирования КДК у самцов. Согласно доминирующим в настоящее время представлениям [36, 37], *С*-конец белка MSL2 взаимодействует с РНК *roX*, что является критичным для сборки КДК. Можно предположить, что прилегающие к Р- и В-доменам участки *С*-конца отвечают за специфичное взаимодействие MSL2 с РНК *roX*, что требует дальнейшего изучения.

Полученные в данной работе результаты предполагают, что в В-домене находятся два лизина, по которым происходит основное автоубиквитинирование MSL2, приводящее к значительному снижению его стабильности. Можно предположить, что при взаимодействии с двухспиральным доменом белка MSL1 происходит снижение катализирующей активности RING-домена, и, как следствие, белок MSL2, находящийся в комплексе с MSL1, стабилизируется. Таким образом, повышается эффективность формирования комплекса и одновременно снижается концентрация свободного MSL2.

Белок MSL2 способен стимулировать транскрипцию в составе КДК, а также имеет независимую функцию в активации транскрипции группы аутосомных промоторов [49]. Для млекопитающих было показано, что ортолог MSL2 убиквитинирует гистон Н3 по лизину 24 [5]. Гистоны обогащены данной меткой в областях интенсивной транскрипции. Нами было показано, что пролин-богатый участок MSL2 может участвовать в активации комплексом дозовой компенсации транскрипции гена *roX2*. Известно, что неструктурированные пролин-богатые участки способны стимулировать

транскрипцию, привлекая и стабилизируя на промоторах транскрипционные комплексы. Интересно, что MSL1 также независимо от комплекса дозовой компенсации стимулирует транскрипцию путем стабилизации связывания с промоторами циклин-зависимой киназы CDK7, которая ускоряет выход РНК-полимеразы II из состояния паузинга [50].

В заключение следует отметить, что полученные нами данные показывают, что сниженный уровень РНК *roX* у самок, экспрессирующих MSL2^{ΔP}, негативно влияет на эффективность формирования КДК. Это проявляется в снижении количества связанных с СПП roX белков MSL1/MSL2. Это является дополнительным подтверждением ключевой роли РНК *roX* в организации дозовой компенсации.

Вклад авторов. П.Г. Георгиев, О.Г. Максименко – концепция и руководство работой; Е.А. Тихонова, О.Г. Максименко – проведение экспериментов; Е.А. Тихонова, П.Г. Георгиев, О.Г. Максименко – обсуждение результатов исследования; П.Г. Георгиев, О.Г. Максименко – написание текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00211).

Благодарности. В работе использовали оборудование Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН, а также оборудование, приобретенное при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках соглашения № 075-15-2021-668.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Samata, M., and Akhtar, A. (2018) Dosage compensation of the X chromosome: a complex epigenetic assignment involving chromatin regulators and long noncoding RNAs, *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 323-350, https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011816.
- 2. Kuroda, M. I., Hilfiker, A., and Lucchesi, J. C. (2016) Dosage compensation in *Drosophila* a model for the coordinate regulation of transcription, *Genetics*, **204**, 435-450, https://doi.org/10.1534/genetics.115.185108.
- 3. Lucchesi, J. C. (2018) Transcriptional modulation of entire chromosomes: dosage compensation, J. Genet., 97, 357-364.
- 4. Straub, T., and Becker, P. B. (2011) Transcription modulation chromosome-wide: universal features and principles of dosage compensation in worms and flies, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **21**, 147-153, https://doi.org/10.1016/j.gde. 2011.01.012.
- 5. Wu, L., Zee, B. M., Wang, Y., Garcia, B. A., and Dou, Y. (2011) The RING finger protein MSL2 in the MOF complex is an E3 ubiquitin ligase for H2B K34 and is involved in crosstalk with H3 K4 and K79 methylation, *Mol. Cell*, 43, 132-144, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.05.015.
- 6. Samata, M., Alexiadis, A., Richard, G., Georgiev, P., Nuebler, J., Kulkarni, T., Renschler, G., Basilicata, M. F., Zenk, F. L., Shvedunova, M., Semplicio, G., Mirny, L., Iovino, N., and Akhtar, A. (2020) Intergenerationally maintained

- histone H4 lysine 16 acetylation is instructive for future gene activation, *Cell*, **182**, 127-144.e23, https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.026.
- 7. Zhou, S., Yang, Y., Scott, M. J., Pannuti, A., Fehr, K. C., Eisen, A., Koonin, E. V., Fouts, D. L., Wrightsman, R., Manning, J. E., and Lucchessi, J. C. (1995) Male-specific lethal 2, a dosage compensation gene of *Drosophila*, undergoes sex-specific regulation and encodes a protein with a RING finger and a metallothionein-like cysteine cluster, *EMBO J.*, 14, 2884-2895.
- 8. Villa, R., Forne, I., Muller, M., Imhof, A., Straub, T., and Becker, P. B. (2012) MSL2 combines sensor and effector functions in homeostatic control of the *Drosophila* dosage compensation machinery, *Mol. Cell*, **48**, 647-654, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.012.
- 9. Schunter, S., Villa, R., Flynn, V., Heidelberger, J. B., Classen, A.-K., Beli, P., and Becker, P. B. (2017) Ubiquitylation of the acetyltransferase MOF in *Drosophila melanogaster*, *PLoS One*, **12**, e0177408, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177408.
- 10. Lyman, L. M., Copps, K., Rastelli, L., Kelley, R. L., and Kuroda, M. I. (1997) *Drosophila* male-specific lethal-2 protein: structure/function analysis and dependence on MSL-1 for chromosome association, *Genetics*, **147**, 1743-1753.
- 11. Hallacli, E., Lipp, M., Georgiev, P., Spielman, C., Cusack, S., Akhtar, A., and Kadlec, J. (2012) Msl1-mediated dimerization of the dosage compensation complex is essential for male X-chromosome regulation in *Drosophila, Mol. Cell*, 48, 587-600, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.014.
- 12. Copps, K., Richman, R., Lyman, L. M., Chang, K. A., Rampersad-Ammons, J., and Kuroda, M. I. (1998) Complex formation by the *Drosophila* MSL proteins: role of the MSL2 RING finger in protein complex assembly, *EMBO J.*, 17, 5409-5417, https://doi.org/10.1093/emboj/17.18.5409.
- 13. Gu, W., Szauter, P., and Lucchesi, J. C. (1998) Targeting of MOF, a putative histone acetyl transferase, to the X chromosome of *Drosophila melanogaster*, *Dev. Genet.*, **22**, 56-64, https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1998)22:1<56:: AID-DVG6>3.0. CO;2-6.
- 14. Kadlec, J., Hallacli, E., Lipp, M., Holz, H., Sanchez-Weatherby, J., Cusack, S., and Akhtar, A. (2011) Structural basis for MOF and MSL3 recruitment into the dosage compensation complex by MSL1, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **18**, 142-149, https://doi.org/10.1038/nsmb.1960.
- 15. Scott, M. J., Pan, L. L., Cleland, S. B., Knox, A. L., and Heinrich, J. (2000) MSL1 plays a central role in assembly of the MSL complex, essential for dosage compensation in *Drosophila*, *EMBO J.*, 19, 144-155, https://doi.org/10.1093/emboj/19.1.144.
- 16. Lee, C. G., Chang, K. A., Kuroda, M. I., and Hurwitz, J. (1997) The NTPase/helicase activities of *Drosophila* maleless, an essential factor in dosage compensation, *EMBO J.*, **16**, 2671-2681, https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2671.
- 17. Ilik, I. A., Quinn, J. J., Georgiev, P., Tavares-Cadete, F., Maticzka, D., Toscano, S., Wan, Y., Spitale, R. C., Luscombe, N., Backofen, R., Chang, H. Y., and Akhtar, A. (2013) Tandem stem-loops in roX RNAs act together to mediate X chromosome dosage compensation in *Drosophila*, *Mol. Cell*, **51**, 156-173, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.07.001.
- 18. Maenner, S., Muller, M., Frohlich, J., Langer, D., and Becker, P. B. (2013) ATP-dependent roX RNA remodeling by the helicase maleless enables specific association of MSL proteins, *Mol. Cell*, **51**, 174-184, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.06.011.
- 19. Fauth, T., Muller-Planitz, F., Konig, C., Straub, T., and Becker, P. B. (2010) The DNA binding CXC domain of MSL2 is required for faithful targeting the dosage compensation complex to the X chromosome, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 3209-3221, https://doi.org/10.1093/nar/gkq026.
- 20. Zheng, S., Villa, R., Wang, J., Feng, Y., Becker, P. B., and Ye, K. (2014) Structural basis of X chromosome DNA recognition by the MSL2 CXC domain during *Drosophila* dosage compensation, *Genes Dev.*, **28**, 2652-2662, https://doi.org/10.1101/gad. 250936.114.
- 21. Alekseyenko, A. A., Peng, S., Larschan, E., Gorchakov, A. A., Lee, O. K., Kharchenko, P., McGrath, S. D., Wang, C. I., Mardis, E. R., Park, P. J., and Kuroda, M. I. (2008) A sequence motif within chromatin entry sites directs MSL establishment on the *Drosophila* X chromosome, *Cell*, **134**, 599-609, https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.033.
- 22. Straub, T., Grimaud, C., Gilfillan, G. D., Mitterweger, A., and Becker, P. B. (2008) The chromosomal high-affinity binding sites for the *Drosophila* dosage compensation complex, *PLoS Genet.*, **4**, e1000302, https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000302.
- 23. Villa, R., Schauer, T., Smialowski, P., Straub, T., and Becker, P. B. (2016) PionX sites mark the X chromosome for dosage compensation, *Nature*, **537**, 244-248, https://doi.org/10.1038/nature19338.
- 24. Soruco, M. M., Chery, J., Bishop, E. P., Siggers, T., Tolstorukov, M. Y., Leydon, A. R., Sugden, A. U., Goebel, K., Feng, J., Xia, P., Vedenko, A., Bulyk, M. L., Park, P. J., and Larschan, E. (2013) The CLAMP protein links the MSL complex to the X chromosome during *Drosophila* dosage compensation, *Genes Dev.*, 27, 1551-1556, https://doi.org/10.1101/gad.214585.113.
- 25. Tikhonova, E., Fedotova, A., Bonchuk, A., Mogila, V., Larschan, E. N., Georgiev, P., and Maksimenko, O. (2019) The simultaneous interaction of MSL2 with CLAMP and DNA provides redundancy in the initiation of dosage compensation in *Drosophila* males, *Development*, **146**, https://doi.org/10.1242/dev.179663.

- 26. Tikhonova, E., Mariasina, S., Efimov, S., Polshakov, V., Maksimenko, O., Georgiev, P., and Bonchuk, A. (2022) Structural basis for interaction between CLAMP and MSL2 proteins involved in the specific recruitment of the dosage compensation complex in *Drosophila*, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 6521-6531, https://doi.org/10.1093/nar/gkac455.
- 27. Albig, C., Tikhonova, E., Krause, S., Maksimenko, O., Regnard, C., and Becker, P. B. (2019) Factor cooperation for chromosome discrimination in *Drosophila*, *Nucleic Acids Res.*, 47, 1706-1724, https://doi.org/10.1093/nar/gky1238.
- 28. Tikhonova, E., Mariasina, S., Arkova, O., Maksimenko, O., Georgiev, P., and Bonchuk, A. (2022) Dimerization activity of a disordered N-terminal domain from *Drosophila CLAMP* protein, *IJMS*, **23**, 3862, https://doi.org/10.3390/ijms23073862.
- 29. Jordan, W., and Larschan, E. (2021) The zinc finger protein CLAMP promotes long-range chromatin interactions that mediate dosage compensation of the *Drosophila* male X-chromosome, *Epigenet. Chromatin*, **14**, 29, https://doi.org/10.1186/s13072-021-00399-3.
- 30. Li, F., Schiemann, A. H., and Scott, M. J. (2008) Incorporation of the noncoding roX RNAs alters the chromatin-binding specificity of the *Drosophila* MSL1/MSL2 complex, *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 1252-1264, https://doi.org/10.1128/MCB.00910-07.
- 31. Bischof, J., Maeda, R. K., Hediger, M., Karch, F., and Basler, K. (2007) An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 3312-7, https://doi.org/10.1073/pnas.0611511104.
- 32. Murawska, M., and Brehm, A. (2012) Immunostaining of *Drosophila* polytene chromosomes to investigate recruitment of chromatin-binding proteins, *Methods Mol. Biol.*, **809**, 267-77, https://doi.org/10.1007/978-1-61779-376-9_18.
- 33. Maksimenko, O., Bartkuhn, M., Stakhov, V., Herold, M., Zolotarev, N., Jox, T., Buxa, M. K., Kirsch, R., Bonchuk, A., Fedotova, A., Kyrchanova, O., Renkawitz, R., and Georgiev, P. (2015) Two new insulator proteins, Pita and ZIPIC, target CP190 to chromatin, *Genome Res.*, 25, 89-99, https://doi.org/10.1101/gr.174169.114.
- 34. Zolotarev, N., Maksimenko, O., Kyrchanova, O., Sokolinskaya, E., Osadchiy, I., Girardot, C., Bonchuk, A., Ciglar, L., Furlong, E. E. M., and Georgiev, P. (2017) Opbp is a new architectural/insulator protein required for ribosomal gene expression, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 12285-12300, https://doi.org/10.1093/nar/gkx840.
- 35. Muller, M., Schauer, T., Krause, S., Villa, R., Thomae, A. W., and Becker, P. B. (2020) Two-step mechanism for selective incorporation of lncRNA into a chromatin modifier, *Nucleic Acids Res.*, **48**, 7483-7501, https://doi.org/10.1093/nar/gkaa492.
- 36. Valsecchi, C. I. K., Basilicata, M. F., Georgiev, P., Gaub, A., Seyfferth, J., Kulkarni, T., Panhale, A., Semplicio, G., Manjunath, V., Holz, H., Dasmeh, P., and Akhtar, A. (2021) RNA nucleation by MSL2 induces selective X chromosome compartmentalization, *Nature*, **589**, 137-142, https://doi.org/10.1038/s41586-020-2935-z.
- 37. Villa, R., Jagtap, P. K. A., Thomae, A. W., Campos Sparr, A., Forne, I., Hennig, J., Straub, T., and Becker, P. B. (2021) Divergent evolution toward sex chromosome-specific gene regulation in *Drosophila*, *Genes Dev.*, https://doi.org/10.1101/gad.348411.121.
- 38. Kelley, R. L., Solovyeva, I., Lyman, L. M., Richman, R., Solovyev, V., and Kuroda, M. I. (1995) Expression of msl-2 causes assembly of dosage compensation regulators on the X chromosomes and female lethality in *Drosophila*, *Cell*, **81**, 867-877, https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90007-1.
- 39. Kelley, R. L., Wang, J., Bell, L., and Kuroda, M. I. (1997) Sex lethal controls dosage compensation in *Drosophila* by a non-splicing mechanism, *Nature*, **387**, 195-9, https://doi.org/10.1038/387195a0.
- 40. Bashaw, G. J., and Baker, B. S. (1997) The regulation of the *Drosophila* gene reveals a function for in translational control, *Cell*, **89**, 789-798, https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80262-7.
- 41. Meller, V. H., and Rattner, B. P. (2002) The roX genes encode redundant male-specific lethal transcripts required for targeting of the MSL complex, *EMBO J.*, **21**, 1084-1091, https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.1084.
- 42. Li, F., Parry, D. A., and Scott, M. J. (2005) The amino-terminal region of *Drosophila* MSL1 contains basic, glycine-rich, and leucine zipper-like motifs that promote X chromosome binding, self-association, and MSL2 binding, respectively, *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 8913-8924, https://doi.org/10.1128/MCB.25.20.8913-8924.2005.
- 43. Demakova, O. V., Kotlikova, I. V., Gordadze, P. R., Alekseyenko, A. A., Kuroda, M. I., and Zhimulev, I. F. (2003) The MSL complex levels are critical for its correct targeting to the chromosomes in *Drosophila melanogaster*, *Chromosoma*, 112, 103-115, https://doi.org/10.1007/s00412-003-0249-1.
- 44. Palmer, M. J., Richman, R., Richter, L., and Kuroda, M. I. (1994) Sex-specific regulation of the male-specific lethal-1 dosage compensation gene in *Drosophila*, *Genes Dev.*, **8**, 698-706, https://doi.org/10.1101/gad.8.6.698.
- 45. Meller, V. H., Wu, K. H., Roman, G., Kuroda, M. I., and Davis, R. L. (1997) roX1 RNA paints the X chromosome of male *Drosophila* and is regulated by the dosage compensation system, *Cell*, **88**, 445-457.
- 46. Rattner, B. P., and Meller, V. H. (2004) *Drosophila* male-specific lethal 2 protein controls sex-specific expression of the roX genes, *Genetics*, **166**, 1825-32.
- 47. Bai, X., Alekseyenko, A. A., and Kuroda, M. I. (2004) Sequence-specific targeting of MSL complex regulates transcription of the roX RNA genes, *EMBO J.*, **23**, 2853-61, https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600299.

- 48. Urban, J., Kuzu, G., Bowman, S., Scruggs, B., Henriques, T., Kingston, R., Adelman, K., Tolstorukov, M., and Larschan, E. (2017) Enhanced chromatin accessibility of the dosage compensated *Drosophila* male X-chromosome requires the CLAMP zinc finger protein, *PLoS One*, 12, e0186855, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186855.
- 49. Valsecchi, C. I. K., Basilicata, M. F., Semplicio, G., Georgiev, P., Gutierrez, N. M., and Akhtar, A. (2018) Facultative dosage compensation of developmental genes on autosomes in *Drosophila* and mouse embryonic stem cells, *Nat. Commun.*, 9, 3626, https://doi.org/10.1038/s41467-018-05642-2.
- 50. Chlamydas, S., Holz, H., Samata, M., Chelmicki, T., Georgiev, P., Pelechano, V., Dundar, F., Dasmeh, P., Mittler, G., Cadete, F. T., Ramírez, F., Conrad, T., Wei, W., Raja, S., Manke, T., Luscombe, N. M., Steinmetz, L. M., and Akhtar, A. (2016) Functional interplay between MSL1 and CDK7 controls RNA polymerase II Ser5 phosphorylation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 23, 580-589, https://doi.org/10.1038/nsmb.3233.

FUNCTIONAL ROLE OF THE C-TERMINAL DOMAINS OF THE MSL2 PROTEIN OF *Drosophila melanogaster*

E. A. Tikhonova, P. G. Georgiev, and O. G. Maksimenko*

Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; e-mail: maksog@mail.ru

Dosage compensation complex, consisting of five proteins and two non-coding RNAs roX, specifically binds to the X chromosome in males, providing a higher level of gene expression, which is necessary to compensate for the monosomy of the sex chromosome in male Drosophila compared to two X chromosomes in females. The MSL2 protein contains an N-terminal RING domain, which acts as an E3 ligase in the ubiquitination of proteins and is the only subunit of the complex that is expressed only in males. The functional role of two C-terminal domains of the MSL2 protein, enriched with proline (P-domain) and basic amino acids (B-domain), was investigated. As a result, it was shown that the B-domain destabilizes the MSL2 protein, which is associated with the presence of two lysines whose ubiquitination is under the control of the RING domain of MSL2. The unstructured proline-rich domain stimulates transcription of the roX2 gene, which is necessary for the effective formation of the dosage compensation complex.

Keywords: dosage compensation, long non-coding RNA, MSL1, roX, MSL complex, ubiquitination

УДК 577.29

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИЙ НУКЛЕОСОМ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Обзор

© 2024 А.А. Украинцев^{1#}, М.М. Кутузов^{1#}, О.И. Лаврик^{1,2*}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: lavrik@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 14.10.2023 После доработки 19.02.2024 Принята к публикации 22.02.2024

Хроматин является эпигенетической платформой для реализации ДНК-зависимых процессов. Нуклеосома, как базовый уровень компактизации хроматина, во многом определяет его свойства и структуру. При изучении структуры и функций нуклеосом активно применяются физикохимические инструменты, такие как магнитный и оптический «пинцеты», «ДНК-шторы», ядерный магнитный резонанс, рентгеноструктурный анализ и криоэлектронная микроскопия, а также оптические методы, основанные на резонансном переносе энергии Ферстера. Несмотря на то что эти подходы позволяют определять широкий спектр структурно-функциональных характеристик хроматина и нуклеосом с высоким пространственным и временным разрешением, атомно-силовая микроскопия (АСМ) дополняет возможности перечисленных методов. В данном обзоре представлены результаты структурных исследований нуклеосом в свете развития метода АСМ. Возможности АСМ рассмотрены в контексте применения других физико-химических подходов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нуклеосома, ACM, хроматин, одномолекулярные методы исследования биомолекул.

DOI: 10.31857/S0320972524040078 **EDN:** ZFKWWH

ВВЕДЕНИЕ

Молекулы ДНК используются клетками для хранения и реализации генетической информации. В клетках эукариот ДНК преимущественно находится в составе хроматина, при этом важное значение имеет как степень компактизации хроматина, так и его пространственная укладка [1]. Базовым уровнем компактизации ДНК является нуклеосома – комплекс, состоящий из восьми гистонов и 147 п.н. ДНК, структура которого во многом определяет свойства хроматина. Первые

представления о структуре нуклеосомы были сформулированы в середине 70-х гт. XX века [2–4]. Схематичное представление нуклеосомы приведено на рис. 1.

К настоящему времени достаточно детально изучены основные характеристики состава и структуры нуклеосомы, а также ее молекулярная динамика. Во многом эти знания были получены с использованием современных физико-химических методов исследования, включая одномолекулярные инструменты, такие как оптический и магнитный пинцеты, «ДНК-шторы» (DNA curtains),

Принятые сокращения: ACM – атомно-силовая микроскопия; криоЭМ – криоэлектронная микроскопия; PCA – рентгеноструктурный анализ; contact mode AFM – контактный режим атомно-силовой микроскопии; DREEM – электростатическая силовая микроскопия с усилением частоты двойного резонанса; FRET – резонансный перенос энергии Ферстера; HS-AFM – высокоскоростная атомно-силовая микроскопия; PARP – поли(ADP-рибоза) полимераза; ssNCP – нуклеосома с одноцепочечной ДНК; tapping mode AFM – полуконтактный режим атомно-силовой микроскопии.

² Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

^{*} Адресат для корреспонденции.

[#] Авторы внесли равный вклад в работу.

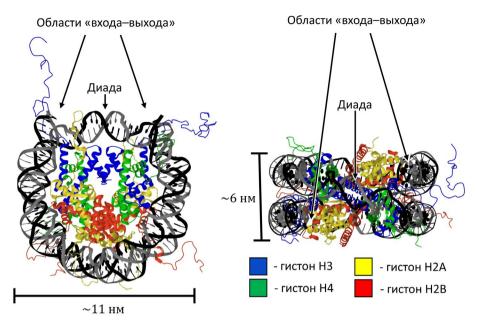


Рис. 1. Структура нуклеосомной частицы (PDB ID: 1KX5). Приведена пространственная структура нуклеосомы в виде ленточной диаграммы в двух проекциях

оптический подход, основанный на резонансном переносе энергии Ферстера (FRET) и др. [5–7]. Эти методы позволяют измерять широкий спектр параметров поведения биомолекул и их комплексов, в том числе хроматина и нуклеосом с высоким пространственным и временным разрешением.

Наряду с перечисленными методами, активно применяется метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). В основе АСМ лежит детекция взаимодействия зонда с поверхностью. Зонд в виде иглы на конце кантилевера сканирует образец. Для детекции изменения вертикальной координаты зонда используется лазер, направленный на кантилевер, и фотодетектор, регистрирующий отраженный луч. При вертикальном смещении зонда отраженный от кантилевера луч смещается. По сигналу от фотодетектора можно судить о силе взаимодействия кантилевера с поверхностью. Далее, в зависимости от режима сканирования эти данные явным образом или опосредованно через систему обратной связи позволяют получить информацию о вертикальной координате поверхности образца. К настоящему моменту существует большое разнообразие режимов сканирования и вариантов реализации сканирования.

КОНТАКТНЫЙ РЕЖИМ АСМ

Первые изображения нуклеосом были получены с использованием контактного режима сканирования (contact mode AFM), при котором фиксируется сила отталкивания зонд-поверхность, регулируемая контуром обратной связи [8, 9]

(рис. 2, *a*). Авторам этих работ удалось показать полинуклеосомную структуру в виде «бусин на нитке» [8, 9]. Кроме того, были определены основные геометрические параметры нуклеосомного дискае го высота и диаметр, которые без учета радиуса кривизны зонда составили ~3 и ~32 нм соответственно [9], а также количество витков суперспирали ДНК в составе нуклеосомы [9].

Контактный режим характеризуется относительно большим механическим воздействием кантилевера на поверхность, что приводит к сильной деформации и повреждению образцов нуклеосом во время сканирования. Кроме того, такой «жесткий» режим сканирования требует применения зондов с радиусом кривизны не менее 10 нм, что снижает чувствительность и точность режима в целом. Как следствие, первые изображения нуклеосом, полученные методом АСМ в контактном режиме, характеризуются невысоким качеством, что в значительной степени ограничило применение этого метода при изучении их структуры.

ПОЛУКОНТАКТНЫЙ РЕЖИМ АСМ

Появление полуконтактного режима сканирования ACM (tapping mode AFM) позволило значительно уменьшить деформации образца во время сканирования, что позволило использовать более острые зонды. В этом режиме кантилевер колеблется на своей резонансной частоте. Контур обратной связи фиксирует изменения в параметрах колебаний кантилевера и корректирует положение зонда относительно поверхности, обеспечивая

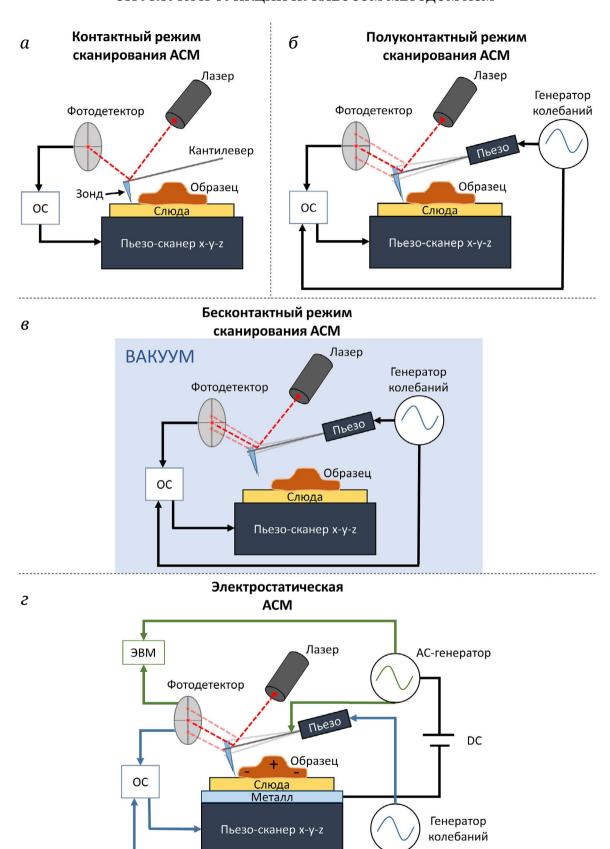


Рис. 2. Схематичное изображение режимов сканирования АСМ на примере прибора с нижним расположением пьезо-сканера. a – Контактный режим сканирования; b – полуконтактный режим сканирования; b – электростатическая АСМ. ОС – обратная связь; ЭВМ – электронная вычислительная машина; АС – переменный электрический ток; DC – постоянный электрический ток

положение равновесия, около которого кантилевер совершает гармонические колебания (рис. 2, б). Такие изменения драматически повысили разрешающую способность АСМ при работе с биологическими молекулами. Так, Martin et al. [10] продемонстрировали преимущества этого режима сканирования по сравнению с контактным режимом при изучении структуры хроматина. В своей работе авторам удалось более точно определить размеры нуклеосомы в полуконтактном режиме, чем в контактном. При сканировании в полуконтактном режиме АСМ высота и диаметр нуклеосомного диска составили $4,3 \pm 1,2$ нм и $23,2 \pm 4,5$ нм соответственно, что с учетом радиуса кривизны зонда приближается к значениям, полученным методом рентгеноструктурного анализа (РСА) [11]. Кроме того, с использованием такого подхода удалось визуализировать ДНК в линкерной области хроматина, что было невозможно при сканировании в контактном режиме, а также экспериментально подтвердить структуру нуклеосомы, рассчитанную при помощи математического моделирования [12].

В работе Qian et al. [13] применение АСМ в полуконтактном режиме при исследовании хроматина из эритроцитов домашних кур позволило визуализировать разные уровни компактизации ДНК. Были получены изображения как отдельных «бусин» нуклеосом на нити ДНК, так и их скопления. Наличие участков с различной плотностью упаковки ДНК позволило авторам предположить роль компактизации в регуляции экспрессии генов. В этой работе были определены геометрические характеристики фибрилл, диаметр которых составил 15-60 нм, подтвердившие соленоидную модель упаковки нуклеосом. Кроме того, впервые было показано, что фибриллы низшей степени компактизации (~30 нм) в дальнейшем сворачиваются с формированием структур хроматина более высокого порядка (~60 нм), которые, в свою очередь, складываются в еще более высокоорганизованные хроматиновые структуры (~90-110 нм и более).

С появлением нуклеосом-позиционирующих последовательностей ДНК [14], характеризующихся однозначным расположением нуклеосомного кора на молекуле ДНК и высокой прочностью формируемых комплексов, стало возможным создание модельных структур с прогнозируемым расположением нуклеосом. Использование таких нуклеосом-позиционирующих последовательностей ДНК позволило показать стохастичность расположения нуклеосом в природном хроматине на примере теломерных участков. Эти результаты подтвердили соответствующую теоретическую модель позиционирования нуклеосом [15].

ACM активно применяется для изучения влияния различных вариантов гистонов, их пост-

трансляционных модификаций и эпигенетических модификаций ДНК на структуру нуклеосом. Модификации хвостов гистонов являются ключевым фактором в регуляции динамики хроматина и клеточного гомеостаза. Отличительной чертой активного хроматина является гиперацетилирование гистонов, что, по-видимому, приводит к более открытой структуре хроматина. В работе Hizume et al. [16] методом ACM с использованием фибрилл хроматина из клеток HeLa было обнаружено, что гиперацетилирование гистонов приводит к уменьшению толщины хроматиновых фибрилл. Этот результат позволил подтвердить модель деконденсации хроматина, основанную на электростатических взаимодействиях. Биотинилирование, напротив, способствует конденсации хроматина. В работах Filenko et al. [17] и Singh et al. [18] использование ACM позволило продемонстрировать, что биотинилирование гистона Н4 по лизинам 12 или 16 приводит к уплотнению структуры нуклеосомы, выраженному в увеличении количества оборотов ДНК вокруг гистонового октамера.

Замена гистонов вариантами, а также перемещение нуклеосом по молекуле ДНК – базовые механизмы регуляции компактизации хроматина, которые, как правило, обусловлены работой белков-ремоделеров. RSC – АТР-зависимый белковый комплекс ремоделеров структуры хроматина, гомологичный человеческому SWI/SNF, осуществляющий сдвиг нуклеосомы. Некоторые детали его работы были показаны с использованием полуконтактного режима АСМ. В частности, оказалось, что RSC перемещает нуклеосому по ДНК до тех пор, пока не будет встречена другая нуклеосома или не встретится обрыв цепи ДНК [19].

Сравнительный анализ работ по изучению структуры нуклеосомного комплекса с вариантом гистона Н3 (CENP-A), выполненных с использованием АСМ, позволил предложить альтернативную модель укладки ДНК в центромерной области хромосом. Эта модель предполагает укладку ДНК в центромерной области в виде массива параллельных участков в форме «змейки» вместо характерной для канонических нуклеосом зигзагообразной укладки [20]. При изучении особенностей структуры нуклеосом с заменой корового гистона Н2А на его недавно открытый вариант мышиного гистона H2AL2, экспрессия которого ассоциирована со сперматогенезом, методом АСМ было показано, что длина ДНК в составе нуклеосомы уменьшается с 147 до 130 п.н. [21]. Укорочение ДНК, находящейся в составе нуклеосомы, обусловлено релаксацией ее структуры посредством частичного разворачивания. В этой же работе с использованием криоэлектронной микроскопии (криоЭМ) дополнительно показано, что нуклеосомы с H2AL2

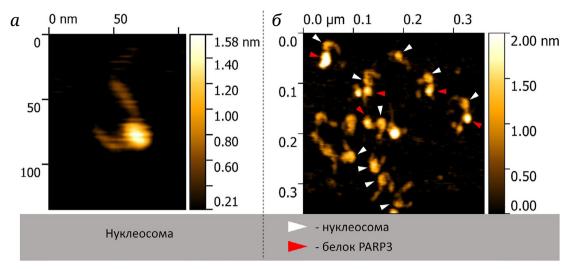


Рис. 3. Изображения, полученные в полуконтактном режиме ACM. a – Нуклеосома; δ – нуклеосомы с белком PARP3

характеризуются более релаксированной структурой с большим значением угла между линкерными областями ДНК, что согласуется с данными, полученными методом АСМ. Привлекает внимание тот факт, что нуклеосома при этом становится устойчивой к действию белков-ремоделеров, таких как RSC и SWI/SNF. Биологическое значение такой модуляции свойств нуклеосомы остается предметом исследований.

Структура нуклеосомы может модулироваться связыванием белка или белкового комплекса. Одним из наиболее наглядных примеров может служить работа, в которой исследовано влияние линкерного гистона Н1 на компактизацию нуклеосомы. С использованием возможностей АСМ было показано, что Н1 не оказывает влияния на степень компактизации нуклеосом, однако в значительной степени стабилизирует ее, уменьшая флуктуации структуры [22]. В нашей работе, посвященной изучению влияния ядерных белков поли(ADP-рибоза)полимераз 1, 2, и 3 (PARP1, PARP2 и PARP3) на степень компактизации нуклеосом, методом АСМ было обнаружено, что PARP3 способствует уплотнению структуры мононуклеосом [23] (рис. 3, а и б). PARP1, PARP2 и PARP3 являются участниками большинства ДНК-зависимых процессов, включая регуляцию транскрипции и репарации. При этом в ответ на повреждение геномной ДНК они катализируют реакцию переноса остатков ADP-рибозы на белки-мишени, используя в качестве субстрата NAD+. PARP3 катализирует реакцию моно(ADPрибозил)ирования, в то время как PARP1 и PARP2 катализируют синтез полимера ADP-рибозы. Кроме того, в отличие от PARP1 и PARP2, PARP3 не взаимодействует с фактором ADP-рибозилирования гистонов HPF1 [24]. С использованием ACM нам удалось установить ранее неизвестную особенность функционирования PARP3, а именно ее влияние на структуру нуклеосом, что может говорить о роли этого белка в регуляции структуры хроматина. В данной работе каталитическая реакция ДНК-зависимых белков ARTD на нуклеосомах не исследовалась, но в других работах наблюдали синтез полимера ADP-рибозы, катализируемый белками PARP1 и PARP2 на протяженных ДНК-субстратах методом ACM [25, 26], что говорит о возможности аналогичных исследований в случае нуклеосом.

БЕСКОНТАКТНЫЙ РЕЖИМ АСМ

Еще одной модификацией метода АСМ является бесконтактный режим сканирования (non contact mode AFM). В его основе лежит детекция изменения сил притяжения, обусловленных взаимодействиями Ван-дер-Ваальса, между зондом и поверхностью, что позволяет проводить сканирование без необходимости непосредственного контакта кантилевера с образцом. При реализации этого режима кантилевер колеблется с низкой амплитудой на частоте, превышающей его резонансную частоту, что приводит к увеличению чувствительности по сравнению с АСМ в полуконтактном режиме. Сканирование нуклеосом в этом режиме позволило получить изображение с разрешением, на момент опубликования работы, превышавшим даже возможности криоЭМ [27]. Тем не менее, несмотря на впечатляющее преимущество, этот режим сканирования не получил широкого распространения в силу технических ограничений. Например, в упомянутой работе Davies et al. [27] сканирование проводили в условиях глубокого вакуума. Следует отметить, что анализ биомолекул и их комплексов предпочтительнее проводить в растворе для облегчения интерпретации результатов, что несовместимо с работой в вакууме. Кроме того, условия вакуума ограничивают изучение динамики исследуемых комплексов.

С учетом ограничений, возникающих при реализации бесконтактного режима и низкого качества изображений, которые могут быть получены в контактном режиме, на сегодняшний день наибольшее распространение при изучении биомолекул получил полуконтактный режим сканирования АСМ. Более того, на полуконтактном режиме сканирования основаны такие варианты АСМ, как МАС-режим, РеакГогсе-режим, высокоскоростной режим, а также электростатическая АСМ.

МАС-РЕЖИМ АСМ

Альтернативой классическому полуконтактному режиму является MAC-режим (magnetic alternating current mode AFM), принцип работы которого основан на возбуждении колебаний кантилевера магнитным полем катушки, расположенной под образцом [28]. Использование МАС-режима обеспечивает меньшее силовое воздействие на образец, по сравнению с классическим полуконтактным режимом АСМ, что способствует сохранению остроты зонда и повышает качество получаемого изображения. Например, именно с использованием этого режима сканирования было показано, что метилирование азотистого основания С в СрGпоследовательностях приводит к более плотной упаковке хроматина в присутствии линкерного гистона Н1 [29]. Эти результаты позволили предложить механизм регуляции транскрипции в крупных доменах хроматина за счет метилирования.

Развитием этого режима сканирования стала модификация кантилевера аффинным агентом, например антителом, что позволило совместить топографическое изучение поверхности и молекулярное распознавание объектов в реальном времени (PicoTREC AFM) [30, 31]. При соприкосновении зонда с образцом регистрируется рельеф поверхности, а по изменению амплитуды колебаний кантилевера можно зарегистрировать наличие антигена в точке сканирования. Применение такого подхода позволило [32, 33] продемонстрировать механизм действия ремоделера хроматина SWI/SNF. В частности, было показано, что SWI/SNF способствует удалению гистона Н2А из состава нуклеосомы, что приводит к релаксации структуры нуклеосомы и сопровождается высвобождением ~80 п.н. ДНК. Эти результаты позволили охарактеризовать изменения геометрических параметров нуклеосомы при удалении гистона Н2А, хотя ранее методами иммунопреципитации, количественной ПЦР и гельэлектрофореза уже были получены данные, указывающие на то, что под действием ремоделера хроматина SWI/SNF происходит удаление гистонов H2A/H2B из нуклеосомы [34, 35].

PEAKFORCE-РЕЖИМ ACM

Внерезонансный режим сканирования, разработанный компанией «Bruker» (США), PeakForce Tapping mode AFM – один из вариантов модификации технологии сканирующей зондовой АСМ, перспективных для применения при работе с биологическими молекулами [36]. При реализации этого режима кантилевер контактирует с поверхностью образца с частотой значительно ниже резонансной, что позволяет рассматривать такие контакты как квазистатичный процесс, а сигнал регистрируется по фиксированной максимальной силе контакта образца с зондом. Такой способ сканирования дополнительно снижает силу воздействия кантилевера на образец и позволяет проводить топографические исследования «мягких» объектов с большой точностью. С использованием этого режима сканирования [37] впервые удалось получить изображение нуклеосом в растворе, без использования вакуума, с характеристиками, наиболее приближенными к данным РСА (рис. 4).

В работе McCauley et al. [37] авторы однозначно идентифицируют нуклеосомы по высоте ~5,5 нм и диаметру ~11 нм, что коррелирует с данными, полученными РСА (высота – 5,7 нм; диаметр – 11 нм) [11]. Столь высокое разрешение позволило установить, что негистоновые белки хроматина Nhp6A и Hmo1 из семейства HMGB дестабилизируют структуру нуклеосомы с высвобождением части ДНК, причем делают это по-разному. Установлено, что Hmo1 релаксирует структуру нуклеосомы в большей степени, чем Nhp6A, что хорошо согласуется с особенностями локализации этих белков на хроматине. Hmo1 сосредоточен в высоко транскрибируемой области, обогащенной генами трансляционного аппарата и обедненной гистонами, где не нужна плотная упаковка ДНК, а Nhp6A локализуется в остальных частях эухроматина.

ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКАЯ АСМ

Отдельного внимания заслуживают методики сканирующей зондовой микроскопии, позволяющие определять поверхностный электростатический потенциал. Они оказались значительно более информативными для изучения биомолекул после того, как были оптимизированы варианты сканирования в однопроходном режиме с реализацией резонансных частот кантилевера на двух

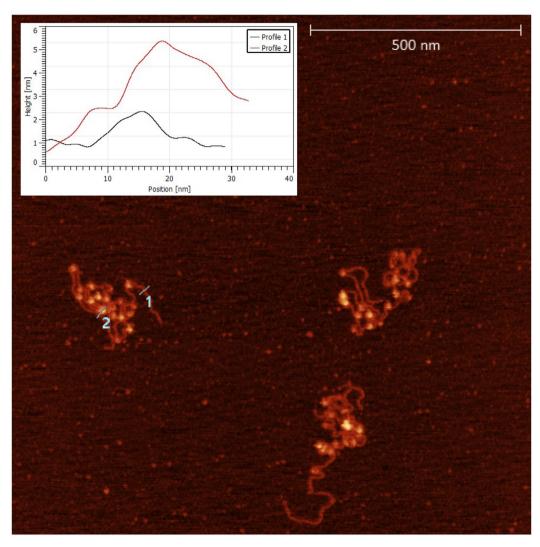


Рис. 4. Кластер нуклеосомных частиц [37]. На АСМ-изображении представлены три кластера нуклеосомных частиц. Отмечены две линии (1, 2). На вставке в верхнем левом углу приведены профили высоты для каждой линии (1 и 2) вдоль измеренного расстояния. Первый профиль (черная линия) пересекает ДНК и показывает высоту и ширину двухцепочечной ДНК. Второй профиль (красная линия) пересекает идентифицированную нуклеосому

гармониках. Реализация такого подхода позволила драматически повысить чувствительность метода [38]. В зависимости от особенностей реализации можно выделить Кельвин-зондовую силовую микроскопию (КРҒМ) [38] и электростатическую силовую микроскопию с усиленной частотой двойного резонанса (DREEM) [39]. На рис. 2, г показан принцип получения сигнала при КРҒМ и DREEM.

DREEM позволяет обнаруживать очень малые изменения градиента электростатической силы с высоким разрешением, что делает его мощным инструментом для характеристики структуры белок-нуклеиновых комплексов на уровне одной молекулы. DREEM позволяет визуализировать ДНК, расположенную как на поверхности, так и внутри белок-нуклеинового комплекса, а также ДНК в составе больших гетерогенных комплексов с несколькими белками. Указанный подход имеет

большой потенциал при изучении структуры как одиночных нуклеосом, так и нуклеосом в составе более сложных комплексов.

Работа Wu et al. [39] посвящена демонстрации возможностей метода DREEM для изучения расположения молекулы ДНК в составе больших мультибелковых комплексов. В качестве одного из примеров была выбрана нуклеосома. С одной стороны, авторы показали, что общие топографические изображения нуклеосом, полученные с помощью DREEM и других методов АСМ, совпадают. С другой стороны, на изображениях DREEM наблюдаются участки с пониженной интенсивностью в области нуклеосомного кора, расположение которых хорошо коррелирует с траекторией расположения ДНК в составе нуклеосомы по данным РСА (рис. 5). Этот факт подтверждает корректность применения такого подхода и интерпретации результатов.

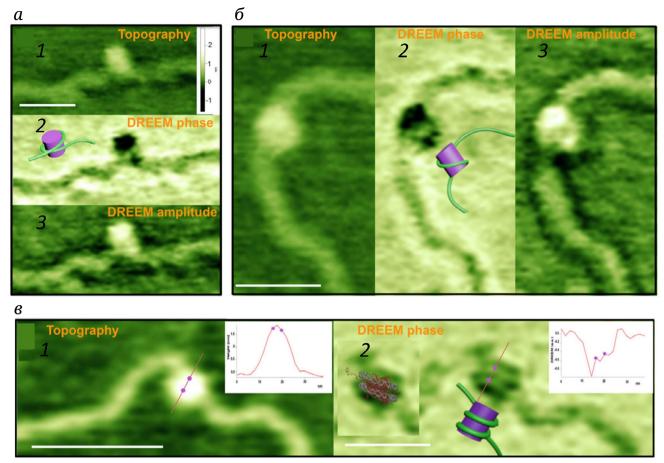


Рис. 5. Топографические изображения нуклеосом с помощью АСМ и DREEM [39]. Топографические (*a*, 1; *б*, 1), изображения фазы DREEM (*a*, 2; *б*, 2) и амплитуды DREEM (*a*, 3; *б*, 3) нуклеосом, показывающие, как молекула ДНК оборачивается вокруг гистонов один раз. *в* – Топографические (1) и DREEM-фазовые изображения нуклеосомы (2), показывающие, что ДНК дважды оборачивается вокруг нуклеосомы. На вставках показаны профили высоты вдоль линии, проведенной через нуклеосому на топографических (*в*, 1) и DREEM изображениях (*в*, 2). Две точки на графиках соответствуют положениям двух точек, показанных на линии, которые отмечают положение пиков, соответствующих ДНК на изображении DREEM. Схематичные модели ДНК, обертывающей гистоны, показаны на каждом изображении DREEM (модели не в масштабе). Кристаллическая структура нуклеосомы, наложенная на изображение DREEM-фазы, показана на вставке к фазовому изображению на панели (*в*, 2)

В качестве второй модели Wu et al. [39] использовали мультибелковый комплекс системы репарации некомплементарных пар оснований ДНК человека, состоящий из MutSα и MutLα. С использованием DREEM удалось визуализировать расположение ДНК, содержащей неканоническую пару нуклеотидов, в составе этого комплекса (рис. 6).

Такая модель призвана продемонстрировать применимость метода для определения расположения ДНК внутри белкового комплекса. Полученные результаты вошли в работу, посвященную изучению функционирования комплекса MutSa и MutLa [40].

Этот же подход был использован в работе Adkins et al. [41] для подтверждения структуры нуклеосомоподобных частиц, реконструированных с использованием одноцепочечной ДНК (ssNCP). С помощью DREEM показано, что ssNCP имеют структуру и размеры, схожие с параметрами кано-

нических нуклеосом, в частности, имеют дискообразную форму и содержат такое же количество оборотов одноцепочечной ДНК на октамере гистонов [41].

Авторы этой работы предположили, что гистоны, высвобождающиеся из состава нуклеосом на начальных этапах процесса репарации двухцепочечных разрывов ДНК, могут связываться с однонитевым участком ДНК. Была показана возможность реконструкции ssNCP *in vitro*. Оказалось, что ssNCP более динамичны, чем канонические нуклеосомы, и способны АТР-независимо переноситься на другие участки одно- или двухцепочечных ДНК. Более того, АТР-зависимые ремоделеры нуклеосом, такие как RSC и Fun30, эффективно связываются с ssNCP и активируются. На основании этих результатов авторы выдвинули предположение, что ssNCP могут быть отличительным признаком различных клеточных процессов,

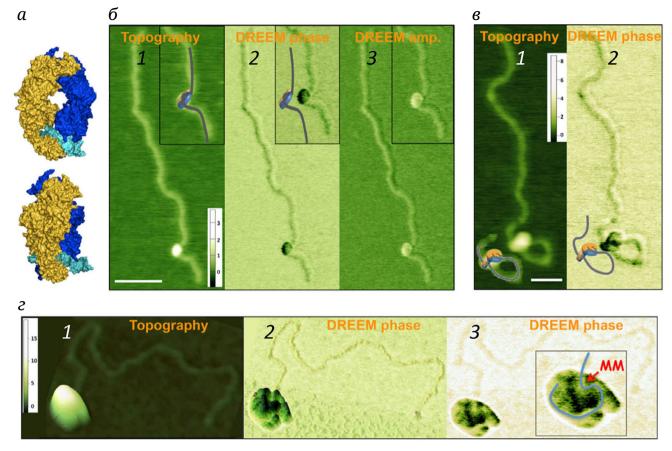


Рис. 6. Топографические АСМ- и DREEM-изображения комплексов репарации ошибочно спаренных нуклеотидов на ДНК длиной 2 т.п.н., содержащей ошибочно спаренные нуклеотиды GT [39]. *а* – Пространственная модель кристаллической структуры Taq MutS (создана из PDB: 1EWQ). Субъединицы A, B и ДНК окрашены в синий, золотой и голубой цвета соответственно. MutS изгибает ДНК примерно на 60° при прохождении через канал связывания ДНК. *б* – Топографические АСМ (*б*, 1), а также DREEM-фазовые (*б*, 2) и амплитудные (*б*, 3) изображения комплекса Taq MutS–ДНК. *в* – Наложение модели комплекса на АСМ-изображения (*в*, 1) и рядом с фазовыми изображениями (*в*, 2). *г* – Топографические АСМ-изображения (*г*, 1) и DREEM-фаза (*г*, 2 и 3) большого комплекса MutSα–МutLα–ДНК, содержащего ~10 белков. Путь ДНК идентифицирован как области с наибольшим снижением величины сигналов DREEM, по сравнению с одним белком, и отмечен на вставке (*г*, 3) синим цветом; ММ – ожидаемое положение ошибочно спаренных нуклеотидов

сопровождающихся формированием одноцепочечных участков ДНК, а возникновение таких структур может быть использовано для регуляции того или иного клеточного процесса.

Несмотря на впечатляющие возможности данного подхода, он имеет ряд технических ограничений, связанных в первую очередь с высокими требованиями, предъявляемыми к качеству кантилеверов, которые должны одновременно обладать высокой остротой и достаточной проводимостью для получения топографических изображений высокого разрешения и изображений DREEM [39].

DREEM позволяет визуализировать конформацию ДНК как на поверхности, так и внутри отдельных комплексов белок–ДНК, а также в составе больших гетерогенных комплексов с несколькими белками. В совокупности способность DREEM обнаруживать очень малые изменения градиента электростатической силы с высоким разрешени-

ем делает его мощным инструментом для характеристики структуры комплексов белок–ДНК на уровне одной молекулы. Указанный подход имеет большой потенциал при изучении структуры как одиночных нуклеосом, так и нуклеосом в составе более сложных комплексов.

высокоскоростная асм

Одним из ключевых недостатков упомянутых режимов проведения АСМ можно считать большие затраты времени, необходимые для получения отдельных изображений. Такая особенность метода ограничивает его применимость при исследовании процессов в динамике. Первые попытки изучения динамических процессов были реализованы с использованием последовательного сканирования образцов. Таким образом, были получены

данные о скольжении РНК-полимеразы вдоль ДНК [42]. В том же режиме удалось продемонстрировать процесс «разматывания» нуклеосомы [43]. Shlyakhtenko et al. [43] показали, что многократное непрерывное сканирование одного и того же поля с нуклеосомой позволило сформировать восемь изображений одной и той же нуклеосомы, отражающих ее преобразования с течением времени. В результате было показало постепенное «разматывание» ДНК с гистонового октамера, завершающееся полным разрушением комплекса.

Дальнейшее усовершенствование метода за счет использования более производительного прибора позволило группе Lyubchenko с использованием высокоскоростного сканирования (HS-AFM) получить более детальные данные о динамике «разматывания» нуклеосом с гистоном Н3 и его центромерным вариантом CENP-A [44, 45]. В этих работах были получены данные о механизмах релаксации структуры нуклеосом, таких как выпетливание ДНК, а также о возможности транслокации нуклеосом вдоль ДНК. Авторы отмечают, что динамические перестройки центромерного хроматина могут происходить при отсутствии факторов ремоделирования. При этом CENP-A стабилизирует нуклеосомные частицы, препятствуя полной диссоциации гистонов при разрыхлении или разворачивании ДНК и обеспечивая быструю повторную сборку нуклеосом при их межнитевом переносе [45]. Канонические нуклеосомные частицы с гистоном Н3 не проявляют такой пластичности и перестраиваются только в присутствии факторов ремоделирования, таких как SNF2h [46]. Позднее в работе Onoa et al. [47] с использованием HS-AFM были показаны некоторые детали динамики нуклеосом и хроматосом, уточняющие механизм их «разворачивания». В частности, в реальном времени продемонстрирована асимметричность «разворачивания» нуклеосом, ступенчатость удаления гетеродимеров гистонов из нуклеосомного кора, а также лабильность положения гистонового тетрамера (H3-H4) × 2 в области диады.

НS-AFM-сканирование сделало возможным анализ динамики нуклеопротеидных и других комплексов биомолекул. Для того чтобы получить представление о кинетических характеристиках исследуемых белков, требуется еще большее увеличение скорости сканирования. В дальнейшем, вероятно, для достижения указанной цели будут привлечены возможности машинного обучения. В работе Kato et al. [48] для анализа данных интегральной симуляции динамики от асинхронного HS-AFM-сканирования предложен подход с использованием машинного обучения. Особенность описанного подхода заключается в том, что в данном случае учитывается асинхронность одиночных проходов при сканировании. Таким образом, было

показано, что этот метод с соответствующей частотой повторной дискретизации является мощным инструментом оценки динамического поведения исследуемого объекта по данным HS-AFM с низким пространственно-временным разрешением.

СРАВНЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ АСМ С НЕКОТОРЫМИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ ПОДХОДАМИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ НУКЛЕОСОМ

При проведении структурно-функциональных исследований нуклеосом, в том числе при изучении их динамики, применяется ряд физикохимических инструментов исследования, таких как: магнитный и оптический «пинцеты», «ДНКшторы», ядерный магнитный резонанс, рентгеноструктурный анализ и криоэлектронная микроскопия, а также оптические методы, основанные на FRET. Эти методы обеспечивают широкий спектр детектируемых параметров с высоким пространственным и временным разрешением.

Одним из таких подходов, получивших распространение, является оптический «пинцет», позволяющий приложить механическую силу непосредственно к исследуемой молекуле или комплексу и одновременно измерить удлинение исследуемого образца. С использованием этого метода впервые была определена прочность нуклеосомного комплекса [49]. Магнитный пинцет, который, помимо растяжения, позволяет передавать вращательное движение объекту, позволил создавать модельные структуры ДНК с суперспирализацией. В работе Gupta et al. [50] было показано, что внутримолекулярное напряжение, возникающее в структуре ДНК с положительной суперспирализацией, изменяет ее конформацию, по сравнению с несуперспирализованной ДНК, таким образом, что образование нуклеосом становится менее эффективным.

Тем не менее применимость обоих подходов ограничивается измерением изменений линейных характеристик объекта и величины прилагаемого усилия. Комбинирование этих методов с флуоресцентной микроскопией значительно расширяет возможности исследователя, но по-прежнему не позволяет исследовать конформационные изменения внутри комплекса. Реализация флуоресцентной микроскопии в режиме FRET безызлучательного механизма передачи энергии между флуорофорами - частично позволяет преодолеть это ограничение, тем не менее зарегистрированные с помощью этого метода конформационные изменения не всегда могут быть интерпретированы однозначно. Несмотря на это, использование механизма FRET является мощным инструментом при изучении структуры и конформационной динамики белок-нуклеиновых

комплексов. Например, применение FRET позволило Andreeva et al. [51] зарегистрировать влияние буферных компонентов на структуру нуклеосомы. В частности, показан стабилизирующий эффект ионов калия, а также продемонстрировано, что такая стабилизация структуры нуклеосомы создает барьер для ATP-независимых белков/комплексов, таких как FACT и PARP1.

Еще один подход, позволяющий исследовать комплексы белков с нуклеиновыми кислотами, основан на формировании нанобарьера на поверхности подложки, который обеспечивает «заякоривание» молекулы ДНК с формированием так называемых «ДНК-штор». «ДНК-шторы» с нуклеосомами – уникальная система, позволяющая отслеживать поведение тысяч отдельных нуклеосомных частиц, содержащих флуоресцентную метку, в режиме реального времени. Применение этого подхода позволило выявить динамику уплотнения ДНК конденсинами I и II, а также уточнить механистическую модель формирования хроматиновых петель конденсином дрожжей и когезином человека [52–56]. Visnapuu и Greene [57] с использованием этого подхода удалось определить энергетический ландшафт локализации нуклеосом на ДНК и подтвердить теоретические предсказания на основе расчетной модели. Кроме того, в этой же работе было показано, что позиции сайтов сборки нуклеосом коррелируют с регуляторными областями транскрипции. К сожалению, этот подход не позволяет явным образом исследовать структурные изменения внутри самих нуклеосом, индуцируемые различными факторами.

Одним из самых мощных инструментов при изучении структуры биополимеров является метод РСА. При помощи РСА структура нуклеосомы была определена на атомарном уровне довольно давно [58]. Несмотря на высокую разрешающую способность, применимость этого метода сильно ограничена. Ограничения во многом связаны с необходимостью выращивать кристалл, что не позволяет изучать изменения структуры в динамике. Более того, получение кристалла само по себе является нетривиальной задачей, при этом качество изображения напрямую зависит от качества кристалла. Задача дополнительно осложняется, когда исследуется структура комплексов белков с нуклеиновыми кислотами, тем более такой сложности, как нуклеосома, и тем более хроматин. Получение пригодного для РСА кристалла также затруднено, если изучаемый полимер в своем составе содержит неупорядоченные структуры. Кроме того, структура белка в кристалле может отличаться от таковой в растворе, что необходимо учитывать при интерпретации данных РСА. Отдельно следует упомянуть сложности расшифровки полученных первичных данных, что дополнительно вносит ограничения на размеры объекта, выбранного для исследований.

На сегодняшний день развитие криоЭМ позволяет получать структуры с разрешением, приближающимся к данным РСА. Например, в работе Markert et al. [59] получено изображение связанного с нуклеосомой полного комплекса деацетилирования гистонов Rpd3S при помощи криоЭМ с общим разрешением 2,8 Å. Этот метод лишен части ограничений, характерных для РСА. Так, например, криоЭМ позволяет изучать белки, содержащие неупорядоченные структуры в своем составе, являющиеся сложными объектами для РСА. Тем не менее применение и этого метода имеет свои ограничения. КриоЭМ лучше подходит для изучения крупных объектов более 200 кДа. Как и РСА, криоЭМ плохо адаптирован для изучения конформационной динамики. Достижения последних лет позволили обеспечить анализ с временным разрешением в диапазоне от миллисекунд до секунд, что позволяет изучать конформационную динамику структуры, но плохо применимо при изучении масштабных изменений в структуре, как, например, транслокация нуклеосомы или ее межнитевой перенос.

Задачу анализа конформационной динамики биомолекул и их комплексов, таких как нуклеосома, позволяет решить ЯМР-спектроскопия. Достижения в области ЯМР-спектроскопии в растворе позволили получить представление о конформационной динамике как связанной коровой части гистонов, так и их свободных *N*- и *C*-хвостов [60]. Методы твердотельной ЯМР представляют собой дополнительные инструменты исследования нуклеосом [61]. Например, методом твердотельной ЯМР получена вторичная структура гистона Н2В в составе нуклеосомы, и она согласуется со структурой, полученной методом РСА. Авторам удалось показать динамические взаимодействия гистона Н2В с гистоном Н4, а также с ДНК [62]. Применимость этого метода преимущественно ограничена необходимостью введения изотопов разных элементов в образец для однозначности интерпретации спектров. Так, в работе Shi et al. [62] был использован гистон, содержащий изотопы ¹³C и ¹⁵N.

Использование АСМ во многом позволяет дополнить данные, полученные с использованием описанных выше подходов. В частности, АСМ позволяет определить геометрические параметры нуклеосом, а также их изменение при взаимодействии нуклеосом с различными белковыми факторами или замене гистонов их вариантами, например, при замене НЗ на СЕNP-А. Возможность проводить сканирование в жидкой среде позволяет имитировать условия, более приближенные к физиологическим, а появление высокоскоростного сканирования позволило наблюдать динамику

релаксации структуры нуклеосомы. Использование возможностей электростатической силовой микроскопии позволяет наблюдать траекторию укладки ДНК в составе нуклеосомы.

Одним из преимуществ АСМ можно считать применимость этого метода при работе со сложными макромолекулярными структурами, например, фрагментами хроматина или модельными полинуклеосомными фрагментами [15, 63]. Изучение таких объектов с помощью FRET или с использованием «пинцетов» может быть ограничено необходимостью введения флуоресцентных меток или микросфер в структуру исследуемого образца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стремительное развитие АСМ как метода исследования сложных белок-нуклеиновых комплексов позволило значительно углубить понимание структуры нуклеосомы. Следует отметить, что большое значение в применении АСМ имеет среда сканирования. Хорошо известно, что реализация АСМ в условиях вакуума положительно сказывается на качестве изображений. Однако для удобства интерпретации результатов при изучении биомолекул предпочтительнее производить сканирование в водной среде. Высушивание таких биомолекул, как ДНК, белки или их комплексы, приводит к нарушению их пространственной структуры [64]. Кроме того, сканирование в водной среде необходимо для реализации возможности изучать динамику процессов. В то же время реализация АСМ в жидкости сопровождается рядом технических сложностей, таких как ограничение спектра используемых подложек и способов иммобилизации объектов сканирования, а также возникают повышенные требования к подготовке кантилеверов.

Возможности АСМ, вероятно, будут расширяться благодаря развитию и внедрению машинного обучения для обработки первичных данных. Такой подход позволит снизить уровень «шума» при сканировании на программном уровне и повысить точность проводимых методом АСМ измерений. Кроме того, повышение производительности на программном уровне позволит увеличить скорость сканирования.

Следует отметить отдельные подходы, основанные на использовании АСМ, но к настоящему времени не нашедшие широкого применения при изучении нуклеосом. Например, сочетание флуоресцентной микроскопии и АСМ может быть востребовано при изучении взаимодействия белковых молекул или их комплексов с субстратами в виде нуклеосом или хроматина. При этом данные о топологии образца позволят локализовать уча-

сток взаимодействия белка/комплекса с субстратом, а данные флуоресценции позволят идентифицировать меченую молекулу. Подобный подход был использован группой Wyman для исследования гомологичной рекомбинации [65].

Широкое применение комбинации АСМ и детекции флуоресценции ограничивается в первую очередь необходимостью использования подложки, которая, будучи атомарно гладкой, была бы оптически прозрачна. На сегодняшний день подготовка такой подложки – нетривиальная задача; один из вариантов ее решения описан в работе Rahman et al. [66]. Вероятно, в будущем эта проблема будет решена, что откроет доступ к арсеналу подходов, основанных на детекции флуоресценции, включая FRET и поляризацию флуоресценции в сочетании с АСМ.

Реализация электростатической силовой микроскопии в жидкости могла бы значительно помочь при изучении динамики конформационных изменений ДНК в составе белок-нуклеинового комплекса, в том числе при использовании нуклеосомы или хроматина. На сегодняшний день измерение электростатического потенциала биологических молекул в жидкости ограничено высокой диэлектрической проницаемостью среды, возможностью образования сольватной оболочки на поверхности образца, а также экранированием поверхностей зонда и образца ионами раствора. Тем не менее некоторые исследования показывают возможность применения электростатической силовой микроскопии твердых материалов при низкой ионной силе [67, 68]. Сканирование электростатического потенциала в жидкости предъявляет повышенные требования в первую очередь к подготовке кантилевера. Он должен не только удовлетворять всем требованиям, предъявляемым к кантилеверу для проведения электростатической силовой микроскопии в режиме DREEM, но еще иметь диэлектрическое покрытие на поверхности зонда за исключением участка, непосредственно находящегося в контакте с образцом. Вероятно, дальнейшее развитие метода, сопряженное с повышением чувствительности прибора, позволит реализовать измерение электростатического потенциала биомолекул в жидкости.

В заключение следует добавить, что исследования последнего десятилетия резко изменили взгляды на структуру хроматина и его базовую единицу – нуклеосому. Статическая картина в настоящее время дополняется динамической, а методы с возможностью исследования одиночных молекул сыграли важную роль в характеризации динамических свойств нуклеосом. Использование АСМ предоставляет возможность охарактеризовать сложную надмолекулярную систему на наноуровне, позволяя непосредственно визуализировать

структурные особенности нуклеосом и изменения в нуклеосомах, например, процесс их разворачивания. Кроме того, немаловажную роль, в сравнении с некоторыми другими методами, играет возможность использования меньших количеств препаратов биополимеров в случае измерений с помощью ACM.

Вклад авторов. А.А. Украинцев, М.М. Кутузов – концепция и написание текста; О.И. Лаврик – редактирование текста статьи и руководство работой.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность А.А. Ломзову и Е.А. Белоусовой

за консультацию и продуктивные дискуссии при подготовке текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-74-10059) и Проекта государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300041-4 (для О.И. Лаврик).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Pombo, A., and Dillon, N. (2015) Three-dimensional genome architecture: players and mechanisms, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 245-257, https://doi.org/10.1038/nrm3965.
- 2. Kornberg, R. D., and Thomas, J. O. (1974) Chromatin structure; oligomers of the histones, *Science*, **184**, 865-868, https://doi.org/10.1126/science.184.4139.865.
- 3. Olins, A. L., and Olins, D. E. (1974) Spheroid chromatin units (v bodies), *Science*, **183**, 330-332, https://doi.org/10.1126/science.183.4122.330.
- 4. Woodcock, C. L., Safer, J. P., and Stanchfield, J. E. (1976) Structural repeating units in chromatin. I. Evidence for their general occurrence, *Exp. Cell Res.*, **97**, 101-110, https://doi.org/10.1016/0014-4827(76)90659-5.
- 5. Robison, A. D., and Finkelstein, I. J. (2014) High-throughput single-molecule studies of protein-DNA interactions, *FEBS Lett.*, **588**, 3539-3546, https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.021.
- 6. Teif, V. B., and Cherstvy, A. G. (2016) Chromatin and epigenetics: current biophysical views, *AIMS Biophys.*, **3**, 88-98, https://doi.org/10.3934/biophy.2016.1.88.
- 7. Fierz, B., and Poirier, M. G. (2019) Biophysics of chromatin dynamics, *Annu. Rev. Biophys.*, **48**, 321-345, https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-032847.
- 8. Vesenka, J., Hansma, H. G., Siegerist, C., Siligardi, G., Schabtach, E., and Bustamante, C. (1992) Scanning force microscopy of circular DNA and chromatin in air and propanol, *Scan. Probe Microscop.*, **1639**, 127-137, https://doi.org/10.1117/12.58189.
- 9. Allen, M. J., Dong, X. F., O'Neill, T. E., Yau, P., Kowalczykowski, S. C., Gatewood, J., Balhorn, R., and Bradbury, E. M. (1993) Atomic force microscope measurements of nucleosome cores assembled along defined DNA sequences, *Biochemistry*, **32**, 8390-8396, https://doi.org/10.1021/bi00084a002.
- 10. Martin, L. D., Vesenka, J. P., Henderson, E., and Dobbs, D. L. (1995) Visualization of nucleosomal substructure in native chromatin by atomic force microscopy, *Biochemistry*, **34**, 4610-4616, https://doi.org/10.1021/bi00014a014.
- 11. Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D., and Klug, A. (1984) Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution, *Nature*, **311**, 532-537, https://doi.org/10.1038/311532a0.
- 12. Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E., and Moudrianakis, E. N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10148-10152, https://doi.org/10.1073/pnas.88.22.10148.
- 13. Qian, R. L., Liu, Z. X., Zhou, M. Y., Xie, H. Y., Jiang, C., Yan, Z. J., Li, M. Q., Zhang, Y., and Hu, J. (1997) Visualization of chromatin folding patterns in chicken erythrocytes by atomic force microscopy (AFM), *Cell Res.*, 7, 143-150, https://doi.org/10.1038/cr.1997.15.
- 14. Lowary, P. T., and Widom, J. (1998) New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning, *J. Mol. Biol.*, **276**, 19-42, https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1494.
- 15. Pisano, S., Pascucci, E., Cacchione, S., De Santis, P., and Savino, M. (2006) AFM imaging and theoretical modeling studies of sequence-dependent nucleosome positioning, *Biophys. Chem.*, **124**, 81-89, https://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.05.012.
- 16. Hizume, K., Araki, S., Hata, K., Prieto, E., Kundu, T. K., Yoshikawa, K., and Takeyasu, K. (2010) Nano-scale analyses of the chromatin decompaction induced by histone acetylation, *Arch. Histol. Cytol.*, **73**, 149-163, https://doi.org/10.1679/aohc.73.149.
- 17. Filenko, N. A., Kolar, C., West, J. T., Smith, S. A., Hassan, Y. I., Borgstahl, G. E., Zempleni, J., and Lyubchenko, Y. L. (2011) The role of histone H4 biotinylation in the structure of nucleosomes, *PLoS One*, **6**, e16299, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016299.

- 18. Singh, M. P., Wijeratne, S. S., and Zempleni, J. (2013) Biotinylation of lysine 16 in histone H4 contributes toward nucleosome condensation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **529**, 105-111, https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.11.005.
- 19. Montel, F., Castelnovo, M., Menoni, H., Angelov, D., Dimitrov, S., and Faivre-Moskalenko, C. (2011) RSC remodeling of oligo-nucleosomes: an atomic force microscopy study, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 2571-2579, https://doi.org/10.1093/nar/gkq1254.
- 20. Lyubchenko, Y. L. (2014) Centromere chromatin: a loose grip on the nucleosome? *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 8, https://doi.org/10.1038/nsmb.2745.
- 21. Syed, S. H., Boulard, M., Shukla, M. S., Gautier, T., Travers, A., Bednar, J., Faivre-Moskalenko, C., Dimitrov, S., and Angelov, D. (2009) The incorporation of the novel histone variant H2AL2 confers unusual structural and functional properties of the nucleosome, *Nucleic Acids Res.*, 37, 4684-4695, https://doi.org/10.1093/nar/gkp473.
- 22. Würtz, M., Aumiller, D., Gundelwein, L., Jung, P., Schütz, C., Lehmann, K., Tóth, K., and Rohr, K. (2019) DNA accessibility of chromatosomes quantified by automated image analysis of AFM data, *Sci. Rep.*, **9**, 12788, https://doi.org/10.1038/s41598-019-49163-4.
- 23. Ukraintsev, A., Kutuzov, M., Belousova, E., Joyeau, M., Golyshev, V., Lomzov, A., and Lavrik, O. (2023) PARP3 affects nucleosome compaction regulation, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 9042, https://doi.org/10.3390/ijms24109042.
- 24. Suskiewicz, M. J., Prokhorova, E., Rack, J. G. M., and Ahel, I. (2023) ADP-ribosylation from molecular mechanisms to therapeutic implications, *Cell*, **186**, 4475-4495, https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.08.030.
- 25. Sukhanova, M. V., Abrakhi, S., Joshi, V., Pastre, D., Kutuzov, M. M., Anarbaev, R. O., Curmi, P. A., Hamon, L., and Lavrik, O. I. (2016) Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribosyl)ation using high-resolution AFM imaging, *Nucleic Acids Res.*, **44**, e60, https://doi.org/10.1093/nar/gkv1476.
- 26. Sukhanova, M. V., Hamon, L., Kutuzov, M. M., Joshi, V., Abrakhi, S., Dobra, I., Curmi, P. A., Pastre, D., and Lavrik, O. I. (2019) A single-molecule atomic force microscopy study of PARP1 and PARP2 recognition of base excision repair DNA intermediates, *J. Mol. Biol.*, 431, 2655-2673, https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.028.
- 27. Davies, E., Teng, K. S., Conlan, R. S., and Wilks, S. P. (2005) Ultra-high resolution imaging of DNA and nucleosomes using non-contact atomic force microscopy, *FEBS Lett.*, **579**, 1702-1706, https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.028.
- 28. Han, W., Lindsay, S., and Jing, T. (1996) A magnetically driven oscillating probe microscope for operation in liquids, *Appl. Phys. Lett.*, **69**, 4111-4113, https://doi.org/10.1063/1.117835.
- 29. Karymov, M. A., Tomschik, M., Leuba, S. H., Caiafa, P., and Zlatanova, J. (2001) DNA methylation-dependent chromatin fiber compaction *in vivo* and *in vitro*: requirement for linker histone, *FASEB J.*, **15**, 2631-2641, https://doi.org/10.1096/fj.01-0345com.
- 30. Stroh, C., Wang, H., Bash, R., Ashcroft, B., Nelson, J., Gruber, H., Lohr, D., Lindsay, S. M., and Hinterdorfer, P. (2004) Single-molecule recognition imaging microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12503-12507, https://doi.org/10.1073/pnas.0403538101.
- 31. Zhang, M., Chen, G., Kumar, R., and Xu, B. (2013) Mapping out the structural changes of natural and pretreated plant cell wall surfaces by atomic force microscopy single molecular recognition imaging, *Biotechnol. Biofuels*, **6**, 147, https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-147.
- 32. Wang, H., Bash, R., Lindsay, S. M., and Lohr, D. (2005) Solution AFM studies of human Swi-Snf and its interactions with MMTV DNA and chromatin, *Biophys. J.*, **89**, 3386-3398, https://doi.org/10.1529/biophysj.105.065391.
- 33. Bash, R., Wang, H., Anderson, C., Yodh, J., Hager, G., Lindsay, S. M., and Lohr, D. (2006) AFM imaging of protein movements: histone H2A-H2B release during nucleosome remodeling, *FEBS Lett.*, **580**, 4757-4761, https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.101.
- 34. Bruno, M., Flaus, A., Stockdale, C., Rencurel, C., Ferreira, H., and Owen-Hughes, T. (2003) Histone H2A/H2B dimer exchange by ATP-dependent chromatin remodeling activities, *Mol. Cell*, **12**, 1599-1606, https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00499-4.
- 35. Vicent, G. P., Nacht, A. S., Smith, C. L., Peterson, C. L., Dimitrov, S., and Beato, M. (2004) DNA instructed displacement of histones H2A and H2B at an inducible promoter, *Mol. Cell*, **16**, 439-452, https://doi.org/10.1016/j.molcel. 2004.10.025.
- 36. Xu, K., Sun, W., Shao, Y., Wei, F., Zhang, X., Wang, W., and Li, P. (2018) Recent development of PeakForce Tapping mode atomic force microscopy and its applications on nanoscience, *Nanotechnol. Rev.*, 7, 605-621, https://doi.org/10.1515/ntrev-2018-0086.
- 37. McCauley, M. J., Huo, R., Becker, N., Holte, M. N., Muthurajan, U. M., Rouzina, I., Luger, K., Maher, L. J., 3rd, Israeloff, N. E., and Williams, M. C. (2019) Single and double box HMGB proteins differentially destabilize nucleosomes, *Nucleic Acids Res.*, 47, 666-678, https://doi.org/10.1093/nar/gky1119.
- 38. Leung, C., Maradan, D., Kramer, A., Howorka, S., Mesquida, P., and Hoogenboom, B. W. (2010) Improved Kelvin probe force microscopy for imaging individual DNA molecules on insulating surfaces, *Appl. Phys. Lett.*, **97**, 203703, https://doi.org/10.1063/1.3512867.

- 39. Wu, D., Kaur, P., Li, Z. M., Bradford, K. C., Wang, H., and Erie, D. A. (2016) Visualizing the path of DNA through proteins using DREEM imaging, *Mol. Cell*, 61, 315-323, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.012.
- 40. Bradford, K. C., Wilkins, H., Hao, P., Li, Z. M., Wang, B., Burke, D., Wu, D., Smith, A. E., Spaller, L., Du, C., Gauer, J. W., Chan, E., Hsieh, P., Weninger, K. R., and Erie, D. A. (2020) Dynamic human MutSα-MutLα complexes compact mismatched DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 16302-16312, https://doi.org/10.1073/pnas.1918519117.
- 41. Adkins, N. L., Swygert, S. G., Kaur, P., Niu, H., Grigoryev, S. A., Sung, P., Wang, H., and Peterson, C. L. (2017) Nucleosome-like, single-stranded DNA (ssDNA)-histone octamer complexes and the implication for DNA double strand break repair, *J. Biol. Chem.*, **292**, 5271-5281, https://doi.org/10.1074/jbc.M117.776369.
- 42. Guthold, M., Zhu, X., Rivetti, C., Yang, G., Thomson, N. H., Kasas, S., Hansma, H. G., Smith, B., Hansma, P. K., and Bustamante, C. (1999) Direct observation of one-dimensional diffusion and transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase, *Biophys. J.*, 77, 2284-2294, https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77067-0.
- 43. Shlyakhtenko, L. S., Lushnikov, A. Y., and Lyubchenko, Y. L. (2009) Dynamics of nucleosomes revealed by time-lapse atomic force microscopy, *Biochemistry*, **48**, 7842-7848, https://doi.org/10.1021/bi900977t.
- 44. Miyagi, A., Ando, T., and Lyubchenko, Y. L. (2011) Dynamics of nucleosomes assessed with time-lapse high-speed atomic force microscopy, *Biochemistry*, **50**, 7901-7908, https://doi.org/10.1021/bi200946z.
- 45. Stumme-Diers, M. P., Banerjee, S., Hashemi, M., Sun, Z., and Lyubchenko, Y. L. (2018) Nanoscale dynamics of centromere nucleosomes and the critical roles of CENP-A, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 94-103, https://doi.org/10.1093/nar/gkx933.
- 46. Sinha, K. K., Gross, J. D., and Narlikar, G. J. (2017) Distortion of histone octamer core promotes nucleosome mobilization by a chromatin remodeler, *Science*, **355**, eaaa3761, https://doi.org/10.1126/science.aaa3761.
- 47. Onoa, B., Díaz-Celis, C., Cañari-Chumpitaz, C., Lee, A., and Bustamante, C. (2023) Real-time multistep asymmetrical disassembly of nucleosomes and chromatosomes visualized by high-speed atomic force microscopy, *ACS Cent. Sci.*, **10**, 122-137, https://doi.org/10.1021/acscentsci.3c00735.
- 48. Kato, S., Takada, S., and Fuchigami, S. (2023) Particle smoother to assimilate asynchronous movie data of high-speed AFM with MD simulations, *J. Chem. Theory Comput.*, **19**, 4678-4688, https://doi.org/10.1021/acs.jctc.2c01268.
- 49. Bennink, M. L., Leuba, S. H., Leno, G. H., Zlatanova, J., de Grooth, B. G., and Greve, J. (2001) Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers, *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 606-610, https://doi.org/10.1038/89646.
- 50. Gupta, P., Zlatanova, J., and Tomschik, M. (2009) Nucleosome assembly depends on the torsion in the DNA molecule: a magnetic tweezers study, *Biophys. J.*, **97**, 3150-3157, https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.032.
- 51. Andreeva, T. V., Maluchenko, N. V., Sivkina, A. L., Chertkov, O. V., Valieva, M. E., Kotova, E. Y., Kirpichnikov, M. P., Studitsky, V. M., and Feofanov, A. V. (2022) Na⁺ and K⁺ ions differently affect nucleosome structure, stability, and interactions with proteins, *Microsc. Microanal.*, **28**, 243-253, https://doi.org/10.1017/S1431927621013751.
- 52. Ganji, M., Shaltiel, I. A., Bisht, S., Kim, E., Kalichava, A., Haering, C. H., and Dekker, C. (2018) Real-time imaging of DNA loop extrusion by condensing, *Science*, **360**, 102-105, https://doi.org/10.1126/science.aar7831.
- 53. Davidson, I. F., Bauer, B., Goetz, D., Tang, W., Wutz, G., and Peters, J. M. (2019) DNA loop extrusion by human cohesin, *Science*, **366**, 1338-1345, https://doi.org/10.1126/science.aaz3418.
- 54. Kim, Y., Shi, Z., Zhang, H., Finkelstein, I. J., and Yu, H. (2019) Human cohesin compacts DNA by loop extrusion, *Science*, **366**, 1345-1349, https://doi.org/10.1126/science.aaz4475.
- 55. Kong, M., Cutts, E. E., Pan, D., Beuron, F., Kaliyappan, T., Xue, C., Morris, E. P., Musacchio, A., Vannini, A., and Greene, E. C. (2020) Human condensin I and II drive extensive ATP-dependent compaction of nucleosome-bound DNA, *Mol. Cell*, 79, 99-114, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.026.
- 56. Kim, E., Kerssemakers, J., Shaltiel, I. A., Haering, C. H., and Dekker, C. (2020) DNA-loop extruding condensin complexes can traverse one another, *Nature*, **579**, 438-442, https://doi.org/10.1038/s41586-020-2067-5.
- 57. Visnapuu, M. L., and Greene, E. C. (2009) Single-molecule imaging of DNA curtains reveals intrinsic energy land-scapes for nucleosome deposition, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 1056-1062, https://doi.org/10.1038/nsmb.1655.
- 58. Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution, *Nature*, **389**, 251-260, https://doi.org/10.1038/38444.
- 59. Markert, J. W., Vos, S. M., and Farnung, L. (2023) Structure of the complete *S. cerevisiae* Rpd3S-nucleosome complex, *bioRxiv*, https://doi.org/10.1101/2023.08.03.551877.
- 60. Van Emmerik, C. L., and van Ingen, H. (2019) Unspinning chromatin: revealing the dynamic nucleosome landscape by NMR, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **110**, 1-19, https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2019.01.002.
- 61. Ackermann, B. E., and Debelouchina, G. T. (2021) Emerging contributions of solid-state NMR spectroscopy to chromatin structural biology, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 741581, https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.741581.
- 62. Shi, X., Kannaian, B., Prasanna, C., Soman, A., and Nordenskiöld, L. (2023) Structural and dynamical investigation of histone H2B in well-hydrated nucleosome core particles by solid-state NMR, *Commun. Biol.*, **6**, 672, https://doi.org/10.1038/s42003-023-05050-3.

- 63. Melters, D. P., Neuman, K. C., Bentahar, R. S., Rakshit, T., and Dalal, Y. (2023) Single molecule analysis of CENP-A chromatin by high-speed atomic force microscopy, *Elife*, **12**, e86709, https://doi.org/10.7554/eLife.86709.
- 64. Heenan, P. R., and Perkins, T. T. (2019) Imaging DNA equilibrated onto mica in liquid using biochemically relevant deposition conditions, *ACS Nano*, **13**, 4220-4229, https://doi.org/10.1021/acsnano.8b09234.
- 65. Sanchez, H., Kertokalio, A., van Rossum-Fikkert, S., Kanaar, R., and Wyman, C. (2013) Combined optical and topographic imaging reveals different arrangements of human RAD54 with presynaptic and postsynaptic RAD51-DNA filaments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 11385-11390, https://doi.org/10.1073/pnas.1306467110.
- 66. Rahman, M., Boggs, Z., Neff, D., and Norton, M. (2018) The Sapphire (0001) Surface: a transparent and ultraflat substrate for DNA nanostructure imaging, *Langmuir*, **34**, 15014-15020, https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01851.
- 67. Johnson, A. S., Nehl, C. L., Mason, M. G., and Hafner, J. H. (2003) Fluid electric force microscopy for charge density mapping in biological systems, *Langmuir*, **19**, 10007-10010, https://doi.org/10.1021/la035255f.
- 68. Gramse, G., Gomila, G., and Fumagalli, L. (2012) Quantifying the dielectric constant of thick insulators by electrostatic force microscopy: effects of the microscopic parts of the probe, *Nanotechnology*, **23**, 205703, https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/20/205703.

STUDYING THE STRUCTURE AND FUNCTION OF NUCLEOSOMES BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY

Review

A. A. Ukraintsev^{1#}, M. M. Kutuzov^{1#}, and O.I. Lavrik^{1,2*}

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

² Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia

Chromatin is an epigenetic platform for the implementation of DNA-dependent processes. The nucleosome, as the basic level of chromatin compaction, largely determines its properties and structure. When studying the structure and functions of nucleosomes, physicochemical tools are actively used, such as magnetic and optical "tweezers," "DNA curtains," nuclear magnetic resonance, X-ray diffraction analysis and cryoelectron microscopy, as well as optical methods based on FRET. Despite the fact that these approaches make it possible to determine a wide range of structural and functional characteristics of chromatin and nucleosomes with high spatial and temporal resolution, atomic-force microscopy (AFM) complements the capabilities of these methods. This review presents the results of structural studies of nucleosomes in view of the development of the AFM method. The capabilities of AFM are considered in the context of the use of other physicochemical approaches.

Keywords: nucleosome, AFM, chromatin, single-molecule methods for studying biomolecules

УДК 577.218

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ И ОРГАНИЗАЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ КОНДЕНСАТОВ

Обзор

© 2024 А.А. Валяева^{1,2,3*}, Е.В. Шеваль^{2,3}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991 Москва, Россия; электронная почта: valyaeva.ann@gmail.com ² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия ³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра клеточной биологии и гистологии, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.10.2023 После доработки 19.11.2023 Принята к публикации 20.11.2023

Клетки эукариот отличаются высокой степенью компартментализации внутреннего содержимого, что обеспечивает точную и контролируемую регуляцию внутриклеточных процессов. Для реализации многих процессов, в том числе разных этапов транскрипции, в клетке формируются динамические безмембранные компартменты, называемые биомолекулярными конденсатами. Транскрипционные конденсаты, содержащие различные транскрипционные факторы и РНК-полимеразу, формируются за счет высоко- и низкоспецифичных взаимодействий между белками, ДНК и находящимися поблизости РНК. В данном обзоре обсуждаются новые данные, демонстрирующие важную роль низкоспецифичных мультивалентных белок-белковых и РНК-белковых взаимодействий в организации и регуляции транскрипции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: транскрипция, РНК, РНК-полимераза, транскрипционные конденсаты, природно неупорядоченные домены.

DOI: 10.31857/S0320972524040087 **EDN:** ZFGMNJ

ВВЕДЕНИЕ

Экспрессия генов в ядре обеспечивается активностью трех РНК-полимераз — РНК-полимеразы I (RNAPI), осуществляющей транскрипцию предшественника 25S, 18S и 5,8S рибосомных РНК (рРНК), РНК-полимеразы II (RNAPII), осуществляющей транскрипцию большей части матричных РНК (мРНК), а также РНК-полимеразы III (RNAPIII), которая осуществляет транскрипцию рибосомной 5S-рРНК, тРНК, 7SL РНК и некоторых других малых РНК. Регуляция транскрипции представляет собой сложный процесс, в который, даже в самых

простых случаях, вовлечено множество различных белков и РНК, аккумулирующихся в целевых сайтах клеточного ядра. Классическим примером такой аккумуляции является ядрышко – самая крупная органелла ядра, в которой происходит транскрипция и процессинг пре-рРНК, а также сборка пре-рибосом [1, 2].

Важнейшей особенностью клеточного ядра, которая обеспечивает возможность осуществлять транскрипцию и гибко ее регулировать, является высокая подвижность ядерных белков. Еще в 2000 году были получены первые данные о том, что многие белки в составе ядрышка, интерхро-

Принятые сокращения: ГК – гранулярный компонент ядрышка; ПФК – плотный фибриллярный компонент ядрышка; СТD – *C*-концевой домен РНК-полимеразы II; FBL – фибрилларин; IDR – природно неупорядоченный домен; PRC2 – Polycomb-репрессивный комплекс 2; RNAPI – PHK-полимераза I; RNAPII – PHK-полимераза III.

^{*} Адресат для корреспонденции.

матиновых гранул и хроматина связаны со структурами не стабильно, а находятся в постоянном достаточно быстром обмене с окружающей нуклеоплазмой [3, 4]. В рамках данного обзора особый интерес представляет характер связи и обмена транскрипционных факторов, которые отвечают за осуществление относительно продолжительного процесса - транскрипции. Теоретически транскрипция могла бы быть активирована при постоянном связывании транскрипционных факторов с промоторами. Однако уже первые эксперименты показали, что глюкокортикоидный рецептор, который при связывании с хроматином модулирует экспрессию генов гормонозависимым образом, подвергается быстрому обмену между целевым сайтом на хроматине и окружающей нуклеоплазмой [3]. Позднее было показано, что глюкокортикоидный рецептор и белок, взаимодействующий с глюкокортикоидным рецептором 1 (GRIP-1), находятся в динамическом равновесии с промотором и должны многократно возвращаться к матрице в ходе активации транскрипции [5]. Другие транскрипционные факторы также связаны с промоторами динамично, находясь на самом промоторе в течение относительно небольшого времени – от долей секунды до нескольких десятков секунд [6]. Динамическая сборка на промоторе была показана и для субъединиц RNAPII [7].

Высокая скорость обмена была показана и для некоторых факторов транскрипции рРНК – UBF [8–10], TAFI48, PAF53 и TIF-IA/Rrn3 [9]. Динамическое поведение демонстрировали на промоторе и субъединицы RNAPI, что свидетельствовало о стохастичности и малой эффективности сборки комплексов, необходимых для транскрипции [9].

Поведение транскрипционных факторов описывается моделью 3D-сканирования генома (3D genome-scanning model) [6] или, как иногда говорят, моделью диффузии и сродства (diffusion and affinity model). Данная модель предполагает, что белки свободно и с большой скоростью диффундируют во всем объеме ядра, периодически взаимодействуя с его компонентами. Большая часть таких взаимодействий неспецифична и нефункциональна. Однако при взаимодействии с целевыми сайтами благодаря высокоаффинным взаимодействиям белки могут временно иммобилизироваться, что с некоторой, по-видимому, весьма невысокой вероятностью может завершаться формированием функциональных макромолекулярных комплексов.

Однако эта модель не в состоянии описать все количественные закономерности, связанные с регуляцией активности генома. Например, были представлены расчеты, что скорость, с которой белки находят свои сайты на ДНК в бактериальных клетках, примерно в 100 раз выше, чем прогнозируется только на основе диффузии [11, 12].

В настоящее время предложено несколько механизмов, которые способны повышать эффективность накопления белков, а также точность такого накопления. Как минимум некоторые из этих механизмов зависят преимущественно от низкоспецифичных взаимодействий между молекулами, что может приводить, в частности, к формированию безмембранных структур, которые в настоящее время принято называть биомолекулярными конденсатами, аккумулирующими молекулы, необходимые для эффективной транскрипции. Так как формирование конденсатов во многих случаях зависит от взаимодействия между белками и РНК, в рамках данного обзора мы последовательно рассмотрим роль белков и РНК, участвующих в организации и регуляции транскрипции путем формирования транскрипционных конденсатов.

КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ТРАНСКРИПЦИИ

Регуляция транскрипции генов базируется, прежде всего, на многочисленных высокоаффинных (специфических) взаимодействиях различных белков с энхансерами и промоторами. Так, активация транскрипции зависит от взаимодействия комплекса Mediator с энхансером и промотором, что облегчает посадку RNAPII в ходе инициации транскрипции [13, 14]. Однако ряд данных свидетельствует, что инициация транскрипции может приводить к формированию достаточно значительных по размеру комплексов - транскрипционных фабрик, внутри которых концентрируется множество транскрибируемых генов. Такая гипотеза привлекательна, прежде всего, тем, что позволяет надеяться на согласованную регуляцию множества генов, собранных в рамках одной транскрипционной фабрики. В пользу существования таких комплексов, прежде всего, свидетельствуют микроскопические данные о формировании кластеров молекул RNAPII в ядрах животных [15-20]. Эти данные изначально были получены методами обычной флуоресцентной, а не локализационной микроскопии с супер-разрешением, которая позволяет определять число молекул в определенной области. Результаты, полученные методами микроскопии с супер-разрешением, свидетельствуют о том, что транскрипционные фабрики невелики и преимущественно образованы всего несколькими молекулами RNAPII [21].

В составе транскрипционных фабрик также аккумулируются субъединицы комплекса Mediator [22]. Предполагается, что крупные кластеры RNAPII и комплекса Mediator (<10% от всех кластеров) могут быть идентичны описанным ранее кластерам супер-энхансеров. Экспрессия

некоторых важных генов контролируется множеством энхансеров (супер-энхансерами) [23–27]. Опубликованные данные свидетельствуют, что крупные кластеры RNAPII и комплекса Mediator, как правило, перекрываются с супер-энхансер-содержащими локусами [22, 28–30].

Прижизненные наблюдения свидетельствуют о том, что такие транскрипционные фабрики формируются как динамические, коротко живущие агрегаты, включающие молекулы RNAPII [31–33]. Похожая ситуация показана и для транскрипционных факторов Zelda и Bicoid в развивающихся эмбрионах дрозофилы [34]. Оба эти фактора образуют динамические короткоживущие конденсаты, которые временно взаимодействуют с участками активной Bicoid-зависимой транскрипции, активируя ее.

Наконец, следует учитывать микроскопические результаты визуализации транскрипции длинных генов. Такие гены образуют достаточно протяженные петли, вдоль которых, по-видимому, движутся молекулы RNAPII [35, 36]. Эти петли напоминают петли в хромосомах типа ламповых щеток [37–39]. Таким образом, последние данные не подтверждают идею о существовании высокоупорядоченных транскрипционных фабрик, скорее, речь идет о высокодинамичных комплексах. Такие комплексы в настоящее время принято называть транскрипционными конденсатами [40].

РОЛЬ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ФОРМИРОВАНИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ КОНДЕНСАТОВ

Представления о биомолекулярных конденсатах возникли при изучении безмембранных органелл [41, 42]. Позднее эти представления были распространены на любые комплексы, которые не демонстрируют стехиометричности своего соста-

ва [43]. В формировании таких комплексов – вне зависимости от их размера – важную роль играют многочисленные низкоаффинные взаимодействия между молекулами. Ключевую (но не исключительную) роль в этом играют взаимодействия, в которые вовлечены природно неупорядоченные домены белков (IDR) [44-47] (рис. 1, a и б). Важное значение также имеют мультивалентные взаимодействия с участием структурированных доменов [48, 49]. По роли в формировании конденсатов белковые молекулы разделяют на молекулы-скэффолды (scaffold molecules), т.е. молекулы, вовлеченные в мультивалентные взаимодействия и способствующие формированию конденсатов, и белки-клиенты (client proteins), накапливающиеся в уже сформированных конденсатах [49]. IDR, хотя и не обладают высокой аффинностью, но, так же как высокоаффинные РНК-связывающие домены, могут быть основой для мультивалентных взаимодействий: либо в случае большой протяженности IDR, либо в случае олигомеризации белковых молекул (рис. 1, в).

В пользу того, что транскрипция может сопровождаться формированием биомолекулярных конденсатов, свидетельствует способность некоторых белков, участвующих в транскрипции, к формированию конденсатов in vitro. Наиболее детальные данные имеются для некоторых белков ядрышка, особенно для двух ключевых ядрышковых белков – FBL и NPM1 [50]. Многие другие белки, которые вовлечены в различные аспекты регуляции активности генома, также способны формировать конденсаты in vitro (в ряде случаев анализ ограничивался IDR этих белков, однако даже такие данные, по-видимому, достаточны для установления потенциальной способности белков участвовать в образовании биомолекулярных конденсатов). Так, к ним относятся компоненты комплекса Mediator и RNAPII [22, 28, 29], TAZ [51], BRD4 [28], факторы транскрипции ОСТ4 [52] и TAF15 [53].

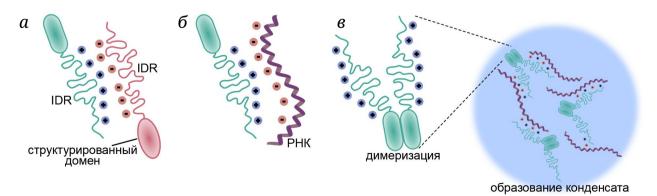


Рис. 1. Роль природно неупорядоченных доменов (IDR) в формировании биомолекулярных конденсатов. a – Электростатические взаимодействия между IDR белков в случае присутствия доменов с разным зарядом. b – Взаимодействия между IDR белка и РНК. b – Формирование биомолекулярного конденсата за счет мультивалентных взаимодействий, обеспечиваемых димерами белков со связывающими молекулы РНК IDR

Одно из наиболее эффектных подтверждений того, что в ходе активации транскрипции происходит формирование биомолекулярных конденсатов, зависящих от IDR, получено при изучении сигнального пути Wnt/β-катенин [54]. β-Катенин при активации сигнального пути транслоцируется в ядро, где образует комплекс с транскрипционными факторами LEF/TCF. Этот комплекс рекрутирует дополнительные кофакторы и усиливает экспрессию целевых генов. LEF1 вместе с β-катенином способен формировать биомолекулярные конденсаты как *in vitro*, так и *in vivo*, причем формирование этих конденсатов необходимо для активации транскрипции. Примечательно, что LEF1 с нарушенным IDR теряет свою активность, которая может быть восстановлена путем замены на природно неупорядоченный домен другого белка (Fused in sarcoma, FUS). Это лишний раз подчеркивает роль неспецифических взаимодействий в процессах регуляции транскрипции.

Также были получены данные о том, что IDR могут не только повышать эффективность транскрипции за счет привлечения разных белковых молекул в транскрипционные конденсаты, но и повышать точность узнавания транскрипционными факторами промоторов. Транскрипционные факторы содержат ДНК-связывающие домены, которые специфически связываются с короткими мотивами последовательностей ДНК. Однако ДНКсвязывающие домены занимают лишь часть последовательностей транскрипционных факторов, большая же часть последовательностей этих белков имеют низкую сложность и лишены стабильной 3D-структуры [55–57]. Как уже упоминалось выше, IDR не способны реализовывать высокоаффинные и высокоспецифические взаимодействия. Однако такие участки способны «направлять» транскрипционные факторы к определенным геномным локусам (т.е. повышать специфичность узнавания промотора), действуя совместно с высокоаффинными ДНК-связывающими доменами [58-60].

РОЛЬ *С*-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА RNAPII В ОРГАНИЗАЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ КОНДЕНСАТОВ

Особую роль в организации процессов транскрипции играет *С*-концевой домен RNAPII (CTD). СТD представляет собой IDR, который содержит множество гептадных повторов с консенсусной последовательностью Туг 1-Ser 2-Pro 3-Thr 4-Ser 5-Pro 6-Ser 7 [61–63]. У различных организмов длина СТD варьирует в широких пределах – от 26 повторов (у *Saccharomyces cerevisiae*) до 52 повторов (у человека).

При экспрессии в клетках CTD накапливается в сайтах активной транскрипции, что может говорить о его потенциальной роли в накоплении RNAPII в целевых сайтах [64]. Данные о его непосредственной роли в процессе транскрипции противоречивы. Каталитическая активность RNAPII обеспечивается консервативными субъединицами фермента RPB1 и RPB2, но не CTD [65], и поэтому кажется логичным, что RNAPII с делетированным CTD может осуществлять транскрипцию in vitro, но не *in vivo* [66]. Этот вопрос изучался разными авторами, но наиболее свежее исследование, проведенное с использованием клеток Raji, говорит о том, что CTD не является обязательным для транскрипции в живых клетках [67]. Представленные в этой работе данные свидетельствуют, что CTD необходим не столько для транскрипции per se, сколько для точной посадки RNAPII в целевые сайты, а также регуляции процессов, связанных с транскрипцией, и созревания транскриптов.

Последовательности CTD человека и дрожжей способны формировать конденсаты in vitro, при этом образующиеся агрегаты имеют сферическую форму и включают в себя интактную RNAPII [68]. Важно, что способность к кластеризации RNAPII в ядре коррелирует с числом гептадных повторов: укорочение человеческого СТD до длины СТD из дрожжей уменьшает накапливаемую концентрацию RNAPII и ее ассоциацию с хроматином в клетках человека, а удлинение повторов увеличивает кластеризацию молекул RNAPII [69]. Моделирование подтверждает, что длина CTD способствует посадке молекул RNAPII на промотор и замедляет их освобождение с него, а также что взаимодействие CTD-CTD позволяет концентрировать множество молекул RNAPII в одной точке. Также несколько работ свидетельствуют о том, что CTD участвует в привлечении комплекса Mediator [22, 28, 70]. А разрушение комплекса Mediator ведет к распаду крупных комплексов гипофосфорилированной RNAPII [71].

Процитированные выше работы свидетельствуют о том, что формирование биомолекулярных конденсатов, которые аккумулируют RNAPII, различные транскрипционные факторы и другие белки, может быть ключевым механизмом интенсификации процессов транскрипции. Однако этот механизм может быть малоэффективным у S. cerevisiae, так как CTD у этого организма намного короче, чем, например, у человека, а более длинный CTD приводит к более сильным взаимодействиям CTD-CTD и формированию менее динамичных конденсатов [68]. Нельзя исключать, что именно по этой причине в ядрах S. cerevisiae молекулы RNAPII не формируют кластеров, как это типично для ядер клеток человека [72]. Наблюдения над единичными молекулами RNAPII в клетках

живых дрожжей показали, что СТD отвечает за ограничение диффузии RNAPII в области ядра, обогащенной активными генами, но без видимого формирования конденсатов. В случае укорочения СТD наблюдалось нарушение ограничения диффузии, увеличивалось время поиска целевого сайта, нарушалось формирование преинициаторного комплекса. По мнению авторов работы, эти отличия могут быть связаны с особенностями организации транскрипции в условиях небольшого ядра дрожжевых клеток, где все компоненты собраны в ограниченной области, что делает формирование транскрипционных конденсатов избыточным [72].

Важные данные были получены с помощью оптогенетической системы, которая позволяет индуцировать биомолекулярные конденсаты на основе IDR транскрипционных регуляторов семейства FET (таких как FUS, Ewings sarcoma (EWS) и TAF15) [73]. IDR этих белков способны инициировать процесс разделения фаз в живых клетках, при этом TAF15 способен взаимодействовать с CTD RNAPII, привлекая молекулы RNAPII в состав конденсатов. Интересно, что зарождающиеся кластеры СТD в праймированных геномных локусах снижают энергетический барьер для роста конденсатов TAF15, которые, в свою очередь, дополнительно рекрутируют RNAPII для запуска транскрипции. Таким образом, авторы выявили механизм, который по принципу положительной обратной связи усиливает накопление RNAPII в сайтах транскрипции, что ведет к повышению эффективности транскрипции. При этом полученные данные свидетельствуют, что элонгация происходит вне индуцированных конденсатов, так как молекулы RNAPII с немодифицированным CTD колокализуются с конденсатами IDR TAF15, а фосфорилированный СТD высвобождается в окружающую область.

Таким образом, имеющиеся данные показывают, что неспецифические взаимодействия неупорядоченного СТD RNAPII способны повышать эффективность транскрипции. При этом следует учитывать, что многие данные, на которых базируются представления о механизмах формирования транскрипционных конденсатов и роли IDR в их образовании, получены в результате опытов *in vitro* или опытов с самими IDR, а не с целыми белками. В составе интактных белков IDR могут вести себя иначе. Так, в недавней работе были представлены данные в пользу того, что IDR недостаточны для индукции кластеризации транскрипционных факторов [74], т.е. этот вопрос требует дальнейшего изучения.

ДВА ТИПА ТРАНСКРИПЦИОННЫХ КОНДЕНСАТОВ ОБЕСПЕЧИВАЮТ РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ИНИЦИАЦИИ И ЭЛОНГАЦИИ

Внедренные в последние годы методы микроскопии с супер-разрешением позволяют оценивать расстояние между транскрипционными факторами и зарождающимися транскриптами. Так, в случае генов Pou5f1 и Nanog зарождающиеся транскрипты находились ближе к элонгирующим молекулам RNAPII, но были удалены от локусов, обогащенных фактором транскрипции SOX2 и BRD4 [75]. Эти наблюдения свидетельствуют о пространственном разделении комплексов элонгации и инициации. Интересно, что результаты, полученные на репортерном гене HIV-1, показывают, что комплекс инициации (инициаторный конденсат) существует в течение относительно непродолжительного времени (~1 мин), за которое в зону промотора рекрутируются молекулы RNAPII [76]. По-видимому, в ходе транскрипции (и последующего сплайсинга и транспорта из ядра) молекулы

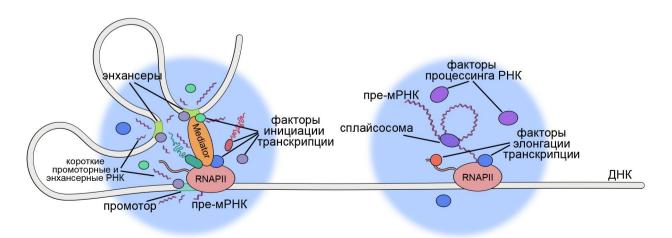


Рис. 2. Модели инициаторного и элонгационного конденсатов, обеспечивающих регуляцию транскрипции РНК-полимеразой II (RNAPII)

проходят через несколько конденсатов, что позволяет добиться высокой эффективности каждого из этапов жизненного цикла молекул РНК [77].

Таким образом, к настоящему времени получены достаточно убедительные данные о существовании конденсатов, в которых концентрируются компоненты, вовлеченные в инициацию транскрипции (рис. 2). Несколько более спорной видится ситуация с существованием элонгационных конденсатов. Как уже упоминалось выше, длинные гены формируют протяженные петли, вдоль которых во время транскрипции движутся молекулы RNAPII [35, 36]. Вероятнее всего, описанные закономерности могут быть распространены и на все остальные гены, однако это требует экспериментального подтверждения хотя бы основных положений. Тем не менее эти морфологические наблюдения плохо стыкуются с представлениями о существовании обособленных элонгационных конденсатов. Дальнейшие эксперименты смогут уточнить эти данные и снять существующие противоречия.

РОЛЬ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ОРГАНИЗАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ПРЕ-рРНК

Ядрышко представляет собой результат транскрипции с относительно небольших участков генома, содержащих множество генов рРНК, которые получили название ядрышковых организаторов [78]. В ядрышках накапливается примерно 80 рибосомных белков и более 200 факторов сборки пре-рибосом [79]. Кроме того, ядрышко содержит большое количество других белков, которые не имеют отношения или имеют только опосредованное отношение к главной функции ядрышка – производству пре-рибосом [80].

По сравнению с большинством ядерных телец, ядрышки имеют относительно сложную внутреннюю организацию. Активные ядрышки млекопитающих, птиц и некоторых рептилий состоят из трех отдельных субкомпартментов: фибриллярного центра (ФЦ), плотного фибриллярного компонента (ПФК) и гранулярного компонента (ГК), которые хорошо видны при электронной микроскопии [81, 82]. ПФК и ГК формируются в процессе биогенеза рибосом.

Транскрипция рДНК происходит на границе ФЦ и ПФК; как следствие, ПФК представляет собой скопление белков, вовлеченных в ранний процессинг пре-рРНК. Основную роль в поддержании структурной целостности этого субкомпартмента ядрышка играет белок фибрилларин (FBL), который связывается с молекулами пре-рРНК еще в ходе транскрипции [83]. Таким образом, тран-

скрибируемые молекулы пре-рРНК нуклеируют формирование ПФК, в котором одновременно происходит и транскрипция, и первые этапы процессинга пре-рРНК. Важно, что этот процесс зависит от неупорядоченного N-концевого участка FBL, обогащенного глицинами и аргининами (GARдомена) [83]. FBL представляет собой крайне консервативную метилтрансферазу, аминокислотная последовательность и пространственная структура которой мало изменились от архей до высших эукариот [84]. Появление GAR-домена, по-видимому, позволило FBL приобрести дополнительные функции, необходимые для белка в составе намного более сложных эукариотических клеток. В частности, этот домен играет роль сигнала ядерной локализации [85]. Еще одной такой функцией можно считать участие GAR-домена в организации ПФК [83].

ГК традиционно рассматривается в качестве компартмента, где происходит процессинг прерРНК и сборка пре-рибосом. Поддержание структурной целостности ГК определяется динамическими взаимодействиями между пре-рибосомами, в чем ключевую роль играет белок NPM1 [86]. По мере созревания свойства ГК меняются, что обеспечивает направленность транспорта пре-рибосом от ПФК к периферии ядрышка [87].

Таким образом, как и в случае транскрипционных конденсатов RNAPII, внутри ядрышка формируется несколько конденсатов, что задает направленность процессу перемещения молекул синтезированных пре-рРНК.

РОЛЬ СИНТЕЗИРУЕМЫХ ТРАНСКРИПТОВ В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Нуклеация процессов разделения фаз при формировании биомолекулярных конденсатов во многих случаях зависит от молекул РНК, которые являются удачным субстратом для мультивалентных взаимодействий. Ниже разбираются ключевые работы, которые свидетельствуют о том, что молекулы РНК могут быть вовлечены в низкоспецифические взаимодействия, участвующие в регуляции транскрипции.

Разнообразные РНК и сам процесс транскрипции влияют на трехмерную структуру хроматина и на опосредованную состоянием хроматина экспрессию генов [88–92]. Активная транскрипция и накопление в генном локусе хроматин-ассоциированных транскриптов, к которым можно отнести пре-мРНК и другие зарождающиеся РНК, поддерживают открытое состояние хроматина посредством положительной обратной связи. Эта роль транскриптов в регуляции состояния хроматина и связанной с ним генной экспрессии, по-видимому,

обеспечивается как путем электростатических взаимодействий с одноименно заряженной ДНК и гистоновыми белками, имеющими противоположный заряд [93], так и путем связывания с различными белковыми факторами, входящими в состав хроматина [94].

Факторы транскрипции и модификации хроматина YY1, СТСF, DNMT1 и DNMT3A представляют собой примеры ДНК-связывающих факторов, чья ассоциация с хроматином может регулироваться зарождающимися транскриптами [95]. В случае повсеместно экспрессируемого транскрипционного фактора ҮҮ1 взаимодействие с зарождающимися РНК стабилизирует его расположение в сайтах связывания на хроматине - преимущественно в промоторных участках [96]. Обратное действие оказывают зарождающиеся РНК на ассоциацию с хроматином метилтрансфераз DNMT1 и DNMT3A [97, 98]. Для метилтрансферазы DNMT1, осуществляющей поддерживающее метилирование CpG-островков ДНК, с помощью методов полногеномного анализа РНК-белкового интерактома (fRIP-seg) показано взаимодействие с различными зарождающимися транскриптами [99], в том числе с мРНК собственного гена [100]. При этом DNMT1 предпочитает связывание с неканонической структурой G-квадруплекса, называемой pUG-фолд, причем аффинность связывания оказывается пропорциональна длине GU-повтора [100]. Взаимодействие с pUG-фолдом РНК предотвращает связывание DNMT1 с ДНК, тем самым ингибируя активность этого фермента. Однако некоторые длинные некодирующие РНК, наоборот, привлекают метилтрансферазу к конкретным участкам хроматина, не подавляя ее активности [101-105], или даже определяют ее локализацию в клетке [106].

Подобные антагонистичные отношения с зарождающимися транскриптами были обнаружены и для Polycomb-репрессивного комплекса 2 (PRC2) [107]. PRC2 представляет собой комплекс эпигенетической регуляции транскрипции, который метилирует остаток лизина 27 гистона Н3 и посредством этого участвует в подавлении генной экспрессии. В связи с выполняемой функцией PRC2 в первую очередь ассоциирован с CpG-островками в репрессированных генах. Однако с помощью высокопроизводительных методов секвенирования РНК, взаимодействующих с компонентами PRC2 (CLIP/iCLIP-seq), были продемонстрированы взаимодействия PRC2 с пре-мРНК большинства активных генов [107, 108]. Ингибирование RNAPII или деградация всей РНК в клетке приводили к рекрутированию PRC2 к хроматину активных генов [109-111], причем эффект был обратимым [112, 113]. В экспериментах in vitro было показано, что РНК вытесняет PRC2 из комплексов с нуклеосомами и ингибирует его каталитическую активность [107,

114-116], причем большую аффинность проявляют РНК, способные формировать G-квадруплексные структуры [112, 117]. Оттитровывая на себя комплексы PRC2, зарождающиеся транскрипты снижают вероятность связывания этих репрессивных комплексов с хроматином, тем самым предотвращая «замалчивание» своих генов. Также было выдвинуто предположение, что все события взаимодействия PRC2 с хроматином опосредованы «мостиком» из РНК [118]. Тем не менее наблюдаемые в эксперименте rChIP-seq свидетельства обязательного наличия РНК в комплексе с PRC2 для его размещения на хроматине [118], по-видимому, являются артефактом эксперимента и нормализации по причине того, что обработка иммунопреципитированного хроматина РНКазой А и соникация в растворе с низкой ионной силой приводят к снижению специфичности иммунопреципитации и увеличению фонового сигнала неспецифической преципитации хроматина [119, 120]. Таким образом, активная транскрипция, в результате которой образуются новые транскрипты, связывающие и иммобилизующие репрессивные эпигенетические регуляторы, поддерживает саму себя.

Вовлеченность зарождающихся транскриптов в регуляцию связывания хроматин-ассоциированных белковых факторов с хроматином, по-видимому, не ограничивается описанными выше случаями, а является намного более распространенным, чем считалось ранее, механизмом контроля структуры и состояния хроматина. Так, эксперименты по ингибированию транскрипции и деградации РНК в клетках показали, что при исчезновении РНК с хроматина одновременно происходят изменения хроматин-ассоциированного протеома [121, 122]. Остановка транскрипции и сопутствующее снижение числа зарождающихся транскриптов приводят к обогащению в хроматиновой фракции белков-модификаторов и факторов ремоделирования хроматина (ДНК-метилтрансферазы семейства DNMT, EHMT1/2, MLL2/SET1A, HUSH, NuRD, NURF, NoRC, CHRAC, NuA4, INO80, BAF, ATRX/DAXX, когезин, СТСF, SMCHD1, SAFB) и транскрипционных факторов (POU5F1, ZFP57, UBTF, TP53, MYBL2 и UTF1), в то время как число связанных с хроматином факторов процессинга РНК снижается. Аналогичная картина качественного изменения хроматин-ассоциированного протеома наблюдается в случае разрушения РНК [121]. При этом среди хроматин-ассоциированных белков оказывается большая доля известных РНК-связывающих белков [122]. Эти белки, часто обладая IDR или участками низкой сложности, благодаря связыванию с зарождающимися транскриптами, находящимися в непосредственной близости с RNAPII, способны обеспечить формирование биомолекулярных конденсатов по механизму

разделения фаз, что способствует концентрации необходимых для экспрессии генов факторов в сайте транскрипции.

РОЛЬ СИНТЕЗИРУЕМЫХ ТРАНСКРИПТОВ В ФОРМИРОВАНИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ КОНДЕНСАТОВ

Многие транскрипционные факторы, взаимодействующие с хроматином в регуляторных участках (промоторных, энхансерных), как оказалось, помимо ДНК-связывающего и эффекторного доменов, имеют консервативный РНК-связывающий домен, который напоминает аргинин-богатый мотив (ARM) белка Таt ВИЧ-1 [123]. Совместный анализ ДНК-белковых взаимодействий (ChIP-seq) и РНК-белковых интерактомов (CLIP-seq) нескольких факторов транскрипции (GATA1, YY1 и СТСF) продемонстрировал наличие взаимодействий данных факторов с РНК, происходящими из локусов, расположенных рядом с сайтами связывания факторов на хроматине (энхансерные, промоторные и зарождающиеся транскрипты). Мутации в ARM-подобном домене приводили к снижению экспрессии таргетных генов, а его делеция увеличила долю свободно диффундирующих в ядре транскрипционных факторов. Эти наблюдения дают основания предположить, что взаимодействия транскрипционных факторов с зарождающимися РНК посредством ARM-подобного домена могут способствовать образованию транскрипционных конденсатов и обеспечивать тонкую регуляцию генной экспрессии.

В соответствии с описанными наблюдениями кажется привлекательной модель организации транскрипционных конденсатов, опосредованной взаимодействием в локусе транскрипции зарождающихся РНК и белковых факторов, обладающих РНК-связывающими доменами и неструктурированными участками, способствующими образованию биомолекулярных конденсатов [122, 124]. В экспериментах, использующих in vitro и in silico системы, было продемонстрировано, что молекулы РНК (как промоторные, так и энхансерные) вне зависимости от своей последовательности способствовали образованию транскрипционных конденсатов, включающих в себя комплекс Mediator [125]. Однако такой эффект наблюдался только в небольшом диапазоне концентраций РНК при фиксированной концентрации комплекса Mediator. При таких концентрациях РНК в системе достигалось состояние равновесия между отрицательным зарядом нуклеиновой кислоты, пропорциональным ее длине, и положительным зарядом белковых факторов. Увеличение количества РНК, несущих отрицательный заряд, в системе приводило к нарушению равновесия и разрушению конденсата. Состоятельность предложенной авторами работы модели регуляции транскрипции по принципу отрицательной обратной связи при участии зарождающихся РНК была продемонстрирована также в in vivo экспериментах. Инициация транскрипции и появление коротких зарождающихся транскриптов приводили к образованию транскрипционного конденсата и сопутствующему повышению экспрессии репортерного гена. Однако при достижении избыточного уровня транскрипции и пороговой концентрации зарождающихся РНК происходило снижение экспрессии репортерного гена и разрушение временно образованных транскрипционных конденсатов, образуемых за счет неспецифических электростатических взаимодействий между синтезируемыми транскриптами и белковыми факторами [124-126]. Такой механизм регуляции генной экспрессии осуществляется в энхансерах посредством короткоживущих энхансерных РНК [125, 126]. При взаимодействии или слиянии энхансер- и промотор-ассоциированных конденсатов этот механизм может обеспечивать наблюдаемые для многих генов «взрывы» транскрипции [126, 127].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накопленные в последние годы данные свидетельствуют, что транскрипция сопровождается формированием молекулярных комплексов с нестехиометрическим составом - транскрипционных конденсатов. По-видимому, формирование таких конденсатов определяется сочетанием действия высокоаффинных, специфических взаимодействий и неспецифических взаимодействий между белками, РНК и участками ДНК, входящих в состав этих конденсатов. Как и в случае других описанных биомолекулярных конденсатов, транскрипционные конденсаты, в состав которых входит RNAPII, крайне динамичны. В то же время транскрипционные конденсаты, образованные в результате активности RNAPI, формируют стабильные безмембранные структуры – ядрышки. Тем не менее во многом формирование транскрипционных конденсатов сходно в случае RNAPI и RNAPII.

Ключевую роль в формировании транскрипционных конденсатов играют IDR белков, вовлеченных в транскрипцию. По-видимому, такие домены, хотя и участвуют в неспецифических взаимодействиях, способны существенно повышать эффективность и специфичность формирования комплексов, принимающих участие в транскрипции. Это касается разных процессов: и поиска целевого сайта в пространстве ядра, и взаимодействия отдельных компонентов друг с другом.

При этом важно, что в таких процессах могут быть задействованы положительные обратные связи, т.е. взаимодействие молекул ведет к формированию транскрипционного конденсата, что облегчает привлечение дополнительных молекул тех же белков, а также, вероятно, других, участвующих в процессе, молекул. Последнее особенно ярко видно на примере ядрышка, которое привлекает в свой состав множество разных молекул [80], с чем отчасти связана мультифункциональность этой структуры [128].

Важную роль в регуляции процессов транскрипции играют и сами новосинтезируемые транскрипты. Транскрипты, еще связанные с полимеразой, или РНК, задержавшиеся в транскрипционном конденсате, благодаря большому отрицательному заряду своего сахарофосфатного остова способны привлекать к сайту транскрипции РНКсвязывающие белки за счет неспецифических взаимодействий с положительно заряженными IDR, помимо специфических взаимодействий, обеспечиваемых вторичными структурами РНК. Длина РНК, которая для разных типов РНК может варьировать от нескольких десятков до нескольких тысяч нуклеотидов, обеспечивает возможность мультивалентных взаимодействий с белками. Описанная способность зарождающихся транскриптов привлекать к сайту транскрипции белковые факторы может быть использована для создания инструментов регуляции генной экспрессии, задействующих системы CRISPR-Cas9 с активаторными доменами транскрипционных факторов [129].

Однако следует отметить, что многие идеи до сих пор не нашли полного экспериментального подтверждения. Так, до сих пор мало дан-

ных о структуре элонгационных транскрипционных конденсатов. Некоторые морфологические наблюдения говорят, что элонгация некоторых генов происходит на протяженных нитях ДНК, напоминающих петли хромосом типа ламповых щеток [35, 36]. Эти наблюдения не противоречат однозначно идее о существовании элонгационных конденсатов, хотя и вызывают некоторые сомнения. Кроме того, следует принимать во внимание данные о разрушении транскрипционных конденсатов под действием большой концентрации транскрибируемых молекул РНК [124–126]. Такое разрушение конденсатов как раз может облегчать перемещение молекул RNAPII вдоль молекулы ДНК. Эти вопросы требуют дальнейшего изучения.

Таким образом, высокая эффективность транскрипции и гибкость ее регуляции связана в значительной степени со слабыми, неспецифическими, но множественными взаимодействиями, которые ведут к формированию крайне динамичных на молекулярном уровне транскрипционных конденсатов.

Вклад авторов. А.А. Валяева и Е.В. Шеваль – сбор и обсуждение литературных данных, написание и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20134).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Scheer, U., and Hock, R. (1999) Structure and function of the nucleolus, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 385-390, https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80054-4.
- 2. Hernandez-Verdun, D., Roussel, P., Thiry, M., Sirri, V., and Lafontaine, D. L. J. (2010) The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **1**, 415-431, https://doi.org/10.1002/wrna.39.
- 3. McNally, J. G., Müller, W. G., Walker, D., Wolford, R., and Hager, G. L. (2000) The glucocorticoid receptor: rapid exchange with regulatory sites in living cells, *Science*, **287**, 1262-1265, https://doi.org/10.1126/science.287.5456.1262.
- 4. Phair, R. D., and Misteli, T. (2000) High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus, *Nature*, **404**, 604-609, https://doi.org/10.1038/35007077.
- 5. Becker, M., Baumann, C., John, S., Walker, D. A., Vigneron, M., McNally, J. G., and Hager, G. L. (2002) Dynamic behavior of transcription factors on a natural promoter in living cells, *EMBO Rep.*, **3**, 1188-1194, https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf244.
- 6. Phair, R. D., Scaffidi, P., Elbi, C., Vecerová, J., Dey, A., Ozato, K., Brown, D. T., Hager, G., Bustin, M., and Misteli, T. (2004) Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins, *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 6393-6402, https://doi.org/10.1128/MCB.24.14.6393-6402.2004.
- 7. Kimura, H., Sugaya, K., and Cook, P. R. (2002) The transcription cycle of RNA polymerase II in living cells, *J. Cell Biol.*, **159**, 777-782, https://doi.org/10.1083/jcb.200206019.

- 8. Chen, D., and Huang, S. (2001) Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells, *J. Cell Biol.*, **153**, 169-176, https://doi.org/10.1083/jcb.153.1.169.
- 9. Dundr, M., Hoffmann-Rohrer, U., Hu, Q., Grummt, I., Rothblum, L. I., Phair, R. D., and Misteli, T. (2002) A kinetic framework for a mammalian RNA polymerase *in vivo*, *Science*, **298**, 1623-1626, https://doi.org/10.1126/science.1076164.
- 10. Stixová, L., Bártová, E., Matula, P., Daněk, O., Legartová, S., and Kozubek, S. (2011) Heterogeneity in the kinetics of nuclear proteins and trajectories of substructures associated with heterochromatin, *Epigenetics Chromatin*, 4, 5, https://doi.org/10.1186/1756-8935-4-5.
- 11. Mirny, L., Slutsky, M., Wunderlich, Z., Tafvizi, A., Leith, J., and Kosmrlj, A. (2009) How a protein searches for its site on DNA: the mechanism of facilitated diffusion, *J. Phys. A Math. Theor.*, **42**, 434013, https://doi.org/10.1088/1751-8113/42/43/434013.
- 12. Jana, T., Brodsky, S., and Barkai, N. (2021) Speed-specificity trade-offs in the transcription factors search for their genomic binding sites, *Trends Genet.*, **37**, 421-432, https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.12.001.
- 13. Richter, W. F., Nayak, S., Iwasa, J., and Taatjes, D. J. (2022) The Mediator complex as a master regulator of transcription by RNA polymerase II, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 732-749, https://doi.org/10.1038/s41580-022-00498-3.
- 14. Rengachari, S., Schilbach, S., and Cramer, P. (2023) Mediator structure and function in transcription initiation, *Biol. Chem.*, **404**, 829-837, https://doi.org/10.1515/hsz-2023-0158.
- 15. Bregman, D. B., Du, L., van der Zee, S., and Warren, S. L. (1995) Transcription-dependent redistribution of the large sub-unit of RNA polymerase II to discrete nuclear domains, *J. Cell Biol.*, 129, 287-298, https://doi.org/10.1083/jcb.129.2.287.
- 16. Van Steensel, B., Brink, M., van der Meulen, K., van Binnendijk, E. P., Wansink, D. G., de Jong, L., de Kloet, E. R., and van Driel, R. (1995) Localization of the glucocorticoid receptor in discrete clusters in the cell nucleus, *J. Cell Sci.*, **108**, 3003-3011, https://doi.org/10.1242/jcs.108.9.3003.
- 17. Iborra, F. J., Pombo, A., Jackson, D. A., and Cook, P. R. (1996) Active RNA polymerases are localized within discrete transcription "factories" in human nuclei, *J. Cell Sci.*, **109**, 1427-1436, https://doi.org/10.1242/jcs.109.6.1427.
- 18. Grande, M. A., van der Kraan, I., de Jong, L., and van Driel, R. (1997) Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II, *J. Cell Sci.*, **110**, 1781-1791, https://doi.org/10.1242/jcs.110.15.1781.
- 19. Pombo, A., Jackson, D. A., Hollinshead, M., Wang, Z., Roeder, R. G., and Cook, P. R. (1999) Regional specialization in human nuclei: visualization of discrete sites of transcription by RNA polymerase III, *EMBO J.*, **18**, 2241-2253, https://doi.org/10.1093/emboj/18.8.2241.
- 20. Osborne, C. S., Chakalova, L., Brown, K. E., Carter, D., Horton, A., Debrand, E., Goyenechea, B., Mitchell, J. A., Lopes, S., Reik, W., and Fraser, P. (2004) Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription, *Nat. Genet.*, **36**, 1065-1071, https://doi.org/10.1038/ng1423.
- 21. Castells-Garcia, A., Ed-Daoui, I., González-Almela, E., Vicario, C., Ottestrom, J., Lakadamyali, M., Neguembor, M. V., and Cosma, M. P. (2022) Super resolution microscopy reveals how elongating RNA polymerase II and nascent RNA interact with nucleosome clutches, *Nucleic Acids Res.*, **50**, 175-190, https://doi.org/10.1093/nar/gkab1215.
- 22. Cho, W.-K., Spille, J.-H., Hecht, M., Lee, C., Li, C., Grube, V., and Cisse, I. I. (2018) Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates, *Science*, **361**, 412-415, https://doi.org/10.1126/science.aar4199.
- 23. Hnisz, D., Abraham, B. J., Lee, T. I., Lau, A., Saint-André, V., Sigova, A. A., Hoke, H. A., and Young, R. A. (2013) Super-enhancers in the control of cell identity and disease, *Cell*, **155**, 934-947, https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.053.
- 24. Whyte, W. A., Orlando, D. A., Hnisz, D., Abraham, B. J., Lin, C. Y., Kagey, M. H., Rahl, P. B., Lee, T. I., and Young, R. A. (2013) Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes, *Cell*, **153**, 307-319, https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.035.
- 25. Lovén, J., Hoke, H. A., Lin, C. Y., Lau, A., Orlando, D. A., Vakoc, C. R., Bradner, J. E., Lee, T. I., and Young, R. A. (2013) Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers, *Cell*, **153**, 320-334, https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.036.
- 26. Mansour, M. R., Abraham, B. J., Anders, L., Berezovskaya, A., Gutierrez, A., Durbin, A. D., Etchin, J., Lawton, L., Sallan, S. E., Silverman, L. B., Loh, M. L., Hunger, S. P., Sanda, T., Young, R. A., and Look, A. T. (2014) Oncogene regulation. An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element, *Science*, 346, 1373-1377, https://doi.org/10.1126/science.1259037.
- 27. Wang, X., Cairns, M. J., and Yan, J. (2019) Super-enhancers in transcriptional regulation and genome organization, *Nucleic Acids Res.*, 47, 11481-11496, https://doi.org/10.1093/nar/gkz1038.
- 28. Sabari, B. R., Dall'Agnese, A., Boija, A., Klein, I. A., Coffey, E. L., Shrinivas, K., Abraham, B. J., Hannett, N. M., Zamudio, A. V., Manteiga, J. C., Li, C. H., Guo, Y. E., Day, D. S., Schuijers, J., Vasile, E., Malik, S., Hnisz, D., Lee, T. I., Cisse, I. I., Roeder, R. G., Sharp, P. A., Chakraborty, A. K., and Young, R. A. (2018) Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control, *Science*, **361**, eaar3958, https://doi.org/10.1126/science.aar3958.
- 29. Guo, Y. E., Manteiga, J. C., Henninger, J. E., Sabari, B. R., Dall'Agnese, A., Hannett, N. M., Spille, J. H., Afeyan, L. K., Zamudio, A. V., Shrinivas, K., Abraham, B. J., Boija, A., Decker, T. M., Rimel, J. K., Fant, C. B., Lee, T. I., Cisse, I. I.,

- Sharp, P. A., Taatjes, D. J., and Young, R. A. (2019) Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates, *Nature*, **572**, 543-548, https://doi.org/10.1038/s41586-019-1464-0.
- 30. Shrinivas, K., Sabari, B. R., Coffey, E. L., Klein, I. A., Boija, A., Zamudio, A. V., Schuijers, J., Hannett, N. M., Sharp, P. A., Young, R. A., and Chakraborty, A. K. (2019) Enhancer features that drive formation of transcriptional condensates, *Mol. Cell*, 75, 549-561.e7, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.009.
- 31. Chen, X., Wei, M., Zheng, M. M., Zhao, J., Hao, H., Chang, L., Xi, P., and Sun, Y. (2016) Study of RNA polymerase II clustering inside live-cell nuclei using bayesian nanoscopy, *ACS Nano*, 10, 2447-2454, https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07257.
- 32. Cisse, I. I., Izeddin, I., Causse, S. Z., Boudarene, L., Senecal, A., Muresan, L., Dugast-Darzacq, C., Hajj, B., Dahan, M., and Darzacq, X. (2013) Real-time dynamics of RNA polymerase II clustering in live human cells, *Science*, **341**, 664-667, https://doi.org/10.1126/science.1239053.
- 33. Cho, W.-K., Jayanth, N., English, B. P., Inoue, T., Andrews, J. O., Conway, W., Grimm, J. B., Spille, J. H., Lavis, L. D., Lionnet, T., and Cisse, I. I. (2016) RNA Polymerase II cluster dynamics predict mRNA output in living cells, *Elife*, 5, e13617, https://doi.org/10.7554/eLife.13617.
- 34. Mir, M., Stadler, M. R., Ortiz, S. A., Hannon, C. E., Harrison, M. M., Darzacq, X., and Eisen, M. B. (2018) Dynamic multifactor hubs interact transiently with sites of active transcription in *Drosophila* embryos, *Elife*, 7, e40497, https://doi.org/10.7554/eLife.40497.
- 35. Leidescher, S., Ribisel, J., Ullrich, S., Feodorova, Y., Hildebrand, E., Galitsyna, A., Bultmann, S., Link, S., Thanisch, K., Mulholland, C., Dekker, J., Leonhardt, H., Mirny, L., and Solovei, I. (2022) Spatial organization of transcribed eukaryotic genes, *Nat. Cell Biol.*, **24**, 327-339, https://doi.org/10.1038/s41556-022-00847-6.
- 36. Ball, M. L., Koestler, S. A., Muresan, L., Rehman, S. A., O'Holleran, K., and White, R. (2023) The anatomy of transcriptionally active chromatin loops in *Drosophila* primary spermatocytes using super-resolution microscopy, *PLoS Genet.*, 19, e1010654, https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010654.
- 37. Morgan, G. T. (2007) Localized co-transcriptional recruitment of the multifunctional RNA-binding protein CELF1 by lampbrush chromosome transcription units, *Chromosome Res.*, **15**, 985-1000, https://doi.org/10.1007/s10577-007-1179-1.
- 38. Morgan, G. T. (2018) Imaging the dynamics of transcription loops in living chromosomes, *Chromosoma*, **127**, 361-374, https://doi.org/10.1007/s00412-018-0667-8.
- 39. Krasikova, A., Fishman, V., and Kulikova, T. (2023) Lampbrush chromosome studies in the post-genomic era, *Bioessays*, **45**, e2200250, https://doi.org/10.1002/bies.202200250.
- 40. Rippe, K., and Papantonis, A. (2021) RNA polymerase II transcription compartments: from multivalent chromatin binding to liquid droplet formation? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **22**, 645-646, https://doi.org/10.1038/s41580-021-00401-6.
- 41. Brangwynne, C. P., Eckmann, C. R., Courson, D. S., Rybarska, A., Hoege, C., Gharakhani, J., Jülicher, F., and Hyman, A. A. (2009) Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation, *Science*, **324**, 1729-1732, https://doi.org/10.1126/science.1172046.
- 42. Shin, Y., and Brangwynne, C. P. (2017) Liquid phase condensation in cell physiology and disease, *Science*, **357**, eaaf4382, https://doi.org/10.1126/science.aaf4382.
- 43. Bhat, P., Honson, D., and Guttman, M. (2021) Nuclear compartmentalization as a mechanism of quantitative control of gene expression, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **22**, 653-670, https://doi.org/10.1038/s41580-021-00387-1.
- 44. Elbaum-Garfinkle, S., Kim, Y., Szczepaniak, K., Chen, C. C.-H., Eckmann, C. R., Myong, S., and Brangwynne, C. P. (2015) The disordered P granule protein LAF-1 drives phase separation into droplets with tunable viscosity and dynamics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 7189-7194, https://doi.org/10.1073/pnas.1504822112.
- 45. Molliex, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, A. P., Kim, H. J., Mittag, T., and Taylor, J. P. (2015) Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization, *Cell*, 163, 123-133, https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.015.
- 46. Nott, T. J., Petsalaki, E., Farber, P., Jervis, D., Fussner, E., Plochowietz, A., Craggs, T. D., Bazett-Jones, D. P., Pawson, T., Forman-Kay, J. D., and Baldwin, A. J. (2015) Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles, *Mol. Cell*, 57, 936-947, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.013.
- 47. Pak, C. W., Kosno, M., Holehouse, A. S., Padrick, S. B., Mittal, A., Ali, R., Yunus, A. A., Liu, D. R., Pappu, R. V., and Rosen, M. K. (2016) Sequence determinants of intracellular phase separation by complex coacervation of a disordered protein, *Mol. Cell*, **63**, 72-85, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.042.
- 48. Li, P., Banjade, S., Cheng, H.-C., Kim, S., Chen, B., Guo, L., Llaguno, M., Hollingsworth, J. V., King, D. S., Banani, S. F., Russo, P. S., Jiang, Q. X., Nixon, B. T., and Rosen, M. K. (2012) Phase transitions in the assembly of multivalent signal-ling proteins, *Nature*, **483**, 336-340, https://doi.org/10.1038/nature10879.
- 49. Banani, S. F., Rice, A. M., Peeples, W. B., Lin, Y., Jain, S., Parker, R., and Rosen, M. K. (2016) Compositional control of phase-separated cellular bodies, *Cell*, **166**, 651-663, https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.010.
- 50. Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T. S., Mitrea, D. M., Zhu, L., Richardson, T. M., Kriwacki, R. W., Pappu, R. V., and Brangwynne, C. P. (2016) Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments, *Cell*, **165**, 1686-1697, https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.047.

- 51. Lu, Y., Wu, T., Gutman, O., Lu, H., Zhou, Q., Henis, Y. I., and Luo, K. (2020) Phase separation of TAZ compartmentalizes the transcription machinery to promote gene expression, *Nat. Cell Biol.*, **22**, 453-464, https://doi.org/10.1038/s41556-020-0485-0.
- 52. Boija, A., Klein, I. A., Sabari, B. R., Dall'Agnese, A., Coffey, E. L., Zamudio, A. V., Li, C. H., Shrinivas, K., Manteiga, J. C., Hannett, N. M., Abraham, B. J., Afeyan, L. K., Guo, Y. E., Rimel, J. K., Fant, C. B., Schuijers, J., Lee, T. I., Taatjes, D. J., and Young, R. A. (2018) Transcription factors activate genes through the phase-separation capacity of their activation domains, *Cell*, 175, 1842-1855.e16, https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.042.
- 53. Altmeyer, M., Neelsen, K. J., Teloni, F., Pozdnyakova, I., Pellegrino, S., Grøfte, M., Rask, M. D., Streicher, W., Jungmichel, S., Nielsen, M. L., and Lukas, J. (2015) Liquid demixing of intrinsically disordered proteins is seeded by poly(ADP-ribose), *Nat. Commun.*, **6**, 8088, https://doi.org/10.1038/ncomms9088.
- 54. Zhao, B., Li, Z., Yu, S., Li, T., Wang, W., Liu, R., Zhang, B., Fang, X., Shen, Y., Han, Q., Xu, X., Wang, K., Gong, W., Li, T., Li, A., Zhou, T., Li, W., and Li, T. (2023) LEF1 enhances β-catenin transactivation through IDR-dependent liquid-liquid phase separation, *Life Sci Alliance*, **6**, e202302118, https://doi.org/10.26508/lsa.202302118.
- 55. Liu, J., Perumal, N. B., Oldfield, C. J., Su, E. W., Uversky, V. N., and Dunker, A. K. (2006) Intrinsic disorder in transcription factors, *Biochemistry*, **45**, 6873-6888, https://doi.org/10.1021/bi0602718.
- 56. Minezaki, Y., Homma, K., Kinjo, A. R., and Nishikawa, K. (2006) Human transcription factors contain a high fraction of intrinsically disordered regions essential for transcriptional regulation, *J. Mol. Biol.*, **359**, 1137-1149, https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.04.016.
- 57. Staby, L., O'Shea, C., Willemoës, M., Theisen, F., Kragelund, B. B., and Skriver, K. (2017) Eukaryotic transcription factors: paradigms of protein intrinsic disorder, *Biochem. J.*, **474**, 2509-2532, https://doi.org/10.1042/BCJ20160631.
- 58. Brodsky, S., Jana, T., Mittelman, K., Chapal, M., Kumar, D. K., Carmi, M., and Barkai, N. (2020) Intrinsically disordered regions direct transcription factor *in vivo* binding specificity, *Mol. Cell*, **79**, 459-471.e4, https://doi.org/10.1016/j.mol-cel.2020.05.032.
- 59. Sandra, U. S., Shukla, A., and Kolthur-Seetharam, U. (2020) Search and capture: disorder rules gene promoter selection, *Trends Genet.*, **36**, 721-722, https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.07.005.
- 60. Jonas, F., Carmi, M., Krupkin, B., Steinberger, J., Brodsky, S., Jana, T., and Barkai, N. (2023) The molecular grammar of protein disorder guiding genome-binding locations, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 4831-4844, https://doi.org/10.1093/nar/gkad184.
- 61. Meinhart, A., Kamenski, T., Hoeppner, S., Baumli, S., and Cramer, P. (2005) A structural perspective of CTD function, *Genes Dev.*, **19**, 1401-1415, https://doi.org/10.1101/gad.1318105.
- 62. Eick, D., and Geyer, M. (2013) The RNA polymerase II carboxy-terminal domain (CTD) code, *Chem. Rev.*, **113**, 8456-8490, https://doi.org/10.1021/cr400071f.
- 63. Zaborowska, J., Egloff, S., and Murphy, S. (2016) The pol II CTD: new twists in the tail, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 771-777, https://doi.org/10.1038/nsmb.3285.
- 64. Lu, F., Portz, B., and Gilmour, D. S. (2019) The C-terminal domain of RNA polymerase II is a multivalent targeting sequence that supports *Drosophila* development with only consensus heptads, *Mol. Cell*, **73**, 1232-1242.e4, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.008.
- 65. Bernecky, C., Herzog, F., Baumeister, W., Plitzko, J. M., and Cramer, P. (2016) Structure of transcribing mammalian RNA polymerase II, *Nature*, **529**, 551-554, https://doi.org/10.1038/nature16482.
- 66. Zehring, W. A., Lee, J. M., Weeks, J. R., Jokerst, R. S., and Greenleaf, A. L. (1988) The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential in vivo but is not required for accurate transcription initiation *in vitro, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3698-3702, https://doi.org/10.1073/pnas.85.11.3698.
- 67. Yahia, Y., Pigeot, A., El Aabidine, A. Z., Shah, N., Karasu, N., Forné, I., Krebs, S., Blum, H., Esnault, C., Sexton, T., Imhof, A., Eick, D., and Andrau, J. C. (2023) RNA polymerase II CTD is dispensable for transcription and required for termination in human cells, *EMBO Rep.*, 24, e56150, https://doi.org/10.15252/embr.202256150.
- 68. Boehning, M., Dugast-Darzacq, C., Rankovic, M., Hansen, A. S., Yu, T., Marie-Nelly, H., McSwiggen, D. T., Kokic, G., Dailey, G. M., Cramer, P., Darzacq, X., and Zweckstetter, M. (2018) RNA polymerase II clustering through carboxy-terminal domain phase separation, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 833-840, https://doi.org/10.1038/s41594-018-0112-y.
- 69. Quintero-Cadena, P., Lenstra, T. L., and Sternberg, P. W. (2020) RNA Pol II length and disorder enable cooperative scaling of transcriptional bursting, *Mol. Cell*, **79**, 207-220.e8, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.030.
- 70. Flores-Solis, D., Lushpinskaia, I. P., Polyansky, A. A., Changiarath, A., Boehning, M., Mirkovic, M., Walshe, J., Pietrek, L. M., Cramer, P., Stelzl, L. S., Zagrovic, B., and Zweckstetter, M. (2023) Driving forces behind phase separation of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II, *Nat. Commun.*, 14, 5979, https://doi.org/10.1038/s41467-023-41633-8.
- 71. Jaeger, M. G., Schwalb, B., Mackowiak, S. D., Velychko, T., Hanzl, A., Imrichova, H., Brand, M., Agerer, B., Chorn, S., Nabet, B., Ferguson, F. M., Müller, A. C, Bergthaler, A., Gray, N. S., Bradner, J. E., Bock, C., Hnisz, D., Cramer, P., and Winter, G. E. (2020) Selective Mediator dependence of cell-type-specifying transcription, *Nat. Genet.*, **52**, 719-727, https://doi.org/10.1038/s41588-020-0635-0.

- 72. Ling, Y. H., Ye, J., Yu, C., Liang, C., Park, G., et al. (2023) Disordered C-terminal domain drives spatiotemporal confinement of RNAPII to enhance search for chromatin targets, *bioRxiv*, https://doi.org/10.1101/2023.07.31.551302.
- 73. Wei, M.-T., Chang, Y.-C., Shimobayashi, S. F., Shin, Y., Strom, A. R., and Brangwynne, C. P. (2020) Nucleated transcriptional condensates amplify gene expression, *Nat. Cell Biol.*, 22, 1187-1196, https://doi.org/10.1038/s41556-020-00578-6.
- 74. Hannon, C. E., and Eisen, M. B. (2023) Intrinsic protein disorder is insufficient to drive subnuclear clustering in embryonic transcription factors, *bioRxiv*, https://doi.org/10.1101/2023.03.27.534457.
- 75. Li, J., Dong, A., Saydaminova, K., Chang, H., Wang, G., et al. (2019) Single-molecule nanoscopy elucidates RNA polymerase II transcription at single genes in live cells, *Cell*, **178**, 491-506.e28, https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.029.
- 76. Forero-Quintero, L. S., Raymond, W., Handa, T., Saxton, M. N., Morisaki, T., et al. (2021) Live-cell imaging reveals the spatiotemporal organization of endogenous RNA polymerase II phosphorylation at a single gene, *Nat. Commun.*, 12, 3158, https://doi.org/10.1038/s41467-021-23417-0.
- 77. Ishov, A. M., Gurumurthy, A., and Bungert, J. (2020) Coordination of transcription, processing, and export of highly expressed RNAs by distinct biomolecular condensates, *Emerg. Top Life Sci.*, **4**, 281-291, https://doi.org/10.1042/ETLS20190160.
- 78. McClintock, B. (1934) The relation of a particular chromosomal element to the development of the nucleoli in Zea mays, *Zeitschr. Zellforschung Mikroskopische Anatomie*, **21**, 294-326, https://doi.org/10.1007/BF00374060.
- 79. Correll, C. C., Bartek, J., and Dundr, M. (2019) The nucleolus: a multiphase condensate balancing ribosome synthesis and translational capacity in health, aging and ribosomopathies, *Cells*, **8**, 869, https://doi.org/10.3390/cells8080869.
- 80. Ahmad, Y., Boisvert, F.-M., Gregor, P., Cobley, A., and Lamond, A. I. (2009) NOPdb: Nucleolar Proteome Database-2008 update, *Nucleic Acids Res.*, **37**, D181-D184, https://doi.org/10.1093/nar/gkn804.
- 81. Scheer, U., and Weisenberger, D. (1994) The nucleolus, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **6**, 354-359, https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90026-4.
- 82. Lamaye, F., Galliot, S., Alibardi, L., Lafontaine, D. L. J., and Thiry, M. (2011) Nucleolar structure across evolution: the transition between bi- and tri-compartmentalized nucleoli lies within the class Reptilia, *J. Struct. Biol.*, **174**, 352-359, https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.02.003.
- 83. Yao, R.-W., Xu, G., Wang, Y., Shan, L., Luan, P.-F., Wang, Y., Wu, M., Yang, L. Z., Xing, Y. H., Yang, L., and Chen, L. L. (2019) Nascent pre-rRNA sorting via phase separation drives the assembly of dense fibrillar components in the human nucleolus, *Mol. Cell*, 76, 767-783.e11, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.014.
- 84. Shubina, M. Y., Musinova, Y. R., and Sheval, E. V. (2016) Nucleolar methyltransferase fibrillarin: evolution of structure and function, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 941-950, https://doi.org/10.1134/S0006297916090030.
- 85. Shubina, M. Y., Arifulin, E. A., Sorokin, D. V., Sosina, M. A., Tikhomirova, M. A., Serebryakova, M. V., Smirnova, T., Sokolov, S. S., Musinova, Y. R., and Sheval, E. V. (2020) The GAR domain integrates functions that are necessary for the proper localization of fibrillarin (FBL) inside eukaryotic cells, *PeerJ*, 8, e9029, https://doi.org/10.7717/peerj.9029.
- 86. Mitrea, D. M., Cika, J. A., Guy, C. S., Ban, D., Banerjee, P. R., Stanley, C. B., Nourse, A., Deniz, A. A., and Kriwacki, R. W. (2016) Nucleophosmin integrates within the nucleolus via multi-modal interactions with proteins displaying R-rich linear motifs and rRNA, *Elife*, 5, e13571, https://doi.org/10.7554/eLife.13571.
- 87. Riback, J. A., Eeftens, J. M., Lee, D. S. W., Quinodoz, S. A., Donlic, A., et al. (2023) Viscoelasticity and advective flow of RNA underlies nucleolar form and function, *Mol. Cell*, **83**, 3095-3107.e9, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.08.006.
- 88. Heinz, S., Texari, L., Hayes, M. G. B., Urbanowski, M., Chang, M. W., et al. (2018) Transcription elongation can affect genome 3D structure, *Cell*, 174, 1522-1536.e22, https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.047.
- 89. Barutcu, A. R., Blencowe, B. J., and Rinn, J. L. (2019) Differential contribution of steady-state RNA and active transcription in chromatin organization, *EMBO Rep.*, **20**, e48068, https://doi.org/10.15252/embr.201948068.
- 90. Saldaña-Meyer, R., Rodriguez-Hernaez, J., Escobar, T., Nishana, M., Jácome-López, K., Nora, E. P., Bruneau, B. G., Tsirigos, A., Furlan-Magaril, M., Skok, J., and Reinberg, D. (2019) RNA interactions are essential for CTCF-mediated genome organization, *Mol. Cell*, **76**, 412-422.e5, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.015.
- 91. Quinodoz, S. A., Jachowicz, J. W., Bhat, P., Ollikainen, N., Banerjee, A. K., et al. (2021) RNA promotes the formation of spatial compartments in the nucleus, *Cell*, **184**, 5775-5790.e30, https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.014.
- 92. Boeren, J., and Gribnau, J. (2021) Xist-mediated chromatin changes that establish silencing of an entire X chromosome in mammals, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **70**, 44-50, https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.11.004.
- 93. Dueva, R., Akopyan, K., Pederiva, C., Trevisan, D., Dhanjal, S., Lindqvist, A., and Farnebo, M. (2019) Neutralization of the positive charges on histone tails by RNA promotes an open chromatin structure, *Cell Chem. Biol.*, **26**, 1436-1449.e5, https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.08.002.
- 94. Nozawa, R.-S., Boteva, L., Soares, D. C., Naughton, C., Dun, A. R., Buckle, A., Ramsahoye, B., Bruton, P. C., Saleeb, R. S., Arnedo, M., Hill, B., Duncan, R. R., et al. (2017) SAF-A regulates interphase chromosome structure through oligomerization with chromatin-associated RNAs, *Cell*, **169**, 1214-1227.e18, https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.029.
- 95. Skalska, L., Beltran-Nebot, M., Ule, J., and Jenner, R. G. (2017) Regulatory feedback from nascent RNA to chromatin and transcription, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 331-337, https://doi.org/10.1038/nrm.2017.12.

- 96. Sigova, A. A., Abraham, B. J., Ji, X., Molinie, B., Hannett, N. M., Guo, Y. E., Jangi, M., Giallourakis, C. C., Sharp, P. A., and Young, R. A. (2015) Transcription factor trapping by RNA in gene regulatory elements, *Science*, **350**, 978-981, https://doi.org/10.1126/science.aad3346.
- 97. Holz-Schietinger, C., and Reich, N. O. (2012) RNA modulation of the human DNA methyltransferase 3A, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 8550-8557, https://doi.org/10.1093/nar/gks537.
- 98. Di Ruscio, A., Ebralidze, A. K., Benoukraf, T., Amabile, G., Goff, L. A., et al. (2013) DNMT1-interacting RNAs block gene-specific DNA methylation, *Nature*, **503**, 371-376, https://doi.org/10.1038/nature12598.
- 99. Hendrickson, D. G., Kelley, D. R., Tenen, D., Bernstein, B., and Rinn, J. L. (2016) Widespread RNA binding by chromatin-associated proteins, *Genome Biol.*, 17, 28, https://doi.org/10.1186/s13059-016-0878-3.
- 100. Jansson-Fritzberg, L. I., Sousa, C. I., Smallegan, M. J., Song, J. J., Gooding, A. R., Kasinath, V., Rinn, J. L., and Cech, T. R. (2023) DNMT1 inhibition by pUG-fold quadruplex RNA, RNA, 29, 346-360, https://doi.org/10.1261/rna.079479.122.
- 101. Mohammad, F., Mondal, T., Guseva, N., Pandey, G. K., and Kanduri, C. (2010) Kcnq1ot1 noncoding RNA mediates transcriptional gene silencing by interacting with Dnmt1, *Development*, 137, 2493-2499, https://doi.org/10.1242/dev.048181.
- 102. Chalei, V., Sansom, S. N., Kong, L., Lee, S., Montiel, J. F., et al. (2014) The long non-coding RNA Dali is an epigenetic regulator of neural differentiation, *Elife*, **3**, e04530, https://doi.org/10.7554/eLife.04530.
- 103. Bao, X., Wu, H., Zhu, X., Guo, X., Hutchins, A. P., Luo, Z., Song, H., Chen, Y., Lai, K., Yin, M., Xu, L., Zhou, L., Chen, J., Wang, D., et al. (2015) The p53-induced lincRNA-p21 derails somatic cell reprogramming by sustaining H3K9me3 and CpG methylation at pluripotency gene promoters, *Cell Res.*, 25, 80-92, https://doi.org/10.1038/cr.2014.165.
- 104. O'Leary, V. B., Hain, S., Maugg, D., Smida, J., Azimzadeh, O., Tapio, S., Ovsepian, S. V., et al. (2017) Long non-coding RNA PARTICLE bridges histone and DNA methylation, *Sci. Rep.*, 7, 1790, https://doi.org/10.1038/s41598-017-01875-1.
- 105. Somasundaram, S., Forrest, M. E., Moinova, H., Cohen, A., Varadan, V., LaFramboise, T., Markowitz, S., and Khalil, A. M. (2018) The DNMT1-associated lincRNA DACOR1 reprograms genome-wide DNA methylation in colon cancer, *Clin. Epigenetics*, **10**, 127, https://doi.org/10.1186/s13148-018-0555-3.
- 106. Jones, R., Wijesinghe, S., Wilson, C., Halsall, J., Liloglou, T., and Kanhere, A. (2021) A long intergenic non-coding RNA regulates nuclear localization of DNA methyl transferase-1, *iScience*, **24**, 102273, https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102273.
- 107. Beltran, M., Yates, C. M., Skalska, L., Dawson, M., Reis, F. P., et al. (2016) The interaction of PRC2 with RNA or chromatin is mutually antagonistic, *Genome Res.*, **26**, 896-907, https://doi.org/10.1101/gr.197632.115.
- 108. Kaneko, S., Son, J., Shen, S. S., Reinberg, D., and Bonasio, R. (2013) PRC2 binds active promoters and contacts nascent RNAs in embryonic stem cells, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 1258-1264, https://doi.org/10.1038/nsmb.2700.
- 109. Kaneko, S., Son, J., Bonasio, R., Shen, S. S., and Reinberg, D. (2014) Nascent RNA interaction keeps PRC2 activity poised and in check, *Genes Dev.*, **28**, 1983-1988, https://doi.org/10.1101/gad.247940.114.
- 110. Riising, E. M., Comet, I., Leblanc, B., Wu, X., Johansen, J. V., and Helin, K. (2014) Gene silencing triggers polycomb repressive complex 2 recruitment to CpG islands genome wide, *Mol. Cell*, **55**, 347-360, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.005.
- 111. Hosogane, M., Funayama, R., Shirota, M., and Nakayama, K. (2016) Lack of transcription triggers H3K27me3 accumulation in the gene body, *Cell Rep.*, **16**, 696-706, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.034.
- 112. Beltran, M., Tavares, M., Justin, N., Khandelwal, G., Ambrose, J., et al. (2019) G-tract RNA removes Polycomb repressive complex 2 from genes, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 899-909, https://doi.org/10.1038/s41594-019-0293-z.
- 113. Garland, W., Comet, I., Wu, M., Radzisheuskaya, A., Rib, L., Vitting-Seerup, K., Lloret-Llinares, M., Sandelin, A., Helin, K., and Jensen, T. H. (2019) A functional link between nuclear RNA decay and transcriptional control mediated by the polycomb repressive complex 2, *Cell Rep.*, **29**, 1800-1811.e6, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.011.
- 114. Cifuentes-Rojas, C., Hernandez, A. J., Sarma, K., and Lee, J. T. (2014) Regulatory interactions between RNA and polycomb repressive complex 2, *Mol. Cell*, **55**, 171-185, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.009.
- 115. Zhang, Q., McKenzie, N. J., Warneford-Thomson, R., Gail, E. H., Flanigan, S. F., Owen, B. M., Lauman, R., Levina, V., Garcia, B. A., Schittenhelm, R. B., Bonasio, R., and Davidovich, C. (2019) RNA exploits an exposed regulatory site to inhibit the enzymatic activity of PRC2, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 26, 237-247, https://doi.org/10.1038/s41594-019-0197-y.
- 116. Song, J., Gooding, A. R., Hemphill, W. O., Love, B. D., Robertson, A., et al. (2023) Structural basis for inactivation of PRC2 by G-quadruplex RNA, *Science*, **381**, 1331-1337, https://doi.org/10.1126/science.adh0059.
- 117. Wang, X., Goodrich, K. J., Gooding, A. R., Naeem, H., Archer, S., Paucek, R. D., Youmans, D. T., Cech, T. R., and Davidovich, C. (2017) Targeting of polycomb repressive complex 2 to RNA by short repeats of consecutive guanines, *Mol. Cell*, **65**, 1056-1067.e5, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.003.
- 118. Long, Y., Hwang, T., Gooding, A. R., Goodrich, K. J., Rinn, J. L., and Cech, T. R. (2020) RNA is essential for PRC2 chromatin occupancy and function in human pluripotent stem cells, *Nat. Genet.*, **52**, 931-938, https://doi.org/10.1038/s41588-020-0662-x.
- 119. Healy, E., Zhang, Q., Gail, E. H., Agius, S. C., Sun, G., Bullen, M., Pandey, V., Das, P. P., Polo, J. M., et al. (2023) The apparent loss of PRC2 chromatin occupancy as an artefact of RNA depletion, *bioRxiv*, https://doi.org/10.1101/2023.08.16.553488.

- 120. Hickman, A. H., and Jenner, R. G. (2023) Apparent RNA bridging between PRC2 and chromatin is an artefact of non-specific chromatin precipitation upon RNA degradation, *bioRxiv*, https://doi.org/10.1101/2023.08.16.553503.
- 121. Skalska, L., Begley, V., Beltran, M., Lukauskas, S., Khandelwal, G., Faull, P., Bhamra, A., Tavares, M., Wellman, R., Tvardovskiy, A., Foster, B. M., Ruiz de Los Mozos, I., Herrero, J., Surinova, S., Snijders, A. P., Bartke, T., and Jenner, R. G. (2021) Nascent RNA antagonizes the interaction of a set of regulatory proteins with chromatin, *Mol. Cell*, 81, 2944-2959.e10, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.05.026.
- 122. Shao, W., Bi, X., Pan, Y., Gao, B., Wu, J., Yin, Y., Liu, Z., Peng, M., Zhang, W., Jiang, X., Ren, W., Xu, Y., Wu, Z., Wang, K., Zhan, G., Lu, J. Y., Han, X., Li, T., Wang, J., Li, G., et al. (2022) Phase separation of RNA-binding protein promotes polymerase binding and transcription, *Nat. Chem. Biol.*, **18**, 70-80, https://doi.org/10.1038/s41589-021-00904-5.
- 123. Oksuz, O., Henninger, J. E., Warneford-Thomson, R., Zheng, M. M., Erb, H., Vancura, A., Overholt, K. J., Hawken, S. W., Banani, S. F., Lauman, R., Reich, L. N., Robertson, A. L., Hannett, N. M., Lee, T. I., Zon, L. I., Bonasio, R., and Young, R. A. (2023) Transcription factors interact with RNA to regulate genes, *Mol. Cell*, 83, 2449-2463.e13, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.06.012.
- 124. Maharana, S., Wang, J., Papadopoulos, D. K., Richter, D., Pozniakovsky, A., Poser, I., Bickle, M., Rizk, S., Guillén-Boixet, J., Franzmann, T. M., Jahnel, M., Marrone, L., Chang, Y. T., Sterneckert, J., Tomancak, P., Hyman, A. A., and Alberti, S. (2018) RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins, *Science*, **360**, 918-921, https://doi.org/10.1126/science.aar7366.
- 125. Henninger, J. E., Oksuz, O., Shrinivas, K., Sagi, I., LeRoy, G., Zheng, M. M., Andrews, J. O., Zamudio, A. V., Lazaris, C., Hannett, N. M., Lee, T. I., Sharp, P. A., Cissé, I. I., Chakraborty, A. K., and Young, R. A. (2021) RNA-mediated feedback control of transcriptional condensates, *Cell*, **184**, 207-225.e24, https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.030.
- 126. Sharp, P. A., Chakraborty, A. K., Henninger, J. E., and Young, R. A. (2022) RNA in formation and regulation of transcriptional condensates, *RNA*, **28**, 52-57, https://doi.org/10.1261/rna.078997.121.
- 127. Pownall, M. E., Miao, L., Vejnar, C. E., M'Saad, O., Sherrard, A., Frederick, M. A., Benitez, M. D. J., Boswell, C. W., Zaret, K. S., Bewersdorf, J., and Giraldez, A. J. (2023) Chromatin expansion microscopy reveals nanoscale organization of transcription and chromatin, *Science*, **381**, 92-100, https://doi.org/10.1126/science.ade5308.
- 128. Iarovaia, O. V., Minina, E. P., Sheval, E. V., Onichtchouk, D., Dokudovskaya, S., Razin, S. V., and Vassetzky, Y. S. (2019) Nucleolus: a central hub for nuclear functions, *Trends Cell Biol.*, **29**, 647-659, https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.04.003.
- 129. Liang, Y., Xu, H., Cheng, T., Fu, Y., Huang, H., Qian, W., Wang, J., Zhou, Y., Qian, P., Yin, Y., Xu, P., Zou, W., and Chen, B. (2022) Gene activation guided by nascent RNA-bound transcription factors, *Nat. Commun.*, 13, 7329, https://doi.org/10.1038/s41467-022-35041-7.

NONSPECIFIC INTERACTIONS IN TRANSCRIPTION REGULATION AND ORGANIZATION OF TRANSCRIPTIONAL CONDENSATES

Review

A. A. Valyaeva^{1,2,3*} and E. V. Sheval^{2,3}

¹ School of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: valyaeva.ann@gmail.com

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

³ Department of Cell Biology and Histology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Eukaryotic cells are characterized by a high degree of compartmentalization of their internal contents, which ensures precise and controlled regulation of intracellular processes. During many processes, including different stages of transcription, dynamic membrane-free compartments called biomolecular condensates are formed. Transcription condensates contain various transcription factors and RNA polymerase and are formed by high and low specificity interactions between protein factors, DNA and near-by RNA. This review discusses recent data demonstrating the important role of nonspecific multivalent protein-protein and RNA-protein interactions in the organization and regulation of transcription.

Keywords: transcription, RNA, RNA polymerase, transcriptional condensates, intrinsically disordered regions

УДК 577.15

АКРИЛАТРЕДУКТАЗА АНАЭРОБНОЙ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ MOPCKOЙ БАКТЕРИИ Shewanella woodyi

© 2024 Ю.В. Берцова, М.В. Серебрякова, В.А. Богачев, А.А. Байков, А.В. Богачев*

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234 Москва, Россия; электронная почта: bogachev@belozersky.msu.ru

> Поступила в редакцию 22.02.2024 После доработки 19.03.2024 Принята к публикации 20.03.2024

В отсутствии кислорода многие микроорганизмы способны к анаэробному дыханию с использованием различных органических соединений в качестве терминальных акцепторов для электронтранспортной цепи. В представленной работе произведена идентификация белка, ответственного за восстановление акрилата в анаэробной дыхательной цепи морской бактерии Shewanella woodyi. Показано, что полученные при разделении периплазматических белков S. woodyi фракции, обладающие акрилатредуктазной активностью, содержат белок ArdA (Swoo_0275) в качестве основного компонента. Гетерологичная экспрессия генов ardA/ardB (swoo 0275/swoo 0276), но не одиночного гена ardA (swoo_0275) в клетках Shewanella oneidensis MR-1 приводит к появлению в их периплазме несвойственной для этой бактерии акрилатредуктазной активности. Эти данные позволяют заключить, что флавоцитохром c ArdAB (Swoo_0275/Swoo_0276) ответственен за восстановление акрилата в клетках S. woodyi. ArdAB обладает высокой субстратной специфичностью и, кроме акрилата среди других 2-еноатов, способен восстанавливать только метакрилат, хотя и с 22-кратно меньшей скоростью по сравнению с восстановлением акрилата. Экспрессия гена ardA индуцируется присутствием акрилата или метакрилата в среде при анаэробном выращивании S. woodyi, что сопровождается появлением акрилатредуктазной активности в периплазме этой бактерии. Восстановление акрилата с помощью ArdAB позволяет осуществлять диметилсульфониопропионатзависимое анаэробное дыхание S. woodyi и, по-видимому, многих других морских бактерий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: анаэробное дыхание, акриловая кислота, флавоцитохром, DMSP-лиаза, DddY, *Shewanella.*

DOI: 10.31857/S0320972524040099 **EDN:** ZFFRMP

ВВЕДЕНИЕ

В отсутствии кислорода многие микроорганизмы способны к анаэробному «дыханию» с использованием различных неорганических или органических соединений в качестве терминальных акцепторов электронов для дыхательной электрон-транспортной цепи. Среди органических соединений наиболее типичным терминальным акцептором является фумарат. Однако вариабельность аминокислотных остатков, формирующих каталитический центр гомологов фумаратредуктазы во многих бактериях, предполагает существова-

ние и других 2-еноатредуктазных активностей [1]. Действительно, среди гомологов фумаратредуктазы были идентифицированы ферменты с иной субстратной специфичностью, например, цитохром с:метакрилат-оксидоредуктазы, NADH:(гидрокси)циннамат-оксидоредуктазы и NADH:акрилатоксидоредуктазы [1–6].

Изучение регуляции экспрессии гена NADH:акрилат-оксидоредуктазы из морской бактерии Vibrio harveyi показало, что этот фермент индуцируется акрилатом вне зависимости от концентрации кислорода в среде роста [1]. Из-за этого вполне веро-

Принятые сокращения: ДСН – додецилсульфат натрия; Ard – акрилатредуктаза; DMSO – диметилсульфоксид; DMSP – диметилсульфониопропионат; MS – масс-спектрометрия; MV – метилвиологен.

^{*} Адресат для корреспонденции.

$$H_3C$$
—S CH_3 CH_3

Рис. 1. Катализируемая DMSP-лиазой DddY реакция разложения диметилсульфониопропионата

ятно, что основной функцией NADH:акрилат-оксидоредуктазы является детоксификация акрилата в цитоплазме *V. harveyi*, а не собственно анаэробное дыхание на этой ненасыщенной карбоновой кислоте. В связи с этим интересно идентифицировать белки, прямо участвующие в работе анаэробной дыхательной цепи, использующей акрилат в качестве терминального акцептора электронов. Способность использовать акрилат в качестве терминального акцептора была ранее обнаружена с помощью микробиологических подходов у бактерии *Halodesulfovibrio aestuarii* (ранее известной как *Desulfovibrio acrylicus*), однако участвующие в этом процессе белки не были идентифицированы [7].

Основным природным источником свободной акриловой кислоты является диметилсульфониопропионат (DMSP) [8]. Это соединение, используемое многими морскими водорослями и растениями в качестве осмолита, накапливается в цитоплазме клеток этих организмов в больших (вплоть до сотен мМ) концентрациях. Как следствие, в земной биосфере образуется порядка 10⁹ тонн DMSP в год, и он составляет существенный источник углерода, восстановленной серы и энергии для многих морских бактерий. Разложение DMSP бактериальными DMSP-лиазами DddL, DddP, DddQ, DddW и DddY сопровождается образованием акрилата (рис. 1) [8], что делает присутствие акриловой кислоты довольно характерным для разных морских экологических ниш.

DMSP-лиаза DddY занимает особое место среди этих ферментов. Она проявляет высокую удельную активность и имеет необычную для DMSP-лиаз периплазматическую локализацию в бактериальной клетке [9]. Последний факт указывает на то, что образующийся из DMSP акрилат может не транспортироваться внутрь клетки, а использоваться в периплазматическом пространстве, и это хорошо согласуется с гипотетической ролью акрилата в качестве терминального акцептора электронов для анаэробной электрон-транспортной цепи. Действительно, контекстный анализ dddY-содержащих бактериальных геномов (работы Curson et al. и Arkhipova et al. [8–10], рис. S1 Приложения) показал, что у многих морских бактерий (например, из родов Shewanella, Ferrimonas и Arcobacter) в непосредственной близости от гена dddY на хромосоме



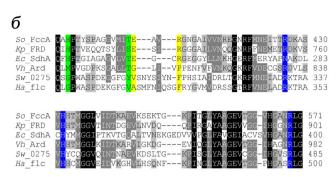


Рис. 2. dddY-Ассоциированные гены морской бактерии Shewanella woodyi. a – Расположение dddY-ассоциированных генов на хромосоме S. woodyi: swoo_0272 – ген NADPH:акрилоил-CoA-оксидоредуктазы; swoo_0273 гипотетического белка с неизвестными функциями; swoo_0274 - регулятора транскрипции; swoo_0275 флавинсодержащей субъединицы флавоцитохрома с; swoo_0276 – тетрагемового цитохрома c; swoo_0277 – DMSP-лиазы DddY (https://www.kegg.jp/kegg-bin/ show_organism?org=T00676). б - Выравнивание аминокислотных последовательностей цитохром с:фумарат-оксидоредуктазы из S. oneidensis MR-1 (So_FccA, GenBank: AAN54044), NADH:фумарат-оксидоредуктазы из Klebsiella pneumoniae (Kp_Frd, B5XRB0), субъединицы SdhA сукцинатдегидрогеназы из Escherichia coli (Ec_SdhA, HDZ3930178), NADH:акрилат-оксидоредуктазы из V. harveyi (Vh. Ard, PODW92), белка Swoo 0275 S. woodyi (Sw_0275, ACA84576) и флавоцитохрома с из H. aestuarii (Ha_flc, SHJ73509). Два приведённых фрагмента выравнивания содержат аминокислотные остатки (выделены синим и зелёным цветом), вовлечённые в связывание соответственно С4- и С1-карбоксилатов фумарата в фумаратредуктазах, а также остатки (выделены жёлтым), участвующие в переносе протона к фумарату

расположены гены, кодирующие одну или две копии флавинсодержащих и гем С-содержащих субъединиц гипотетического флавоцитохрома с (swoo_0275 и swoo_0276 на рис. 2, а соответственно), сходного с цитохром с:фумарат-оксидоредуктазами этих бактерий. Продукты этих генов содержат сигнальные пептиды Tat- и Sec-типа для флавин- и гемсодержащих субъединиц соответственно, что указывает на периплазматическую локализацию зрелых белков. Биоинформатический анализ позиций аминокислотных остатков, участвующих в связывании восстанавливаемого субстрата [1, 4], показывает, что продукты dddY-ассоциированных генов флавинсодержащих субъединиц флавоцитохрома с содержат в своём составе аминокислотные остатки, ответственные за связывание карбоксильной группы, соответствующей С4-карбоксильной группе фумарата. Однако вместо консервативных остатков His и Thr(Ser) фумаратредуктаз, принимающих участие в связывании С1-карбоксильной группы фумарата, в первичной структуре представленных на рис. S1 Приложения DddY-ассоциированных редуктаз находятся остатки Gly и Туг соответственно (рис. 2, δ). Таким образом, можно заключить, что DddY-ассоциированные флавоцитохромы c участвуют в восстановлении какой-то другой, отличной от фумарата α,β -ненасыщенной карбоновой кислоты.

Обращает на себя внимание присутствие в большинстве dddY-ассоциированных генных кластеров гена, кодирующего NADPH:акрилоил-СоА-оксидоредуктазу AcuI (swoo_0272 на рис. 2, a), ответственную во многих бактериях за детоксификацию цитоплазматического акрилата [11]. Эти данные могут указывать на то, что весь генный кластер swoo_0272-swoo_0277 кодирует белки, связанные с метаболизмом акрилата. Если это так, то описанный выше флавоцитохром с Swoo_0275/ Swoo_0276 S. woodyi и гомологичные ферменты из других dddY-содержащих бактерий являются хорошими кандидатами на роль акрилатредуктаз анаэробной дыхательной цепи. Экспериментальная проверка этого предположения и была целью данной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы и условия их выращивания. Клетки Shewanella woodyi выращивали при 25 °C в жидкой среде МК (31,5% морских солей («Магіпе Life», Россия), 20 мМ L-лактат, 0,5%-ный пептон, 0,25%-ный дрожжевой экстракт, 20 мМ НЕРЕS/NaOH (рН 7,5)) аэробно или анаэробно в присутствии различных акцепторов электронов или их сочетаний (0,5–20 мМ диметилсульфоксид (DMSO), акрилат или метакрилат). Анаэробные выращивания проводили в герметичных стеклянных колбах, полностью заполненных средой. Анаэробные условия достигались за счёт собственной оксидазной активности клеток.

Клетки Shewanella oneidensis растили при 28 °C аэробно в жидкой среде LB или анаэробно в жидкой среде, содержащей 0,225 г/л K_2HPO_4 , 0,225 г/л KH_2PO_4 , 0,46 г/л NaCl, 0,225 г/л $(NH_4)_2SO_4$, 0,117 г/л MgSO $_4$ \cdot 7H $_2$ O, 20 мМ L-лактат, 0,05%-ный дрожжевой экстракт, 20 мМ DMSO, 20 мМ HEPES/NaOH (pH 7,2). При необходимости в среды роста S. oneidensis добавляли канамицин (50 мкг/мл).

Конструирование экспрессионных векторов. Экспрессионный вектор для компонентов флавоцитохрома ArdAB был получен за счёт амплификации ard-оперона (swoo_0275–swoo_0276) с геномной ДНК S. woodyi при использовании высокоточной полимеразы Tersus («Евроген», Россия) и праймеров Sh_wood_dir/Sh_wood_CR4_rev (последователь-

ности праймеров указаны в табл. S1 Приложения). Амплифицированный фрагмент (2571 п.н.) клонировали в вектор pCR4-TOPO («Invitrogen», CША) с получением плазмиды pSwoo_0275&Swoo_0276.

Экспрессионный вектор для белка ArdA получали с помощью частичного гидролиза плазмиды pSwoo_0275&Swoo_0276 эндонуклеазами рестрикции HindIII и NotI. Укороченный на 350 п.н. продукт затупляли и самолигировали с получением плазмиды pSwoo_0275. Сконструированные плазмиды проверяли секвенированием и трансформировали в клетки S. oneidensis MR-1 с помощью электропорации.

Получение периплазматической фракции из клеток Shewanella. Клетки S. woodyi или S. oneidensis осаждали центрифугированием (10 000 g, 10 мин) и дважды промывали буфером (0,5 M NaCl, 10 мМ Tris-HCl (рН 8,0) для S. woodyi или 75 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl (рН 8,0) для S. oneidensis). Периплазматическую фракцию получали обработкой полимиксином Б [12, 13]. Для этого клеточный осадок суспендировали в соответствующем буфере промывки (6-9×10¹⁰ клеток/мл), содержащем полимиксин Б (2000 единиц/мл), и инкубировали на льду в течение 20 мин. Обработанные полимиксином клетки удаляли центрифугированием (10 000 g, 10 мин), а полученный супернатант использовали в качестве периплазматической фракции для измерения акрилатредуктазной активности и для выделения Ard (акрилатредуктазы).

Выделение и характеризация Ard. Для выделения Ard клетки растили анаэробно в шести литрах среды MR, содержащей 20 мМ DMSO и 1,5 мМ акрилат (выход биомассы составлял ~170 мг клеточного белка). Полученную из этих клеток периплазматическую фракцию концентрировали с помощью 30-кДа центрифужного фильтра, разбавляли средой (10 мМ Tris-HCl (рН 8,0)) до 80 мМ концентрации NaCl и наносили на колонку с DEAE-сефарозой CL-6B (16 × 30 мм), уравновешенную буфером 1 (10 мМ Tris-HCl (рН 8,0)), содержащим 80 мМ NaCl. Колонку промывали тремя объёмами буфера 1, содержащего 100 мМ NaCl, после чего смывали Ard с помощью линейного градиента NaCl от 100 до 340 мМ в буфере 1. Остаточный белок смывали с колонки 2 M NaCl в буфере 1. Наиболее активные фракции Ard (~0,6 мг белка) объединяли, концентрировали на центрифужном фильтре и хранили при -70 °C. Концентрацию белка определяли бицинхониновым методом [14], используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Связанные с Ard флавины экстрагировали трифторуксусной кислотой и разделяли с помощью ВЭЖХ, как описано ранее [13]. Электрофорез в ДСН-ПААГ (ДСН-ПААГЭ, ДСН – додецилсульфат натрия) проводили с использованием 12,5%-ных полиак-

риламидных гелей [15]. Гели окрашивали на белок с помощью раствора PageBlueTM («Fermentas», Литва), либо на гем С 3,3′,5,5′-тетраметилбензидином и H_2O_2 [16]. MALDI-TOF MS-анализ (MS – масс-спектрометрия) проводили на масс-спектрометре UltrafleXtreme MALDI-TOF-TOF («Bruker Daltonik», Германия), как описано ранее [5].

Определение ферментативных активностей. Акрилатредуктазную активность определяли на спектрофотометре Hitachi-557 («Hitachi», Япония) при 606 нм по окислению восстановленного метилвиологена (MV, $\varepsilon_{606} = 13.7 \text{ мM}^{-1} \text{ см}^{-1}$). Измерение проводили при 25 °C в герметичной кювете объёмом 3,2 мл, полностью заполненной средой. Среда измерения содержала 100 мМ HEPES/Tris (рН 7,5), 0,05-1 мМ акцептора электронов и 1 мМ MV. Создание анаэробных условий и восстановление MV осуществлялось за счёт дробных добавок дитионита. При этом MV восстанавливали до значений оптической плотности ~1,5-2,0 при 606 нм, что соответствовало ~110-150 мкМ восстановленной и ~850-890 мкМ окисленной формы MV. Одну единицу ферментативной активности определяли как количество фермента, катализирующего окисление 2 мкмоль MV за 1 мин.

Параметры уравнения Михаэлиса-Ментен для акрилат- и метакрилатредуктазных активностей Ard при 0-50 мкМ концентрации (мет)акрилата определяли по интегральной кинетике восстановления этих акцепторов электронов при 606 нм до полного исчерпания акцептора. Все измерения проводили при насыщающих концентрациях восстановленного MV (значение кажущейся K_{m} Ard для MV ≤ 2 мкМ). Скорости рассчитывали для 20 временных точек интегральной кинетики при её дифференцировании (-d[MV]/dt) с использованием пакета MATLAB («The MathWorks, Inc.», США). Концентрацию акцептора электрона в каждый момент времени рассчитывали из A_{606} , используя соотношение MV: акцептор, равное 2:1, и предполагая, что конечное значение A_{606} соответствует 100%-ному восстановлению акцептора электронов. Скорости восстановления (мет)акрилата в 0,05-1 мМ диапазоне их концентраций определяли по начальной скорости реакции, как описано выше. Фиттирование данных уравнением Михаэлиса-Ментен проводили с помощью нелинейной регрессии.

Пропионатдегидрогеназную активность измеряли при 600 нм в присутствии феназинметасульфата и 2,6-дихлорфенолиндофенола в качестве акцепторов электронов. Среда измерения содержала 100 мМ HEPES/Tris (рН 7,5), 2 мМ пропионат, 2 мМ феназинметасульфат и 25 мкМ 2,6-дихлорфенолиндофенол.

Индукция акрилатредуктазной активности и экспрессии генов ardA и dddY в клетках S. woodyi. Клетки S. woodyi растили аэробно или анаэробно в среде MR, содержащей 20 мМ DMSO и соответствующий индуктор, в течение 4 ч для определения экспрессии генов методом количественной полимеразной цепной реакции (рвПЦР) или в течение 14 ч для измерения акрилатредуктазной активности.

Экстракцию РНК из клеток S. woodyi проводили с помощью кита RNA Solo («Евроген»). Полученный препарат дополнительно обрабатывали свободной от РНКаз ДНКазой I («Thermo Fisher Scientific», США) при 37 °С в течение 1 ч. кДНК синтезировали с использованием набора MMLV RT («Евроген») со случайными декануклеотидными праймерами. Для каждой реакции ставили контрольную пробу, не содержащую обратной транскриптазы. рвПЦР проводили с помощью набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген»), используя полученные препараты кДНК в качестве матрицы и пар праймеров A1/A2 или D3/D4 (табл. S1 Приложения) для определения экспрессии ardA и dddY соответственно. Для нормализации использовали 16S рРНК (праймеры 16s_FWS/16s_RV). Для калибровки использовали последовательные разведения геномной ДНК S. woodyi, содержащей гены для DddY, ArdA и 16S рРНК в соотношении 1:1:10.

Биоинформатика. Геномный контекстный анализ генов dddY проводили с использованием программы webFlags [17]. Множественное выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы Clustal Omega [18]. Клеточную локализацию бактериальных белков предсказывали, используя программу SignalP 6.0 [19]. Предсказание оперонной структуры проводили с помощью сервиса Operon-mapper [20], наличие терминаторов транскрипции определяли программой iTerm-PseKNC [21]. Идентификацию белков масс-спектрометрией проводили поиском MS- и MS/MS-ионов в базе данных NCBI, используя программный пакет Mascot 2.3.02 («Маtrix Science», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение Ard из периплазматической фракции S. woodyi. Для поиска Ard анаэробной дыхательной цепи в качестве модельного организма нами была выбрана морская светящаяся бактерия S. woodyi [22], так как её геном содержит описанный выше dddY-ассоциированный генный кластер (рис. 2, а и рис. S1 Приложения), она способна расщеплять DMSP и демонстрирует высокую акрилатредуктазную активность при анаэробном выращивании в присутствии акрилата (см. последний раздел Результатов).

Из выращенных в присутствии акрилата клеток *S. woodyi* выделяли периплазматическую фракцию и разделяли её ионообменной хроматографией

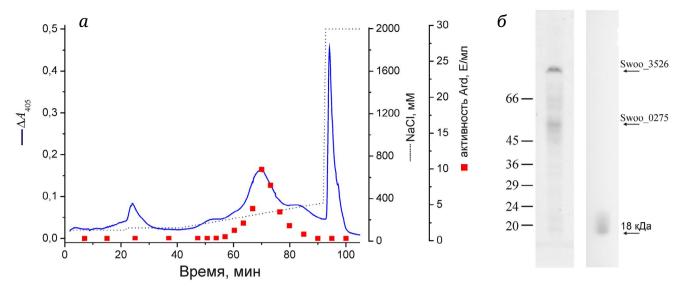


Рис. 3. Выделение Ard из клеток S. woodyi. a − Разделение периплазматической фракции клеток S. woodyi, выращенных анаэробно в присутствии акрилата, с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-сефарозе. Поглощение света при 405 нм показано синей кривой, концентрация NaCl показана пунктиром. Красными квадратами обозначена акрилатредуктазная активность в полученных фракциях. б − ДСН-ПААГЭ полученного препарата Ard. На каждую дорожку наносили по 2 мкг белка. Гель окрашивали либо на белок с помощью Кумасси (левая панель), либо на гем С с помощью тетраметилбензидина/Н₂О₂ (правая панель). Полосы с числами с левой стороны указывают положение белковых маркеров молекулярных весов. Белковые полосы, идентифицированные с помощью MALDI-MS, указаны с правой стороны

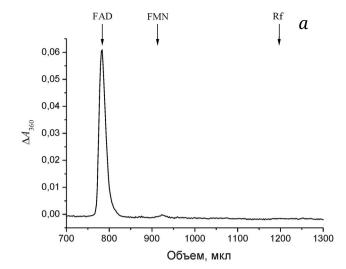
на DEAE-сефарозе с детекцией акрилатредуктазной активности. При хроматографии наблюдался единственный пик этой активности (рис. 3, *a*), который хорошо совпадал с одним из пиков цитохромов, детектируемых по поглощению света с длиной волны 405 нм.

Разделение полученного препарата с помощью ДСН-ПААГЭ выявило в нём два основных белка с массой ≈ 80 и 52 кДа (рис. 3, δ , левая панель). МS- и MS/MS-анализ этих полос показал, что верхняя полоса представляет собой редуктазу триметиламин-N-оксида TorA (Swoo_3526, покрытие последовательности – 50%), тогда как полоса с массой ≈ 52 кДа идентифицировалась как флавинсодержащая субъединица флавоцитохрома c (Swoo_0275, покрытие последовательности – 65%), то есть именно тот белок, который был биоинформатически предсказан в качестве субъединицы гипотетического Ard.

Определение флавинов в полученном препарате (рис. 4, a) показало, что в нём детектируется только FAD (5 нмоль мг $^{-1}$). Это также находится в хорошем согласии с идентификацией Ard $S.\ woodyi$, так как все известные на сегодняшний день флавоцитохромы c содержат FAD в качестве простетической группы [2–4, 23, 24]. Спектральный анализ полученного препарата показал, что он также содержит цитохром типа c (рис. 4, δ). Важно отметить, что примесный периплазматический белок TorA не содержит в своём составе ни флавинов, ни гемов C [25]. Окраска электрофоре-

граммы выделенного препарата на гем С (рис. 3, б, правая панель) выявляет гемсодержащую полосу с массой ≈ 18 кДа. Однако MS- и MS/MS-анализы этой полосы не позволили идентифицировать соответствующий белок. По-видимому, это связано с тем, что предполагаемая цитохромная субъединица Ard (Swoo_0276) содержит в своей первичной структуре четыре последовательности СххСН и, по-видимому, присоединяет четыре гема восемью ковалентными связями. Таким образом, этот белок потенциально способен образовывать лишь один немодифицированный триптический пептид (на N-конце зрелого белка), аминокислотную последовательность которого также нельзя однозначно предсказать из-за альтернативных возможностей отрезания лидерного пептида.

Гетерологичная экспрессия генов swoo_0275/swoo_0276 из S. woodyi в клетках S. oneidensis MR-1. Фракционирование периплазматической фракции клеток S. woodyi позволяет предположить, что Ard этой бактерии представляет собой флавоцитохром с Swoo_0275/Swoo_0276. Однако наличие в выделенном препарате дополнительного белка (TorA) и невозможность идентификации Swoo_0276 с помощью масс-спектрометрии сделало необходимым использование альтернативных подходов для доказательства правильности идентификации Ard. Для этого мы провели гетерологичную экспрессию гена swoo_0275 и генов swoo_0275/swoo_0276 из S. woodyi в клетках S. oneidensis MR-1.



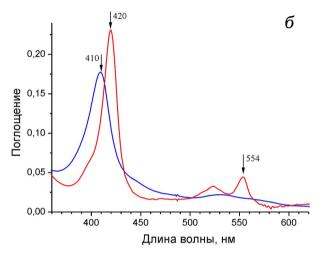


Рис. 4. Идентификация простетических групп Ard. a – Разделение нековалентно связанных с Ard флавинов с помощью ВЭЖХ. Объёмы удержания стандартов FAD, FMN и рибофлавина (Rf) показаны стрелками. δ – Спектры поглощения окисленного воздухом (синяя кривая) и восстановленного дитионитом (красная кривая) препаратов Ard. Спектры измеряли в 100 мМ Tris-HCl (pH 8,0) буфере, содержащем 0,1 мг/мл Ard. Специфичные для цитохромов c максимумы поглощения γ - и α -полос показаны стрелками

Было обнаружено, что клетки *S. oneidensis* MR-1, выращенные в присутствии или в отсутствии акрилата как в аэробных, так и в анаэробных условиях, не обладают собственной акрилатредуктазной активностью (табл. 1). Внесение плазмиды, содержащей гены swoo_0275/swoo_0276, в клетки *S. oneidensis* MR-1 приводило к появлению акрилатредуктазной активности в периплазматической фракции полученного штамма. В то же время экспрессия одиночного гена флавиновой субъединицы (swoo_0275) не сопровождалась появлением акрилатредуктазной активности в клетках *S. oneidensis* (табл. 1).

Таким образом, данные гетерологичной экспрессии подтверждают предположение о том, что

Таблица 1. Удельные активности Ard в периплазматических фракциях клеток различных штаммов *S. oneidensis*, выращенных аэробно в отсутствии акрилата

Штамм	Акрилатредуктазная активность ¹ (нмоль мин ⁻¹ мг клеточного белка ⁻¹⁾	
S. oneidensis MR-1	< 0,3	
S. oneidensis/ pSwoo_0275&Swoo_0276	19 ± 4	
S. oneidensis/pSwoo_0275	< 0,3	

¹ Среднее для двух независимых измерений.

Ard *S. woodyi* представляет собой флавоцитохром *c*, состоящий из FAD-содержащей субъединицы Swoo_0275 (ArdA) и гем C-содержащей субъединицы Swoo_0276 (ArdB).

Субстратная специфичность Ard. Редуктазная активность Ard по отношению к различным природным α,β -ненасыщенным карбоновым кислотам была измерена при их концентрации 1 мМ. Как оказалось, фермент Ard довольно специфичен и способен восстанавливать только акрилат и метакрилат, но не кротоновую, фумаровую, сорбиновую, урокановую, коричную, n-кумаровую, кофейную или феруловую кислоты. Также оказалось, что для активности Ard необходимо наличие карбоксильной группы в восстанавливаемом субстрате, и поэтому этот фермент не восстанавливал акриламид. Активность Ard была максимальной при рН \approx 7,5.

Для акрилата и метакрилата были определены кинетические параметры соответствующих ферментативных редуктазных активностей. В случае акрилата наблюдалась гиперболическая зависимость скорости катализируемой реакции от концентрации этого субстрата с $K_{\rm m}$ 16 ± 0,4 мкМ и максимальной удельной активностью 58 ± \pm 0,5 мкмоль мин $^{-1}$ мг $^{-1}$ (рис. 5, a). Величина $K_{\rm m}$ для метакрилата была практически такой же (19 ± 1,1 мкМ), но значение максимальной удельной активности $(2,6 \pm 0,1 \text{ мкмоль мин}^{-1} \text{ мг}^{-1})$ было в 22 раза меньше (рис. 5, *a*, рис. S2 Приложения). Такое сходство в значениях $K_{\rm m}$ и существенное различие в значениях максимальной удельной активности указывает на то, что метакрилат может выступать в качестве конкурентного ингибитора акрилатредуктазной активности Ard. Действительно, внесение метакрилата в среду для измерения акрилатредуктазной активности приводило к ингибированию редуктазной активности фермента, зависящему от соотношения концентраций метакрилат/акрилат (рис. 5, б). Остальные исследованные а,β-ненасыщенные карбоновые

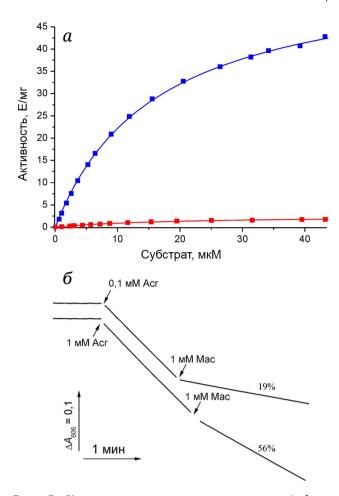


Рис. 5. Каталитические характеристики Ard из S. woodyi. a - Зависимость ферментативной активности Ard от концентрации акрилата (синие квадраты) или метакрилата (красные квадраты). Показаны значения акрилат- и метакрилатредуктазных активностей Ard, полученные с помощью анализа интегральной кинетики восстановления акцепторов в 0,5-50 мкМ диапазоне концентраций (мет)акрилата. Линиями показаны результаты фиттирования полученных данных уравнением Михаэлиса-Ментен (данные для метакрилата в увеличенном масштабе приведены на рис. S2 Приложения). б – Типичные кривые окисления MV в присутствии Ard. Добавки 1 или 0,1 мМ акрилата (Acr) и 1 мМ метакрилата (Mac) указаны стрелками. Числа над кривыми указывают остаточную ферментативную активность Ard после добавки метакрилата, где активность до этой добавки принимали за 100%

кислоты (см. выше) не обладали таким эффектом и не ингибировали акрилатредуктазную активность Ard.

Была также проверена способность Ard катализировать обратную акрилатредуктазной реакцию. Оказалось, что этот белок не способен окислять пропионат при использовании феназинметасульфата и дихлорфенолиндофенола в качестве акцепторов электронов. Таким образом, Ard, так же как и многие другие редуктазы ненасыщенных карбоновых кислот [1, 2, 4, 13, 24], катализирует однона-

правленную реакцию и функционирует в качестве молекулярного диода [26].

Индукция синтеза Ard в клетках S. woodyi. Для определения способности различных субстратов Ard вызывать индукцию его синтеза в клетках S. woodyi проводили выращивание этой бактерии в аэробных или анаэробных условиях в отсутствии или в присутствии 1,5 мМ акрилата или метакрилата (выбранная концентрация субстрата равна максимальной концентрации акрилата, при которой ещё наблюдался анаэробный рост), а также в присутствии 5 мМ DMSP. Как видно в табл. 2, акрилатредуктазная активность не детектировалась в клетках S. woodyi при аэробном выращивании, в том числе и в присутствии в среде роста использованных потенциальных индукторов. Напротив, при анаэробном выращивании даже в отсутствии индукторов в клетках детектировалась низкая, но измеряемая акрилатредуктазная активность. Эта активность умеренно повышалась в присутствии DMSP и значительно индуцировалась в присутствии акрилата или метакрилата (в ~30 и 80 раз соответственно).

Сходные результаты были получены и при измерении уровня транскрипции ard-генов. Биоинформатический анализ показал, что гены $swoo_0275-swoo_0276$ образуют на хромосоме S. woodyi оперон (ard), не включающий в свой состав ген dddY ($swoo_0277$). Поэтому регуляцию транскрипции измеряли отдельно для ard-оперона и для гена dddY. Как видно в табл. 2, в аэробных условиях индукции ard-оперона не наблюдалось. Анаэробные условия выращивания приводили к ~13-кратному повышению транскрипции ard, присутствие в анаэробной среде роста акрилата или метакрилата сопровождалось дополнительным 4–11-кратным повышением транскрипции этого оперона (табл. 2).

Сходным образом индуцировалась и транскрипция гена *dddY* (*swoo_*0277). Максимальный уровень транскрипции наблюдался в анаэробных условиях в присутствии акрилата или метакрилата (табл. 2). Однако в случае гена *dddY* максимальное воздействие оказывало присутствие в среде роста несопряжённых карбоновых кислот, а анаэробные условия роста сами по себе были хоть и необходимым, но недостаточным условием для повышения транскрипции этого гена.

Для определения способности *S. woodyi* использовать субстраты Ard в качестве терминальных акцепторов электронов для анаэробного дыхания клетки этой бактерии выращивали в присутствии акрилата, метакрилата или DMSP, используя классический акцептор электронов DMSO в качестве контроля. Было обнаружено, что акрилат в концентрациях, превышающих 1 мМ, ингибировал анаэробный рост *S. woodyi*, что хорошо

в клетках <i>S. woody</i> i, выращенных в различных условиях	Таблица 2. Уровни транскрипции генов ardA и dddY, а так	кже величины акрилатредуктазной активности

Условия выращивания	Акрилатредуктазная активность (нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹)	<i>ardA</i> мРНК/рРНК × 10 ⁻⁶	dddY мРНК/рРНК × 10 ⁻⁶
+ О2, без индукторов	< 0,3	1,5 ± 0,2	3,2 ± 0,6
+ O ₂ , 5 mM DMSP	< 0,3	0,9 ± 0,1	2,7 ± 0,4
+ О2, 1,5 мМ акрилат	< 0,3	1,6 ± 0,3	3,5 ± 0,2
+ О2, 1,5 мМ метакрилат	< 0,3	0,9 ± 0,2	1,9 ± 0,1
– O ₂ , без индукторов	9,0 ± 4,0	20 ± 2,0	2,6 ± 0,2
- O ₂ , 5 мМ DMSP	45 ± 15	13 ± 1,0	1,7 ± 0,2
– O ₂ , 1,5 мМ акрилат	260 ± 30	87 ± 5,0	21 ± 1,0
– O ₂ , 1,5 мМ метакрилат	780 ± 50	220 ± 40	27 ± 2,0

согласуется с известной токсичностью этого соединения [11, 27]. Поскольку концентрации терминального акцептора электронов менее 1 мМ не позволяют обнаружить стимуляцию роста при анаэробном дыхании, дальнейшие эксперименты проводили с использованием 10 мМ метакрилата, который гораздо менее токсичен [28], а также с такой же концентрацией DMSP или DMSO. Метакрилат и DMSP увеличивали выход биомассы на 20–25% (рис. 6). Похожий эффект вызывал и DMSO.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведённые эксперименты показали, что (i) полученные при разделении периплазматических белков S. woodyi фракции, обладающие акрилатредуктазной активностью, содержат белок ArdA (Swoo_0275) в качестве одного из основных компонентов; (іі) гетерологичная экспрессия генов *ardA/ardB* (*swoo*_0275/*swoo*_0276), но не одиночного гена ardA (swoo 0275) в клетках S. oneidensis MR-1 приводит к появлению в их периплазме несвойственной для этой бактерии акрилатредуктазной активности; (iii) экспрессия ard-оперона индуцируется присутствием акрилата или метакрилата в среде при анаэробном выращивании S. woodyi, что сопровождается появлением акрилатредуктазной активности в периплазме этой бактерии. Совокупность этих наблюдений позволяет заключить, что флавоцитохром *c* ArdAB (Swoo 0275/Swoo 0276) ответственен за восстановление акрилата в клетках S. woodyi. По аналогии со сходными ферментами [28] можно предположить, что природным донором электронов для Ard является низкопотенциальный цитохром c.

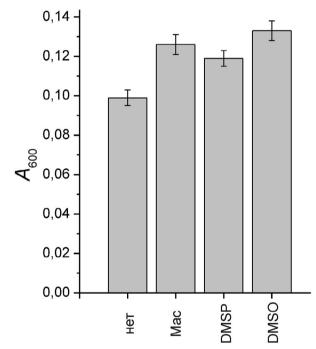


Рис. 6. Анаэробный рост *S. woodyi* в присутствии различных акцепторов электронов. Начальная оптическая плотность при посеве культуры составляла 0,005. Клетки выращивали анаэробно при 25 °C в течение 18 ч. Где указано, в среду роста добавляли 10 мМ метакрилат (Mac), DMSP или DMSO (столбец «нет» – без добавления акцепторов). Показаны конечные значения оптической плотности культур при 600 нм, планки погрешностей указывают стандартные отклонения для трёх биологических повторов

Анализ ферментативной активности Ard показал, что этот белок довольно специфичен и восстанавливает только акрилат и метакрилат. По-видимому, в каталитическом центре Ard способны связываться α,β-ненасыщенные карбоновые кислоты только с небольшими по размеру

заместителями в α- и β-положениях. При этом белок более чувствителен к размеру заместителя в β-положении, так как Ard не способен восстанавливать кротонат (β-метилакрилат), тогда как метакрилат (α-метилакрилат) восстанавливается Ard, хотя и с низкой скоростью. В случае метакрилата наличие метильной группы в α-положении слабо влияет на связывание этого соединения с Ard, однако, по-видимому, приводит к неправильной ориентации субстрата в активном центре, значительно замедляющей перенос гидрид-иона или протона на метакрилат. Это, по-видимому, и объясняет 22-кратное различие метакрилатредуктазной и акрилатредуктазной активностей Ard (рис. 5).

Исследование индукции синтеза Ard в клетках S. woodyi показало, что максимальная активность этого белка наблюдается в анаэробных условиях в присутствии акрилата и особенно метакрилата (табл. 2). Больший индуцирующий эффект метакрилата, по-видимому, не физиологичен и объясняется медленным исчерпанием этого соединения в среде роста из-за низкой активности Ard по отношению к метакрилату. Интересно, что DMSP был лишь слабым индуктором Ard, возможно, из-за бо́льшей индукции Ard по сравнению с DddY в анаэробных условиях, вследствие чего стационарная концентрация акрилата при росте в присутствии DMSP должна быть незначительной. Такое соотношение активностей Ard и DddY, по-видимому, позволяет избежать токсического действия акрилата при DMSP-зависимом анаэробном росте этой бактерии.

Акрилатзависимая индукция синтеза Ard в анаэробных условиях и её отсутствие в аэробных условиях выращивания указывают на то, что данный белок нужен клеткам S. woodyi для анаэробного дыхания, использующего этот субстрат как терминальный акцептор в электрон-транспортной цепи. Проверка такого предположения осложнялась тем, что эта бактерия неспособна к анаэробному росту в минимальной среде, а использование богатых сред обеспечивает её анаэробный рост даже в отсутствии акцепторов электронов, что значительно снижает наблюдаемый эффект стимуляции ими анаэробного роста. Нам не удалось обнаружить стимуляцию роста S. woodyi в анаэробных условиях в присутствии акрилата (данные не представлены). Как уже отмечено выше, это, по-видимому, связано с токсичностью этой ненасыщенной карбоновой кислоты [11, 27], что не позволяет использовать концентрации акрилата более 1 мМ. Однако в присутствии метакрилата и DMSP наблюдалось небольшое, но достоверное увеличение выхода биомассы (на 20-25%), сравнимое с эффектом такого классического терминального акцептора, как DMSO (рис. 6).

Гены Ard-подобных белков широко распространены среди различных морских бактерий и зачастую вместе с геном dddY образуют на хромосоме характерный генный кластер (рис. S1 Приложения), по-видимому, позволяющий осуществлять анаэробное дыхание на таком широко распространённом в морских экологических нишах соединении, как DMSP. H. aestuarii, единственная описанная ранее бактерия, способная использовать образованный из DMSP акрилат в качестве терминального акцептора электронов [7], также содержит в своём геноме такой кластер, в том числе и ген ArdA-подобного белка (GenBank: SHJ73509). Аминокислотные последовательности белков ArdA из S. woodyi и H. aestuarii сходны между собой (50% идентичности, 66% сходства), особое сходство наблюдается для аминокислотных остатков каталитического центра (рис. 2, б). Интересно, что геном S. oneidensis MR-1 тоже содержит генный кластер dddY-ardAB (so_3622-so_3624), однако он инактивирован транспозоном ISSod3 [29], что, по-видимому, связано с адаптацией этой пресноводной бактерии к жизни в условиях, в которых водоросли и растения не синтезируют DMSP из-за низкой осмолярности среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе идентифицирован фермент, ответственный за восстановление акрилата в электрон-транспортной цепи *S. woodyi*. Возможность протекания этой реакции позволяет осуществлять DMSP-зависимое анаэробное дыхание у этой и, по-видимому, у многих других морских бактерий.

Вклад авторов. А.В. Богачев – концепция работы; Ю.В. Берцова, М.В. Серебрякова, В.А. Богачев, А.А. Байков, А.В. Богачев – получение результатов и анализ данных; А.А. Байков и А.В. Богачев – написание и редактирование текста статьи.

Благодарности. MALDI-MS был доступен для нас в результате реализации Программы развития Московского государственного университета 5.13.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-24-00043).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 89, вып. 4, 2024.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Bertsova, Y. V., Serebryakova, M. V., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2022) A novel, NADH-dependent acrylate reductase in *Vibrio harveyi*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **88**, e0051922, https://doi.org/10.1128/aem.00519-22.
- 2. Mikoulinskaia, O., Akimenko, V., Galouchko, A., Thauer, R. K., and Hedderich, R. (1999) Cytochrome *c*-dependent methacrylate reductase from *Geobacter sulfurreducens* AM-1, *Eur. J. Biochem.*, **263**, 346-352, https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00489.x.
- 3. Gross, R., Simon, J., and Kröger, A. (2001) Periplasmic methacrylate reductase activity in *Wolinella succinogenes*, *Arch. Microbiol.*, **176**, 310-313, https://doi.org/10.1007/s002030100323.
- 4. Bogachev, A. V., Bertsova, Y. V., Bloch, D. A., and Verkhovsky, M. I. (2012) Urocanate reductase: Identification of a novel anaerobic respiratory pathway in *Shewanella oneidensis* MR-1, *Mol. Microbiol.*, **86**, 1452-1463, https://doi.org/10.1111/mmi.12067.
- 5. Bertsova, Y. V., Serebryakova, M. V., Anashkin, V. A., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2024) A redox-regulated, heterodimeric NADH:cinnamate reductase in *Vibrio ruber*, *Biochemistry (Moscow)*, **89**, 241-256, https://doi.org/10.1134/S0006297924020056.
- 6. Little, A. S., Younker, I. T., Schechter, M. S., Bernardino, P. N., Méheust, R., Stemczynski, J., Scorza, K., Mullowney, M. W., Sharan, D., Waligurski, E., Smith, R., Ramanswamy, R., Leiter, W., Moran, D., McMillin, M., Odenwald, M. A., Iavarone, A. T., Sidebottom, A. M., Sundararajan, A., Pamer, E. G., Eren, A. M., and Light, S. H. (2024) Dietary- and host-derived metabolites are used by diverse gut bacteria for anaerobic respiration, *Nat. Microbiol.*, 9, 55-69. https://doi.org/10.1038/s41564-023-01560-2.
- 7. Van der Maarel, M. J. E. C., van Bergeijk, S., van Werkhoven, A. F., Laverman, A. M., Meijer, W. G., Stam, W. T., and Hansen, T. A. (1996) Cleavage of dimethylsulfoniopropionate and reduction of acrylate by *Desulfovibrio acrylicus* sp. nov., *Arch. Microbiol.*, **166**, 109-115, https://doi.org/10.1007/s002030050363.
- 8. Curson, A. R., Todd, J. D., Sullivan, M. J., and Johnston, A. W. (2011) Catabolism of dimethylsulphoniopropionate: microorganisms, enzymes and genes, *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 849-859, https://doi.org/10.1038/nrmicro2653.
- 9. Curson, A. R., Sullivan, M. J., Todd, J. D., and Johnston, A. W. (2011) DddY, a periplasmic dimethylsulfoniopropionate lyase found in taxonomically diverse species of Proteobacteria, *ISME J.*, **5**, 1191-1200, https://doi.org/10.1038/ismej.2010.203.
- 10. Arkhipova, O. V., Meer, M. V., Mikoulinskaia, G. V., Zakharova, M. V., Galushko, A. S., Akimenko, V. K., and Kondrashov, F. A. (2015) Recent origin of the methacrylate redox system in *Geobacter sulfurreducens* AM-1 through horizontal gene transfer, *PLoS One*, **10**, e0125888, https://doi.org/10.1371/journal.pone.
- 11. Todd, J. D., Curson, A. R., Sullivan, M. J., Kirkwood, M., and Johnston, A. W. (2012) The *Ruegeria pomeroyi acu*I gene has a role in DMSP catabolism and resembles *yhd*H of *E. coli* and other bacteria in conferring resistance to acrylate, *PLoS One*, 7, e35947, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035947.
- 12. Peek, J. A., and Taylor, R. K. (1992) Characterization of a periplasmic thiol:disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6210-6214, https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.6210.
- 13. Bertsova, Y. V., Kostyrko, V. A., Baykov, A. A., and Bogachev, A. V. (2014) Localization-controlled specificity of FAD:threonine flavin transferases in *Klebsiella pneumoniae* and its implications for the mechanism of Na⁺-translocating NADH:quinone oxidoreductase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1122-1129, https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2013.12.006.
- 14. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85, https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- 15. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, https://doi.org/10.1038/227680a0.
- 16. Thomas, P. E., Ryan, D., and Levin, W. (1976) An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, 75, 168-176, https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90067-1.
- 17. Saha, C. K., Sanches Pires, R., Brolin, H., Delannoy, M., and Atkinson, G. C. (2021) FlaGs and webFlaGs: discovering novel biology through the analysis of gene neighbourhood conservation, *Bioinformatics*, **37**, 1312-1314, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa788.
- 18. Sievers, F., and Higgins, D. G. (2018) Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences, *Protein Sci.*, **27**, 135-145, https://doi.org/10.1002/pro.3290.
- 19. Teufel, F., Almagro Armenteros, J. J., Johansen, A. R., Gíslason, M. H., Pihl, S. I., Tsirigos, K. D., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2022) SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models, *Nat. Biotechnol.*, **40**, 1023-1025, https://doi.org/10.1038/s41587-021-01156-3.

- 20. Taboada, B., Estrada, K., Ciria, R., and Merino, E. (2018) Operon-mapper: a web server for precise operon identification in bacterial and archaeal genomes, *Bioinformatics*, **34**, 4118-4120, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty496.
- 21. Feng, C. Q., Zhang, Z. Y., Zhu, X. J., Lin, Y., Chen, W., Tang, H., and Lin, H. (2019) iTerm-PseKNC: a sequence-based tool for predicting bacterial transcriptional terminators, *Bioinformatics*, **35**, 1469-1477, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty827.
- 22. Makemson, J. C., Fulayfil, N. R., Landry, W., van Ert, L. M., Wimpee, C. F., Widder, E. A., and Case, J. F. (1997) *Shewanella woodyi* sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 1034-1039, https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1034.
- 23. Dobbin, P. S., Butt, J. N., Powell, A. K., Reid, G. A., and Richardson, D. J. (1999) Characterization of a flavocytochrome that is induced during the anaerobic respiration of Fe³⁺ by *Shewanella frigidimarina* NCIMB400, *Biochem. J.*, **342**, 439-448, https://doi.org/10.1042/bj3420439.
- 24. Morris, C. J., Black, A. C., Pealing, S. L., Manson, F. D., Chapman, S. K., Reid, G. A., Gibson, D. M., and Ward, F. B. (1994) Purification and properties of a novel cytochrome: flavocytochrome *c* from *Shewanella putrefaciens*, *Biochem. J.*, **302**, 587-593, https://doi.org/10.1042/bj3020587.
- 25. Czjzek, M., Dos Santos, J. P., Pommier, J., Giordano, G., Méjean, V., and Haser, R. (1998) Crystal structure of oxidized trimethylamine N-oxide reductase from *Shewanella massilia* at 2.5 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **284**, 435-447, https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2156.
- 26. Sucheta, A., Ackrell, B. A., Cochran, B., and Armstrong, F. A. (1992) Diode-like behavior of a mitochondrial electron-transport enzyme, *Nature*, **356**, 361-362, https://doi.org/10.1038/356361a0.
- 27. Sieburth, J. M. (1961) Antibiotic properties of acrylic acid, a factor in the gastrointestinal antibiosis of polar marine animals, *J. Bacteriol.*, **82**, 72-79, https://doi.org/10.1128/jb.82.1.72-79.1961.
- 28. Arkhipova, O. V. (2023) Methacrylate redox systems of anaerobic bacteria, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **59**, 766-777, https://doi.org/10.1134/S0003683823060017.
- 29. Romine, M. F., Carlson, T. S., Norbeck, A. D., McCue, L. A., and Lipton, M. S. (2008) Identification of mobile elements and pseudogenes in the *Shewanella oneidensis* MR-1 genome, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 3257-3265, https://doi.org/10.1128/AEM.02720-07.

ACRYLATE REDUCTASE OF AN ANAEROBIC ELECTRON TRANSPORT CHAIN OF THE MARINE BACTERIUM Shewanella woodyi

Y. V. Bertsova, M. V. Serebryakova, V. A. Bogachev, A. A. Baykov, and A. V. Bogachev*

Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; E-mail: bogachev@belozersky.msu.ru

Many microorganisms are capable of anaerobic respiration in the absence of oxygen, by using different organic compounds as terminal acceptors in electron transport chain. We identify here an anaerobic respiratory chain protein responsible for acrylate reduction in the marine bacterium *Shewanella woodyi*. When the periplasmic proteins of *S. woodyi* were separated by ion exchange chromatography, acrylate reductase activity copurified with an ArdA protein (Swoo_0275). Heterologous expression of *S. woodyi ardA* gene (swoo_0275) in Shewanella oneidensis MR-1 cells did not result in the appearance in them of periplasmic acrylate reductase activity, but such activity was detected when the ardA gene was co-expressed with an ardB gene (swoo_0276). Together, these genes encode flavocytochrome c ArdAB, which is thus responsible for acrylate reduction in *S. woodyi* cells. ArdAB was highly specific for acrylate as substrate and reduced only methacrylate (at a 22-fold lower rate) among a series of other tested 2-enoates. In line with these findings, acrylate and methacrylate induced ardA gene expression in *S. woodyi* under anaerobic conditions, which was accompanied by the appearance of periplasmic acrylate reductase activity. ArdAB-linked acrylate reduction supports dimethylsulfoniopropionate-dependent anaerobic respiration in *S. woodyi* and, possibly, other marine bacteria.

Keywords: anaerobic respiration, acrylic acid, flavocytochrome, DMSP lyase, DddY, Shewanella

УДК 612.8

ГИППОКАМП ПОД ДАВЛЕНИЕМ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ У КРЫС SHR

Обзор

© 2024 М.Ю. Степаничев*, Д.И. Мамедова, Н.В. Гуляева

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485 Москва, Россия; электронная почта: m_stepanichev@ihna.ru

Поступила в редакцию 20.11.2023 После доработки 20.11.2023 Принята к публикации 14.03.2024

В клинических исследованиях и в экспериментах на животных были получены данные, свидетельствующие о связи хронической гипертензии с развитием когнитивных нарушений. В обзоре рассмотрены структурные и биохимические изменения в гиппокампе крыс линии SHR с генетической гипертензией, которых используют как модель эссенциальной гипертензии, а также сосудистой деменции. Дисфункция гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы, наблюдаемая у крыс SHR уже в раннем возрасте, может, наряду с развитием гипертензии, быть ключевым фактором изменений гиппокампа на структурном и молекулярном уровнях. Глобальные изменения на уровне организма (гипертензия, нейрогуморальная дисфункция) ассоциированы с развитием сосудистой патологии и нарушением гематоэнцефалического барьера. Изменения множественных биохимических глюкокортикоид-зависимых процессов в гиппокампе (дисфункция рецепторов стероидных гормонов, нарушения нейромедиаторных систем, дефицит нейротрофического фактора мозга (BDNF), окислительный стресс, нейровоспаление) сопровождаются структурными изменениями, включающими клеточные процессы нейровоспаления (микроглиоз, астроглиоз), нарушения нейрогенеза в субгранулярной нейрогенной нише, нейродегенеративные процессы на уровне синапсов, аксонов и дендритов вплоть до гибели нервных клеток. Следствием этого является дисфункция гиппокампа, ключевой структуры лимбической системы, необходимой для реализации когнитивных функций. Обобщение имеющихся результатов на различных уровнях, от уровня организма и структуры мозга (гиппокампа) до молекулярного, позволяет подтвердить трансляционную валидность крыс SHR для моделирования механизмов сосудистой деменции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гиппокамп, гипертензия, деменция, крысы SHR, крысы WKY, память, глюко-кортикоиды, гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальная система.

DOI: 10.31857/S0320972524040107 **EDN:** ZESRTD

ВВЕДЕНИЕ

Деменция – медленное прогрессирующее ухудшение психической функции, затрагивающее разные домены когнитивной сферы, в том числе механизмы памяти. Деменция часто ассоциирована с сосудистыми нарушениями (болезнью малых сосудов мозга, острыми нарушениями мозгового кровообращения и др.). Согласно дан-

ным Всемирной организации здравоохранения, в мире более 55 миллионов человек страдает от деменции, и это число ежегодно увеличивается примерно на 20% [WHO (2023) Dementia: Key facts, URL: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia]. В Российской Федерации деменция диагностирована более чем у 1,5 миллионов человек [Alzheimer's Association Data, URL: https://www.alz.org/ru/dementia-alzheimers-russia.asp].

Принятые сокращения: ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; ГГАКС – гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальная система; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; MP – минералокортикоидные рецепторы; BDNF – нейротрофический фактор мозга; SHR – spontaneously hypertensive rats, спонтанно-гипертензивные крысы; WKY – крысы Wistar-Kyoto.

^{*} Адресат для корреспонденции.

Основным фактором риска возникновения деменции, в т.ч. наиболее распространённой её формы, болезни Альцгеймера, является возраст пациента, а повышенное кровяное давление (гипертензия) является вторым по значимости фактором риска [1, 2]. Длительное наблюдение за пожилыми пациентами показало, что развитию деменции предшествовало повышение систолического и диастолического давления [3], и эти данные впоследствии были подтверждены другими исследователями [4]. Популяционное исследование группы людей в возрасте 59–71 года показало, что риск возникновения когнитивных нарушений выше у гипертензивных индивидуумов, особенно если они не получали антигипертензивной терапии [5]. Рассматривается возможная связь между гипертензией, возникающей в более раннем (детском, подростковом и юношеском) возрасте, и последующей когнитивной дисфункцией [6]. Гипертензию считают фактором риска для широкого спектра когнитивных нарушений, предшествующих развитию деменции: когнитивного снижения (ускоренного ухудшения когнитивных функций по сравнению с возрастной нормой), умеренных когнитивных нарушений (ухудшения памяти и мыслительной деятельности, не затрагивающей повседневные жизненные потребности) и самой деменции (нарушения памяти и других когнитивных функций, которые препятствуют нормальной жизнедеятельности) [7]. В связи с этим важно понять механизмы нарушений, к которым может приводить гипертензия в отделах мозга, играющих центральную роль в осуществлении когнитивных процессов.

В настоящем обзоре мы рассмотрим, какие механизмы задействованы в изменениях функции гиппокампа, структуры «информационной» системы мозга [8], которая участвует в процессах как формирования, так и извлечения памятных следов [8-10]. Гиппокамп - парная структура мозга, расположенная в височных долях, часть старой коры – принадлежит к отделам мозга, селективно чувствительным к различным типам повреждения [11-13]. Роль гиппокампа не ограничивается его вовлечённостью в осуществление когнитивных процессов. Он является одной из структур мозга, которые осуществляют регуляцию глобальной нейрогуморальной стресс-реализующей оси организма, гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной системы (ГГАКС) [14], и рефлекторного контроля деятельности сердечно-сосудистой системы [15, 16].

Отличительной чертой кровоснабжения гиппокампа является гораздо менее развитое сосудистое русло по сравнению с другими отделами мозга: сосуды, проникающие в паренхиму гиппокампа, расположены более редко, а их плотность ниже по сравнению с неокортексом [17]. Вследствие меньшей плотности капилляров и больших расстояний между ними для обеспечения нормального уровня функционирования плотно упакованных нейронов кислород должен диффундировать на довольно большие расстояния [18, 19]. Другой важной особенностью сосудов гиппокампа, в первую очередь артериол, является регуляция их просвета, поскольку эндотелиальные клетки гиппокампальных артериол, по-видимому, не экспрессируют эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS) и не могут продуцировать оксид азота (NO), важный фактор вазодилатации [20, 21]. Недостаточный уровень кровообращения в гиппокампе (гипоперфузия) является ведущей причиной его атрофии при старении и ассоциированных со старением заболеваний, например, болезни Альцгеймера [22, 23]. В отличие от молодых испытуемых, даже кратковременные колебания артериального давления у пожилых людей приводят к выраженному снижению перфузии медиальной височной доли, прежде всего гиппокампа и парагиппокампальной извилины [24], что увеличивает вероятность возникновения деменции. Показано, что нарушения эпизодической памяти связаны со снижением микроциркуляции в гиппокампе и парагиппокампальной извилине [25]. Аналогичное зависимое от возраста снижение перфузии гиппокампа наблюдали и у 6-месячных гипертензивных крыс линии SHR (spontaneously hypertensive rats, спонтанно-гипертензивные крысы) по сравнению с 4-месячными животными [20], и именно у 6-месячных крыс наблюдали нарушения памяти.

В обзоре мы приведём полученные в экспериментах на животных данные, свидетельствующие о связи гипертензии с развитием когнитивных нарушений, и рассмотрим молекулярные механизмы, лежащие в их основе. Основное внимание будет уделено результатам, полученным при исследовании на крысах линии SHR. Эта линия крыс, в которой у 100% особей наблюдается естественная гипертензия, была выведена К. Окамото и К. Аоки в Медицинской школе г. Киото в 1963 г. из аутбредных крыс Wistar-Kyoto (WKY) [26, 27]. Линию SHR используют как модель эссенциальной гипертензии, а также сосудистой патологии мозга, приводящей к деменции, а линию WKY (иногда линию Wistar) - в качестве их нормотензивного контроля [28, 29].

КРЫСЫ SHR КАК МОДЕЛЬ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ И СОСУДИСТОЙ ДЕМЕНЦИИ

Повышение артериального давления у крыс SHR происходит с раннего возраста, стабилизи-

руется на уровне 200 мм рт.ст. и более в возрасте 5-7 месяцев и остаётся на этом уровне до конца жизни [28, 30]. Структурные изменения сердечнососудистой системы у крыс этой линии включают гипертрофию и ремоделирование, максимально выраженные в левом желудочке, приводящие к нарушению сократительной функции и фибрилляции желудочков, апоптозу кардиомиоцитов [31, 32]. Повышенное давление крови у крыс SHR ассоциировано с модификацией жёсткости артерий и дисфункцией эндотелия, которые проявляются с возрастом [33]. У крыс этой линии проводящие артерии жёстче, чем у нормотензивных крыс, благодаря наличию более выраженного экстраклеточного матрикса, а изменение жёсткости сосудистой стенки сочетается с эндотелиальной дисфункцией, которая может возникать в результате высвобождения вазоконстрикторных факторов, противодействующих сосудорасширяющему эффекту NO без изменения или с незначительными изменениями его продукции. Влияние некоторых вазодилататоров в сосудах крыс SHR извращено: простациклин, обычно действующий как вазодилатирующий фактор благодаря взаимодействию с рецепторами простаноидов IP-типа, в аорте крыс SHR не вызывает релаксации, а стимулирует рецепторы ТР-типа в гладкомышечных клетках, вызывая их сокращение. У крыс SHR IP-рецепторы гладкомышечных клеток аорты не функционируют с возраста 12 недель, что способствует эндотелиальной дисфункции [34, 35].

Нарушения микроциркуляции мозга являются характерной чертой гипертензии, и этот общий принцип проявляется у крыс SHR. Артериолы гиппокампа 6-месячных самцов крыс SHR имеют меньший диаметр по сравнению с нормотензивными крысами WKY [20, 21], вероятно, в связи со сниженной продукцией NO и его биодоступностью в артериолах гиппокампа [17]. Важно, что у гипертензивных животных гипертрофическое ремоделирование сосудов и снижение способности к вазодилатации в максимальной степени характерны именно для сосудов гиппокампа в сравнении с другими отделами мозга [17, 20]. Как было отмечено выше, гиппокамп селективно чувствителен к патологическим факторам, вызывающим ухудшение перфузии, и это непосредственно связано со снижением когнитивных функций. В процессе формирования памяти гиппокамп может играть роль входного фильтра информации [9], а также участвовать в извлечении следов памяти для использования их в ходе организации поведенческого акта [36, 37]. Кроме того, гиппокамп принадлежит к структурам мозга, которые обеспечивают реакцию на события с низкой вероятностью подкрепления [8]. Эти реакции являются эмоционально окрашенными, и роль гиппокампа

в реализации таких эмоциональных состояний связана со специфическим контролем эмоций, которые осуществляет вентральная/передняя его часть [14].

Изменения поведения отмечают у крыс SHR уже в возрасте 3 месяцев (повышенная двигательная активность, импульсивность, невнимательность при выполнении разных поведенческих тестов, что позволяет многим авторам рассматривать такой фенотип как модель синдрома дефицита внимания с гиперактивностью) [38, 39]. Молодые животные SHR демонстрируют нарушения памяти в разных экспериментальных задачах, основанных на кратковременном или долговременном хранении приобретённого опыта [40, 41] или использовании рабочей памяти [42], а также повышенную импульсивность в ходе инструментального обучения [43].

Пространственную гиппокамп-зависимую память у крыс SHR исследовали в классической задаче в водном лабиринте Морриса (ВЛМ), когда животные должны были научиться находить скрытую платформу, ориентируясь по внелабиринтным сигналам. Интересно, что данные, полученные разными группами авторов, часто диаметрально противоположны в зависимости от тех контрольных линий животных, которые были использованы в экспериментах. Девятимесячные крысы SHR обучались хуже, чем нормотензивные крысы Sprague-Dawley (SD) [44]. Крысы SHR медленнее обучались находить платформу в ВЛМ по сравнению с крысами WKY в возрасте 1,5 [45], 3 [30] и 15 месяцев, при этом возрастные изменения обучения и памяти в ВЛМ развивались раньше именно у крыс SHR [46, 47]. При исследовании долговременной памяти, формирующейся в тесте распознавания нового объекта, было показано, что в возрасте 10 месяцев крысы SHR плохо запоминали объекты и не демонстрировали предпочтения в обследовании нового объекта при его предъявлении [48, 49]. Гипотензивная терапия блокатором рецепторов ангиотензина II типа лозартаном (но не фрагментами ангиотензина, обладающими гипотензивным действием) существенно улучшала различение знакомых и новых объектов [49]. Исследование рабочей памяти при обучении 3-месячных крыс SHR и WKY в радиальном восьмирукавном лабиринте выявило увеличение общего числа ошибок у крыс SHR по сравнению с животными WKY, которое становилось максимально выраженным при введении часовой задержки между 4-м и 5-м выбором рукава [50]. Tchekalarova et al. [40] наблюдали нарушение рабочей памяти у крыс SHR в Y-образном лабиринте. В целом, выраженность нарушений гиппокамп-зависимой пространственной памяти у гипертензивных крыс SHR зависит от возраста и условий задачи,

которую животные должны решить в ходе испытания. При этом вероятность нарушения рабочей памяти более выражена у тех животных, у которых изменения в мозге затрагивают не только гиппокамп, но и фронтальную кору, поскольку эта структура неокортекса играет ключевую роль в механизмах рабочей памяти [51].

СТРУКТУРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГИППОКАМПА У КРЫС SHR

Состояние церебральных артерий, в частности жёсткость артерий, является одним из факторов неблагоприятного прогноза развития процессов старения в мозге и деменции, поскольку оно ассоциировано с болезнью малых сосудов, инсультами, отложением β-амилоида, атрофией мозга [52]. Возникновение когнитивных нарушений у пожилых людей часто связывают с изменением объёма гиппокампа, одной из причин которого могут быть нейродегенеративные изменения, вызванные гипертензией. Длительные наблюдения больных с гипертензией показали, что у пациентов с большим сроком заболевания объём гиппокампа, измеренный при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ), снижен [53]. При этом уменьшение гиппокампа коррелировало с тяжестью когнитивных нарушений. Когнитивные нарушения и снижение объёма некоторых отделов гиппокампа были более выражены у гипертензивных пациентов, субъективно ощущающих деменцию, по сравнению с аналогичной группой больных без высокого давления [54].

Высокое артериальное давление приводит к модификации гиппокампа и в различных моделях гипертензии у животных. Содержание молодых половозрелых крыс на диете с высоким содержанием соли в течение девяти недель приводило к росту кровяного давления, сопровождавшемуся не только ухудшением выработки классического условнорефлекторного замирания и пространственной памяти, но и снижением синаптогенеза в гиппокампе [55]. В гиппокампе мышей, которых содержали в аналогичных условиях с 9 по 16 месяц жизни, было обнаружено снижение ветвления дендритов и плотности шипиков нейронов зубчатой извилины и новой коры [56], и эти морфологические изменения не восстанавливались даже после возвращения к диете с нормальным уровнем соли. Как у крыс, так и у мышей, содержавшихся на диете с высоким содержанием соли, было отмечено снижение мозгового кровотока [55, 56]. Поскольку, как отмечено выше, мозговой кровоток является ключевым звеном, влияющим на состояние нейронов гиппокампа, его снижение (примерно на 40% у крыс SHR по сравнению с крысами

Wistar [20, 57]), обусловленное высокой жёсткостью аорты и церебральных артерий и снижением их диаметра [58], приводит к значительным структурным изменениям в гиппокампе. Выявлено снижение объёма гиппокампа, а также фронтальной и окципитальной коры 6-месячных крыс SHR по сравнению с крысами WKY [59]. Эти данные также подтверждены исследованием с использованием 9,4Т МРТ, в котором показано, что изменения объёма структур мозга наблюдаются уже на этапах онтогенеза, предшествующих гипертензии (7 недель), или после её манифестации (19 недель) [60]. Снижение размера мозговых структур, атрофия головного мозга, уменьшение объёмов белого вещества [61] компенсируются накоплением жидкости в мозге, результатом чего является увеличение объёма желудочков мозга и развитие гидроцефалии [59, 62-64]. Характерной особенностью крыс SHR является нарушение гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [61].

У крыс SHR сети покоя в области гиппокампа более активны, чем у WKY, а значения времени релаксации Т1р, изменения которого ассоциированы с нейродегенеративными заболеваниями, в гиппокампе, таламусе и лобной коре у SHR были стабильно выше [65]. Нейродегенеративные изменения в гиппокампе, обусловленные гипертензией, включают снижение плотности нейронов в пирамидных слоях СА1 и СА3 [57, 63, 66], сопровождающееся уменьшением экспрессии нейрофиламента 200 кДа, которое может отражать дегенерацию аксонов пирамидных нейронов [67]. При этом в поле СА1 были обнаружены погибающие клетки с ядрами, содержавшими фрагментированный хроматин [66], а экспрессия каспазы-3, основной исполнительной каспазы апоптоза, была выше у крыс SHR по сравнению с крысами WKY [57]. У крыс SHR при сравнении с WKY отмечены изменения морфологии дендритов нейронов гиппокампа, медиальной префронтальной коры и прилежащего ядра [68]. В возрасте 8 месяцев у крыс SHR наблюдалась атрофия дендритов пирамидных нейронов поля СА1 дорсального гиппокампа и слоёв 3 и 5 префронтальной коры [69, 70]. Уменьшение плотности нейронов отмечено также в зубчатой извилине [70]. Обнаруженное у крыс SHR повреждение нейронов гиппокампа сопровождается снижением экспрессии синаптических белков, а также нарушенной аутофагией, о чём свидетельствовали сниженные уровни экспрессии белка Беклин-1 и дефект деградации Р62, одного из ключевых белков аутофагии [71].

Структурные изменения гиппокампа у крыс SHR характерны не только для нейронов, но и для глиальных клеток. Выявлен астроглиоз, проявлявшийся в увеличении как площади, проявлявшей иммунореактивность глиального фибриллярного

кислого белка (GFAP) - одного из основных маркеров астроцитов в клеточных областях СА1 и СА3 и зубчатой фасции [48, 66, 67], – так и общего количества этого белка в гиппокампе [67]. Интересно, что в новой коре экспрессия GFAP, оцененная по площади сигнала, у крыс SHR ниже по сравнению с крысами WKY, а с возрастом у крыс SHR она увеличивается [72]. Обусловленные гипертензией изменения затрагивают также увеличение проницаемости ткани мозга крыс SHR для воды. Известно, что проницаемость мозга для воды регулируется работой мембранного канала, образованного белком аквапорином-4 (AQP4) [73-75], максимальная экспрессия которого обнаружена в ножках астроцитов, формирующих ГЭБ и плотно примыкающих к микрососудам мозга [76-78]. У крыс SHR более высокий по сравнению с нормотензивными крысами WKY уровень экспрессии AQP4 ассоциирован с большим числом астроцитов в гиппокампе [66], что может свидетельствовать о нарушении проницаемости ГЭБ и большей его проницаемости для воды. Астроциты мозга крыс SHR характеризуются сдвигом фенотипа в сторону преобладания клеток типа А1 (провоспалительного фенотипа) [79]. Провоспалительная активация астроцитов ведёт к патологическому ремоделированию клеток и препятствует реализации их роли как элемента ренин-ангиотензиновой системы мозга, что способствует гибели нейронов и дальнейшему разрушению ГЭБ [80]. Кроме того, в гиппокампе крыс SHR уже в возрасте 1,5 месяцев наблюдаются более низкие уровни окклюдина и ZO-1 – белков плотных контактов, принимающих участие в формировании ГЭБ [81].

Изменения микроглии в гиппокампе крыс SHR начинаются в первые месяцы жизни этих животных. Плотность микроглии в их гиппокампе по сравнению с крысами WKY возрастает уже с 1,5-месячного возраста [81], а число микроглиоцитов увеличивается по мере старения животных [82]. При этом максимальное число клеток наблюдается в поле CA1, поле CA3 и хилусе [83]. Микроглия в гиппокампе крыс SHR имеет более выраженный провоспалительный фенотип [48], что сопровождается усилением экспрессии фактора некроза опухолей-α (TNF-α) [81].

Таким образом, характерные для крыс SHR нарушения обучения и памяти имеют под собой структурную основу, ассоциированную с уменьшением объёма гиппокампа, плотности нейронов в его основных клеточных полях, медленно развивающейся нейродегенерацией, включающей как увеличение числа гибнущих клеток, так и снижение синаптогенеза, нарушениями ГЭБ, в том числе за счёт модификации состояния астроцитов, микроглиозом с увеличением числа клеток с провоспалительным фенотипом.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГИППОКАМПЕ КРЫС SHR

Дисфункция ГГАКС у крыс SHR. Наряду со многими функциями, которые гиппокамп выполняет как регулятор когнитивных процессов и сложного поведения, этот отдел мозга играет важную роль в реакции на стресс [14, 84]. Гиппокамп включён в регуляторную петлю отрицательной обратной связи ГГАКС, которая контролирует выброс стероидных гормонов из коры надпочечников. Это возможно благодаря высокому уровню экспрессии в гиппокампе глюкокортикоидных (ГР) и минералокортикоидных (МР) рецепторов, а также 11-β-гидроксистероиддегидрогеназы-1, фермента, отвечающего за превращение неактивных стероидов в их активную форму [85]. Поскольку аффинность МР гиппокампа в отношении глюкокортикоидов гораздо выше, чем к альдостерону, они играют важную роль в поддержании ГГАКС, в то время как ГР, которые связывают глюкокортикоиды при стрессе или в период пика суточного ритма секреции этих гормонов, участвуют в реализации петли обратной связи [86-89]. В гиппокампе крыс SHR экспрессия MP и число иммунореактивных клеток, одновременно экспрессирующих МР и ГР, увеличено по сравнению с контрольными животными WKY [83]. Поскольку наряду с повышением экспрессии рецепторов кортикостероидов у крыс SHR наблюдали развитие нейровоспалительных процессов, предполагается, что повышенная экспрессия МР в гиппокампе вызывает смещение в сторону провоспалительного фенотипа, характерного для гипертонической энцефалопатии. Выявлена повышенная экспрессия мРНК МР во всём гиппокампе согласно данным qPCR, а также в поле САЗ по данным in situ гибридизации [90]. Внутривенное введение антагониста MP RU-2831 вызывало значительное снижение кровяного давления у крыс SHR. Авторы предполагают, что патологическая перегрузка МР гиппокампа может быть ассоциирована с гипертензией и энцефалопатией у крыс SHR. В сравнении с крысами WKY ёмкость связывания ГР у крыс SHR была выше в гипофизе, но ниже в гипоталамусе. Интересно, что введение антагониста МР эплеренона уменьшало когнитивный дефицит и усиливало аутофагию в нейронах гиппокампа [71].

Дисфункция ГГАКС отмечена и признана принципиально важной для развития гипертензии и патологии мозга у крыс SHR, начиная с самых ранних этапов изучения этой линии. Повышенные уровни циркулирующих глюкокортикоидов были выявлены у крыс SHR ещё в 1980–90-е гг. [91], и этот феномен подтверждался в многочисленных последующих исследованиях, в которых отмечалось повышенное содержание прогестерона,

кортикостерона и кортизола у этих животных [92]. Постепенное изменение уровня циркулирующего пролактина, кортикостерона и альдостерона заметно уже в возрасте 2 месяцев, когда уровень артериального давления начинает повышаться; это позволяет предположить, что существует связь между генетически запрограммированным патогенезом спонтанной гипертензии и прогрессивно повышающейся с возрастом чувствительностью ГГАКС к стрессу [93]. У молодых крыс SHR функция коры надпочечников усилена, и предполагается, что снижение реакции адренокортикотропного гормона (АКТГ) на стресс и введение экзогенного кортикотропин-релизинг гормона (CRH) у этих животных может быть связано с более высокими уровнями кортикостерона в плазме крови, а также, что повышенный уровень кортикостерона ассоциирован с развитием гипертонии у SHR [94]. Аномальную реакцию ГГАКС крыс SHR на CRH связывают с десенсибилизацией гипофиза животных к CRH [95, 96]. Интересно, что «циркадианные часы» надпочечников демонстрируют отчётливое фазовое опережение у линии SHR, что может влиять на регуляцию транскрипции генов, контролируемых такими «часами», и секрецию стероидных гормонов надпочечниками [97]. При этом крысы SHR демонстрируют нарушение регуляции экспрессии генов циркадианного ритма в гиппокампе, миндалине, паравентрикулярном ядре и префронтальной коре в сравнении с WKY [98]. Эти гены являются частью 103 дифференциально экспрессируемых генов в гиппокампе крыс SHR и WKY, выявленных транскриптомным анализом, при этом метаболомный анализ выявил 56 метаболитов со значительными отличиями, включая различные аминокислоты и их метаболиты [99]. В мозге крыс SHR отмечены повышенные базальные уровни фермента, синтезирующего эстроген – ароматазы [70, 100]. Это может свидетельствовать о том, что изменения метаболизма стероидных гормонов у животных этой линии не ограничиваются ГГАКС.

Нейромедиаторные системы. Развитие хронической гипертензии сопровождается целым рядом изменений в нейромедиаторном обеспечении мозга. Относительно хорошо исследованы изменения моноаминергической трансмиссии в мозге крыс SHR [29]. У крыс этой линии норадренергическая система гораздо более активна по сравнению с крысами линии WKY, что выражается в более высоком содержании норадреналина в структурах мозга. Путём использования метода суперфузии *in vitro* показано, что стимулированное глутаматом и К+ высвобождение радиоактивно меченого норадреналина ([3H]NE) из срезов префронтальной коры и гиппокампа у SHR выше, чем у нормотензивных крыс WKY или SD, но высвобождение

норадреналина в ответ на гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) у крыс SHR ниже [101, 102]. Эти данные позволяют предположить, что in vivo внеклеточные концентрации ГАМК могут быть снижены в гиппокампе SHR. Активность глутаматдекарбоксилазы и эффективность связывания рецепторов ГАМК были снижены в гиппокампе крыс SHR по сравнению с крысами WKY в прегипертензивный период онтогенеза и на ранних стадиях проявления гипертензии [103, 104]. Секреция ГАМК, индуцированная K⁺, была снижена в гиппокампе 3–4-месячных крыс SHR по сравнению с WKY [105], и связывание лигандов с ГАМКв-рецепторами также было слабее [106]. Предполагают, что нарушения равновесия и взаимной регуляции ГАМКергической и моноаминергической трансмиссии также могут лежать в основе гиперактивного поведения крыс SHR. Существенны изменения и дофаминергической трансмиссии. Повышенная двигательная активность крыс SHR позволяет предположить, что у этих животных изменена дофаминергическая трансмиссия [68]. В мозге крыс SHR до двухмесячного возраста наблюдается снижение экспрессии транспортера дофамина DAT, которое нормализуется с возрастом; нарушено высвобождение дофамина в префронтальной коре, прилежащем ядре и хвостатом ядре [29, 39]. В дорсальном гиппокампе крыс SHR снижение экспрессии тирозингидроксилазы коррелировало с ухудшением памяти [107]. В то же время у молодых крыс SHR уровень дофамина в гиппокампе был повышен по сравнению с крысами WKY, экспрессия тирозингидроксилазы и экспрессия практически всех ферментов, участвующих в метаболизме моноаминов, была также повышена [103]. Можно предположить, что преобладание норадренергической трансмиссии, особенно у взрослых и старых животных, обусловливает повышенную активность крыс SHR во многих поведенческих тестах.

Тела холинергических нейронов в основном сосредоточены в базальных ядрах переднего мозга, а их восходящие проекции в новую кору и гиппокамп имеют большое значение для осуществления когнитивных функций. В гиппокампе сублинии крыс SHR, предрасположенных к инсульту, уровень холина был ниже по сравнению с крысами WKY, и с возрастом он продолжал снижаться. Высвобождение ацетилхолина после стимуляции высокими концентрациями К+ также было снижено [108]. В гиппокампе 15-месячных крыс SHR наблюдали увеличение экспрессии везикулярного транспортера ацетилхолина (VAChT) по сравнению с 4-месячными животными, что свидетельствует о развивающемся дефиците этого медиатора [109]. В гиппокампе 6-месячных крыс SHR уровень везикулярного транспортера ацетилхолина был выше по сравнению с нормотензивными животными [110].

При этом рецепция ацетилхолина в гиппокампе практически не меняется: не обнаружено существенных изменений связывания радиоактивно меченых лигандов никотиновых и мускариновых рецепторов [30, 111].

Данные об особенностях глутаматергической системы крыс SHR немногочисленны и достаточно противоречивы. Было показано функциональное доминирование GluN2B-рецепторов [112], однако не было выявлено значимых различий между крысами SHR и WKY по экспрессии разных субъединиц NMDA-рецепторов глутамата. Увеличение с возрастом экспрессии GluN2B- и GluNA1-рецепторов в гиппокампе коррелировало с увеличением двигательной активности, но не изменениями памяти [113]. Электрофизиологические исследования выявили существенно сниженную трансмиссию, опосредованную глутаматными АМРА-рецепторами, в синапсах пирамидальных клеток от САЗ к CA1 в stratum radiatum и stratum oriens у крыс SHR. Результаты электронной микроскопии указывают на существенное повышение экспрессии субъединицы GluA2/3 в нейронах stratum oriens у этих животных [114]. Представленность симпортера хлорида и калия 5 (КСС2) в гиппокампе крыс SHR повышена, как и сплайс-варианта GLT1b глутаматного транспортера GLT1, в то время как общее количество GLT1 (в основном сплайс-варианта GLT1a) было снижено в сравнении с крысами WKY и SD; этот паттерн указывает на повышенный уровень внеклеточного глутамата [102]. Изменения обмена глутамата в гиппокампе и некоторых других отделах мозга крыс SHR подтверждаются метаболомными исследованиями [103, 115]. В мозге крыс SHR изменена экспрессия некоторых изоформ Homer, семейства каркасных белков, локализованных в постсинаптической плотности глутаматергических возбуждающих синапсов. Как мРНК, так и белки Homer 1a и Homer 2a/b, но не Homer 1b/c, экспрессировались на значительно более низких уровнях в гиппокампе SHR по сравнению с крысами WKY [116].

В целом, для крыс SHR характерно преобладание возбуждающей нейротрансмиссии в гиппокампе. Уровень возбуждающих медиаторов и активность их рецепторов увеличиваются с возрастом. Это коррелирует с более высокой активностью крыс этой линии в поведенческих тестах, поэтому считают, что функциональные нарушения в глутаматергической синаптической передаче могут быть в числе основных механизмов, приводящих к аномальному поведению у SHR [112]. Снижение тонических уровней ГАМК и ацетилхолина и повышение уровня глутамата в гиппокампе может быть причиной наблюдающихся когнитивных нарушений, которые, однако, удаётся выявить не у всех возрастных категорий животных и не во

всех тестах. Интересно, что генетически обусловленная гипертензия у крыс SHR ассоциирована с выраженными изменениями кальциевого гомеостаза. При этом у крыс SHR наблюдаются изменения как внутри-, так и внеклеточного содержания кальция. Они обусловлены изменениями структуры и функционирования кальциевых каналов разных типов, что приводит к перегрузке цитозоля клеток несвязанными ионами Ca²⁺ и их дефициту во внеклеточной среде [32, 117, 118].

У крыс SHR отмечены изменения и ряда других нейромедиаторных систем в структурах лимбической системы мозга. Например, продемонстрировано повышение экспрессии каннабиноидных рецепторов СВ1 в прелимбической коре и области 1 поясной извилины, а также в области САЗ дорсального гиппокампа, снижение экспрессии рецепторов TRPV1 в прелимбической и СА1-областях дорсального гиппокампа и её увеличение в базолатеральной миндалине [119]. У этих животных обнаружены также изменения рецепторов гиппокампа, связанных с опиоидной системой, которые, как предполагают, могут играть роль в центральном механизме контроля артериального давления [120].

Нейровоспаление, окислительный стресс, нейротрофический фактор мозга (BDNF). Сосудистые и цереброваскулярные изменения при гипертонической болезни часто связаны с воспалительными процессами. Воспаление поражает эндотелий сосудов, периваскулярные астроциты, которые образуют ГЭБ. Эта воспалительная реакция может привести к процессам нейровоспаления с последующим повреждением мозговой ткани [61]. Воспалительные процессы на уровне целого организма у крыс SHR описаны: было обнаружено повышенное содержание провоспалительных маркеров, уровень которых снижается с возрастом. Крысы SHR возрастом 5 недель демонстрируют повышенные уровни цитокинов, хемокинов, маркеров окислительного стресса в сыворотке крови и селезёнке по сравнению с 10-недельными животными [121].

Несколько групп исследователей с использованием различных подходов показали наличие процессов нейровоспаления в мозге крыс SHR. Макро- и микроглиоз, описанный рядом исследователей [61], отражает клеточные признаки нейровоспаления. В гиппокампе крыс SHR была повышена экспрессия TLR4 (Toll-подобного рецептора), GFAP и маркера микроглии Iba1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1). Высокую экспрессию TLR4 и ответ глиальных клеток в гиппокампе при гипертензии считают одним из ключевых механизмов повреждения мелких сосудов, результатом которого могут быть когнитивные нарушения [122]. По сравнению с крысами WKY у крыс

SHR уровни цитокинов интерлейкина (IL) IL-1β и TNF-а в гиппокампе были повышены. Значительное повышение уровня провоспалительного цитокина IL-1β отмечено в поле CA1 гиппокампа крыс SHR [61]. Старение крыс SHR приводит к значительному увеличению числа активированных астроцитов и апоптозных клеток, что сопровождается повышенной экспрессией маркеров окислительного стресса индуцибельной изоформы синтазы оксида азота (iNOS) и белка gp47phox, а также регуляторных белков апоптоза (Вах и каспаза-3). Сравнение с аналогичными по возрасту крысами WKY показало, что как старение, так и гипертония усиливают повреждение мозга и окислительный стресс в гиппокампе гипертензивных животных [123]. На фоне увеличения числа рамифицированных Iba1-позитивных глиальных клеток в гиппокампе крыс SHR обнаружено возрастание экспрессии сывороточной активируемой глюкокортикоидами киназы 1 (Sgk1), циклооксигеназы 2 (Cox2) и инфламмасомы Nlrp3, тогда как экспрессия мРНК трансформирующего фактора роста-в (Tgfβ) и NADPH-диафоразная активность NOS были снижены [83]. В гиппокампе и гипоталамусе крыс SHR заметно повышена экспрессия белка NF-кВ и способствующей воспалению iNOS, а также клеток, экспрессирующих расщеплённую каспазу-3 [124]. Другими авторами были получены противоположные данные: в гиппокампе взрослых крыс SHR продемонстрирована сниженная экспрессия iNOS на фоне повышенной экспрессии гемоксигеназы HO-1 [125]. У взрослых крыс SHR активность глутатионпероксидазы и уровни TNF-α были снижены в гиппокампе и префронтальной коре. Предполагается, что крысы SHR обладают окислительным профилем, который характеризуется увеличением выработки активных форм кислорода без эффективной антиоксидантной защиты и дефицитом цитокина TNF-α [126].

Несмотря на ряд противоречивых данных, обусловленных, наиболее вероятно, использованием животных разного возраста, имеющиеся результаты надёжно свидетельствуют о развитии нейровоспаления и окислительного стресса в гиппокампе крыс SHR. Это может быть одной из основных причин того, что крысы SHR демонстрируют более низкую экспрессию BDNF в гиппокампе по сравнению с крысами линий Wistar и WKY [40, 70, 100]. Известно, что дефицит BDNF ассоциирован с нарушениями глутаматергической нейротрансмиссии, и в этом взаимодействии участвуют механизмы, связанные с рецепторами как глутамата, так и BDNF [127]. Дефицит BDNF, наряду с избытком глюкокортикоидов, нейровоспалительными процессами в гиппокампе и окислительным стрессом, также является важным механизмом, который опосредует подавление нейрогенеза в гиппокампе [128]. Действительно, снижение нейрогенеза отмечено в зубчатой извилине крыс SHR [70, 100] и может вносить важный вклад в развитие когнитивных нарушений, наряду с нейродегенерацией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

«Мозг подобен скороварке, и он может выдержать не так много, прежде чем взорвётся». Кэти Гласс, британская писательница

Практически все биохимические механизмы, нарушение которых лежит в основе структурных изменений в гиппокампе, находятся под контролем ГГАКС [129], поэтому выявленная на раннем этапе исследования крыс SHR дисфункция этой основной нейрогуморальной системы организма на разных уровнях (исполнительного гормона кортикостерона, его рецепторов, регуляции на уровне гипоталамуса, гипофиза и надпочечников) может быть причиной изменений, найденных у животных этой линии в сравнении с нормотензивными. Нет сомнений в наличии многочисленных механистических связей гипертензии и нарушений ГГАКС, однако большинство механизмов ассоциации ГГАКС с различными системами организма в целом и мозга в частности, опосредующими повышенное давление крови при генетической гипертензии у крыс SHR, остаётся неисследованным. Основные гиппокампальные изменения у крыс этой линии кратко представлены на схеме (рисунок). Глобальные изменения на уровне организма (гипертензия, дисфункция ГГАКС) несомненно ассоциированы с развитием сосудистой патологии и нарушением ГЭБ. Изменения множественных биохимических глюкокортикоид-зависимых процессов в гиппокампе (дисфункция стероидных рецепторов, нарушения нейромедиаторных систем, дефицит BDNF, окислительный стресс, нейровоспаление) взаимосвязаны, и эти связи многочисленны и разнонаправлены. Возникающие на базе этих процессов структурные изменения включают клеточные процессы нейровоспаления (микроглиоз, астроглиоз), изменения нейрогенеза в субгранулярной нейрогенной нише, нейродегенеративные процессы на уровне синапсов, аксонов и дендритов вплоть до гибели нервных клеток. Следствием этого является нарушение функционирования гиппокампа, ключевой структуры лимбической системы, необходимой для осуществления когнитивных функций. Этот этап вновь реализуется на организменном уровне: возникают изменения поведения, когнитивный дефицит.

Крысы SHR представляют собой модель гипертонии и повреждения сосудов [61]. Принято считать, что цереброваскулярные изменения у SHR



Линия SHR как модель сосудистой деменции: изменения в гиппокампе. Схема показывает, каким образом глобальные изменения на уровне целого организма (гипертензия и нарушение функционирования ГГАКС) последовательно приводят к патологическим биохимическим и структурным изменениям в гиппокампе на фоне сосудистой патологии мозга и нарушения ГЭБ. Нейродегенеративные процессы и патологические изменения нейрогенеза в гиппокампе влияют на его функционирование, приводя в конечном итоге к когнитивным расстройствам, последствия которых реализуются на уровне поведения

могут имитировать заболевания сосудов головного мозга у лиц с артериальной гипертензией. Поскольку нарушение памяти у крыс SHR связано с гипоперфузией и сосудистой дисфункцией гиппокампа [20], животные этой линии в последние годы также рассматриваются как модель сосудистой деменции [61, 69]. Недавно было показано, что при проведении теста на толерантность к глюкозе уровень инсулина в плазме крови был значительно повышен у 7-месячных крыс SHR по сравнению с WKY. Крысы SHR демонстрировали сниженную экспрессию и повышенную активность β-субъединицы инсулинового рецептора (IR) в гиппокампе и неокортексе на фоне изменения соотношения фосфорилированной и общей киназы гликогенсинтазы 3β [130]. Иными словами, когнитивный дефицит у крыс SHR сопровождается как центральной, так и периферической дисфункцией инсулиновой системы, что позволяет дополнительно рассматривать линию SHR как модель деменции, индуцированной инсулинорезистентностью.

Вклад авторов. Концепция – М.С. и Н.Г; подбор литературы и подготовка рукописи – М.С., Д.М. и Н.Г; окончательный вариант рукописи был прочитан и одобрен всеми авторами.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 22-15-00132.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Santisteban, M. M., Iadecola, C., and Carnevale, D. (2023) Hypertension, neurovascular dysfunction, and cognitive impairment, *Hypertension*, **80**, 22-34, https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.122.18085.
- 2. Iadecola, C., Smith, E. E., Anrather, J., Gu, C., Mishra, A., Misra, S., Perez-Pinzon, M. A., Shih, A. Y., Sorond, F. A., van Veluw, S. J., and Wellington, C. L. (2023) The neurovasculome: key roles in brain health and cognitive impairment:

- a scientific statement from the American heart association/American stroke association, *Stroke*, **54**, 251-271, https://doi.org/10.1161/STR.00000000000431.
- 3. Skoog, I., Lernfelt, B., Landahl, S., Palmertz, B., Andreasson, L. A., Nilsson, L., Persson, G., Odén, A., and Svanborg, A. (1996) 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia, *Lancet*, **347**, 1141-1145, https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)90608-x.
- 4. Launer, L. J., Ross, G. W., Petrovitch, H., Masaki, K., Foley, D., White, L. R., and Havlik, R. J. (2000) Midlife blood pressure and dementia: the Honolulu-Asia aging study, *Neurobiol. Aging*, **21**, 49-55, https://doi.org/10.1016/s0197-4580(00)00096-8.
- 5. Tzourio, C., Dufouil, C., Ducimetière, P., and Alpérovitch, A. (1999) Cognitive decline in individuals with high blood pressure: a longitudinal study in the elderly. EVA Study Group. Epidemiology of vascular aging, *Neurology*, **53**, 1948-1952, https://doi.org/10.1212/wnl.53.9.1948.
- 6. Lancaster, K., Xu, Y., Savage, G., Cysique, L. A., and Peters, R. (2022) Blood pressure change and cognition in child-hood and early adulthood: a systematic review, *Ther. Adv. Chronic Dis.*, **13**, 20406223221085111, https://doi.org/10.1177/20406223221085111.
- 7. Iadecola, C., and Gottesman, R. F. (2019) Neurovascular and cognitive dysfunction in hypertension: epidemiology, pathobiology and treatment, *Circ. Res.*, **124**, 1025-1044, https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313260.
- 8. Симонов П. В. (2004) Избранные труды. Т. 1. Мозг: эмоции, потребности, поведение (Шевелев И. А., Раевский В. В., ред.), Наука, Москва.
- 9. Виноградова О. С. (1975) Гиппокамп и память, Наука, Москва, 332 с.
- 10. Dolan, R. J. (2002) Human memory systems, in *Memory and Emotions, Proceedings of the International School of Biocybernetics* (Calabrese, P., and Neugebauer, A., eds) New Jersey, London, Singapore, Hong Kong, World Scientific, pp. 183-201.
- 11. Cervós-Navarro, J., and Diemer, N. H. (1991) Selective vulnerability in brain hypoxia, *Crit. Rev. Neurobiol.*, **6**, 149-182.
- 12. Hossmann, K. A. (2000) The hypoxic brain. Insights from ischemia research, Adv. Exp. Med. Biol., 474, 155-169.
- 13. Stamenkovic, S., Li, Y., Waters, J., and Shih, A. (2023) Deep imaging to dissect microvascular contributions to white matter degeneration in rodent models of dementia, *Stroke*, **54**, 1403-1415, https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.122.037156.
- 14. Gulyaeva, N. V. (2019) Functional neurochemistry of the ventral and dorsal hippocampus: stress, depression, dementia and remote hippocampal damage, *Neurochem. Res.*, 44, 1306-1322, https://doi.org/10.1007/s11064-018-2662-0.
- 15. Shoemaker, J. K., and Goswami, R. (2015) Forebrain neurocircuitry associated with human reflex cardiovascular control, *Front. Physiol.*, **6**, 240, https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00240.
- 16. Shoemaker, J. K., Norton, K. N., Baker, J., and Luchyshyn, T. (2015) Forebrain organization for autonomic cardiovas-cular control, *Auton. Neurosci.*, **188**, 5-9, https://doi.org/10.1016/j.autneu.2014.10.022.
- 17. Johnson, A. C. (2023) Hippocampal vascular supply and its role in vascular cognitive impairment, *Stroke*, **54**, 673-685, https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.122.038263.
- 18. Ji, X., Ferreira, T., Friedman, B., Liu, R., Liechty, H., Bas, E., Chandrashekar, J., and Kleinfeld, D. (2021) Brain microvasculature has a common topology with local differences in geometry that match metabolic load, *Neuron*, **109**, 1168-1187, e13, https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.02.006.
- 19. Zhang, X., Yin, X., Zhang, J., Li, A., Gong, H., Luo, Q., Zhang, H., Gao, Z., and Jiang, H. (2019) High-resolution mapping of brain vasculature and its impairment in the hippocampus of Alzheimer's disease mice, *Natl. Sci. Rev.*, **6**, 1223-1238, https://doi.org/10.1093/nsr/nwz124.
- 20. Johnson, A. C., Miller, J. E., and Cipolla, M. J. (2020) Memory impairment in spontaneously hypertensive rats is associated with hippocampal hypoperfusion and hippocampal vascular dysfunction, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **40**, 845-859, https://doi.org/10.1177/0271678X19848510.
- 21. Johnson, A. C., and Cipolla, M. J. (2017) Altered hippocampal arteriole structure and function in a rat model of preeclampsia: potential role in impaired seizure-induced hyperemia, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **37**, 2857-2869, https://doi.org/10.1177/0271678X16676287.
- 22. Zhou, T. D., Zhang, Z., Balachandrasekaran, A., Raji, C. A., Becker, J. T., Kuller, L. H., Ge, Y., Lopez, O. L., Dai, W., and Gach, H. M. (2023) Prospective longitudinal perfusion in probable Alzheimer's disease correlated with atrophy in temporal lobe, *Aging Dis.*, https://doi.org/10.14336/AD.2023.0430.
- 23. Camargo, A., and Wang, Z. (2021) Longitudinal cerebral blood flow changes in normal aging and the Alzheimer's disease continuum identified by arterial spin labeling MRI, *J. Alzheimer's Dis.*, **81**, 1727-1735, https://doi.org/10.3233/JAD-210116.
- 24. Sible, I. J., Yew, B., Dutt, S., Li, Y., Blanken, A. E., Jang, J. Y., Ho, J. K., Marshall, A. J., Kapoor, A., Gaubert, A., Bangen, K. J., Sturm, V. E., Shao, X., Wang, D. J., and Nation, D. A. (2022) Selective vulnerability of medial temporal regions

- to short-term blood pressure variability and cerebral hypoperfusion in older adults, *Neuroimage Rep.*, **2**, 100080, https://doi.org/10.1016/j.ynirp.2022.100080.
- 25. Vikner, T., Eklund, A., Karalija, N., Malm, J., Riklund, K., Lindenberger, U., Bäckman, L., Nyberg, L., and Wåhlin, A. (2021) Cerebral arterial pulsatility is linked to hippocampal microvascular function and episodic memory in healthy older adults, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 41, 1778-1790, https://doi.org/10.1177/0271678X20980652.
- 26. Okamoto, K., and Aoki, K. (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats, *Jpn. Circ. J.*, **27**, 282-293, https://doi.org/10.1253/jcj.27.282.
- 27. Okamoto, K., Tabei, R., Fukushima, M., Nosaka, S., Yamori, Y., Ichijima, K., Haebara, H., Matsumoto, M., Maruyama, T., Suzuki, Y., and Tamegai, M. (1966) Further observations of the development of a strain of spontaneously hypertensive rats, *Jpn. Circ. J.*, **30**, 703-716, https://doi.org/10.1253/jcj.30.703.
- 28. Trippodo, N. C., and Frohlich, E. D. (1981) Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat, *Circ. Res.*, **48**, 309-319, https://doi.org/10.1161/01.res.48.3.309.
- 29. Tayebati, S. K., Tomassoni, D., and Amenta, F. (2012) Spontaneously hypertensive rat as a model of vascular brain disorder: microanatomy, neurochemistry and behavior, *J. Neurol. Sci.*, **322**, 241-249, https://doi.org/10.1016/j.jns.2012.05.047.
- 30. Gattu, M., Terry, A. V., Pauly, J. R., and Buccafusco, J. J. (1997) Cognitive impairment in spontaneously hypertensive rats: role of central nicotinic receptors. Part II, *Brain Res*, 771, 104-114, https://doi.org/10.1016/s0006-8993 (97)00794-4.
- 31. Азова М. М., Благонравов М. Л., Фролов В. А., Гигани О. Б., Гигани О. О. (2012) Апоптоз кардиомиоцитов и гипертрофия миокарда в динамике генетически обусловленной артериальной гипертензии у крыс, *Вестник РГМУ*, **6**, 63-65.
- 32. Kockskämper, J., and Pluteanu, F. (2022) Left atrial myocardium in arterial hypertension, *Cells*, **11**, 3157, https://doi.org/10.3390/cells11193157.
- 33. Safar, M., Chamiot-Clerc, P., Dagher, G., and Renaud, J. F. (2001) Pulse pressure, endothelium function, and arterial stiffness in spontaneously hypertensive rats, *Hypertension*, **38**, 1416-1421, https://doi.org/10.1161/hy1201.096538.
- 34. Félétou, M., Verbeuren, T. J., and Vanhoutte, P. M. (2009) Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors, *Br. J. Pharmacol.*, **156**, 563-574, https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00060.x.
- 35. Gluais, P., Lonchampt, M., Morrow, J. D., Vanhoutte, P. M., and Feletou, M. (2005) Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin, *Br. J. Pharmacol.*, **146**, 834-845, https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706390.
- 36. Hirsh, R. (1974) The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: a theory, *Behav. Biol.*, **12**, 421-444, https://doi.org/10.1016/s0091-6773(74)92231-7.
- 37. Gilmore, A. W., Audrain, S., and Martin, A. (2022) Specifying 'where' and 'what' is critical for testing hippocampal contributions to memory retrieval, *Cogn. Neurosci.*, **13**, 144-146, https://doi.org/10.1080/17588928.2022.2076071.
- 38. Kantak, K. M. (2022) Rodent models of attention-deficit hyperactivity disorder: An updated framework for model validation and therapeutic drug discovery, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **216**, 173378, https://doi.org/10.1016/j.pbb.2022.173378.
- 39. Regan, S. L., Williams, M. T., and Vorhees, C. V. (2022) Review of rodent models of attention deficit hyperactivity disorder, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **132**, 621-637, https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.11.041.
- 40. Tchekalarova, J., Krushovlieva, D., Ivanova, P., and Kortenska, L. (2023) Spontaneously hypertensive rats vs. Wistar Kyoto and Wistar rats: An assessment of anxiety, motor activity, memory performance, and seizure susceptibility, *Physiol. Behav.*, **269**, 114268, https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2023.114268.
- 41. Ferguson, S. A., and Gray, E. P. (2005) Aging effects on elevated plus maze behavior in spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley male and female rats, *Physiol. Behav.*, **85**, 621-628, https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.06.009.
- 42. Kantak, K. M., Singh, T., Kerstetter, K. A., Dembro, K. A., Mutebi, M. M., Harvey, R. C., Deschepper, C. F., and Dwoskin, L. P. (2008) Advancing the spontaneous hypertensive rat model of attention deficit/hyperactivity disorder, *Behav. Neurosci.*, **122**, 340-357, https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.2.340.
- 43. Sagvolden, T., Pettersen, M. B., and Larsen, M. C. (1993) Spontaneously hypertensive rats (SHR) as a putative animal model of childhood hyperkinesis: SHR behavior compared to four other rat strains, *Physiol. Behav.*, **54**, 1047-1055, https://doi.org/10.1016/0031-9384(93)90323-8.
- 44. De Bruin, N. M. W. J., Kiliaan, A. J., De Wilde, M. C., and Broersen, L. M. (2003) Combined uridine and choline administration improves cognitive deficits in spontaneously hypertensive rats, *Neurobiol. Learn Mem.*, **80**, 63-79, https://doi.org/10.1016/s1074-7427(03)00024-8.
- 45. King, J. A., Barkley, R. A., Delville, Y., and Ferris, C. F. (2000) Early androgen treatment decreases cognitive function and catecholamine innervation in an animal model of ADHD, *Behav. Brain Res.*, **107**, 35-43, https://doi.org/10.1016/s0166-4328(99)00113-8.

- 46. Wyss, J. M., Kadish, I., and van Groen, T. (2003) Age-related decline in spatial learning and memory: attenuation by captopril, *Clin. Exp. Hypertens.*, **25**, 455-474, https://doi.org/10.1081/ceh-120024988.
- 47. Wyss, J. M., Chambless, B. D., Kadish, I., and van Groen, T. (2000) Age-related decline in water maze learning and memory in rats: strain differences, *Neurobiol. Aging*, **21**, 671-681, https://doi.org/10.1016/s0197-4580 (00)00132-9.
- 48. Ronchetti, S., Labombarda, F., Roig, P., de Nicola, A. F., and Pietranera, L. (2023) Beneficial effects of the phytoestrogen genistein on hippocampal impairments of spontaneously hypertensive rats (SHR), *J. Neuroendocrinol.*, **35**, e13228, https://doi.org/10.1111/jne.13228.
- 49. Coatl-Cuaya, H., Tendilla-Beltrán, H., de Jesús-Vásquez, L. M., Garcés-Ramírez, L., Gómez-Villalobos, M. de J., and Flores, G. (2022) Losartan enhances cognitive and structural neuroplasticity impairments in spontaneously hypertensive rats, *J. Chem. Neuroanat.*, **120**, 102061, https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2021.102061.
- 50. Nakamura-Palacios, E. M., Caldas, C. K., Fiorini, A., Chagas, K. D., Chagas, K. N., and Vasquez, E. C. (1996) Deficits of spatial learning and working memory in spontaneously hypertensive rats, *Behav. Brain Res.*, 74, 217-221, https://doi.org/10.1016/0166-4328(95)00165-4.
- 51. Slotnick, S. D. (2023) No convincing evidence the hippocampus is associated with working memory, *Cogn. Neurosci.*, **14**, 96-106, https://doi.org/10.1080/17588928.2023.2223919.
- 52. Hughes, T. M., Craft, S., and Lopez, O. L. (2015) Review of 'the potential role of arterial stiffness in the pathogenesis of Alzheimer's disease', *Neurodegener. Dis. Manag.*, **5**, 121-135, https://doi.org/10.2217/nmt.14.53.
- 53. Triantafyllou, A., Ferreira, J. P., Kobayashi, M., Micard, E., Xie, Y., Kearney-Schwartz, A., Hossu, G., Rossignol, P., Bracard, S., and Benetos, A. (2020) Longer duration of hypertension and MRI microvascular brain alterations are associated with lower hippocampal volumes in older individuals with hypertension, *J. Alzheimers Dis.*, 74, 227-235, https://doi.org/10.3233/JAD-190842.
- 54. Cai, G., Wang, Y., Chen, R., Xu, S., Luo, J., Sun, Q., Li, M., Lin, H., Zhang, Q., Zheng, Y., Lin, H., and Liu, J. (2022) Hypertension status moderated the relationship between the hippocampal subregion of the left GC-ML-DG and cognitive performance in subjective cognitive decline, *Dis. Markers*, **15**, 7938001, https://doi.org/10.1155/2022/7938001.
- 55. Guo, C. P., Wei, Z., Huang, F., Qin, M., Li, X., Wang, Y. M., Wang, Q., Wang, J. Z., Liu, R., Zhang, B., Li, H. L., and Wang, X. C. (2017) High salt induced hypertension leads to cognitive defect, *Oncotarget*, **8**, 95780-95790, https://doi.org/10.18632/oncotarget.21326.
- 56. Meissner, A., Garcia-Serrano, A. M., Vanherle, L., Rafiee, Z., Don-Doncow, N., Skoug, C., Larsson, S., Gottschalk, M., Magnusson, M., and Duarte, J. M. N. (2022) Alterations to cerebral perfusion, metabolite profiles, and neuronal morphology in the hippocampus and cortex of male and female mice during chronic exposure to a high-salt diet, *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 300, https://doi.org/10.3390/ijms24010300.
- 57. Wang, Y., Zhang, Y., Wang, W., Liu, X., Chi, Y., Lei, J., Zhang, B., and Zhang, T. (2019) Effects of circadian rhythm disorder on the hippocampus of SHR and WKY rats, *Neurobiol. Learn. Memory*, **168**, 107141, https://doi.org/10.1016/j.nlm.2019.107141.
- 58. Sabbatini, M., Strocchi, P., Vitaioli, L., and Amenta, F. (2001) Microanatomical changes of intracerebral arteries in spontaneously hypertensive rats: a model of cerebrovascular disease of the elderly, *Mech. Ageing Dev.*, **122**, 1257-1268, https://doi.org/10.1016/s0047-6374(01)00234-2.
- 59. Sabbatini, M., Baldoni, E., Cadoni, A., Vitaioli, L., Zicca, A., and Amenta, F. (1999) Forebrain white matter in spontaneously hypertensive rats: a quantitative image analysis study, *Neurosci. Lett.*, **265**, 5-8, https://doi.org/10.1016/s0304-3940(99)00151-2.
- 60. Koundal, S., Liu, X., Sanggaard, S., Mortensen, K., Wardlaw, J., Nedergaard, M., Benveniste, H., and Lee, H. (2019) Brain morphometry and longitudinal relaxation time of spontaneously hypertensive rats (SHR) in early and intermediate stages of hypertension investigated by 3D VFA-SPGR MRI, *Neuroscience*, **404**, 14-26, https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.01.030.
- 61. Tayebati, S. K., Tomassoni, D., and Amenta, F. (2016) Neuroinflammatory markers in spontaneously hypertensive rat brain: an immunohistochemical study, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **15**, 995-1000, https://doi.org/10.2174/1871527315666160527155014.
- 62. Bendel, P., and Eilam, R. (1992) Quantitation of ventricular size in normal and spontaneously hypertensive rats by magnetic resonance imaging, *Brain Res.*, **574**, 224-228, https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90820-y.
- 63. Tajima, A., Hans, F. J., Livingstone, D., Wei, L., Finnegan, W., DeMaro, J., and Fenstermacher, J. (1993) Smaller local brain volumes and cerebral atrophy in spontaneously hypertensive rats, *Hypertension*, **21**, 105-111, https://doi.org/10.1161/01.hyp.21.1.105.
- 64. Lolansen, S. D., Barbuskaite, D., Ye, F., Xiang, J., Keep, R. F., MacAulay, N. (2023) Spontaneously hypertensive rats can become hydrocephalic despite undisturbed secretion and drainage of cerebrospinal fluid, *Fluids Barriers CNS*, **20**, 53, https://doi.org/10.1186/s12987-023-00448-x.

- 65. Huang, S. M., Wu, Y. L., Peng, S. L., Peng, H. H., Huang, T. Y., Ho, K. C., and Wang, F. N. (2016) Inter-strain differences in default mode network: a resting state fMRI study on spontaneously hypertensive rat and Wistar Kyoto rat, *Sci. Rep.*, **6**, 21697, https://doi.org/10.1038/srep21697.
- 66. Sabbatini, M., Strocchi, P., Vitaioli, L., and Amenta, F. (2000) The hippocampus in spontaneously hypertensive rats: a quantitative microanatomical study, *Neuroscience*, **100**, 251-258, https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00297-9.
- 67. Sabbatini, M., Catalani, A., Consoli, C., Marletta, N., Tomassoni, D., and Avola, R. (2002) The hippocampus in spontaneously hypertensive rats: an animal model of vascular dementia? *Mech. Ageing Dev.*, **123**, 547-559, https://doi.org/10.1016/s0047-6374(01)00362-1.
- 68. Sánchez, F., Gómez-Villalobos, M. de J., Juarez, I., Quevedo, L., and Flores, G. (2011) Dendritic morphology of neurons in medial prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in adult SH rats, *Synapse*, **65**, 198-206, https://doi.org/10.1002/syn.20837.
- 69. Solis-Gaspar, C., Vazquez-Roque, R. A., de Jesús Gómez-Villalobos, M., and Flores, G. (2016) Cerebrolysin improves memory and ameliorates neuronal atrophy in spontaneously hypertensive, aged rats, *Synapse*, **70**, 378-389, https://doi.org/10.1002/syn.21912.
- 70. Pietranera, L., Brocca, M. E., Roig, P., Lima, A., Garcia-Segura, L. M., and de Nicola, A. F. (2015) Estrogens are neuroprotective factors for hypertensive encephalopathy, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **146**, 15-25, https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.001.
- 71. Lin, Z., Lu, Y., Li, S., Li, Y., Li, H., Li, L., and Wang, L. (2022) Effect of eplerenone on cognitive impairment in spontaneously hypertensive rats, *Am. J. Transl. Res.*, **14**, 3864-3878.
- 72. Ritz, M.-F., Fluri, F., Engelter, S. T., Schaeren-Wiemers, N., and Lyrer, P. A. (2009) Cortical and putamen age-related changes in the microvessel density and astrocyte deficiency in spontaneously hypertensive and stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Curr. Neurovasc. Res.*, **6**, 279-287, https://doi.org/10.2174/156720209789630311.
- 73. Fukuda, A. M., and Badaut, J. (2012) Aquaporin 4: a player in cerebral edema and neuroinflammation, *J. Neuroinflammation*, **9**, 279, https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-279.
- 74. Nicchia, G. P., Nico, B., Camassa, L. M. A., Mola, M. G., Loh, N., Dermietzel, R., Spray, D. C., Svelto, M., and Frigeri, A. (2004) The role of aquaporin-4 in the blood–brain barrier development and integrity: studies in animal and cell culture models, *Neuroscience*, **129**, 935-944, https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.055.
- 75. Mader, S., and Brimberg, L. (2019) Aquaporin-4 water channel in the brain and its implication for health and disease, *Cells*, **8**, 90, https://doi.org/10.3390/cells8020090.
- 76. Dunn, C., Sturdivant, N., Venier, S., Ali, S., Wolchok, J., and Balachandran, K. (2021) Blood-brain barrier breakdown and astrocyte reactivity evident in the absence of behavioral changes after repeated traumatic brain injury, *Neurotrauma Rep.*, **2**, 399-410, https://doi.org/10.1089/neur.2021.0017.
- 77. Cibelli, A., Stout, R., Timmermann, A., de Menezes, L., Guo, P., Maass, K., Seifert, G., Steinhäuser, C., Spray, D. C., and Scemes, E. (2021) Cx43 carboxyl terminal domain determines AQP4 and Cx30 endfoot organization and blood brain barrier permeability, *Sci. Rep.*, **11**, 24334, https://doi.org/10.1038/s41598-021-03694-x.
- 78. Kushwaha, R., Li, Y., Makarava, N., Pandit, N. P., Molesworth, K., Birukov, K. G., and Baskakov, I. V. (2023) Reactive astrocytes associated with prion disease impair the blood brain barrier, *Neurobiol. Dis.*, **185**, 106264, https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106264.
- 79. Wang, L., Wu, L., Duan, Y., Xu, S., Yang, Y., Yin, J., Lang, Y., Gao, Z., Wu, C., Lv, Z., Shi, J., Wu, D., and Ji, X. (2022) Phenotype shifting in astrocytes account for benefits of intra-arterial selective cooling infusion in hypertensive rats of ischemic stroke, *Neurotherapeutics*, **19**, 386-398, https://doi.org/10.1007/s13311-022-01186-y.
- 80. Ramos, A. J. (2023) Brain renin–angiotensin system in the injured brain: the role of astrocytes and microglia, in *Angiotensin: From Kidney to Coronavirus* (Pilowsky, P., ed.) Amsterdam, Elsevier, pp. 449-471, https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99618-1.00016-7.
- 81. Fang, Z., Shen, G., Amin, N., Lou, C., Wang, C., and Fang, M. (2023) Effects of neuroinflammation and autophagy on the structure of the blood-brain barrier in ADHD model, *Neuroscience*, **530**, 17-25, https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2023.08.025.
- 82. Zhang, P., Fang, H., Lou, C., Ye, S., Shen, G., Chen, S., Amin, N., Botchway, B. O. A., and Fang, M. (2022) Enhanced glial reaction and altered neuronal nitric oxide synthase are implicated in attention deficit hyperactivity disorder, *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 901093, https://doi.org/10.3389/fcell.2022.901093.
- 83. Brocca, M. E., Pietranera, L., Meyer, M., Lima, A., Roig, P., de Kloet, E. R., and de Nicola, A. F. (2017) Mineralocorticoid receptor associates with pro-inflammatory bias in the hippocampus of spontaneously hypertensive rats, *J. Neuroendocrinol.*, **29**, https://doi.org/10.1111/jne.12489.
- 84. McEwen, B. S., Nasca, C., and Gray, J. D. (2015) Stress effects on neuronal structure: hippocampus, amygdala, and prefrontal cortex, *Neuropsychopharmacology*, **41**, 3-23, https://doi.org/10.1038/npp.2015.171.
- 85. Gadek-Michalska, A., Tadeusz, J., Rachwalska, P., and Bugajski, J. (2013) Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems, *Pharmacol. Rep.*, **65**, 1655-1662, https://doi.org/10.1016/s1734-1140(13)71527-5.

- 86. Gomez-Sanchez, E. P. (2014) Brain mineralocorticoid receptors in cognition and cardiovascular homeostasis, *Steroids*, **91**, 20-31, https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.014.
- 87. Sapolsky, R. M. (2003) Stress and plasticity in the limbic system, *Neurochem. Res.*, **28**, 1735-1742, https://doi.org/10.1023/a:1026021307833.
- 88. Sorrells, S. F., Caso, J. R., Munhoz, C. D., and Sapolsky, R. M. (2009) The stressed CNS: when glucocorticoids aggravate inflammation, *Neuron*, **64**, 33-39, https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.032.
- 89. Brocca, M. E., Pietranera, L., de Kloet, E. R., and de Nicola, A. F. (2019) Mineralocorticoid receptors, neuroin-flammation and hypertensive encephalopathy, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **39**, 483-492, https://doi.org/10.1007/s10571-018-0610-9.
- 90. Pietranera, L., Brocca, M. E., Cymeryng, C., Gomez-Sanchez, E., Gomez-Sanchez, C. E., Roig, P., Lima, A., and De Nicola, A. F. (2012) Increased expression of the mineralocorticoid receptor in the brain of spontaneously hypertensive rats, *J. Neuroendocrinol.*, **24**, 1249-1258, https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02332.x.
- 91. Kenyon, C. J., Panarelli, M., Holloway, C. D., Dunlop, D., Morton, J. J., Connell, J. M., and Fraser, R. (1993) The role of glucocorticoid activity in the inheritance of hypertension: studies in the rat, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **45**, 7-11, https://doi.org/10.1016/0960-0760(93)90115-d.
- 92. Kozłowska, A., Wojtacha, P., Równiak, M., Kolenkiewicz, M., and Tsai, M.-L. (2019) Differences in serum steroid hormones concentrations in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) an animal model of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD), *Physiol. Res.*, **68**, 25-36, https://doi.org/10.33549/physiolres.933907.
- 93. Iams, S. G., McMurthy, J. P., and Wexler, B. C. (1979) Aldosterone, deoxycorticosterone, corticosterone, and prolactin changes during the lifespan of chronically and spontaneously hypertensive rats, *Endocrinology*, **104**, 1357-1363, https://doi.org/10.1210/endo-104-5-1357.
- 94. Hashimoto, K., Makino, S., Hirasawa, R., Takao, T., Sugawara, M., Murakami, K., Ono, K., and Ota, Z. (1989) Abnormalities in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in spontaneously hypertensive rats during development of hypertension, *Endocrinology*, **125**, 1161-1167, https://doi.org/10.1210/endo-125-3-1161.
- 95. Fukuda, N., Honda, M., and Hatano, M. (1987) Abnormal response of adrenocorticotropin to corticotropin releasing factor in spontaneously hypertensive rats, *Jpn. Circ. J.*, **51**, 556-562, https://doi.org/10.1253/jcj.51.556.
- 96. Hattori, T., Hashimoto, K., and Ota, Z. (1986) Adrenocorticotropin responses to corticotropin releasing factor and vasopressin in spontaneously hypertensive rats, *Hypertension*, **8**, 386-390, https://doi.org/10.1161/01.hyp.8.5.386.
- 97. Tanaka, S., Ueno, T., Tsunemi, A., Nagura, C., Tahira, K., Fukuda, N., Soma, M., Abe, M. (2019) The adrenal gland circadian clock exhibits a distinct phase advance in spontaneously hypertensive rats, *Hypertens. Res.*, **42**, 165-173, https://doi.org/10.1038/s41440-018-0148-8.
- 98. Murray, A., Tharmalingam, S., Khurana, S., Lalonde, C., Nguyen, P., and Tai, T. C. (2022) Effect of prenatal glucocorticoid exposure on circadian rhythm gene expression in the brains of adult rat offspring, *Cells*, **11**, 1613, https://doi.org/10.3390/cells11101613.
- 99. Li, Y., Chu, X., Xie, X., Guo, J., Meng, J., Si, Q., and Jiang, P. (2023) Integrating transcriptomics and metabolomics to analyze the mechanism of hypertension-induced hippocampal injury, *Front. Mol. Neurosci.*, **16**, 1146525, https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1146525.
- 100. Pietranera, L., Correa, J., Brocca, M. E., Roig, P., Lima, A., Di Giorgio, N., Garcia-Segura, L. M., and De Nicola, A. F. (2016) Selective oestrogen receptor agonists rescued hippocampus parameters in male spontaneously hypertensive rats, *J. Neuroendocrinol.*, **28**, https://doi.org/10.1111/jne.12415.
- 101. Sterley, T. L., Howells, F. M., and Russell, V. A. (2013) Evidence for reduced tonic levels of GABA in the hippocampus of an animal model of ADHD, the spontaneously hypertensive rat, *Brain Res.*, **1541**, 52-60, https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.10.023.
- 102. Sterley, T. L., Howells, F. M., and Russell, V. A. (2016) Genetically determined differences in noradrenergic function: the spontaneously hypertensive rat model, *Brain Res.*, **1641**, 291-305, https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.11.019.
- 103. Alharbi, H., Ahmad, M., Tian, Z., Yu, R., and Li, Y. L. (2021) Therapeutic value of the metabolomic active neurotransmitter isorhynchophylline in the treatment of spontaneously hypertensive rats by regulating neurotransmitters, *Transl. Neurosci.*, **12**, 425-431, https://doi.org/10.1515/tnsci-2020-0185.
- 104. Czyzewska-Szafran, H., Wutkiewicz, M., Remiszewska, M., Jastrzebski, Z., Czarnecki, A., and Danysz, A. (1989) Down-regulation of the GABA-ergic system in selected brain areas of spontaneously hypertensive rats (SHR), *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, **41**, 619-627.
- 105. Ichida, T., Takeda, K., Sasaki, S., Nakagawa, M., Hashimoto, T., and Kuriyama, K. (1995) Age-related decrease of γ-aminobutyric acid (GABA) release in brain of spontaneously hypertensive rats, *Life Sci.*, **58**, 209-215, https://doi.org/10.1016/0024-3205(95)02278-3.
- 106. Ichida, T., and Kuriyama, K. (1998) Age-related development of gamma-aminobutyric acid (GABA)B receptor functions in various brain regions of spontaneously hypertensive rats, *Neurochem. Res.*, **23**, 89-95, https://doi.org/10.1023/a:1022409722274.

- 107. Leão, A. H. F. F., Meurer, Y. S. R., Freitas, T. A., Medeiros, A. M., Abílio, V. C., Izídio, G. S., Conceição, I. M., Ribeiro, A. M., and Silva, R. H. (2021) Changes in the mesocorticolimbic pathway after low dose reserpine-treatment in Wistar and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR): implications for cognitive deficits in a progressive animal model for Parkinson's disease, *Behav. Brain Res.*, **410**, 113349, https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113349.
- 108. Togashi, H., Kimura, S., Matsumoto, M., Yoshioka, M., Minami, M., and Saito, H. (1996) Cholinergic changes in the hippocampus of stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Stroke*, **27**, 520-526, https://doi.org/10.1161/01.str.27.3.520.
- 109. Hernandez, C. M., Høifødt, H., and Terry, A. V. (2003) Spontaneously hypertensive rats: Further evaluation of agerelated memory performance and cholinergic marker expression, *J. Psychiatry Neurosci.*, **28**, 197-209.
- 110. Tayebati, S. K., Di Tullio, M. A., and Amenta, F. (2004) Effect of treatment with the cholinesterase inhibitor rivastigmine on vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in rat brain, *Clin. Exp. Hypertens.*, **26**, 363-373, https://doi.org/10.1081/ceh-120034140.
- 111. Terry, A. V., Hernandez, C. M., Buccafusco, J. J., and Gattu, M. (2000) Deficits in spatial learning and nicotinic-acetylcholine receptors in older, spontaneously hypertensive rats, *Neuroscience*, **101**, 357-368, https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00377-8.
- 112. Jensen, V., Rinholm, J. E., Johansen, T. J., Medin, T., Storm-Mathisen, J., Sagvolden, T., Hvalby, O., and Bergersen, L. H. (2009) N-methyl-D-aspartate receptor subunit dysfunction at hippocampal glutamatergic synapses in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder, *Neuroscience*, **158**, 353-364, https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.05.016.
- 113. Yen, P. S. Y., Liu, Y. C., Chu, C. H., and Chen, S. L. (2022) Upregulation of glutamatergic receptors in hippocampus and locomotor hyperactivity in aged spontaneous hypertensive rat, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **42**, 2205-2217, https://doi.org/10.1007/s10571-021-01094-3.
- 114. Medin, T., Jensen, V., Skare, Ø., Storm-Mathisen, J., Hvalby, Ø., and Bergersen, L. H. (2019) Altered α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor function and expression in hippocampus in a rat model of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD), *Behav. Brain Res.*, **360**, 209-215, https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.12.028.
- 115. Yu, R., Yang, W., Qi, D., Gong, L., Li, C., Li, Y., and Jiang, H. (2019) Targeted neurotransmitter metabolomics profiling of oleanolic acid in the treatment of spontaneously hypertensive rats, *RSC Adv.*, **9**, 23276-88, https://doi.org/10.1039/c9ra02377a.
- 116. Hong, Q., Wang, Y. P., Zhang, M., Pan, X. Q., Guo, M., Li, F., Tong, M. L., Chen, R. H., Guo, X. R., and Chi, X. (2011) Homer expression in the hippocampus of an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder, *Mol. Med. Rep.*, 4, 705-712, https://doi.org/10.3892/mmr.2011.479.
- 117. Альдекеева А. С., Резник С. Я., Крайнова Ю. С., Клюева Н. З. (2020) Двигательная активность и уровни экспрессии мРНК белков пар-22 и gap-43 у крыс со спонтанной гипертензией, *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **106**, 654-662, https://doi.org/10.31857/S0869813920050015.
- 118. Чурина С. К., Клюева Н. З., Антонова О. С., Руденко Е. Д., Петрова Е. И., Макаров В. Л., Борисова И. Ю. (2014) Генетически детерминированные механизмы развития артериальной гипертензии при дефиците экзогенного кальция (паратиреоидный гипертензивный фактор), *Артериальная гипертензия*, **20**, 342-348, https://doi.org/10.18705/1607-419X-2014-20-5-342-348.
- 119. Almeida, V., Levin, R., Peres, F. F., Suiama, M. A., Vendramini, A. M., Santos, C. M., Silva, N. D., Zuardi, A. W., Hallak, J. E. C., Crippa, J. A., Abílio, V. C. (2019) Role of the endocannabinoid and endovanilloid systems in an animal model of schizophrenia-related emotional processing/cognitive deficit, *Neuropharmacology*, **155**, 44-53, https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.05.015.
- 120. McConnaughey, M. M., Wong, S. C., and Ingenito, A. J. (1992) Dynorphin receptor changes in hippocampus of the spontaneously hypertensive rat, *Pharmacology*, **45**, 52-57, https://doi.org/10.1159/000138972.
- 121. Kozłowska, A., Wojtacha, P., Równiak, M., Kolenkiewicz, M., and Huang, A. C. W. (2019) ADHD pathogenesis in the immune, endocrine and nervous systems of juvenile and maturating SHR and WKY rats, *Psychopharmacology (Berl)*, **236**, 2937-2958, https://doi.org/10.1007/s00213-019-5180-0.
- 122. Gao, F., Jing, Y., Zang, P., Hu, X., Gu, C., Wu, R., Chai, B., and Zhang, Y. (2019) Vascular cognitive impairment caused by cerebral small vessel disease is associated with the TLR4 in the hippocampus, *J. Alzheimers Dis.*, **70**, 563-572, https://doi.org/10.3233/JAD-190240.
- 123. Li, Y., Liu, J., Gao, D., Wei, J., Yuan, H., Niu, X., and Zhang, Q. (2016) Age-related changes in hypertensive brain damage in the hippocampi of spontaneously hypertensive rats, *Mol. Med. Rep.*, **13**, 2552-2560, https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4853.
- 124. Avolio, E., Pasqua, T., Di Vito, A., Fazzari, G., Cardillo, G., Alò, R., Cerra, M. C., Barni, T., Angelone, T., and Canonaco, M. (2018) Role of brain neuroinflammatory factors on hypertension in the spontaneously hypertensive rat, *Neuroscience*, **375**, 158-168, https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.01.067.

- 125. Huang, Y., Wu, L., Xu, C., Yang, B., and Wang, R. (2006) Increased HO-1 expression and decreased iNOS expression in the hippocampus from adult spontaneously hypertensive rats, *Cell Biochem. Biophys.*, **46**, 35-42, https://doi.org/10.1385/CBB:46:1:35.
- 126. Leffa, D. T., Bellaver, B., de Oliveira, C., de Macedo, I. C., de Freitas, J. S., Grevet, E. H., Caumo, W., Rohde, L. A., Quincozes-Santos, A., and Torres, I. L. S. (2017) Increased oxidative parameters and decreased cytokine levels in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder, *Neurochem. Res.*, **42**, 3084-3092, https://doi.org/10.1007/s11064-017-2341-6.
- 127. Gulyaeva, N. V. (2017) Interplay between brain BDNF and glutamatergic systems: a brief state of the evidence and association with the pathogenesis of depression, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 301-307, https://doi.org/10.1134/S0006297917030087.
- 128. Podgorny, O. V., and Gulyaeva, N. V. (2021) Glucocorticoid-mediated mechanisms of hippocampal damage: contribution of subgranular neurogenesis, *J. Neurochem.*, **157**, 370-392, https://doi.org/10.1111/jnc.15265.
- 129. Gulyaeva, N. V. (2023) Glucocorticoids orchestrate adult hippocampal plasticity: growth points and translational aspects, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 565-589, https://doi.org/10.1134/S0006297923050012.
- 130. Grünblatt, E., Bartl, J., Iuhos, D. I., Knezovic, A., Trkulja, V., Riederer, P., Walitza, S., and Salkovic-Petrisic, M. (2015) Characterization of cognitive deficits in spontaneously hypertensive rats, accompanied by brain insulin receptor dysfunction, *J. Mol. Psychiatry*, **3**, 6, https://doi.org/10.1186/s40303-015-0012-6.

HIPPOCAMPUS UNDER PRESSURE: MOLECULAR MECHANISMS OF COGNITIVE IMPAIRMENT IN SHR RATS

Review

M. Yu. Stepanichev*, D. I. Mamedova, and N. V. Gulyaeva

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology of the Russian Academy of Sciences, 117495 Moscow, Russia; e-mail: m stepanichev@ihna.ru

In clinical studies and in animal experiments, data have been obtained indicating the association of chronic hypertension with the development of cognitive impairment. The review examines structural and biochemical changes in the hippocampus of SHR rats with genetic hypertension, which are used as a model of essential hypertension, as well as vascular dementia. The dysfunction of the hypothalamicpituitary-adrenocortical system, observed in SHR rats at an early age, may, along with the development of hypertension, be a key factor in the damage to the hippocampus at the structural and molecular levels. Global changes at the body level (hypertension, neurohumoral dysfunction) are associated with the development of vascular pathology and destruction of the blood-brain barrier. Changes in multiple biochemical glucocorticoid-dependent processes in the hippocampus (dysfunction of steroid hormone receptors, disorders of neurotransmitter systems, BDNF deficiency, oxidative stress, neuroinflammation) are accompanied by structural changes including cellular processes of neuroinflammation (microgliosis, astrogliosis), disorders of neurogenesis in the subgranular neurogenic niche, neurodegenerative processes at the level of synapses, axons and dendrites up to neuronal cell death. The consequence of this is dysfunction of the hippocampus, a key structure of the limbic system necessary for the realization of cognitive functions. Summarizing of the available results at various levels, from the level of the organism and the structure of the brain (hippocampus) to the molecular one, allows us to confirm the translational validity of SHR rats for modeling the mechanisms of vascular dementia.

Keywords: hippocampus, hypertension, dementia, SHR rats, WKY rats, memory, glucocorticoids, hypothalamic-pituitary-adrenal axis

УДК 576.311.348.7:576.311.346.2

УНИКАЛЬНАЯ РОЛЬ ВИМЕНТИНА В СЕМЕЙСТВЕ БЕЛКОВ ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ФИЛАМЕНТОВ

Обзор

© 2024 И.Б. Алиева^{1*}, А.С. Шахов¹, А.А. Даял², А.С. Чуркина¹, О.И. Парфентьева², А.А. Минин^{2*}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная noчта: irina_alieva@belozersky.msu.ru

² Институт белка РАН, 119334 Москва, Россия; электронная почта: alexminin@gmail.com

Поступила в редакцию 20.11.2023 После доработки 10.12.2023 Принята к публикации 21.03.2024

Наименее изученный до недавнего времени компонент цитоскелета – промежуточные филаменты (ПФ) – в последние годы находится в зоне пристального внимания и активного исследования. В различных клетках ПФ состоят из разных белков, характерных для данного типа клеток. Накопленные к настоящему моменту данные меняют устоявшиеся представления о ПФ как структурах, обеспечивающих исключительно механическую прочность клеток. Помимо этой роли, было показано их участие в поддержании формы клеток и усилении клеточной адгезии. К настоящему времени накоплены данные, свидетельствующие о роли ПФ во множестве других биологических процессов, включая организацию микротрубочек и микрофиламентов, регуляцию ядерной структуры и активности, контроль клеточного цикла и регуляцию путей передачи сигналов. Отдельно следует отметить их активное участие в регуляции некоторых аспектов внутриклеточного транспорта. Среди белков, составляющих ПФ, особое место занимает виментин – как оказалось, он связан с развитием целого спектра различных патофизиологических состояний, включая онкологические заболевания, катаракту, болезнь Крона, ревматоидный артрит и ВИЧ. Учитывая особенности строения виментина, биологические функции различных его частей, его вовлечённость в регуляцию широкого спектра основных клеточных функций и связь с развитием заболеваний человека, в настоящем обзоре мы сосредоточились почти исключительно на виментине и известных к настоящему времени функциях виментиновых ПФ, акцентируя их особую роль в физиологии клеток в сравнении с ПФ, построенными из других белков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитоскелет, микротрубочки, актиновые филаменты, промежуточные филаменты, виментиновые филаменты, митохондрии.

DOI: 10.31857/S0320972524040113 **EDN:** ZENAYT

ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее сложноорганизованных и функционально универсальных систем клеток животных является цитоскелет – комплекс, состоящий из трёх типов структур: микротрубочек, актиновых филаментов (микрофиламентов) и промежуточных филаментов (ПФ). Цитоскелет участвует во множестве процессов, таких как деление клеток, эндоцитоз и внутриклеточный транспорт,

Принятые сокращения: ПФ – промежуточные филаменты.

сохранение и изменение формы клеток, клеточная подвижность и реакции клеток на внешние воздействия. Компоненты цитоскелета образуют высокоструктурированную и динамичную сеть, эффективно реагирующую на внешние и внутренние сигналы быстрой (в минутной шкале) реорганизацией.

Начиная с 80-х годов прошлого века, когда появились новые молекулярно-биологические и клеточные подходы к исследованиям, а затем и новые микроскопические методы, происходил бурный рост количества работ, касающихся динамики и функциональных особенностей микротрубочек и актиновых филаментов. В то же время ПФ исследо-

^{*} Адресат для корреспонденции.

694



Рис. 1. Классификация ПФ. К белкам I и II типов относятся кислые и основные кератины, эти белки экспрессируются в эпителиальных клетках. Белки III типа экспрессируются в различных типах клеток, включая мышечные клетки (десмин и синкоилин); фибробласты, лейкоциты и эндотелиальные клетки (виментин); периферические нейроны (периферин); глиальные клетки (GFAP). Белки IV типа в основном экспрессируются в клетках-предшественниках (нестин), в нейрональных (нейрофиламенты, α-интернексин, синемин-α и -β) и глиальных клетках (синемин-α и -β). К белкам типа V относят повсеместно экспрессируемые ламины, которые образуют ядерную ламину. Тип VI включает белки, специфичные для хрусталика (факинин и филензин). Звёздочкой отмечены типы белков, способные образовывать облигатные гетерополимеры

вались не столь активно, оставаясь наименее изученным компонентом цитоскелета. Позднее интерес к изучению ПФ возрос, в частности, и в связи с тем, что мутации в этих белках связаны с тяжёлыми заболеваниями человека: кожными болезнями (вызываются мутациями кератинов), нервными патологиями (связаны с нарушениями нейрофиламентов), мышечными дистрофиями и кардиомиопатиями (результат мутаций десмина) [1–4].

В геноме человека найдено около 70 генов, кодирующих белки ПФ. В эпителиях экспрессируются гены кератинов, в клетках нервной ткани нейрофиламентов или кислого глиального белка, в мышечных клетках – десмина. Виментин характерен для мезенхимных клеток, однако он может появляться и в других типах клеток, образуя смешанные ПФ. Одним из примеров такой экспрессии виментина является его появление в раковых клетках эпителиоидной природы при их злокачественном перерождении и образовании метастазов. Таким образом, виментин, по-видимому, играет ключевую роль в эпителиально-мезенхимальном переходе, хотя детали его участия в этом процессе до конца не ясны. Виментин играет определяющую роль и в процессах регенерации нейронов и мышечной ткани, поскольку в этих клетках он присутствует наряду с белками ПФ, характерными для данного типа тканей. В настоящем обзоре мы анализируем современные данные, свидетельствующие об индивидуальной функциональной роли виментина в физиологии различных клеток, его особом вкладе в контроль клеточных функций путём взаимодействия с другими белками и клеточными компонентами и вовлечённости в развитие разнообразных заболеваний, когда виментин может выступать в качестве клинического биомаркера.

БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ ПФ

ПФ вместе с микрофиламентами и микротрубочками образуют цитоскелет клеток многоклеточных животных. Два из трёх компонентов цитоскелета, микротрубочки и микрофиламенты, построены соответственно из тубулина и актина, представленных небольшим количеством изоформ и практически идентичных у всех эукариот. В отличие от них, в геноме человека обнаружено более 70 генов, кодирующих различные белки ПФ [5], которые, таким образом, образуют одно из самых многочисленных белковых семейств [6].

ПФ в разных клетках построены из различных белков, которые подразделяют на 6 типов (рис. 1) [6].

К І и ІІ типам относятся кислые и основные кератины соответственно. У человека обнаружено 28 кислых и 26 основных кератинов, что вместе составляет больше 75% от всех известных у человека белков ПФ (54 из 74). Кератины всегда собираются как гетерополимеры: одна молекула кератина І типа и одна – кератина ІІ типа формируют гетеродимер. Ко-экспрессирующиеся пары кератинов можно разделить на три группы: простые кератины однослойных эпителиев (например, К8/К18), барьерные (эпидермальные) кератины многослойного эпителия (например, К5/К14, К1/К10, К3/К12, К4/К13) и структурные кератины, которые формируют волосы и ногти [7].

К III типу ПФ относятся четыре основных белка (десмин, виментин, периферин и кислый глиальный белок (GFAP – glial filament acidic protein)) и синкоилин. Десмин характерен для мышечных клеток всех типов; виментин экспрессируется в фибробластах, лейкоцитах, эндотелиальных клетках и некоторых других мезенхимальных тканях. Периферин присутствует в основном в периферических нейронах, где он участвует в сборке ПФ вместе с белками IV типа; GFAP экспрессируется в глиальных клетках. Все белки III типа могут формировать как гомо-, так и гетерополимеры [6, 8]. Синкоилин экспрессируется в небольших количествах в мышечных клетках [9].

К IV типу ПФ относится 7 белков. Тяжёлый (NF-H), средний (NF-M) и лёгкий (NF-L) белки нейрофиламентов и α-интернексин экспрессируются в нейронах [10]. Синемин-α и синемин-β экспрессируются в нейронах и астроцитах [10], а также в мышечных клетках [10–12]. Нестин характерен для стволовых клеток и клеток эндотелия [10–12].

К V типу относятся белки внутриядерных ПФ. У человека к этой группе относятся 6 белков, кодируемых 3 генами: ламин А, ламин С1 и ламин С2 – продукты альтернативного сплайсинга гена *LMNA*; ламин В – продукт гена *LMNB1*; ламины В2 и В3 – продукты гена *LMNB2* [5, 13]. К VI типу относят два белка ПФ, экспрессирующихся в хрусталике глаза – факинин и филензин. Они достаточно сильно отличаются по структуре от других белков ПФ, однако их относят к этой группе на основании геномного анализа [14, 15].

РОЛЬ ПФ В ФИЗИОЛОГИИ КЛЕТКИ

Данные о белковом разнообразии ПФ наводят на мысль об их индивидуальной функциональной роли в физиологии различных клеток. Анализируя полученные к настоящему времени литературные данные и результаты собственных работ, мы при-

ходим к выводу о том, что виментин является белком ПФ, уникальным и важным для функционирования не только мезенхимальных, но и других типов клеток. Это представление базируется на целом ряде экспериментальных фактов. Так, в разных тканях организма различные белки из семейства ПФ вовлечены во взаимодействие с другими белками. В среднем каждый белок ПФ взаимодействует с пятьюдесятью другими белками, тогда как количество белков-партнёров виментина составляет около 300 [16]. Если известные мутации белков ПФ (например, кератина) приводят к генетическим заболеваниям различной степени тяжести, но не являются летальными, то известны лишь единичные случаи заболеваний, вызванных мутациями в гене виментина [17].

Известно, что виментиновые филаменты характерны для различных клеток мезенхимного происхождения (фибробласты, макрофаги, остеобласты, эндотелий и гладкомышечные клетки сосудов), а ПФ нейронов являются нейрофиламенты, играющие важную роль в поддержании формы отростков нервных клеток. Вместе с тем показано, что присутствие виментина необходимо для развития и регенерации периферических нервов [18–20] и целых сенсорных органов, например, вкусовых сосочков рыб [21].

Кроме того, экспрессия виментина является ключевым событием целого ряда патологий, возникающих у человека, поэтому он является широко используемым маркером в медицине [22-24]. Появление виментиновых ПФ характерно для эпителиально-мезенхимального перехода - процесса приобретения эпителиальными клетками подвижного фенотипа, в норме характерного для процессов эмбрионального развития и заживления ран, но сопутствующего также опухолевому метастазированию [23, 24]. Обнаружено увеличение содержания растворимого виментина при развитии воспалительных процессов и атеросклероза. И, хотя роль его пока ещё не определена, он используется как индикатор при диагностике этих заболеваний [22]. Многие исследователи рассматривают виментин как потенциальную мишень при лечении различных раковых [24] и нейродегенеративных заболеваний [20].

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПФ

Несмотря на белковое разнообразие, филаменты, построенные из разных белков ПФ, внешне не отличаются друг от друга. ПФ были названы так потому, что их диаметр составляет примерно 10 нм, т.е. имеет промежуточное значение между толщиной микрофиламентов (7 нм) и микротрубочек (25 нм). ПФ обладают следующими свойствами:

(1) они расположены в виде сетей в разных частях цитоплазмы клетки, окружают ядро, участвуют в образовании межклеточных контактов и поддерживают форму клетки; (2) основная функция ПФ, основанная на их механических свойствах и способности к самостоятельной сборке, заключается в сохранении целостности клеток и тканей, регуляции жёсткости клеток и защите клетки от механических повреждений, а также в регуляции клеточной адгезии и подвижности; (3) в клетках разных тканей ПФ состоят из белков различных типов.

Общей особенностью белков ПФ является высококонсервативный центральный альфа-спиральный домен, благодаря которому они обладают способностью образовывать фибриллярные структуры [25]. Два концевых домена не имеют определённой вторичной структуры, значительно различаясь у разных белков ПФ. Центральные части молекул образуют тело филамента, в то время как концевые части экспонированы на поверхности, чем, по-видимому, объясняется большое разнообразие свойств ПФ в разных типах клеток, а также разнообразные их взаимодействия со многими внутриклеточными компонентами.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПФ С ДРУГИМИ СТРУКТУРАМИ ЦИТОСКЕЛЕТА

Изначально описанные как отдельные структуры с характерными строением и функциями в клетке, три компонента цитоскелета оказались тесно взаимосвязанными. В настоящее время очевидно, что функциональная взаимосвязь между всеми тремя системами призвана поддерживать клеточную структуру и форму, а также регулировать её биохимические, механические и пространственные свойства.

Примечательно, что первые экспериментальные данные, наводящие на мысль о скоординированных реакциях отдельных компонентов цитоскелета, были получены на клетках, содержащих именно виментиновые филаменты. Было замечено, что прицельное разрушение одного компонента цитоскелета приводит к реорганизации одного либо двух других: при деполимеризации микротрубочек под действием колцемида или винбластина одновременно наблюдался коллапс виментиновых филаментов, проходивший в две стадии [26]: формирование толстых тяжей виментина, а затем – образование плотной околоядерной массы. Разрушение системы актиновых микрофиламентов с помощью цитохалазина D приводило к формированию тяжей виментина, но образования перинуклеарной массы не происходило; в клетках с полным коллапсом виментиновых филаментов наблюдалось восстановление тяжей. Авторы

предположили, что связывание тяжей виментина в перинуклеарную массу происходит за счёт взаимодействия ПФ с компонентами актинового кортекса клетки [26]. Чуть позднее, в начале 90-х годов, Ф. Гиоевой и В. Гельфандом было установлено, что распределение сети виментиновых ПФ в клетках зависит от активности моторного белка кинезина, который транспортирует их вдоль микротрубочек от центра к периферии [27].

Взаимодействие виментиновых и актиновых филаментов. Позже выяснилось, что актиновые и виментиновые филаменты могут быть связаны напрямую при участии С-концевого (хвостового) домена молекулы виментина; выделенные С-концевые фрагменты виментина колокализовались с актиновой сетью, но не с микротрубочками [28]. Механические характеристики ПФ, образованных виментином без С-концевого домена и полноразмерным виментином, мало отличаются [28]. Авторы этой работы считают, что непосредственное взаимодействие виментиновых филаментов и F-актина усиливается большим количеством переплетений, формирующихся в плотной сети, что предотвращает свободное скольжение виментиновых филаментов под действием механического стресса [28].

Связь виментиновых и актиновых структур может быть принципиально важна не только во время интерфазы, но и для обеспечения правильного прохождения митоза [29]. Виментиновые филаменты перераспределяются в актиновом кортексе во время деления клетки и образуют прочный каркас вместе с F-актином, при этом С-концевой домен виментина принципиально важен для такого перераспределения. Лишённый его полностью мутантный виментин (с аминокислотной последовательностью 1-411 без последних 55 аминокислот) образует изогнутые пучки, которые опутывают делящиеся хромосомы, что в дальнейшем приводит к митотическим катастрофам или асимметричным делениям [29]. В клетках с последовательными (разной длины) делециями хвостового домена (от виментина полностью без концевого домена до виментина 1-459) соразмерно нарушалась кортикальная ассоциация виментина с актином и прохождение митоза. Важно отметить, что разрушение F-актина, но не микротрубочек, приводит к «слипанию» виментина вблизи хромосомы [29].

Исследование протеома клеток HeLa показало, что виментин и плектин выступают в качестве ключевых регуляторов кортекса митотической клетки [30]. Виментиновые филаменты при делении клетки локализуются под актиновым кортексом, причём субкортикальный виментин регулирует организацию актинового кортекса и механику митоза [30].

Взаимодействие виментиновых филаментов и микротрубочек. Виментиновые филаменты взаимодействуют и с микротрубочками. Так, было показано, что в восстановленной системе in vitro виментиновые филаменты препятствуют деполимеризации микротрубочек и способствуют их восстановлению [31]. С. Костер с соавторами напрямую измеряли взаимодействие отдельных филаментов, в результате чего определили источник данного стабилизирующего эффекта – стохастическое, временное связывание виментиновых филаментов с микротрубочками [31]. В образовании такой связи участвуют как гидрофобные, так и электростатические взаимодействия [31].

Функциональная роль взаимодействия виментиновых ПФ с микротрубочками была продемонстрирована в экспериментах по изучению миграции эндотелиоцитов и ветвления сосудов. Впервые участие виментина в ангиогенезе было показано Eckes et al. [32]. В дальнейшем было продемонстрировано, что одним из ключевых компонентов, ответственных за формирование новых сосудов и контролирующих связанные процессы, такие как клеточная адгезия, организация внеклеточного матрикса и пептидазная активность, является белок Rudhira/BCAS3 [33]. Непосредственно связываясь как с микротрубочками, так и с виментиновыми филаментами, Rudhira/BCAS3 служит посредником в процессах ремоделирования цитоскелетных структур и изменения их динамики при миграции эндотелиальных клеток [34]. В то же время удаление белка Rudhira/BCAS3 приводит к уменьшению связей между филаментами, ведёт к нестабильности микротрубочек и, следовательно, нарушению фокальной адгезии. Кроме того, виментин оказался одним из регуляторов лигандов Notch во время ангиогенеза [35].

Взаимосвязь трёх цитоскелетных структур. Ярким примером тесной кооперации трёх систем цитоскелета является элонгация клеточного отростка, формирующегося у раковых клеток – инвадоподии [36]. Хотя для начальной стадии формирования инвадоподий требуется только участие актиновой системы, для дальнейшего их развития требуется участие микротрубочек и ПФ [36]. Виментиновые филаменты обнаруживались преимущественно в инвадоподиях значительной длины, т.е. на поздних этапах образования [36].

Функциональная связь акто-миозинового цитоскелета и ПФ также играет важную роль в эмбриогенезе [37]. Кооперативное взаимодействие виментиновых филаментов с другими компонентами цитоскелета регулируется активностью малых GTPаз семейства Rho. Так, в клетках остеосаркомы, в которых виментиновые ПФ ингибируют GTPазу RhoA, связывая фактор обмена гуаниловых нуклеотидов (GEF-H1), наблюдаются значи-

тельные перестройки актинового цитоскелета и уменьшение сократимости [37]. Согласно последним данным, процесс блэббинга плазматической мембраны зависит от субклеточного распределения виментиновых филаментов [38]. Как известно, образование блэбов (клеточных выступов, которые играют важную роль в миграции клеток при нормальном развитии, а также в распространении агрессивно мигрирующих опухолевых клеток (меланома, глиобластома)) обусловлено гидростатическим давлением, создаваемым в цитоплазме сократительным акто-миозиновым кортексом [39], причём разные клетки подчас одной и той же клеточной культуры по-разному предрасположены к образованию блэбов. Вместе с соавторами [38] мы исследовали особенности гетерогенности клеток, проявляемой клетками фибросаркомы НТ1080 во время их перехода к амебоидной подвижности после фармакологического ингибирования комплекса Arp2/3. Интенсивность мечения виментином в клетках с блэбами оказалась выше в околоядерной области и относительно низкой на периферии по сравнению с клетками без блэбов, где виментин распределялся равномерно. Уменьшение количества виментиновых филаментов на периферии клетки в значительной степени стимулирует блэббинг плазматической мембраны, тогда как увеличение количества виментиновых филаментов на периферии локально его предотвращает. В клетках с перинуклеарным распределением виментиновых филаментов блэббинг осуществляется более активно; более того, в клетках с асимметричным распределением виментиновых филаментов блэббинг происходит на краях клеток с уменьшенным количеством виментина. Такая связь между расположением блэбов и распределением виментиновых филаментов существует как в интерфазных, так и в митотических клетках [38].

Таким образом, различные функциональные взаимодействия виментиновых филаментов с микротрубочками и актиновыми компонентами клетки принципиально важны для её жизнедеятельности как в интерфазе, так и в митозе, на всех стадиях её развития и жизни, начиная с эмбриогенеза, и, особенно, при дифференцировке. Вместе с тем сведений о возможной роли других ПФ в разнообразных клеточных процессах пока недостаточно. Можно предположить, что разные белки ПФ играют специфическую роль в соответствующих дифференцированных тканях, но уже сейчас ясно, что виментин играет особую роль во многих клетках.

СВЯЗЬ ПФ С МИТОХОНДРИЯМИ

К настоящему времени в литературе накопились многочисленные сведения о взаимодействии ПФ с различными клеточными органеллами, помимо цитоскелетных структур, например, лизосомами и центросомой [40]. Однако наиболее активно исследуется их связь с митохондриями, поскольку последние занимают особое место в физиологии клеток [41].

Митохондрии являются основным источником метаболической энергии и многих важных клеточных компонентов, а также являются регулятором внутриклеточной концентрации кальция и процессов, связанных с апоптозом [42]. Неудивительно, что для обеспечения правильного распределения митохондрий в клетках имеется развитая система транспорта и локализации. Так, было показано, что митохондрии эффективно доставляются в места наибольшего потребления энергии целым комплексом моторных белков, связанных с микротрубочками и микрофиламентами [43, 44]. Вместе с тем многие авторы обратили внимание на возможную роль ПФ в закреплении митохондрий в определённых районах клеток и регуляции их свойств [45–47]. Данные о том, что связь между ПФ и митохондриями в значительной степени определяет свойства клеток, появились в ходе исследования причин наследственных заболеваний. Связь митохондрий с десминовыми филаментами была продемонстрирована в мышечных клетках [45], с белками нейрофиламентов - в нейронах [46, 48], а с виментином – в фибробластах [49]. Нарушенные распределение и форма митохондрий наблюдались в кератиноцитах у пациентов с тяжёлым кожным заболеванием - буллезным эпидермолизом (еріdermolysis bullosa simplex), которое вызывается мутациями в генах кератинов 5 и 14 [50]. В гепатоцитах, экспрессирующих мутантные формы кератинов 8 и 18, была обнаружена повышенная предрасположенность к апоптозу из-за повреждённых митохондрий [51]. К настоящему времени накоплено большое количество данных о различных патологических состояниях, связанных с нарушением структуры ПФ и, как следствие, с дефектами в функциях митохондрий [50-53]. Одним из ярких примеров такой зависимости является целый ряд наследственных десминопатий, при которых из-за мутаций гена десмина нарушается сеть ПФ, а также нормальное распределение и форма митохондрий в мышечных клетках [43]. Это приводит к тяжёлым заболеваниям, выражающимся в дистрофических нарушениях скелетных и сердечной мышц. Другой пример - группа нейродегенеративных заболеваний, вызванных мутациями в генах белков нейрофиламентов, при которых нарушаются морфология, распределение и функции митохондрий [53, 54]. Однако пока неясно, каков механизм действия различных белков ПФ на свойства митохондрий, связаны ли они напрямую или необходимо участие каких-то посредников, каков вклад каждого белка

при наличии смешанных сетей ПФ. Нам удалось ответить на некоторые из этих вопросов в отношении связи митохондрий с виментиновыми ПФ.

ОСОБАЯ РОЛЬ ВИМЕНТИНОВЫХ ПФ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ МИТОХОНДРИЙ

В наших исследованиях впервые было показано, что в *N*-концевой части молекулы виментина есть участок, ответственный за связь ПФ с митохондриями [55], которая контролирует их подвижность. Удаление или нарушение этого участка в молекуле виментина приводит к значительному увеличению подвижности митохондрий. Кроме того, мы продемонстрировали, что связывание митохондрий с виментиновыми филаментами приводит к увеличению их мембранного потенциала [56], а фосфорилирование виментина по остатку серина-55 в результате активации малой GTРазы Rac1 и её эффектора, протеинкиназы РАК1, нарушает эту связь и приводит к снижению потенциала митохондрий [57]. Мы предположили, что некоторые белки ПФ, подобно виментину, содержат участки, ответственные за взаимодействие с митохондриями. Анализ аминокислотных последовательностей различных белков ПФ показал, что такие белки как десмин, белок нейрофиламентов NFL и некоторые другие, содержат в *N*-концевой части участки, которые могли бы связываться с митохондриями, подобно соответствующему участку виментина [56]. Действительно, эксперименты с очищенным десмином и митохондриями из печени крысы показали, что этот белок ПФ может напрямую связываться с митохондриями in vitro [58]. Эти данные заставляют задуматься о роли виментина в клетках, содержащих и другие белки ПФ, что представляет собой крайне интересную тему для дальнейших исследований.

Проведённый нами анализ подвижности митохондрий показал, что основная часть этих органелл находится в стационарном состоянии благодаря взаимодействиям с цитоскелетом, и лишь небольшая их часть находится в процессе транспорта по микротрубочкам [59-63]. Оказалось, что один из ростовых факторов, лизофосфатидная кислота, действуя через малую GTPasy RhoA и связанный с ней белок mDia1, ингибирует движение митохондрий и вызывает их заякоривание на периферии клеток [62]. Этот эффект связан с индукцией полимеризации актина, так как латрункулин В, разрушающий F-актин, полностью его блокирует и, наоборот, увеличивает подвижность митохондрий [61, 62]. Дальнейшие исследования показали, что в регуляции подвижности митохондрий могут участвовать клеточные рецепторы, связывающие фибронектин [60], и протеинкиназа С [63].

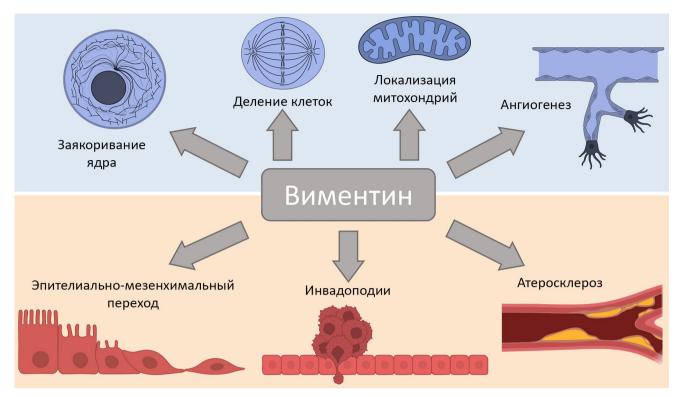


Рис. 2. Функции виментина в клетках в норме и при развитии различных патологий. В норме (голубой фон) виментин принимает участие в заякоривании ядра – его позиционировании в центральной части клетки [65]; взаимодействие виментина и актиновых филаментов необходимо для обеспечения митотического деления [29]; взаимодействие с виментином необходимо для правильной локализации митохондрий [41]; виментиновые филаменты необходимы для миграции эндотелиоцитов и ангиогенеза [35]. Виментин участвует в развитии ряда патологических процессов (розовый фон): экспрессия виментина в эпителиальных клетках сопровождает эпителиально-мезенхимальный переход при опухолевой инвазии [23]; виментин обеспечивает формирование инвадоподий у опухолевых клеток при их выходе в просвет сосудов через эндотелий, что способствует появлению метастазов [36]; растворимый виментин является маркером атеросклероза [22]

Оказалось, что активирующий эффект форболового эфира, активатора протеинкиназы С, на движение митохондрий зависит от наличия в клетках виментиновых филаментов. Используя мышиные клетки линии МFТ-16, в которых разрушен ген виментина, мы обнаружили, что подвижность митохондрий в них выше, чем в клетках контрольной линии МFТ-16, содержащих виментин, и добавление форболового эфира не приводит к дополнительному её увеличению. Это позволило нам предположить, что в основе регуляции лежит фосфорилирование протеинкиназой С одного из белков, принимающих участие во взаимодействии митохондрий с ПФ.

Чтобы подытожить всё вышесказанное о взаимодействии митохондрий с ПФ, нужно подчеркнуть, что распределение и локализация этих органелл определяется хорошо скоординированным действием всех цитоскелетных структур. Как было недавно показано в работе из лаборатории Л. Бруно, взаимодействия между митохондриями и цитоскелетом изменяют митохондриальную структуру [64]. По данным авторов, распределение в клетке и локальная ориентация митохондрий

ассоциированы главным образом с микротрубочками, которые являются основным каркасом митохондриальной организации. Оказалось, что с микротрубочками взаимодействуют преимущественно более удлинённые органеллы, тогда как связь с виментиновыми и актиновыми филаментами увеличивает изгиб митохондрий, что позволяет предположить наличие между ними механических взаимодействий. Механизмы, лежащие в основе этого явления, в значительной степени неизвестны [64].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интерес к исследованию ПФ в последние годы привёл к значительным успехам в нашем понимании их структурных и функциональных особенностей, важности для клеточной физиологии, а также позволил очертить круг внутриклеточных процессов, в которые они вовлечены. Наибольший прогресс достигнут в изучении функций виментина как в норме, так и при развитии различных патологий человека (рис. 2).

На ранних этапах исследований было продемонстрировано присутствие виментина в отдельных органах [65, 66]. Была показана экспрессия гена виментина в клетках соединительной ткани и центральной нервной системе, а также в эритроидных и мышечных клетках [67, 68]. Оказалось, что виментин в основном экспрессируется в высокопролиферативных и недифференцированных клетках [69, 70]. В результате более поздних исследований экспрессии гена виментина выяснилось, что он конститутивно экспрессируется во всех основных тканях человека [71–73]: белок виментин экспрессируется в большинстве из 44 проанализированных тканей, в 14 из которых (кожа, лёгкие, почки, костный мозг и лимфатические узлы) наблюдались высокие уровни его экспрессии.

Виментин является биомаркером и лекарственной мишенью в клинической практике, поскольку связан с большим количеством патологических состояний, таких как катаракта [74], злокачественные новообразования [75–77], заболевания, связанные с фиброзом [78], заболевания сердца и сосудов [79], инфекционные заболевания [80], кожные заболевания [81], заболевания кишечника (болезнь Крона) [82], диабет [83] и воспалительные заболевания [84].

Виментин является уникальным представителем семейства ПФ: мутации кодирующего его гена, по-видимому, преимущественно летальны; без участия виментина другие ПФ не способны формировать нормальную сеть; без его участия не могут нормально идти процессы регенерации и восстановления тканей после повреждения. Вместе с тем появившиеся новые сведения породили целый ряд вопросов, которые только предстоит разрешить – в частности, эти вопросы касаются функциониро-

вания клеток, содержащих не один тип ПФ. (1) Как регулируются функции митохондрий в клетках, содержащих одновременно виментиновые и десминовые филаменты? Являются ли виментин и десмин взаимозаменяемыми в отношении взаимодействия с митохондриями? (2) Какой из двух типов ПФ регулирует мембранный потенциал митохондрий в клетках, которые, помимо виментина, содержат нейрофиламенты? (3) Участвуют ли ПФ в связывании актиновых микрофиламентов с митохондриями? (4) Каковы молекулярные механизмы связывания различных белков ПФ с митохондриями и их влияния на функции митохондрий? В перспективе можно ожидать, что, используя новейшие методические и технические возможности современной биологии, исследователям удастся получить ответы на эти крайне актуальные для понимания физиологии клетки и человеческого организма вопросы в самое ближайшее время.

Вклад авторов. И.Б. Алиева, А.А. Минин – концепция и руководство работой; И.Б. Алиева, А.С. Шахов, А.А. Даял, А.С. Чуркина, О.И. Парфентьева, А.А. Минин – обсуждение результатов исследований; И.Б. Алиева, А.С. Шахов, А.А. Минин – написание текста; А.А. Даял, А.С. Чуркина – подготовка иллюстраций; И.Б. Алиева, А.С. Шахов, А.С. Чуркина, А.А. Минин – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа поддержана Российским научным фондом (проект 23-74-00036).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Cheng, J., Syder, A. J., Yu, Q. C., Letal, A., Paller, A. S., and Fuchs, E. (1992) The genetic basis of epidermolytic hyper-keratosis: a disorder of differentiation-specific epidermal keratin genes, *Cell*, **70**, 811-819, https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90314-3.
- 2. Chipev, C. C., Korge, B. P., Markova, N., Bale, S. J., DiGiovanna, J. J., Compton, J. G., and Steinert, P. M. (1992) A leucine→proline mutation in the H1 subdomain of keratin 1 causes epidermolytic hyperkeratosis, *Cell*, **70**, 821-828, https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90315-4.
- 3. Côté, F., Collard, J. F., and Julien, J. P. (1993) Progressive neuronopathy in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis, *Cell*, **73**, 35-46, https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90158-M.
- 4. Di Somma, S., De Divitiis, O., Marotta, M., Salvatore, G., Cudemo, G., Cuda, G., et al. (2000) Changes in myocardial cytoskeletal intermediate filaments and myocyte contractile dysfunction in dilated cardiomyopathy: an *in vivo* study in humans, *Heart*, **84**, 659-667, https://doi.org/10.1136/heart.84.6.659.
- 5. Fuchs, E., and Weber, K. (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease, *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 345-382, https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.002021.
- 6. Dutour-Provenzano, G., and Etienne-Manneville, S. (2021) Intermediate filaments, *Curr. Biol.*, **31**, R522-R529, https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.04.011.

- 7. Schweizer, J., Bowden, P. E., Coulombe, P. A., Langbein, L., Lane, E. B., Magin, T. M., et al. (2006) New consensus no-menclature for mammalian keratins, *J. Cell Biol.*, **174**, 169-174, https://doi.org/10.1083/jcb.200603161.
- 8. Toivola, D. M., Tao, G.-Z., Habtezion, A., Liao, J., and Omary, M. B. (2005) Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments, *Trends Cell Biol.*, **15**, 608-617, https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.09.004.
- 9. Iwatsuki, H., and Suda, M. (2010) Seven kinds of intermediate filament networks in the cytoplasm of polarized cells: structure and function, *Acta Histochem. Cytochem.*, **43**, 19-31, https://doi.org/10.1267/ahc.10009.
- 10. Lépinoux-Chambaud, C., and Eyer, J. (2013) Review on intermediate filaments of the nervous system and their pathological alterations, *Histochem. Cell Biol.*, **140**, 13-22, https://doi.org/10.1007/s00418-013-1101-1.
- 11. Lund, L. M., Kerr, J. P., Lupinetti, J., Zhang, Y., Russell, M. A., Bloch, R. J., and Bond, M. (2012) Synemin isoforms differentially organize cell junctions and desmin filaments in neonatal cardiomyocytes, *FASEB J.*, **26**, 137-148, https://doi.org/10.1096/fj.10-179408.
- 12. Michalczyk, K., and Ziman, M. (2005) Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organization, *Histol. Histopathol.*, **20**, 665-671, https://doi.org/10.14670/HH-20.665.
- 13. Schreiber, K. H., and Kennedy, B. K. (2013) When lamins go bad: nuclear structure and disease, *Cell*, **152**, 1365-1375, https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.015.
- 14. Georgatos, S. D., Gounari, F., and Remington, S. (1994) The beaded intermediate filaments and their potential functions in eye lens, *BioEssays*, **16**, 413-418, https://doi.org/10.1002/bies.950160609.
- 15. Song, S., Landsbury, A., Dahm, R., Liu, Y., Zhang, Q., and Quinlan, R. A. (2009) Functions of the intermediate filament cytoskeleton in the eye lens, *J. Clin. Invest.*, **119**, 1837-1848, https://doi.org/10.1172/JCI38277.
- 16. Battaglia, R. A., Delic, S., Herrmann, H., and Snider, N. T. (2018) Vimentin on the move: new developments in cell migration, *F1000Res.*, 7, https://doi.org/10.12688/f1000research.15967.1.
- 17. Muller, M., Bhattacharya, S. S., Moore, T., Prescott, Q., Wedig, T., Herrmann, H., and Magin, T. M. (2009) Dominant cataract formation in association with a vimentin assembly disrupting mutation, *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 1052-1057, https://doi.org/10.1093/hmg/ddn440.
- 18. Han, X., Xu, J., Chen, Z., Li, P., Zhao, L., Tao, J., et al. (2022) Gas5 inhibition promotes the axon regeneration in the adult mammalian nervous system, *Exp. Neurol.*, **356**, 114157, https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114157.
- 19. Ye, D., Wang, Q., Yang, Y., Chen, B., Zhang, F., Wang, Z., and Luan, Z. (2023) Identifying genes that affect differentiation of human neural stem cells and myelination of mature oligodendrocytes, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **43**, 2337-2358, https://doi.org/10.1007/s10571-022-01313-5.
- 20. Chen, K.-Z., Liu, S.-X., Li, Y.-W., He, T., Zhao, J., Wang, T., et al. (2023) Vimentin as a potential target for diverse nervous system diseases, *Neural Regener. Res.*, **18**, 969-975, https://doi.org/10.4103/1673-5374.355744.
- 21. Aragona, M., Porcino, C., Briglia, M., Mhalhel, K., Abbate, F., Levanti, M., et al. (2023) Vimentin localization in the zebrafish oral cavity: a potential role in taste buds regeneration, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, https://doi.org/10.3390/ijms242115619.
- 22. Kim, S. Y., Cho, W., Kim, I., Lee, S. H., Oh, G. T., and Park, Y. M. (2020) Oxidized LDL induces vimentin secretion by macrophages and contributes to atherosclerotic inflammation, *J. Mol. Med.*, **98**, 973-983, https://doi.org/10.1007/s00109-020-01923-w.
- 23. Zeisberg, M., and Neilson, E. G. (2009) Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions, *J. Clin. Invest.*, **119**, 1429-1437, https://doi.org/10.1172/JCI36183.
- 24. Mendez, M. G., Kojima, S.-I., and Goldman, R. D. (2010) Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition, *FASEB J.*, **24**, 1838-1851, https://doi.org/10.1096/fj.09-151639.
- 25. Herrmann, H., and Aebi, U. (2000) Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 79-90, https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)00060-5.
- 26. Hollenbeck, P. J., Bershadsky, A. D., Pletjushkina, O. Y., Tint, I. S., and Vasiliev, J. M. (1989) Intermediate filament collapse is an AtP-dependent and actin-dependent process, *J. Cell Sci.*, **92**, 621-631, https://doi.org/10.1242/jcs.92.4.621.
- 27. Gyoeva, F. K., and Gelfand, V. I. (1991) Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin, *Nature*, **353**, 445-448, https://doi.org/10.1038/353445a0.
- 28. Esue, O., Carson, A., Tseng, Y., and Wirtz, D. (2006) A direct interaction between actin and vimentin filaments mediated by the tail domain of vimentin, *J. Biol. Chem.*, **281**, 30393-30399, https://doi.org/10.1074/jbc.M605452200.
- 29. Duarte, S., Viedma-Poyatos, Á., Navarro-Carrasco, E., Martínez, A. E., Pajares, M. A., and Pérez-Sala, D. (2019) Vimentin filaments interact with the actin cortex in mitosis allowing normal cell division, *Nat. Commun.*, **10**, 1-19, https://doi.org/10.1038/s41467-019-12029-4.
- 30. Serres, M. P., Samwer, M., Truong Quang, B. A., Lavoie, G., Perera, U., Görlich, D., et al. (2020) F-actin interactome reveals vimentin as a key regulator of actin organization and cell mechanics in mitosis, *Dev. Cell*, **52**, 210-222.e7, https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.12.011.

- 31. Schaedel, L., Lorenz, C., Schepers, A. V., Klumpp, S., and Köster, S. (2021) Vimentin intermediate filaments stabilize dynamic microtubules by direct interactions, *Nat. Commun.*, **12**, https://doi.org/10.1038/s41467-021-23523-z.
- 32. Eckes, B., Dogic, D., Colucci-Guyon, E., Wang, N., Maniotis, A., Ingber, D., et al. (1998) Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts, *J. Cell Sci.*, **111**, 1897-1907, https://doi.org/10.1242/jcs.111.13.1897.
- 33. Shetty, R., Joshi, D., Jain, M., Vasudevan, M., Paul, J. C., Bhat, G., et al. (2018) Rudhira/BCAS3 is essential for mouse development and cardiovascular patterning, *Sci. Rep.*, **8**, 5632, https://doi.org/10.1038/s41598-018-24014-w.
- 34. Joshi, D., and Inamdar, M. S. (2019) Rudhira/BCAS3 couples microtubules and intermediate filaments to promote cell migration for angiogenic remodeling, *Mol. Biol. Cell*, **30**, 1437-1450, https://doi.org/10.1091/mbc.E18-08-0484.
- 35. Antfolk, D., Sjöqvist, M., Cheng, F., Isoniemi, K., Duran, C. L., Rivero-Muller, A., et al. (2017) Selective regulation of Notch ligands during angiogenesis is mediated by vimentin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E4574-E4581, https://doi.org/10.1073/pnas.1703057114.
- 36. Schoumacher, M., Goldman, R. D., Louvard, D., and Vignjevic, D. M. (2010) Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia, *J. Cell Biol.*, **189**, 541-556, https://doi.org/10.1083/jcb.200909113.
- 37. Van Bodegraven, E. J., and Etienne-Manneville, S. (2020) Intermediate filaments against actomyosin: the David and Goliath of cell migration, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **66**, 79-88, https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.05.006.
- 38. Chikina, A. S., Zholudeva, A. O., Lomakina, M. E., Kireev, I. I., Dayal, A. A., Minin, A. A., Maurin, M., Svitkina, T. M., and Alexandrova, A. Y. (2024) Plasma membrane blebbing is controlled by subcellular distribution of vimentin intermediate filaments, *Cells*, **13**, 105, https://doi.org/10.3390/cells13010105.
- 39. Paluch, E. K., and Raz, E. (2013) The role and regulation of blebs in cell migration, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **25**, 582-590, https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.05.005.
- 40. Monteiro, P., Yeon, B., Wallis, S. S., and Godinho, S. A. (2023) Centrosome amplification fine tunes tubulin acetylation to differentially control intracellular organization, *EMBO J.*, **42**, e112812, https://doi.org/10.15252/embj. 2022112812.
- 41. Schwarz, N., and Leube, R. (2016) Intermediate filaments as organizers of cellular space: how they affect mitochondrial structure and function, *Cells*, **5**, 30, https://doi.org/10.3390/cells5030030.
- 42. Nicholls, D. G., and Budd, S. L. (2000) Mitochondria and neuronal survival, Physiol. Rev., 80, 315-360.
- 43. Morris, R. L., and Hollenbeck, P. J. (1993) The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth, *J. Cell Sci.*, **104**, 917-927.
- 44. Chada, S. R., and Hollenbeck, P. J. (2003) Mitochondrial movement and positioning in axons: the role of growth factor signaling, *J. Exp. Biol.*, **206**, 1985-1992.
- 45. Milner, D. J., Mavroidis, M., Weisleder, N., and Capetanaki, Y. (2000) Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function, *J. Cell Biol.*, **150**, 1283-1298, https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1283.
- 46. Wagner, O. I., Lifshitz, J., Janmey, P. A., Linden, M., McIntosh, T. K., and Leterrier, J.-F. (2003) Mechanisms of mitochondria-neurofilament interactions, *J. Neurosci.*, 23, 9046-9058, https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-27-09046.2003.
- 47. Tolstonog, G. V., Belichenko-Weitzmann, I. V., Lu, J.-P., Hartig, R., Shoeman, R. L., Traub, U., and Traub, P. (2005) Spontaneously immortalized mouse embryo fibroblasts: growth behavior of wild-type and vimentin-deficient cells in relation to mitochondrial structure and activity, *DNA Cell Biol.*, **24**, 680-709, https://doi.org/10.1089/dna. 2005.24.680.
- 48. Straube-West, K., Loomis, P. A., Opal, P., and Goldman, R. D. (1996) Alterations in neural intermediate filament organization: functional implications and the induction of pathological changes related to motor neuron disease, *J. Cell Sci.*, **109 (Pt 9)**, 2319-2329, https://doi.org/10.1242/jcs.109.9.2319.
- 49. Mose-Larsen, P., Bravo, R., Fey, S. J., Small, J. V., and Celis, J. E. (1982) Putative association of mitochondria with a subpopulation of intermediate-sized filaments in cultured human skin fibroblasts, *Cell*, **31 (3 Pt 2)**, 681-692, https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90323-3.
- 50. Uttam, J., Hutton, E., Coulombe, P. A., Anton-Lamprecht, I., Yu, Q. C., Gedde-Dahl, T. J., et al. (1996) The genetic basis of epidermolysis bullosa simplex with mottled pigmentation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9079-9084, https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9079.
- 51. Gilbert, S., Loranger, A., Daigle, N., and Marceau, N. (2001) Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation, *J. Cell Biol.*, **154**, 763-773, https://doi.org/10.1083/jcb.200102130.
- 52. Capetanaki, Y. (2002) Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function, *Trends Cardiovasc. Med.*, **12**, 339-348, https://doi.org/10.1016/s1050-1738(02)00184-6.
- 53. Brownlees, J., Ackerley, S., Grierson, A. J., Jacobsen, N. J. O., Shea, K., Anderton, B. H., et al. (2002) Charcot-Marie-Tooth disease neurofilament mutations disrupt neurofilament assembly and axonal transport, *Hum. Mol. Genet.*, 11, 2837-2844, https://doi.org/10.1093/hmg/11.23.2837.

- 54. Pérez-Ollé, R., López-Toledano, M. A., Goryunov, D., Cabrera-Poch, N., Stefanis, L., Brown, K., and Liem, R. K. H. (2005) Mutations in the neurofilament light gene linked to Charcot-Marie-Tooth disease cause defects in transport, *J. Neurochem.*, 93, 861-874, https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03095.x.
- 55. Nekrasova, O. E., Mendez, M. G., Chernoivanenko, I. S., Tyurin-Kuzmin, P. A., Kuczmarski, E. R., Gelfand, V. I., et al. (2011) Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria, *Mol. Biol. Cell*, **22**, 2282-2289, https://doi.org/10.1091/mbc.E10-09-0766.
- 56. Chernoivanenko, I. S., Matveeva, E. A., Gelfand, V. I., Goldman, R. D., and Minin, A. A. (2015) Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments, *FASEB J.*, **29**, 820-827, https://doi.org/10.1096/fj.14-259903.
- 57. Matveeva, E. A., Venkova, L. S., Chernoivanenko, I. S., and Minin, A. A. (2015) Vimentin is involved in regulation of mitochondrial motility and membrane potential by Rac1, *Biol. Open*, 4, 1290-1297, https://doi.org/10.1242/bio.011874.
- 58. Dayal, A. A., Medvedeva, N. V., Nekrasova, T. M., Duhalin, S. D., Surin, A. K., and Minin, A. A. (2020) Desmin interacts directly with mitochondria, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8122, https://doi.org/10.3390/ijms21218122.
- 59. Кулик А. В., Гиоева Ф. К., Минин А. А. (2002) Видеомикроскопическое исследование движения митохондрий, *Онтогенез*, **33**, 366-373.
- 60. Некрасова О. Е., Минин А. А., Кулик О. В., Минин А. А. (2005) Регуляция фибронектином формы и внутри-клеточного распределения митохондрий, *Биологические мембраны*, **22**, 55-65.
- 61. Кулик А. В., Некрасова О. Е., Минин А. А. (2006) Фибриллярный актин регулирует подвижность митохондрий, *Биологические мембраны*, **23**, 42-51.
- 62. Minin, A. A., Kulik, A. V., Gyoeva, F. K., Li, Y., Goshima, G., and Gelfand, V. I. (2006) Regulation of mitochondria distribution by RhoA and formins, *J. Cell Sci.*, **119**, 659-670, https://doi.org/10.1242/jcs. 02762.
- 63. Некрасова О. Е., Кулик А. В., Минин А. А. (2007) Протеинкиназа С регулирует подвижность митохондрий, *Биологические мембраны*, **24**, 126-132.
- 64. Fernández Casafuz, A. B., De Rossi, M. C., and Bruno, L. (2023) Mitochondrial cellular organization and shape fluctuations are differentially modulated by cytoskeletal networks, *Sci. Rep.*, **13**, 4065, https://doi.org/10.1038/s41598-023-31121-w.
- 65. Gerashchenko, M. V., Chernoivanenko, I. S., Moldaver, M. V., and Minin, A. A. (2009) Dynein is a motor for nuclear rotation while vimentin IFs is a "brake", *Cell. Biol. Int.*, **33**, 1057-1064, https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2009.06.020.
- 66. Ramaekers, F. C. S., Duniat, I., Dodemont, H. J., Benedettit, E. L., and Bloemendal, H. (1982) Lenticular intermediate-sized filaments: biosynthesis and interaction with plasma membrane, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3208-3212, https://doi.org/10.1073/pnas.79.10.3208.
- 67. Ramaekers, F. C., Poels, L. G., Jap, P. H., and Bloemendal, H. (1982) Simultaneous demonstration of microfilaments and intermediate-sized filaments in the lens by double immunofluorescence, *Exp. Eye Res.*, **35**, 363-369, https://doi.org/10.1016/0014-4835(82)90099-9.
- 68. Capetanaki, Y. G., Ngai, J., Flytzanis, C. N., and Lazarides, E. (1983) Tissue-specific expression of two mRNA species transcribed from a single vimentin gene, *Cell*, **35**, 411-420, https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90174-5.
- 69. Schnitzer, J., Franke, W. W., and Schachner, M. (1981) Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system, *J. Cell Biol.*, **90**, 435-447, https://doi.org/10.1083/jcb.90.2.435.
- 70. Tapscott, S. J., Bennett, G. S., Toyama, Y., Kleinbart, F., and Holtzer, H. (1981) Intermediate filament proteins in the developing chick spinal cord, *Dev. Biol.*, **86**, 40-54, https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90313-4.
- 71. Sax, C. M., Farrell, F. X., and Zehner, Z. E. (1989) Down-regulation of vimentin gene expression during myogenesis is controlled by a 5'-flanking sequence, *Gene*, **78**, 235-242, https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90226-6.
- 72. Battle, A., Brown, C. D., Engelhardt, B. E., and Montgomery, S. B. (2017) Genetic effects on gene expression across human tissues. *Nature*, **550**, 204-213, https://doi.org/10.1038/nature24277.
- 73. Forrest, A. R. R., Kawaji, H., Rehli, M., Baillie, J. K., de Hoon, M. J. L., Haberle, V., and Hayashizaki, Y. (2014) A promoter-level mammalian expression atlas, *Nature*, **50**7, 462-470, https://doi.org/10.1038/nature13182.
- 74. Joo, C. K., Lee, E. H., Kim, J. C., Kim, Y. H., Lee, J. H., Kim, J. T., and Kim, J. (1999) Degeneration and transdifferentiation of human lens epithelial cells in nuclear and anterior polar cataracts, *J. Cataract Refract. Surg.*, **25**, 652-658, https://doi.org/10.1016/s0886-3350(99)00009-7.
- 75. Upton, M. P., Hirohashi, S., Tome, Y., Miyazawa, N., Suemasu, K., and Shimosato, Y. (1986) Expression of vimentin in surgically resected adenocarcinomas and large cell carcinomas of lung, *Am. J. Surg. Pathol.*, **10**, 560-567, https://doi.org/10.1097/00000478-198608000-00006.
- 76. Dauphin, M., Barbe, C., Lemaire, S., Nawrocki-Raby, B., Lagonotte, E., Delepine, G., Polette, M. (2013) Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas, *Lung Cancer*, **81**, 117-122, https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.03.011.

- 77. Virtakoivu, R., Mai, A., Mattila, E., De Franceschi, N., Imanishi, S. Y., Corthals, G., Ivaska, J. (2015) Vimentin-ERK signaling uncouples slug gene regulatory function, *Cancer Res.*, 75, 2349-2362, https://doi.org/10.1158/0008-5472. CAN-14-2842.
- 78. Flier, S. N., Tanjore, H., Kokkotou, E. G., Sugimoto, H., Zeisberg, M., and Kalluri, R. (2010) Identification of epithelial to mesenchymal transition as a novel source of fibroblasts in intestinal fibrosis, *J. Biol. Chem.*, **285**, 20202-20212, https://doi.org/10.1074/jbc.M110.102012.
- 79. Evrard, S. M., Lecce, L., Michelis, K. C., Nomura-Kitabayashi, A., Pandey, G., Purushothaman, K.-R., and Kovacic, J. C. (2016) Endothelial to mesenchymal transition is common in atherosclerotic lesions and is associated with plaque instability, *Nat. Commun.*, 7, 11853, https://doi.org/10.1038/ncomms11853.
- 80. Fernández-Ortega, C., Ramírez, A., Casillas, D., Paneque, T., Ubieta, R., Dubed, M., and Betancourt, L. (2016) Identification of vimentin as a potential therapeutic target against HIV infection, *Viruses*, **8**, 98, https://doi.org/10.3390/v8060098.
- 81. Kueper, T., Grune, T., Prahl, S., Lenz, H., Welge, V., Biernoth, T., and Blatt, T. (2007) Vimentin is the specific target in skin glycation. Structural prerequisites, functional consequences, and role in skin aging, *J. Biol. Chem.*, **282**, 23427-23436, https://doi.org/10.1074/jbc.M701586200.
- 82. Mortensen, J. H., Godskesen, L. E., Jensen, M. D., Van Haaften, W. T., Klinge, L. G., Olinga, P., and Krag, A. (2015) Fragments of citrullinated and MMP-degraded vimentin and MMP-degraded type III collagen are novel serological biomarkers to differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis, *J. Crohns Colitis*, 9, 863-872, https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv123.
- 83. Zhang, L., Wang, Y., Li, W., Tsonis, P. A., Li, Z., Xie, L., and Huang, Y. (2017) MicroRNA-30a regulation of epitheli-al-mesenchymal transition in diabetic cataracts through targeting SNAI1, *Sci. Rep.*, 7, 1117, https://doi.org/10.1038/s41598-017-01320-3.
- 84. Stevens, C., Henderson, P., Nimmo, E. R., Soares, D. C., Dogan, B., Simpson, K. W., and Satsangi, J. (2013) The intermediate filament protein, vimentin, is a regulator of NOD2 activity, *Gut*, **62**, 695-707, https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301775.

THE UNIQUE ROLE OF VIMENTIN IN THE INTERMEDIATE FILAMENT PROTEINS FAMILY

Review

I. B. Alieva^{1*}, A. S. Shakhov¹, A. A. Dayal², A. S. Churkina¹, O. I. Parfentyeva², and A. A. Minin^{2*}

 Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: irina_alieva@belozersky.msu.ru
 Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; e-mail: alexminin@gmail.com

Intermediate filaments (IFs), being traditionally the least studied component of the cytoskeleton, have begun to receive more attention in recent years. IFs are found in different cell types and are specific to them. Accumulated data have shifted the paradigm about the role of IFs as structures that merely provide mechanical strength to the cell. In addition to this role, IFs have been shown to participate in maintaining cell shape and strengthening cell adhesion. The data have also been obtained that point out to the role of IFs in a number of other biological processes, including organization of microtubules and microfilaments, regulation of nuclear structure and activity, cell cycle control, and regulation of signal transduction pathways. They are also actively involved in the regulation of several aspects of intracellular transport. Among the intermediate filament proteins, vimentin is of particular interest for researchers. Vimentin has been shown to be associated with a range of diseases, including cancer, cataracts, Crohn's disease, rheumatoid arthritis, and HIV. In this review, we focus almost exclusively on vimentin and the currently known functions of vimentin intermediate filaments (VIFs). This is due to the structural features of vimentin, biological functions of its domains, and its involvement in the regulation of a wide range of basic cellular functions, and its role in the development of human diseases. Particular attention in the review will be paid to comparing the role of VIFs with the role of intermediate filaments consisting of other proteins in cell physiology.

Keywords: cytoskeleton, microtubules, actin microfilaments, intermediate filaments, vimentin filaments, mitochondria

УДК 548.73;620.187;615.21/.26

РАЦИОНАЛЬНАЯ РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВ, НАПРАВЛЕННЫХ НА РЕЦЕПТОРЫ, СОПРЯЖЕННЫЕ С G-БЕЛКОМ: ВЗГЛЯД СО СТОРОНЫ СТРУКТУРНОЙ БИОЛОГИИ

Обзор

© 2024 П.А. Хорн¹, А.П. Лугинина¹, В.А. Поспелов¹, Д.Е. Дашевский¹, А.Н. Хныкин¹, О.В. Моисеева^{1,2}, Н.А. Сафронова¹, А.С. Белоусов¹, А.В. Мишин^{1*}, В.И. Борщевский^{1,3*}

¹ Московский физико-технический институт (НИУ), 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия; электронная почта: borshchevskiy.vi@phystech.edu; mishinalexey@phystech.edu

² ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 21.09.2023 После доработки 22.02.2024 Принята к публикации 29.02.2024

Рецепторы, сопряженные с G-белком (G protein-coupled Receptors, GPCR), играют ключевую роль в передаче внеклеточных сигналов и регуляции множества биологических процессов, что делает эти мембранные белки одним из наиболее важных классов мишеней фармакологических агентов. Значительное увеличение количества атомарных структур GPCR за последнее время открыло путь к разработке лекарств на их основе (Structure Based Drug Design, SBDD). SBDD использует информацию о структуре комплекса рецептор–лиганд для поиска аффинных и селективных лигандов без необходимости проведения высокопроизводительного экспериментального скрининга лигандов и позволяет существенно расширить химическое пространство поиска лигандов. В обзоре мы описываем процесс получения структуры GPCR методами рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии – важный этап рациональной разработки лекарств, направленных на GPCR. Нашей основной целью является освещение широкому кругу специалистов современных аспектов и ключевых особенностей методов экспериментальной структурной биологии, необходимых для детального понимания SBDD GPCR.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: разработка лекарств, GPCR, MX, крио-ЭМ, SBDD.

DOI: 10.31857/S0320972524040124 **EDN:** ZEMVSA

ВВЕДЕНИЕ

Разработка лекарственных средств представляет собой сложный, дорогостоящий и многостадийный процесс. Он включает в себя: поиск и валидацию лекарственной мишени; поиск соединений-хитов (hit compounds), которые специфически связываются с мишенью; модификации соединения-хита до соединения-лидера (lead compound), оптимизированного по критериям медицинской химии, и проведение анализа структурно-функциональных зависимостей; отбор соединений-кан-

дидатов; доклинические испытания на животных и клинические испытания [1]. Согласно аналитическим отчетам, для вывода нового терапевтического продукта на фармацевтический рынок требуется в среднем более 13 лет и около 2 миллиардов долларов [2].

Традиционная разработка лекарственных средств предусматривает широкомасштабный экспериментальный скрининг библиотек соединений, что является низкоэффективным, экстенсивным и дорогостоящим подходом. Для оптимизации этого процесса и сужения круга соединений-кандидатов применяются различные рациональные подходы, основные из которых –

³ Объединенный институт ядерных исследований, лаборатория нейтронной физики им. Франка, 141980 Дубна, Московская обл., Россия

^{*} Адресат для корреспонденции.

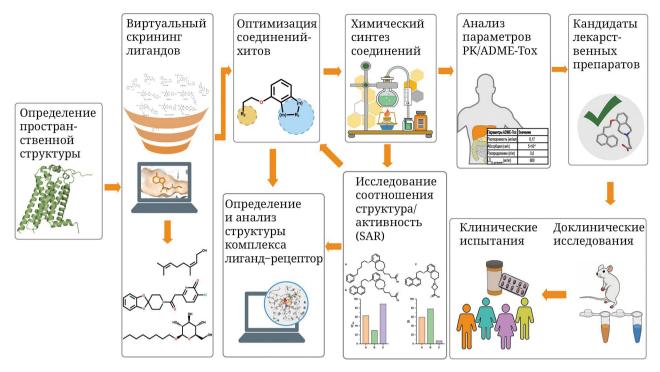


Рис. 1. Основные стадии разработки лекарств на основе структуры (SBDD)

это комбинаторная химия [3], разработка лекарств на основе малых фрагментов (Fragment-based Drug Discovery, FBDD), а также виртуальный скрининг библиотек химических соединений, основанный на структуре (Structural-base Virtual Screening, SBVS); также используют подходы, основанные на использовании моделей искусственного интеллекта [4].

Структурная биология вносит решающий вклад в оптимизацию большинства из перечисленных выше этапов разработки лекарств (рис. 1).

В первую очередь знание трехмерной структуры целевого белка позволяет определить детали молекулярного механизма его функционирования и помогает при валидации конкретных мишеней. Не менее значимым для разработки лекарств на основе структуры (SBDD) является использование полученных трехмерных структур в качестве модели для виртуального скрининга гораздо больших библиотек соединений с существенно меньшими затратами средств, времени и усилий по сравнению с широкомасштабным экспериментальным

скринингом [5]. Процесс оптимизации соединений-лидеров может быть значительно улучшен, если дополнить анализ структурным картированием лиганд-связывающего кармана. С этой целью обычно определяют сотни различных структур рецептора с лигандом, которые служат для лучшего понимания их специфических взаимодействий и которые применяют для итерационной оптимизации лигандов.

К настоящему времени на фармацевтический рынок выведено множество лекарств, полученных с использованием структур лекарственных мишеней, что говорит об успешности такого подхода. Например, еще в 1970-х гг. для разработки ряда препаратов, стабилизирующих гемоглобин в несвязанном с кислородом состоянии, использовали его структуру [6]. В 1980-е гг. анализ кристаллических структур карбоангидразы позволил улучшить аффинность лиганда к требуемой конформации фермента, что привело к созданию препарата для снижения внутриглазного давления, Дорзоламида. Более современными примерами являются инги-

Принятые сокращения: крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; ММС – мембраномоделирующие системы; ПО – программное обеспечение; СИ – синхротронное излучение; BRIL – термостабилизированный апоцитохромом b_{562} RIL; ССD – coupled charge device; СНS – холестерил гемисукцинат; Fab – антигенраспознающий фрагмент антитела (Fragment Antigen Binding); GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белком (G protein coupled receptor); ICL3 – третья внутриклеточная петля (Intracellular Loop 3); LCP – липидная кубическая фаза (Lipidic Cubic Phase); МSP – мембранный каркасный белок (Membrane Scaffold Protein); МХ – макромолекулярная рентгеновская кристаллография (Macromolecular Crystallography); SBDD – разработка лекарств на основе структуры (Structure Based Drug Design); SFX – серийная фемтосекундная кристаллография (Serial Femtosecond X-ray Crystallography); SWSX – малосекторальная синхротронная кристаллография (Small-wedge Synchrotron Crystallography); XFEL – рентгеновский лазер на свободных электронах (X-ray Free Electron Laser).

SBDD GPCR 707

битор протеазы ВИЧ Саквинавир (1995 г.), ингибиторы нейрамидазы – противовирусные препараты Занамивир (1999 г.) и Осельтамвир (1999 г.), противолейкозный цитостатический препарат Иматиниб (2001 г.), селективный ингибитор ренина Алискирен (2007 г.), противовирусный препарат Боцепревир (2011 г.) и др. [7–9].

В последнее десятилетие в структурной биологии произошел качественный скачок, вызванный революцией в возможности получения структур высокого разрешения при помощи криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) [10–12], прорывами в области серийной фемтосекундной кристаллографии с использованием рентгеновских лазеров на свободных электронах (X-ray Free Electron Laser, XFEL) [13], а также в связи с появлением систем моделирования структур при помощи подходов искусственного интеллекта AlphaFold2 [14] и RoseTTAFold [15]. Благодаря этому появляются структуры высокого разрешения для важных биологических мишеней, которые невозможно было получить ранее, а структурная биология переживает ренессанс.

Наш обзор раскрывает особенности одного из ключевых этапов SBDD рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR) – получения структуры мишени методами белковой кристаллографии и крио-ЭМ.

БЕЛКОВАЯ КРИСТАЛЛОГРАФИЯ

Описание и особенности метода для исследования GPCR. SBDD опирается на полученные атомарные модели структур белков-мишеней высокого разрешения, которые позволяют обнаруживать специфические сайты связывания лигандов. Основным методом получения белковых структур является макромолекулярная рентгеновская кристаллография (Macromolecular X-Ray Crystallography, MX), с помощью которой получено более 85% всех известных на сегодняшний день структур (rcsb.org от 12.09.23 г.). Улучшение и введение новых сверхярких источников рентгеновского излучения, разработка оборудования для экспериментальных станций, создание новых методов молекулярной и структурной биологии постоянно совершенствуют белковую кристаллографию, сокращая время эксперимента и снижая требования к белковым кристаллам. В итоге возможности метода МХ значительно расширились, что привело к появлению структур белков (в частности, GPCR) и их комплексов, которые раньше получить не удавалось. В течение последних 10 лет прирост новых белковых структур, полученных методами МХ, увеличился и составляет более 8000 ежегодно, а суммарное число полученных структур к середине 2023 г. превысило 176 000.

Кристаллизация GPCR является трудоемким процессом – рецепторам свойственны низкий уровень экспрессии, высокая конформационная подвижность, амфифильность. Эти особенности, а также наличие подвижных внемембранных участков затрудняют процесс их кристаллизации. Пути решения заключаются в подборе гетерологической системы экспрессии, уменьшении конформационной подвижности методами генной инженерии, использовании метода кристаллизации *in meso*. Однако качество кристаллов GPCR в среднем остается хуже, чем для большинства водорастворимых белков, поэтому технологии и методики получения и обработки рентгеноструктурных данных GPCR требуют дальнейшего совершенствования.

Подготовка GPCR к кристаллизации. GPCR эукариотические трансмембранные белки, как правило, с низким уровнем экспрессии, структурные исследования которых методом MX требуют получения стабильного функционального белкового препарата в миллиграммовых количествах (в среднем требуется ~5 мг на одну кристаллизацию [16]). Подготовка GPCR к кристаллизации состоит из нескольких этапов и начинается с выбора гетерологической системы экспрессии, к которой предъявляют следующие требования: корректный биосинтез целевого белка – система должна обладать необходимым набором ко- и посттрансляционных модификаций для правильного сворачивания и транспортировки белка; интересующий белок должен экспрессироваться в системе в необходимом для кристаллизации количестве, а протокол работы с системой должен быть относительно простым (как в случае с экспрессией в Escherichia coli). Чаще всего экспрессию GPCR проводят в клетках насекомых с использованием бакуловирусной системы или в клетках млекопитающих с использованием, к примеру, системы Вас-Мат [17]. Использование подобных экспрессионных систем подразумевает введение в ген интересующего белка *N*-концевых сигнальных последовательностей: пептида гемагглютинина (Hemagglutinin (HA) signal peptide), сайта N-гликозилирования мускаринового ацетилхолинового рецептора M4 (3N-glycosylation site), лейцин-богатого пептида (leucine-rich signal peptide, Lucy tag) и др. [18, 19]. Помимо этого, с помощью метода «направленной эволюции» (Directed Evolution) вводят и отбирают точечные мутации, способствующие повышению уровня функциональной экспрессии белка [20, 21]. Метод заключается в проведении случайного мутагенеза гена исследуемого рецептора при помощи склонной к ошибкам ПЦР (error-prone PCR) и последующей экспрессии мутантных рецепторов с клеточной сортировкой (а именно, Fluorescence-activated cell sorting, FACS). Для трансформации полученной библиотеки ДНК авторы «направленной эволюции» используют клетки *E. coli* и *Saccharomyces cerevisiae* в силу простоты работы с ними. Однако главная особенность этого метода, без которой невозможно его использование, – наличие флуоресцентно меченного лиганда к изучаемому белку, который применяется для отбора мутантов с наилучшей функциональной экспрессией.

Другой этап подготовки GPCR состоит в получении конформационно стабильной конструкции рецептора, для чего из последовательности гена удаляют подвижные N- и/или С-концевые участки [22]. Также на место третьей внутриклеточной петли (ICL3) вставляют белки-партнеры, например, Т4 лизоцим или термостабилизированный апоцитохромом b_{562} RIL (BRIL) [23]. Помимо стабилизации белка, они способствуют кристаллизации GPCR за счет увеличения относительно небольшой площади полярной поверхности рецепторов, доступной для формирования контактов кристаллической решетки. Структуры многих GPCR, например, β₂AR [24], А₂AAR [25] и др., были получены с использованием таких «драйверов кристаллизации» (панель (a) на рисунке в Приложении). В качестве еще одного инструмента стабилизации GPCR используют схожие по действию «шапероны кристаллизации» – нанотела или Fab (антигенраспознающий фрагмент антитела) к участку последовательности рецептора (например, к BRIL [26]). Добавление лиганда к рецептору при выделении и последующей кристаллизации также снижает его конформационную подвижность и способствует образованию и росту кристаллов [27].

Так как успешность кристаллизации коррелирует с термостабильностью белка [28, 29], то в качестве подготовки к кристаллизации для ее повышения в последовательность рецептора вводят одиночные аминокислотные замены. Одним из способов поиска термостабилизирующих мутаций является аланиновое сканирование [22, 30]. Причем комбинация из полученных этим методом одиночных мутаций в большей степени увеличивает термостабильность рецептора [31]. Если проводить отбор термостабильных мутантов в присутствии агонистов или антагонистов, то можно найти такое сочетание мутаций в гене, которое бы, помимо термостабильности, снижало и конформационную подвижность рецептора. Авторы этого подхода используют выражение «конформационной термостабильности» для описания полученного эффекта, а рецепторы называют StaR (Stabilized Receptor) [32]. Несмотря на эффективность, экспериментальные методики получения последовательностей стабилизированных рецепторов нельзя считать рациональными из-за их ресурсоемкости и невозможности использовать полученные закономерности для других рецепторов.

Альтернативными экспериментальным являются подходы, использующие вычислительные методы. Известны in silico инструменты для предсказания термостабилизирующих мутаций у водорастворимых белков, но они не эффективны для GPCR, так как не учитывают природу трансмембранной части рецепторов. Это привело к разработке таких вычислительных инструментов, как CompoMug (COMputational Predictions Of MUtations in GPCRs) [33] и Construct design tool [34]. В основе CompoMug лежат компьютерные алгоритмы, построенные на четырех различных принципах. Первый сравнивает аминокислотную последовательность целевого GPCR с другими близкородственными рецепторами, пытаясь обнаружить девиантные остатки, замена которых на консервативные увеличила бы стабильность белка. Второй, основываясь на известных структурах, пытается построить специфические стабилизирующие взаимодействия (в том числе ковалентные в виде дисульфидных связей) между различными частями рецептора за счет введения в определенные места рецептора пар аминокислотных остатков. Третий алгоритм ищет в известных структурах других GPCR «полезные» мутации – такие, которые привели бы к повышению термостабильности рецептора и способствовали образованию кристаллов. Наконец, четвертый использует накопленные данные о стабильности сотен мутаций в различных GPCR для обучения предиктора машинного обучения распознаванию стабилизирующих мутаций. CompoMug экспериментально был успешно проверен на примерах серотонинового рецептора 5-HT₂C [35], цистеинил лейкотриенового рецептора 2-типа (CysLT₂R) [36, 37], канабиноидного рецептора СВ2 [38] и др. Алгоритмы Construct design tool устроены схожим образом, но предсказывают также аминокислотные остатки, которые, взаимодействуя, поддерживают активную или неактивную конформации рецептора.

Отдельным этапом подготовки GPCR является подбор условий выделения и очистки. Так как GPCR – трансмембранные белки и обладают амфифильной природой, в водных растворах они нестабильны и агрегируют из-за относительно большой гидрофобной части, изначально обращенной внутрь бислойной липидной мембраны. Поэтому при работе с этими белками необходимо подбирать такие мембраномоделирующие системы (ММС), которые бы позволили переводить белки из мембран в раствор (солюбилизировать) и их стабилизировали. Среди таких ММС можно выделить основные - мицеллы детергента и нанодиски [39]. Мягкие детергенты обеспечивают солюбилизацию GPCR без его денатурации. Чаще всего применяют п-додецил-β-D-мальтопиранозид (DDM) или неопентилгликоль лаурилмальтозы (LMNG), в качестве добавки к которым испольSBDD GPCR 709

зуют холестерил гемисукцинат (СНS) [39]. При этом подбирают не только оптимальный для данного рецептора и метода исследования детергент, но и соотношение количества добавляемого детергента (в процентах) к массе клеточных мембран, из которых выделяют белок. Среди альтернативных ММС стоит отметить нативные нанодиски и липодиски, для формирования которых и солюбилизации рецептора из мембран применяют химически синтезируемые сополимеры малеиновой кислоты или фрагмент белка сапозин A (Salipro) [40]. Такие мембраномоделирующие системы призваны в большей степени, чем мицеллы, стабилизировать изучаемый рецептор, а также сохранить его нативное липидное окружение.

Помимо выбора подходящих условий выделения, варьируют условия очистки. GPCR очищают с помощью хелат-аффинной хроматографии, для чего предварительно в ген белка вводят последовательность из десяти остатков His на *C*- или *N*-конец (положение индивидуально проверяют для каждого рецептора), также для аффинной хроматографии можно использовать FLAG-метку, которую обычно вводят на *N*-конец гена белка для детекции его экспрессии. В процессе очистки меняют объем и состав используемых буферных растворов, в частности подбирают оптимальную концентрацию солей (например, NaCl) и глицерина.

На каждом из вышеперечисленных этапов подготовки GPCR к кристаллизации проводят: оценку уровня полной и поверхностной экспрес-

сии белка методом проточной цитофлуориметрии с использованием флуоресцентно меченных антител; оценку гомогенности полученных препаратов белка методами аналитической эксклюзионной хроматографии и денатурирующего электрофореза в ПААГ; оценку термостабильности методами ДСФ (дифференциальной сканирующей флуориметрии) и анализа кривой плавления в присутствии тиолспецифических красителей (Thermal Shift Assay, TSA). На основе результатов анализа белка этими методами выбирают ряд потенциальных кандидатов для кристаллизации [41].

Кристаллизация GPCR. Для исследования GPCR методом МХ рецепторы кристаллизуют в липидной кубической фазе (Lipidic Cubic Phase, LCP). Данный подход позволил получить первые детали высокого разрешения человеческих GPCR, связанных с лигандами (панель (в) на рисунке в Приложении), а 97% рентгеновских структур суперсемейства, полученных при помощи кристаллизации в LCP (*in meso*), имеют разрешение в среднем 2,8 Å [24].

LCP является одной из многих жидкокристаллических фаз, которые спонтанно образуются при смешивании определенных липидов с водой в соответствующих условиях. Данная фаза является биконтинуальной – состоит из одного липидного бислоя, который следует из бесконечной периодической минимальной поверхности, разделяющей пространство на две непересекающиеся сети водных каналов [42] (рис. 2, *a*).

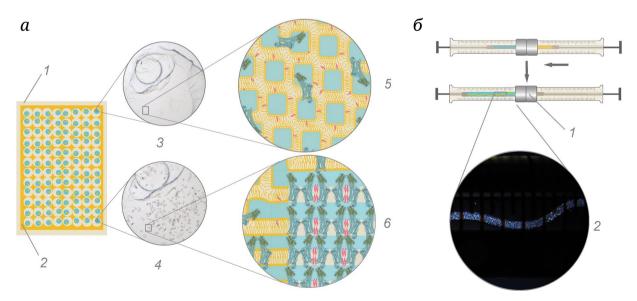


Рис. 2. Схематическое изображение получения кристаллов GPCR при использовании стеклянных плашек (*a*) с гидрофобным покрытием (*1*) и «спейсером» для разделения кристаллизационных условий (*2*). Кристаллизационная капля (обозначена голубым цветом) представляет собой буферный раствор преципитанта разного состава, в который с помощью робота вводится смесь белка с липидами – LCP (обозначена желтым цветом). Фото кристаллизационной капли (*3* и *4*). Проекция объемной LCP на плоскости представлена в момент начала кристаллизации (*5*) и в момент роста кристалла (*6*). Розовым цветом обозначены молекулы холестерина. *б* – Схематическое изображение получения кристаллов GPCR при использовании стеклянных шприцов: *1* – «каплер», *2* – фото шприца в кросс-поляризованном свете

При кристаллизации GPCR чаще всего используют смесь липидов моноолеин/холестерин, но использование других липидов тоже возможно [39]. Рецептор, встроенный в бислой кубической фазы, может диффундировать в трехмерном пространстве, оставаясь в липидном бислое, что обеспечивает приток белковых молекул из объема LCP к растущему кристаллу (рис. 2).

Успех использования липидной кубической фазы для выращивания высокоупорядоченных кристаллов мембранных белков человека можно объяснить несколькими факторами. Во-первых, LCP обеспечивает более нативную мембранную среду для белков в отличие от мицелл детергентов. Во-вторых, образуется кристаллическая упаковка I типа, где контакты образуются между полярными и неполярными частями белка, способствуя лучшему порядку в кристалле и дифракции, в отличие от кристаллизации белка из мицелл, где контактируют только водорастворимые участки белка (упаковка II типа) [43]. Кроме того, LCP может действовать как фильтр, эффективно удаляя из процесса кристаллизации крупноразмерные частицы и белковые агрегаты, мешающие росту кристаллов [44, 45].

Особенностью матриц LCP является изогнутость липидного бислоя, которая определяет скорость диффузии и в то же время делает энергетически выгодным образование кристаллов: гидрофобное несоответствие (hydrophobic mismatch), вызванное экспонированием трансмембранных участков в раствор, снижается при локальном спрямлении фазы (переход из кубической в ламеллярную), вызванном сближением белковых молекул (рис. 2) [46]. Использование специфических преципитантов (precipitant), таких как соли и полимеры полиэтиленгликоля, модулирует геометрические параметры фазы и гидрофильное окружение белка, способствующее образованию полярных внемембранных взаимодействий [47]. Кроме того, часто применяющийся полиэтиленгликоль выступает в качестве криопротектора во время извлечения и заморозки кристаллов для получения дифракционных данных.

При проведении кристаллизации выделенный белок смешивают с липидами в соотношении, необходимом для образования кубической фазы (обычно – 1/1,5). Перемешивание проводят с помощью воздухонепроницаемых шприцов, соединенных «каплером» (соединительный элемент), до образования прозрачной смеси, а затем к смеси в ~10-кратном избытке добавляют преципитант, заполняющий водные каналы фазы. Белок в LCP инкубируют при температуре 20–22 °C до окончания формирования кристаллов. Для исследований на синхротронах кристаллы выращивают с использованием специализированных стеклянных планше-

тов и кристаллизационных роботов, обеспечивающих возможность воспроизводимого нанесения капель LCP объемом от 25 нл, рост кристаллов детектируют при помощи микроскопии в видимом и кросс-поляризованном свете (рис. 2) [48]. Для исследований на XFEL фазу с белком при помощи каплера переносят в шприц с преципитантом, рост кристаллов при этом происходит вдоль длины шприца (рис. 2, б) [49]. Оптимальный состав преципитанта определяют итерационно перебором. Подспорьем служит метод восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP), где анализируют скорость диффузии GPCR в липидной фазе с использованием флуоресцентно меченного рецептора [47].

МХ-Методы исследования GPCR. Макромолекулярная или белковая рентгеновская кристаллография является методом получения трехмерных структур закристаллизованных макромолекул с использованием рентгеновского излучения. Благодаря упорядоченному строению кристалла, падающее на него рентгеновское излучение рассеивается и интерферирует, образуя дифракционные картины на детекторе, из которых затем удается восстановить атомарное строение изучаемого белка. Чтобы получить больше дифракционных данных, кристалл во время эксперимента вращают, собирая информацию под разными углами. От качества кристалла и параметров сбора дифракционных данных зависит разрешение конечной структуры. Чем лучше будет определено разрешение, тем больше деталей строения удастся установить, что позволит лучше понять функционирование белка на молекулярном уровне и создать надежную основу для разработки лекарств.

Основным толчком к развитию белковой кристаллографии послужило введение ультраярких источников синхротронного излучения (СИ) последних поколений. К ним относят установки класса «мегасайенс», называемые синхротронами, представляющие собой циклические ускорители заряженных частиц и являющиеся источниками рентгеновского излучения в большом энергетическом диапазоне. Непрерывный спектр СИ позволяет выбирать длину волны используемого излучения и получать дополнительную информацию об объектах методами аномальной дифракции [50]. Одним из параметров эффективности источника рентгеновского излучения является плотность генерируемого им потока. По своим характеристикам новейшие синхротроны 4-го поколения на сегодняшний день достигли потока 10^{35} фотонов/мм 2 в секунду, что на 15 порядков больше, чем в лабораторных рентгеновских источниках с вращающимся анодом [51]. Дальнейшие улучшения источников по этому параметру в силу

SBDD GPCR 711

технических возможностей требуют строительства накопительных колец большего диаметра с еще более мощными сверхпроводящими магнитами. В качестве альтернативы в начале 2000-х гг. стали появляться источники рентгеновского излучения нового типа – рентгеновские лазеры на свободных электронах [52]. XFEL представляет собой линейный ускоритель, большую часть которого занимает длинный магнитный ондулятор [53]. Генерируемая им плотность потока составляет 10⁴⁰ фотонов/мм² в секунду, что на 5 порядков выше, чем у мощнейших синхротронов [51]. На сегодняшний день в мире насчитывается более 70 синхротронов (https://www.diamond.ac.uk/Home/About/FAQs/About-Synchrotrons) и 5 XFEL (https://www.xfel.eu/facility/ comparison/index_eng.html, https://lightsources.org/ lightsources-of-the-world/).

Вместе с развитием установок СИ развитие получили станции МХ - комплексы приборов, предназначенные для проведения дифракционных экспериментов. Одним из наиболее важных и технически сложных элементов станции является рентгеновский детектор. Благодаря высокой пространственной разрешающей способности и широкому динамическому диапазону работы в 2000-х гг. популярными были приборы с зарядовой связью – CCD-детекторы (coupled charge device) [54, 55]. Однако их существенными недостатками при проведении МХ-экспериментов являются долгое время считывания и необходимость постоянного охлаждения для понижения темнового шума [51]. Поэтому на данный момент наиболее подходящими являются гибридные пиксельные детекторы (Hybrid Pixel Array Detector, HPAD) [56, 57]. Они состоят из двух независимо разрабатываемых частей: полупроводниковых матриц-сенсоров и считывающих схем (Application-Specific Integrated Circuit, ASIC). Независимость этих двух частей стала одним из ключевых нововведений в области создания детекторов. Работая совместно, эти части позволяют снизить количество шумов, по сравнению с CDD-детекторами, за счет того, что полупроводниковые сенсоры, улавливая рентгеновское излучение, при комнатной температуре работают стабильно, а ASIC оцифровывают считываемое сенсорами изображение напрямую. Помимо отсутствия шума считывания [51], такие детекторы имеют практически стопроцентную квантовую эффективность детектирования (Detective Quantum Efficiency, DQE) в нужном для белков диапазоне энергий, устойчивость и высокую скорость считывания, позволяющие наблюдать дифракцию в реальном времени. В настоящее время в связи с ростом числа источников СИ производство гибридных детекторов для синхротронов стало серийным: их созданием на коммерческой основе занимается несколько компаний, что существенно

упрощает проектировку экспериментальных станций. Тем не менее для XFEL гибридные детекторы разрабатываются индивидуально [13, 58].

Проведение экспериментов на описанных выше установках и развитие инструментария станций, к которому, помимо совершенствования детекторов, относится разработка микрофокусного оборудования, позволило снизить минимальный требуемый размер белковых кристаллов до микронного масштаба [59, 60], сократить время проведения эксперимента от суток до часов, существенно повысить качество получаемых дифракционных данных, что в совокупности позволяет решать более сложные и важные с научной точки зрения задачи [61]. Однако стоит отметить появившиеся вместе с тем особенности проведения дифракционного эксперимента – преждевременное радиационное повреждение образцов [62] и проблема доставки образца к источнику. Частично или полностью эти особенности учитываются в методах малосекторальной синхротронной и серийной белковой кристаллографии.

Малосекторальная синхротронная кристаллография. Кристалл во время эксперимента облучается и неизбежно получает радиационные повреждения, срок его жизни зависит от его размера и обратно пропорционален плотности падающего потока фотонов. Для эффективного сбора данных следует учитывать, что радиационные повреждения увеличивают кристаллическую мозаичность, изменяют объем элементарной ячейки и снижают получаемое количество пиков дифракции, помимо этого, изменения происходят в химических связях внутри белковой молекулы [63, 64]. Основным способом уменьшить вклад радиационных эффектов на сегодняшний день является последовательный сбор дифракционных данных с нескольких кристаллов микронного размера микрокристаллов. Одну из первых работ с использованием такой стратегии для GPCR выполнила группа Вадима Черезова в 2007 г. [24]. Для получения структуры человеческого адренергического рецептора β2 собрали дифракционные данные 40 кристаллов, средний размер которых составил 30 × 15 × 5 микрон. При этом каждый кристалл снимали в диапазоне 5-10 градусов поворота петли, пока облучаемая доза не достигала предельного значения или кристалл не выходил из зоны облучения (рис. 3, *a*).

Сегодня данный метод называется малосекторальная синхротронная кристаллография (Smallwedge Synchrotron Crystallography, SWSX) [65]. Его главное преимущество заключается в возможности подобрать оптимальный режим накопления интегральной интенсивности падающего потока фотонов для каждого кристалла из выборки, чего нельзя сделать при монокристальном сборе

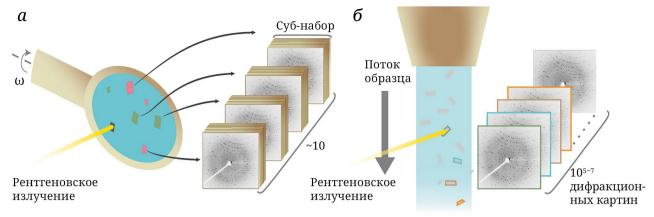


Рис. 3. Процесс сбора данных. a – В малосекторальной синхротронной кристаллографии (SWSX) данные последовательно собирают с нескольких кристаллов. При этом диапазон сбора для каждого кристалла определяется небольшим углом ω . δ – Сбор данных в серийной кристаллографии нагляднее описывается с использованием инжектора в качестве системы доставки. С каждого кристалла, падающего под произвольным углом, собирается лишь одна картина дифракции, потом картины образуют единый набор

данных. Это позволяет увеличить дифрагирующий объем при накоплении данных во время съемки и обеспечивает дополнительный выигрыш в отношении сигнал/шум.

При проведении кристаллографического эксперимента одного кристалла в петлю вылавливают кристалл с линейными размерами порядка сотни микрон. Но микрокристаллы слишком малы, чтобы было возможным отделить их друг от друга при извлечении из липидной фазы. Поэтому в одной петле часто содержится несколько кристаллов. Другая особенность микрокристаллов мембранных белков и, в частности, GPCR, закристаллизованных в LCP, заключается в том, что они прозрачны - белки скрыты в липидном растворе, и их трудно распознать оптическим микроскопом - необходим другой способ их детектирования. В ранее упомянутой нами работе [24] исследователи впервые применили предварительное сканирование рентгеновским микропучком для поиска крошечных кристаллов в среде LCP. В наши дни данная процедура выполняется в автоматическом режиме [66, 67]. Благодаря автоматизации сегодня возможно провести сбор данных методом SWSX (малосекторальная синхротронная кристаллография) полностью удаленно, поскольку созданы программы, способные эффективно отцентрировать образцы, настроить яркость и размер пучка относительно измеряемых кристаллов, гарантируя определение оптимальной стратегии сбора данных [68]. Недавно одна из таких программ была использована для изучения структур CysLT₁R и CysLT₂R в комплексе с различными антагонистами [36, 37, 69].

Синергетическое развитие методов стабилизации GPCR, кристаллизации LCP *in meso* и микрокристаллографии в недавнем прошлом совершили революцию в структурной биологии GPCR. В 2007 г. при помощи SWSX была получена первая структура гетерологически экспрессированного GPCR высокого разрешения [24], в том числе получилось достичь наивысшего для структурных исследований этой группы белков разрешения в 1,7 Å [70]. Для более сотни рецепторов были определены карманы связывания лиганда. Благодаря структурным исследованиям стабилизированного антагонистом неактивного состояния рецепторов, а также комплексов рецептора с G-белком [71] для GPCR класса A изучены примерный механизм активации рецептора с перемещением спиралей в его внутриклеточной части и перестроением консервативных мотивов-переключателей, а также роль аллостерического натрия в функционировании рецептора [72]. Кроме того, постоянное совершенствование приборной базы для SWSX и дальнейшая разработка кристаллографических подходов, таких как «вымачивание» кристаллов в буферах, содержащих различные лиганды (crystal soaking), делают методологию перспективным инструментом для SBDD [73].

Серийная белковая кристаллография. Одним из наиболее трудных этапов белковой кристаллографии все еще является получение хорошо дифрагирующих белковых кристаллов. Метод SWSX оказывается неэффективен, если максимальный размер кристаллов не превышает примерно 5 микрон, поскольку с них не удается собрать данные подходящего качества и даже использовать процедуру предварительного сканирования [74] – максимальная доза облучения у них слишком мала. С появлением XFEL стало возможным успешно проводить эксперименты даже для таких образцов. Его ультраяркое излучение позволяет собирать данные благодаря эффекту «дифракция до разрушения» (diffraction-before-destruction): несмотря на то что кристалл разрушается вплоть до перехода в плазму под ультраярким рентгеновским

излучением, дифракционные картины удается детектировать быстрее, чем это произойдет [75]. Данный подход привел к созданию нового семейства методов – серийная фемтосекундная (Serial Femtosecond X-ray Crystallography, SFX) [76] и синхротронная (Serial Synchrotron X-ray Crystallography, SSX) [77] кристаллографии. Их существенное отличие от предыдущих методов в том, что набор данных собирают с тысяч изоморфных малых кристаллов, причем с каждого собирают только одну дифракционную картину [76], таким образом получают набор произвольно ориентированных картин дифракции (рис. 3, б). Друг от друга методы отличаются типом источника излучения.

Изучение кристаллов малого размера под интенсивным излучением требует разработки новых способов доставки образца к потоку фотонов. Система доставки образца является важным техническим аспектом серийной кристаллографии. На сегодняшний день в мире в основном применяют 2 типа систем: системы fixed-target и инжекторы. К первой группе также относятся и кристаллографические петли, используемые в классических подходах. За последние 15 лет были разработаны новые устройства, снижающие расход образца и фоновое рассеяние от растворителя, например, тонкие пленки из силикона [78] или синтетического полимера [79]. Созданы пленки, в которых можно вырастить кристаллы и провести сбор данных in situ, с заранее известными положениями кристаллов [80], что очень удобно для серийной кристаллографии. Второй тип систем доставки инжекторы, которые выпускают поток кристаллов, ресуспендированных в подходящей среде-носителе, перпендикулярно траектории рентгеновского луча (рис. 3, б). Главный их недостаток – высокий расход образца, но инжекторы активно модифицируют. На данный момент для мембранных белков широко популярен инжектор вязкой среды – он обеспечивает широкий диапазон скоростей потока с расходом до 1 нл/мин и совместим с LCP [81]. Помимо указанных систем доставки, существует совершенно иная, называемая dropon-demand [82]. Она сочетает акустический выброс капель с приводом конвейерной ленты, что облегчает одновременный сбор дифракционных и спектроскопических данных при наблюдении за конформационными перестройками в исследуемых белках [83].

Помимо систем доставки образцов, существуют другие особенности серийных методов, которые приходится учитывать при проектировании экспериментальных станций и разработке специализированного программного обеспечения (ПО). Ультраяркий поток рентгеновского излучения создает огромное количество дифракционных картин (порядка сотен тысяч) за предельно малое

время, что требует создания детекторов с очень низким временем считывания и ПО для быстрой и автоматической их первичной обработки [13]. Другая особенность состоит в том, что дифракционные картины, считанные с каждого кристалла в случайной ориентации, отличаются от классических характером интерференции – интенсивности рефлексов не имеют интегральной информации. Минимизировать влияние этой особенности при обработке полученных данных можно за счет незначительного вращения кристаллов во время съемки – это позволяет проводить SSX при условии использования fixed-target-системы доставки образцов, что является преимуществом метода над SFX [74].

Для первичной обработки поступающих дифракционных картин на сегодняшний день разработаны и внедрены в системы станций на XFEL следующие ПО: Cheetah [67], NanoPeakCell [84], neural network [85], Zaef [86], Dials [87], nXDS [88], cctbx.spotfinder [89]. Принцип их работы следующий: они быстро сканируют получаемые изображения с целью идентификации дифракционных картин и отбрасывают пустые изображения, а также выполняют подготовку данных к последующей ручной обработке [74]. Для интегрирования, шкалирования дифракционных картин, имеющих случайную ориентацию, также существует несколько ПО: CrystFEL [90], ccpxfel [91], Dials, nXDS, cctbx.spotfinder. Проблема учета отсутствия интегральной интенсивности решается в них по-разному, преимущественно с использованием методов Монте-Карло [13].

Итак, серийная белковая кристаллография, в частности SFX, является важным инструментом для структурных исследований GPCR. Первая проба метода была проведена на серотониновом рецепторе 5-НТ2В [92], для которого проводили сравнение с ранее решенной структурой: при общей схожести моделей было обнаружено несколько отличий в положениях аминокислотных остатков, что объясняли сбором данных при отсутствии заморозки. Стоит также отметить, что метод SFX позволил получить структуру высокого разрешения комплекса родопсина с аррестином, что до этого было невозможно ввиду малого размера кристаллов [93]. Но, несмотря на очевидные перспективы использования SFX, существуют несколько факторов, ограничивающих данный метод. Один из них - малое количество ХГЕС-установок: на сегодняшний день существует только пять доступных для МХ-исследований. При этом на одну установку приходится меньше станций, чем на один синхротрон. Это создает высокий спрос и существенно ограничивает число структурных экспериментов с их использованием. Первый доступный для МХ-экспериментов XFEL появился в 2011 г. [76].

А с 2017 г. крио-ЭМ стала конкурентоспособной альтернативой для получения структур GPCR – более широкая доступность электронных микроскопов и качество получаемых с них данных еще сильнее ударила по популярности SFX в области. В результате, несмотря на свои преимущества, метод SFX так и не стал популярным.

КРИОЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Описание метода и особенности современных микроскопов. Крио-ЭМ – совокупность процедур и инструментов, в основе которых лежит

детекция электронного пучка, проходящего через тонкослойный замороженный образец белка в растворе [94]. Данный подход применяется для GPCR с 2017 г. и к 2020 г. обогнал по популярности рентгеновскую кристаллографию, став важным подспорьем для рациональной разработки лекарств на основе структурных данных. Ряд технологических усовершенствований метода, таких как разработка детекторов, напрямую регистрирующих электроны [95], энергетические фильтры, отсеивающие неупруго рассеянные электроны [96], золотые сетки, обеспечивающие правильный режим абсорбции, снижение деформации при витрификации и меньшую подвижность образца во время

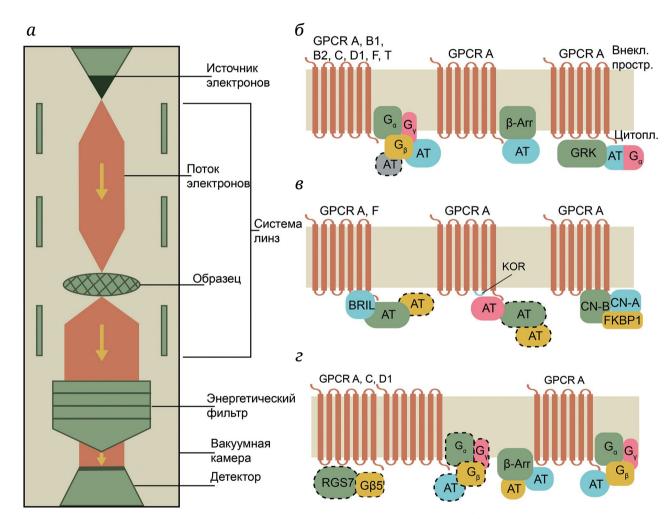


Рис. 4. Крио-ЭМ в исследовании GPCR. a – Схема электронного микроскопа. δ – GPCR-комплексы в активном состоянии: комплекс GPCR–G-белок (более 80% структур, полученных методом крио-ЭМ), стабилизированный одним или двумя фрагментами антитела (наиболее популярные – scFv16, Nb-35, а также различные типы Fab); комплекс GPCR–β-аррестин-1, стабилизированный фрагментом антитела (наиболее популярные – scFv30 и Fab30 (gpcrdb.org)); комплексы GPCR–GRK, стабилизированные Fab в случае GRK₁, и комплекс GPCR–GRK₂–G_α. ϵ – GPCR-комплексы в неактивном состоянии: с использованием белка-партнера в ICL3 (чаще всего BRIL), стабилизированные специфичным к партнеру антителом и, в некоторых случаях, вторичным нанотелом; с заменой ICL3 на ICL3 к-опиоидного рецептора, стабилизированные специфичным нанотелом и, в некоторых случаях, вторичным Fab или вторичным Fab + анти-Fab Nb («сандвич из антител»); комплекс с заменой ICL3 на CN-В-, а *C*-конца – на CN-А-субъединицы кальцинейрина, стабилизированного белком FKBP₁₂. ϵ – Мегакомплексы GPCR: гомо- и гетеродимеры в активном и неактивном состояниях, в комплексе с G-белком (для некоторых активных структур) и с регулятором G-белок-сигнализации, связанным с белком Gβ5 (для некоторых неактивных структур) [99]; мегакомплекс GPCR с G-белком и ϵ -аррестином, стабилизированный антителами

облучения [97], а также разработка и оптимизация ПО для обработки данных [98] привели к созданию эффективного подхода для массового получения пространственных структур высокого разрешения, в том числе и для таких сложных объектов, как GPCR.

Современные электронные микроскопы состоят из источника электронов, генерирующих пучок, серии электронных линз и корректирующей оптики, размещенных перед образцом и фокусирующих на нем луч, а также детектора, улавливающего прошедший луч (рис. 4, *a*).

В большинстве коммерческих микроскопов используются два вида источников электронов: полевые эмиссионные термоэмиссионные пушки (High-brightness Field Emission Gun, XFEG) и охлажденные полевые эмиссионные пушки (Cold Field Emission Gun, CFEG). Меньший разброс энергии испускаемых электронов улучшает временную когерентность электронного пучка, что приводит к лучшему соотношению сигнал/шум в формируемых изображениях, поэтому CFEG, которые генерируют электронный пучок с разбросом энергии около 0,3 эВ без потери яркости луча, по сравнению с XFEG, у которых разброс составляет 0,7 эВ, представляют собой предпочтительную альтернативу [100]. Но XFEG отличаются высокой надежностью и имеют более скромные требования к качеству вакуума, поэтому продолжают составлять конкуренцию CFEG. Большинство структур с высоким разрешением получают на микроскопах с напряжением в 300 кэВ, однако для уменьшения радиационного повреждения и стоимости экспериментов разрабатывают приборы и техники для съемки при 200 и даже 100 кэВ [101, 102] без потери в разрешении.

Полученный поток электронов фокусируется системой линз, которые представляют собой электромагниты (рис. 4, *a*). Траектории движения электронов могут изменяться в зависимости от величины тока, подаваемого на электромагниты. В микроскопе используются конденсорные линзы и линзы объектива. С помощью конденсорной линзы электронный пучок, выходящий из катода, сходится и коллимируется в относительно параллельный поток. Линзы объектива используются для фокусировки электронного луча в точку зондирования на поверхности образца и для дальнейшего направления луча [103].

В результате фокусировки при помощи линз в луче возникают сферические и хроматические аберрации. Проблему сферических аберраций и аберраций более высокого порядка в настоящее время решают при помощи корректоров аберраций [104], однако хроматические аберрации в сочетании с разбросом энергии источника электронов продолжают накладывать ограничения на

пространственное разрешение. Отчасти хроматические аберрации могут быть скомпенсированы корректором хроматических аберраций [105]. Другим подходом к улучшению распределения энергии электронов является энергетическая фильтрация падающего луча с помощью монохроматора. Монохроматоры могут улучшать энергетический разброс, но делают это за счет уменьшения потока, однако их использование значительно повышает разрешение финальной структуры [96].

После прохождения сквозь образец и корректировки при помощи оптики луч попадает на детектор. Ранее в качестве детекторов использовали устройства с зарядовой связью. Как уже указывалось, CCD-детекторы обладают длительным временем считывания, и решением проблемы могло бы стать использование ССД-детектора в режиме прямого обнаружения, однако при этом высок уровень радиационных повреждений, что делает срок службы детекторов слишком коротким для регулярного использования. Поэтому в настоящее время данный вид детекторов практически не используют. Альтернативой ССД-детекторам стали прямые детекторы электронов (Direct Electron Detector, DED), которые представлены HPAD, эксплуатирующими идею разделения датчика и считывающей электроники, и пиксельными датчиками (Active Pixel Sensor, APS) с технологией комплементарных металлооксидных полупроводников (Complementary Metal Oxide Semiconductor, CMOS). С внедрением DED произошло значительное увеличение количества структур высокого разрешения, а также случился качественный скачок предела разрешения до ~1,2 Å [96]. Одним из последних достижений в усовершенствовании технологии детекции стала запись данных в формате представления электронных событий (Electron Event Representation, EER) [106]. В этом формате записывают единичные события детекции электронов с указанием места и времени события. Такой формат уменьшает необходимый объем памяти для записи, а также облегчает дальнейшую коррекцию движения, применяемую при обработке.

Получение образцов для крио-ЭМ. Особенностью крио-ЭМ является наличие нижнего предела по массе исследуемого объекта, поэтому в настоящее время при помощи этого метода преимущественно исследуют GPCR, находящиеся в активном состоянии в комплексе с G-белками (панель (г) на рисунке в Приложении) [107]. Для получения комплекса чаще всего проводят коэкспрессию GPCR с субъединицами G-белка в клеточной культуре [108]. После получения биомассы клетки разрушают, процесс образования комплекса стимулируют за счет инкубации лизата с агонистом и стабилизирующими комплекс антителами, например, Nb53, а также апиразой для стабилизации

комплекса GDP-G_α [109]. Получившийся комплекс встраивают в мицеллы детергента в процессе солюбилизации и иммобилизируют на аффинном сорбенте при помощи введенного в аминокислотную последовательность тага, часто – polyHis или FLAG [110]. После промывок на смоле и элюции белковый образец концентрируют, и проводят препаративную эксклюзионную хроматографию для отделения фракции, содержащей комплекс [111]. Образец затем наносят на углеродную [112] или золотую сетку [108], которую предварительно подвергают воздействию тлеющего разряда для обеспечения лучших условий адсорбции образца. После удаления избыточного количества образца (blotting) в рамках процедуры подготовки сетки, сетку замораживают в жидком этане: происходит витрификация, это обеспечивает аморфность льду и делает возможными крио-измерения. Для витрификации используют автоматические установки [113]. Съемку изображений проводят на криоэлектронных микроскопах с энергией электронов 300 кэВ, в некоторых случаях - 200 кэВ [114]. Длительность съемки ограничена из-за радиационных повреждений, возникающих в образце, поэтому за секунды записывают порядка 10 000 видеороликов с изображениями сетки [115].

В сравнении с МХ, для подготовки образца к которому требуется провести колоссальную работу по подбору условий экспрессии, выделению, очистке и стабилизации белка [39], подготовка образца к проведению крио-ЭМ требует гораздо меньших усилий. В частности, отсутствует необходимость введения в белок термостабилизирующих мутаций, а также белков-драйверов кристаллизации; количество рецептора, необходимое для крио-ЭМ-исследований, существенно меньше, чем требуется для подбора кристаллизационных условий и проведения кристаллизации в шприцах, используемой в серийной фемтосекундной кристаллографии [116], а значит снимается ограничение по уровню поверхностной экспрессии рецептора. Зачастую для крио-ЭМ GPCR используют белок дикого типа [117, 118]. Несмотря на это, для подготовки белкового препарата для крио-ЭМ-исследований необходимо проводить оптимизацию условий коэкспрессии GPCR и белков-компонентов комплекса, на этапе очистки препарата вводят дополнительные стадии очистки, для контроля чистоты препарата и подтверждения успешной сборки комплекса проводят ряд дополнительных экспериментов, также варьируют условия нанесения образца на сетки и дальнейшей заморозки [119, 120].

Важную роль в подготовке образцов для крио-ЭМ играют мембраномоделирующие системы. В отличие от МХ, где солюбилизированный в мицеллы GPCR кристаллизуют в LCP, для крио-ЭМ

рецептор замораживают из раствора мицелл или нанодисков, поэтому к белковому препарату предъявляют дополнительные требования по монодисперсности и функциональности. Наиболее популярными ММС для крио-ЭМ-исследований являются мицеллы на основе LMNG благодаря его низкой ККМ (критическая концентрация мицеллообразования) - это уменьшает количество свободных молекул детергента и пустых мицелл в растворе и, как следствие, улучшает качество образца и получаемых с него данных. Кроме того, используют добавки CHS и дигитонина или глико-диосгенина (GDN) для формирования более стабильных мицелл и создания близкого к нативному окружения рецептора [121, 122]. Использование нанодисков на основе мембранных каркасных белков (MSP) и сапозин-липопротеинов (Salipro), а также полимеров на основе малеиновой кислоты (SMA) и амфиполей позволяет повысить контраст данных крио-ЭМ, а также обеспечивает более нативное, чем в мицеллах, и стабилизирующее окружение мембранных белков [121]. Так, комплекс нейротензинового рецептора NTSR₁, встроенного в циркуляризованные нанодиски (cNW), был разрешен без использования дополнительных стабилизирующих антител и нанотел, что привело к открытию новых механизмов взаимодействия рецептора с G-белком [123]; для комплекса D₂-дофаминового рецептора D₂R с G-белком, встроенного в нанодиски на основе MSP1D1, были исследованы взаимодействия восьмой спирали рецептора с липидным бислоем [124]. Для адренергического рецептора β1 (β₁AR), встроенного в нанодиски на основе белка zap1, и мускаринового ацетилхолинового рецептора М2 (М2), встроенного в нанодиски на основе MSP1D1H5 и MSP1D1E3, было исследовано взаимодействие рецептора с β-аррестином [125, 126].

Обработка данных крио-ЭМ. Процесс обработки крио-ЭМ-изображений за последнее десятилетие становится все более стандартизированным. Обработка данных начинается с вычислений, предназначенных для коррекции движения образца. Для учета радиационных повреждений снимки фильтруют [127]. Частицы на снимках идентифицируют на исправленных микрофотографиях, после чего проводят двумерное (2D) выравнивание, классификацию и усреднение изображений частиц. Обработанное подмножество частиц подвергают циклам трехмерной (3D) классификации, выполняемой при помощи сопоставления проекций. 3D-Классификация служит для определения угловых распределений частиц [128]. Затем для улучшения разрешения трехмерной реконструкции угловые распределения для каждого класса уточняют отдельно [129]. По полученным 3D-классам строят модели белков и происходит их валидация при помощи различных метрик.

Основной метрикой качества для данных крио-ЭМ является кривая корреляции оболочек Фурье (FSC или номинальное разрешение) [115], которая измеряет согласованность между двумя независимо уточненными «полукартами», каждая из которых содержит случайный полунабор данных, в зависимости от пространственного разрешения. Значение, полученное при FSC = 0,143, обычно принимают как номинальное разрешение карты [130].

Исследования GPCR методом крио-ЭМ. С помощью крио-ЭМ удалось исследовать взаимодействие GPCR со всеми основными группами G-белков (рис. 4, 6). Были исследованы особенности механизмов передачи сигнала GPCR в случае смещенной активности, что важно для современной фармакологии [131]. Кроме того, при помощи крио-ЭМ были изучены взаимодействия GPCR с β-аррестином-1 и GRK-киназами типа 1 и 2 [132–134], а также получена структура мега-комплекса вазопрессинового рецептора 2-типа AVPR₂, связанного одновременно с G-белком и β-аррестином (рис. 4, г) [135].

При помощи крио-ЭМ возможно получение неактивного состояния GPCR (рис. 4, в). Для этого существует несколько подходов. Один из них - создание комплекса гетеродимера кальцинейрина с GPCR, стабилизированного связью между кальцинейрином и спиралями 5, 6 и 7 рецептора [131]. Другой заключается в том, чтобы вместо ICL3 GPCR вставить BRIL и использовать комплекс антител Fab/Nb против BRIL. Альтернативно вместо ICL3 вставляют домен гликогенсинтазы из Pyrococcus abyssi (PGS) без использования дополнительных антител [136] или аналогичный участок из к-опиоидного рецептора, к которому было разработано нанотело Nb6 [137], в последнем случае масса исследованного комплекса составила 60 кДа, что почти в 3 раза меньше по сравнению с гетеропентамерными комплексами первых крио-ЭМ GPCR-структур массой 160 кДа [109, 138, 139]. Это соответствует общему тренду уменьшения массы белковых препаратов, исследуемых методом крио-ЭМ [140]. Помимо перечисленных подходов, для исследования неактивных состояний рецепторов применяют «сандвичи» из нескольких фрагментов антител, так, например, получили структуру комплекса гистаминового рецептора H₂R с фрагментом к-опиоидного рецептора + Nb6 + NabFab + анти-Fab Nb [137]. К числу частных примеров неактивных структур GPCR можно отнести структуры: рецептора тиреотропного гормона с ингибирующим аутоантителом [141], комплекса кальцитонинового рецептора с белком, модифицирующим активность рецептора (RAMP₁) [142], а также комплекса хемокинового рецептора с оболочечным белком gp160 ВИЧ и

водорастворимого домена рецептора CD4 Т-лимфоцита [143].

Интересным примером изучения GPCR при помощи крио-ЭМ является исследование димеризации рецепторов — важного модулятора функциональной активности белков. Так, получено несколько десятков структур представителей GPCR класса С: гомо- и гетеродимеров ГАМК-В GPCR, а также метаботропных глутаматных рецепторов как в активной, так и в неактивной формах. Стоит отметить пример структуры гомодимера апелинового рецептора, принадлежащего к GPCR класса А, а также несколько структур STE₂ – грибного рецептора класса D [131, 144, 145].

Несмотря на то что крио-ЭМ все еще уступает в разрешении рентгеноструктурному анализу, метод активно развивается: с момента первых GPCR-структур в 2017 г. с разрешением более 4 Å к 2021 г. в качестве крио-ЭМ-данных произошел существенный скачок – удалось достичь разрешения в 2 Å для структуры холецистокинового рецептора ССК1 [146]. Стоит отметить, что разрешение структур крио-ЭМ неоднородно, оно, как правило, лучше в области образования комплекса и ухудшается в области внеклеточных петель, а в публикациях часто указывают номинальное разрешение. Однако отсутствие фазовой проблемы, характерной для МХ, быстрое развитие приборной и программной баз для крио-ЭМ позволяет ежегодно получать все большее число структур, пригодных для использования в SBDD [147] (панель (б) на рисунке в Приложении).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря развитию белковой кристаллографии и крио-ЭМ область структурной биологии стремительно развивается: в последние годы число полученных структур рецепторов класса GPCR растет экспоненциально. До 2010 г. было решено всего 6 уникальных структур «рецептор–лиганд», а после 2010 г. – 152, и 70 из них получены в период с 2021 по 2022 г. (панель (в) на рисунке в Приложении). В данном обзоре мы показали, какое существенное влияние на разработку лекарств оказали последние достижения методов структурной биологии. Возможность использования информации о структуре GPCR сделало многоэтапный процесс создания фармокологических агентов рациональным, а значит более эффективным.

Вклад авторов. А.М., Н.С. подготовили текст введения; В.П., А.Б., П.Х., В.Б. подготовили раздел по белковой кристаллографии; А.Л., Д.Д. подготовили раздел по криоэлектронной микроскопии; А.Л., П.Х., В.П., Д.Д., А.Х., А.Б. работали над рисунками;

О.М. принимала участие в редактировании текста рукописи; П.Х., А.Л., А.М., В.Б. предложили концепцию, план обзора, редактировали текст рукописи.

Финансирование. Раздел «Подготовка GPCR к кристаллизации» подготовлен при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-00024, https://rscf.ru/project/22-74-00024/); раздел «Кристаллизация GPCR» выполнен в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования (грантовое соглашение № 075-03-2024-117, проект № FSMG-2024-0012); раздел «МХ-методы исследования GPCR» подготовлен при поддержке Министерства науки и высшего образования

(грантовое соглашение № 075-15-2021-1354); раздел «Криоэлектронная микроскопия» подготовлен при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-10036, https://rscf.ru/project/22-74-10036/).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (https://biochemistrymoscow.com).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B., and Philpott, K. L. (2011) Principles of early drug discovery, *Br. J. Pharmacol.*, **162**, 1239-1249, https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.
- 2. Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., and Schacht, A. L. (2010) How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9, 203-214, https://doi.org/10.1038/nrd3078.
- 3. Liu, R., Li, X., and Lam, K. S. (2017) Combinatorial chemistry in drug discovery, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **38**, 117-126, https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.017.
- 4. Nguyen, A. T. N., Nguyen, D. T. N., Koh, H. Y., Toskov, J., MacLean, W., Xu, A., Zhang, D., Webb, G. I., May, L. T., and Halls, M. L. (2023) The application of artificial intelligence to accelerate G protein-coupled receptor drug discovery, *Br. J. Pharmacol.*, https://doi.org/10.1111/bph.16140.
- 5. Van Montfort, R. L. M., and Workman, P. (2017) Structure-based drug design: aiming for a perfect fit, *Essays Biochem.*, **61**, 431-437, https://doi.org/10.1042/EBC20170052.
- 6. Beddell, C. R., Goodford, P. J., Norrington, F. E., Wilkinson, S., and Wootton, R. (1976) Compounds designed to fit a site of known structure in human haemoglobin, *Br. J. Pharmacol.*, 57, 201-209, https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1976. tb07468.x.
- 7. Talele, T. T., Khedkar, S. A., and Rigby, A. C. (2010) Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic, *Curr. Top. Med. Chem.*, **10**, 127-141, https://doi.org/10.2174/156802610790232251.
- 8. Kim, C. U., Lew, W., Williams, M. A., Liu, H., Zhang, L., Swaminathan, S., Bischofberger, N., Chen, M. S., Mendel, D. B., Tai, C. Y., Laver, W. G., and Stevens, R. C. (1997) Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 681-690, https://doi.org/10.1021/ja963036t.
- 9. Zhu, K.-F., Yuan, C., Du, Y.-M., Sun, K.-L., Zhang, X.-K., Vogel, H., Jia, X.-D., Gao, Y.-Z., Zhang, Q.-F., Wang, D.-P., and Zhang, H.-W. (2023) Applications and prospects of cryo-EM in drug discovery, *Mil. Med. Res.*, **10**, 10, https://doi.org/10.1186/s40779-023-00446-y.
- 10. Editorial (2016) Method of the Year 2015, Nat. Methods, 13, 1, https://doi.org/10.1038/nmeth.3730.
- 11. Robertson, M. J., Meyerowitz, J. G., and Skiniotis, G. (2022) Drug discovery in the era of cryo-electron microscopy, *Trends Biochem. Sci.*, **47**, 124-135, https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.06.008.
- 12. Renaud, J.-P., Chari, A., Ciferri, C., Liu, W.-T., Rémigy, H.-W., Stark, H., and Wiesmann, C. (2018) Cryo-EM in drug discovery: achievements, limitations and prospects, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 17, 471-492, https://doi.org/10.1038/nrd.2018.77.
- 13. Mishin, A., Gusach, A., Luginina, A., Marin, E., Borshchevskiy, V., and Cherezov, V. (2019) An outlook on using serial femtosecond crystallography in drug discovery, *Expert Opin. Drug Discov.*, **14**, 933-945, https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1626822.
- 14. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., and Hassabis, D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, 596, 583-589, https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2.
- 15. Baek, M., DiMaio, F., Anishchenko, I., Dauparas, J., Ovchinnikov, S., Lee, G. R., Wang, J., Cong, Q., Kinch, L. N., Schaeffer, R. D., et al. (2021) Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network, *Science*, 373, 871-876, https://doi.org/10.1126/science.abj8754.

- 16. Selinsky, B. S. (2003) Membrane Protein Protocols, Humana Press, https://doi.org/10.1385/159259400x.
- 17. Luginina, A., Maslov, I., Khorn, P., Volkov, O., Khnykin, A., Kuzmichev, P., Shevtsov, M., Belousov, A., Dashevskii, D., Kornilov, D., et al. (2023) Functional GPCR expression in eukaryotic LEXSY system, *J. Mol. Biol.*, **23**, 168310, https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168310.
- 18. Quitterer, U., Pohl, A., Langer, A., Koller, S., and Abdalla, S. (2011) A cleavable signal peptide enhances cell surface delivery and heterodimerization of Cerulean-tagged angiotensin II AT1 and bradykinin B2 receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **409**, 544-549, https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.041.
- 19. Shepard, B. D., Natarajan, N., Protzko, R. J., Acres, O. W., and Pluznick, J. L. (2013) A cleavable N-terminal signal peptide promotes widespread olfactory receptor surface expression in HEK293T cells, *PLoS One*, **8**, e68758, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068758.
- 20. Sarkar, C. A., Dodevski, I., Kenig, M., Dudli, S., Mohr, A., Hermans, E., and Plückthun, A. (2008) Directed evolution of a G protein-coupled receptor for expression, stability, and binding selectivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14808-14813, https://doi.org/10.1073/pnas.0803103105.
- 21. Schlinkmann, K. M., and Plückthun, A. (2013) Directed evolution of G-protein-coupled receptors for high functional expression and detergent stability, *Methods Enzymol.*, **520**, 67-97, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391861-1.00004-6.
- 22. Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Tate, C. G., and Schertler, G. F. X. (2009) Development and crystallization of a minimal thermostabilised G protein-coupled receptor, *Protein Expr. Purif.*, **65**, 204-213, https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.01.014.
- 23. Chun, E., Thompson, A. A., Liu, W., Roth, C. B., Griffith, M. T., Katritch, V., Kunken, J., Xu, F., Cherezov, V., Hanson, M. A., and Stevens, R. C. (2012) Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors, *Structure*, **20**, 967-976, https://doi.org/10.1016/j.str.2012.04.010.
- 24. Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G. F., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Choi, H.-J., Kuhn, P., Weis, W. I., Kobilka, B. K., et al. (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor, *Science*, 318, 1258-1265, https://doi.org/10.1126/science.1150577.
- 25. Liu, W., Chun, E., Thompson, A. A., Chubukov, P., Xu, F., Katritch, V., Han, G. W., Roth, C. B., Heitman, L. H., IJzerman, A. P., et al. (2012) Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions, *Science*, **337**, 232-236, https://doi.org/10.1126/science.1219218.
- 26. Miyagi, H., Suzuki, M., Yasunaga, M., Asada, H., Iwata, S., and Saito, J. I. (2023) Structural insight into an anti-BRIL Fab as a G-protein-coupled receptor crystallization chaperone, *Acta Crystallogr. D. Struct. Biol.*, **79**, 435-441, https://doi.org/10.1107/S205979832300311X.
- 27. Lebon, G., Warne, T., Edwards, P. C., Bennett, K., Langmead, C. J., Leslie, A. G. W., and Tate, C. G. (2011) Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation, *Nature*, **474**, 521-525, https://doi.org/10.1038/nature10136.
- 28. Niesen, M. J. M., Bhattacharya, S., Grisshammer, R., Tate, C. G., and Vaidehi, N. (2013) Thermostabilization of the β1-adrenergic receptor correlates with increased entropy of the inactive state, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 7283-7291, https://doi.org/10.1021/jp403207c.
- 29. Vaidehi, N., Grisshammer, R., and Tate, C. G. (2016) How can mutations thermostabilize G-protein-coupled receptors?, *Trends Pharmacol. Sci.*, **37**, 37-46, https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.09.005.
- 30. Yang, L.-K., and Tao, Y.-X. (2020) Alanine scanning mutagenesis of the DRYxxI motif and intracellular loop 2 of human melanocortin-4 receptor, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7611, https://doi.org/10.3390/ijms21207611.
- 31. Shibata, Y., Gvozdenovic-Jeremic, J., Love, J., Kloss, B., White, J. F., Grisshammer, R., and Tate, C. G. (2013) Optimising the combination of thermostabilising mutations in the neurotensin receptor for structure determination, *Biochim. Biophys. Acta*, **1828**, 1293-1301, https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.01.008.
- 32. Robertson, N., Jazayeri, A., Errey, J., Baig, A., Hurrell, E., Zhukov, A., Langmead, C. J., Weir, M., and Marshall, F. H. (2011) The properties of thermostabilised G protein-coupled receptors (StaRs) and their use in drug discovery, *Neuropharmacology*, **60**, 36-44, https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.07.001.
- 33. Popov, P., Peng, Y., Shen, L., Stevens, R. C., Cherezov, V., Liu, Z.-J., and Katritch, V. (2018) Computational design of thermostabilizing point mutations for G protein-coupled receptors, *Elife*, 7, e34729, https://doi.org/10.7554/eLife.34729.
- 34. Munk, C., Mutt, E., Isberg, V., Nikolajsen, L. F., Bibbe, J. M., Flock, T., Hanson, M. A., Stevens, R. C., Deupi, X., and Gloriam, D. E. (2019) An online resource for GPCR structure determination and analysis, *Nat. Methods*, **16**, 151-162, https://doi.org/10.1038/s41592-018-0302-x.
- 35. Peng, Y., McCorvy, J. D., Harpsøe, K., Lansu, K., Yuan, S., Popov, P., Qu, L., Pu, M., Che, T., Nikolajsen, L. F., et al. (2018) 5-HT_{2C} receptor structures reveal the structural basis of GPCR polypharmacology, *Cell*, **172**, 719-730.e14, https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.001.
- 36. Luginina, A., Gusach, A., Marin, E., Mishin, A., Brouillette, R., Popov, P., Shiriaeva, A., Besserer-Offroy, É., Longpré, J.-M., Lyapina, E., et al. (2019) Structure-based mechanism of cysteinyl leukotriene receptor inhibition by antiasthmatic drugs, *Sci. Adv.*, 5, eaax2518, https://doi.org/10.1126/sciadv.aax2518.

720

- 37. Gusach, A., Luginina, A., Marin, E., Brouillette, R. L., Besserer-Offroy, É., Longpré, J.-M., Ishchenko, A., Popov, P., Patel, N., Fujimoto, T., et al. (2019) Structural basis of ligand selectivity and disease mutations in cysteinyl leukotriene receptors, *Nat. Commun.*, **10**, 5573, https://doi.org/10.1038/s41467-019-13348-2.
- 38. Li, X., Hua, T., Vemuri, K., Ho, J.-H., Wu, Y., Wu, L., Popov, P., Benchama, O., Zvonok, N., Locke, K., Qu, L., Han, G. W., Iyer, M. R., Cinar, R., Coffey, N. J., Wang, J., Wu, M., Katritch, V., Zhao, S., Kunos, G., Bohn, L. M., Makriyannis, A., Stevens, R. C., and Liu, Z.-J.. (2019) Crystal structure of the human cannabinoid receptor CB₂, *Cell*, 176, 459-467.e13, https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.011.
- 39. Dmitrieva, D. A., Kotova, T. V., Safronova, N. A., Sadova, A. A., Dashevskii, D. E., and Mishin, A. V. (2023) Protein design strategies for the structural-functional studies of G protein-coupled receptors, *Biochemistry*, **88**, S192-S226, https://doi.org/10.1134/S0006297923140110.
- 40. Lavington, S., and Watts, A. (2020) Lipid nanoparticle technologies for the study of G protein-coupled receptors in lipid environments, *Biophys. Rev.*, **12**, 1287-1302, https://doi.org/10.1007/s12551-020-00775-5.
- 41. Alexandrov, A. I., Mileni, M., Chien, E. Y. T., Hanson, M. A., and Stevens, R. C. (2008) Microscale fluorescent thermal stability assay for membrane proteins, *Structure*, **16**, 351-359, https://doi.org/10.1016/j.str.2008.02.004.
- 42. Landau, E. M., and Rosenbusch, J. P. (1996) Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14532-14535, https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14532.
- 43. Caffrey, M. (2009) Crystallizing membrane proteins for structure determination: use of lipidic mesophases, *Annu. Rev. Biophys.*, **38**, 29-51, https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.050708.133655.
- 44. Kors, C. A., Wallace, E., Davies, D. R., Li, L., Laible, P. D., and Nollert, P. (2009) Effects of impurities on membrane-protein crystallization in different systems, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **65**, 1062-1073, https://doi.org/10.1107/S0907444909029163.
- 45. Bogorodskiy, A., Frolov, F., Mishin, A., Round, E., Polovinkin, V., Cherezov, V., Gordeliy, V., Büldt, G., Gensch, T., and Borshchevskiy, V. (2015) Nucleation and growth of membrane protein crystals *in meso* a fluorescence microscopy study, *Crystal Growth Des.*, **15**, 5656-5660, https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01061.
- 46. Caffrey, M., and Cherezov, V. (2009) Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases, *Nat. Protoc.*, **4**, 706-731, https://doi.org/10.1038/nprot.2009.31.
- 47. Xu, F., Liu, W., Hanson, M. A., Stevens, R. C., and Cherezov, V. (2011) Development of an automated high throughput LCP-FRAP assay to guide membrane protein crystallization in lipid mesophases, *Crystal Growth Des.*, **11**, 1193-1201, https://doi.org/10.1021/cg101385e.
- 48. Li, D., Boland, C., Walsh, K., and Caffrey, M. (2012) Use of a robot for high-throughput crystallization of membrane proteins in lipidic mesophases, *J. Vis. Exp.*, **67**, e4000, https://doi.org/10.3791/4000.
- 49. Ishchenko, A., Cherezov, V., and Liu, W. (2016) Preparation and delivery of protein microcrystals in lipidic cubic phase for serial femtosecond crystallography, *J. Vis. Exp.*, **115**, e54463, https://doi.org/10.3791/54463.
- 50. Hendrickson, W. A. (2014) Anomalous diffraction in crystallographic phase evaluation, *Q. Rev. Biophys.*, **47**, 49-93, https://doi.org/10.1017/S0033583514000018.
- 51. Willmott, P. (2019) *An Introduction to Synchrotron Radiation: Techniques and Applications*, John Wiley & Sons, https://doi.org/10.1002/9781119280453.
- 52. Pellegrini, C. (2012) The history of X-ray free-electron lasers, *Eur. Phys. J.*, **37**, 659-708, https://doi.org/10.1140/epjh/e2012-20064-5.
- 53. Kurilko, V. I., and Tkach, Y. V. (1995) Physical mechanisms of generation of coherent radiation in an ultrarelativistic free-electron laser, *Usp. Fiz. Nauk*, **165**, 241-261.
- 54. Ponchut, C. (2006) Characterization of X-ray area detectors for synchrotron beamlines, *J. Synchrotron Radiat.*, **13**, 195-203, https://doi.org/10.1107/S0909049505034278.
- 55. Walter, R. L., Thiel, D. J., Barna, S. L., Tate, M. W., Wall, M. E., Eikenberry, E. F., Gruner, S. M., and Ealick, S. E. (1995) High-resolution macromolecular structure determination using CCD detectors and synchrotron radiation, *Structure*, **3**, 835-844, https://doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00218-0.
- 56. Heijne, E. H. M., Jarron, P., Olsen, A., and Redaelli, N. (1988) The silicon micropattern detector: a dream?, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A*, **273**, 615-619, https://doi.org/10.1016/0168-9002(88)90065-4.
- 57. Delpierre, P. (1994) Pixels detectors and silicon X-rays detectors, *J. Phys.*, **04**, C9-11-C9-18, https://doi.org/10.1051/jp4:1994902.
- 58. Brönnimann, C., and Trüb, P. (2016) in *Accelerator Physics, Instrumentation and Science Applications* (Jaeschke, E., Khan, S., Schneider, J., Hastings, J., eds) Springer, Cham, pp. 995-1027, https://doi.org/10.1007/978-3-319-14394-1_36.
- 59. Caffrey, M. (2015) A comprehensive review of the lipid cubic phase or *in meso* method for crystallizing membrane and soluble proteins and complexes, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 71, 3-18, https://doi.org/10.1107/S2053230X14026843.
- 60. Smith, J. L., Fischetti, R. F., and Yamamoto, M. (2012) Micro-crystallography comes of age, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **22**, 602-612, https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.09.001.

- 61. Helliwell, J. R., and Mitchell, E. P. (2015) Synchrotron radiation macromolecular crystallography: science and spin-offs, *IUCrJ*, **2**, 283-291, https://doi.org/10.1107/S205225251402795X.
- 62. Sanishvili, R., Yoder, D. W., Pothineni, S. B., Rosenbaum, G., Xu, S., Vogt, S., Stepanov, S., Makarov, O. A., Corcoran, S., Benn, R., et al. (2011) Radiation damage in protein crystals is reduced with a micron-sized X-ray beam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 6127-6132, https://doi.org/10.1073/pnas.1017701108.
- 63. Kmetko, J., Husseini, N. S., Naides, M., Kalinin, Y., and Thorne, R. E. (2006) Quantifying X-ray radiation damage in protein crystals at cryogenic temperatures, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **62**, 1030-1038, https://doi.org/10.1107/S0907444906023869.
- 64. Garman, E. F. (2010) Radiation damage in macromolecular crystallography: what is it and why should we care?, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 339-351, https://doi.org/10.1107/S0907444910008656.
- 65. Baba, S., Matsuura, H., Kawamura, T., Sakai, N., Nakamura, Y., Kawano, Y., Mizuno, N., Kumasaka, T., Yamamoto, M., and Hirata, K. (2021) Guidelines for de novo phasing using multiple small-wedge data collection, *J. Synchrotron Radiat.*, **28**, 1284-1295, https://doi.org/10.1107/S1600577522001655.
- 66. Hilgart, M. C., Sanishvili, R., Ogata, C. M., Becker, M., Venugopalan, N., Stepanov, S., Makarov, O., Smith, J. L., and Fischetti, R. F. (2011) Automated sample-scanning methods for radiation damage mitigation and diffraction-based centering of macromolecular crystals, *J. Synchrotron Radiat.*, **18**, 717-722, https://doi.org/10.1107/S0909049511029918.
- 67. Barty, A., Kirian, R. A., Maia, F. R. N. C., Hantke, M., Yoon, C. H., White, T. A., and Chapman, H. (2014) Cheetah: software for high-throughput reduction and analysis of serial femtosecond X-ray diffraction data, *J. Appl. Crystallogr.*, 47, 1118-1131, https://doi.org/10.1107/S1600576714007626.
- 68. Svensson, O., Malbet-Monaco, S., Popov, A., Nurizzo, D., and Bowler, M. W. (2015) Fully automatic characterization and data collection from crystals of biological macromolecules, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **71**, 1757-1767, https://doi.org/10.1107/S1399004715011918.
- 69. Marin, E., Luginina, A., Gusach, A., Kovalev, K., Bukhdruker, S., Khorn, P., Polovinkin, V., Lyapina, E., Rogachev, A., Gordeliy, V., et al. (2020) Small-wedge synchrotron and serial XFEL datasets for Cysteinyl leukotriene GPCRs, *Sci. Data*, 7, 388, https://doi.org/10.1038/s41597-020-00729-2.
- 70. Segala, E., Guo, D., Cheng, R. K. Y., Bortolato, A., Deflorian, F., Doré, A. S., Errey, J. C., Heitman, L. H., IJzerman, A. P., Marshall, F. H., et al. (2016) Controlling the dissociation of ligands from the adenosine A2A receptor through modulation of salt bridge strength, *J. Med. Chem.*, **59**, 6470-6479, https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem. 6b00653.
- 71. Rasmussen, S. G. F., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., et al. (2011) Crystal structure of the β2 adrenergic receptor–Gs protein complex, *Nature*, 477, 549-555, https://doi.org/10.1038/nature10361.
- 72. Zhou, Q., Yang, D., Wu, M., Guo, Y., Guo, W., Zhong, L., Cai, X., Dai, A., Jang, W., Shakhnovich, E. I., et al. (2019) Common activation mechanism of class A GPCRs, *Elife*, **8**, e50279, https://doi.org/10.7554/eLife.50279.
- 73. Rucktooa, P., Cheng, R. K. Y., Segala, E., Geng, T., Errey, J. C., Brown, G. A., Cooke, R. M., Marshall, F. H., and Doré, A. S. (2018) Towards high throughput GPCR crystallography: *in meso* soaking of adenosine A2A receptor crystals, *Sci. Rep.*, **8**, 41, https://doi.org/10.1038/s41598-017-18570-w.
- 74. Yamamoto, M., Hirata, K., Yamashita, K., Hasegawa, K., Ueno, G., Ago, H., and Kumasaka, T. (2017) Protein microcrystallography using synchrotron radiation, *IUCrJ*, 4, 529-539, https://doi.org/10.1107/S2052252517008193.
- 75. Neutze, R., Wouts, R., van der Spoel, D., Weckert, E., and Hajdu, J. (2000) Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses, *Nature*, **406**, 752-757, https://doi.org/10.1038/35021099.
- 76. Chapman, H. N., Fromme, P., Barty, A., White, T. A., Kirian, R. A., Aquila, A., Hunter, M. S., Schulz, J., DePonte, D. P., Weierstall, U., et al. (2011) Femtosecond X-ray protein nanocrystallography, *Nature*, **470**, 73-77, https://doi.org/10.1038/nature09750.
- 77. Gati, C., Bourenkov, G., Klinge, M., Rehders, D., Stellato, F., Oberthür, D., Yefanov, O., Sommer, B. P., Mogk, S., Duszenko, M., Betzel, C., Schneider, T. R., Chapmana, H. N., and Redeckec, L. (2014) Serial crystallography on *in vivo* grown microcrystals using synchrotron radiation, *IUCrJ*, 1, 87-94, https://doi.org/10.1107/S2052252513033939.
- 78. Roedig, P., Duman, R., Sanchez-Weatherby, J., Vartiainen, I., Burkhardt, A., Warmer, M., David, C., Wagner, A., and Meents, A. (2016) Room-temperature macromolecular crystallography using a micro-patterned silicon chip with minimal background scattering, *J. Appl. Crystallogr.*, **49**, 968-975, https://doi.org/10.1107/S1600576716006348.
- 79. Huang, C. Y., Olieric, V., Ma, P., Panepucci, E., Diederichs, K., Wang, M., and Caffrey, M. (2015) *In meso* in situ serial X-ray crystallography of soluble and membrane proteins, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 71, 1238-1256, https://doi.org/10.1107/S1399004715005210.
- 80. Baxter, E. L., Aguila, L., Alonso-Mori, R., Barnes, C. O., Bonagura, C. A., Brehmer, W., Brunger, A. T., Calero, G., Caradoc-Davies, T. T., Chatterjee, R., et al. (2016) High-density grids for efficient data collection from multiple crystals, *Acta Crystallogr. D. Struct. Biol.*, 72, 2-11, https://doi.org/10.1107/S2059798315020847.

- 81. Weierstall, U., James, D., Wang, C., White, T. A., Wang, D., Liu, W., Spence, J. C. H., Doak, R. B., Nelson, G., Fromme, R., Grotjohann, I., Kupitz, C., Zatsepin, N. A., Liu, H., Basu, S., Wacker, D., et al. (2014) Lipidic cubic phase injector facilitates membrane protein serial femtosecond crystallography, *Nat. Commun.*, 5, 3309, https://doi.org/10.1038/ncomms4309.
- 82. Fuller, F. D., Gul, S., Chatterjee, R., Burgie, E. S., Young, I. D., Lebrette, H., Srinivas, V., Brewster, A. S., Michels-Clark, T., Clinger, J. A., et al. (2017) Drop-on-demand sample delivery for studying biocatalysts in action at X-ray free-electron lasers, *Nat. Methods*, **14**, 443-449, https://doi.org/10.1038/nmeth.4195.
- 83. Miller, R. J. D. (2014) Femtosecond crystallography with ultrabright electrons and x-rays: capturing chemistry in action, *Science*, **343**, 1108-1116, https://doi.org/10.1126/science.1248488.
- 84. Coquelle, N., Brewster, A. S., Kapp, U., Shilova, A., Weinhausen, B., Burghammer, M., and Colletier, J. P. (2015) Raster-scanning serial protein crystallography using micro- and nano-focused synchrotron beams, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 71, 1184-1196, https://doi.org/10.1107/S1399004715004514.
- 85. Ke, T. W., Brewster, A. S., Yu, S. X., Ushizima, D., Yang, C., and Sauter, N. K. (2018) A convolutional neural network-based screening tool for X-ray serial crystallography, *J. Synchrotron Radiat.*, **25**, 655-670, https://doi.org/10.1107/S1600577518004873.
- 86. Zaefferer, S. (2000) New developments of computer-aided crystallographic analysis in transmission electron microscopy, *J. Appl. Crystallogr.*, **33**, 10-25, https://doi.org/10.1107/S0021889899010894.
- 87. Winter, G., Waterman, D. G., Parkhurst, J. M., Brewster, A. S., Gildea, R. J., Gerstel, M., Fuentes-Montero, L., Vollmar, M., Michels-Clark, T., Young, I. D., et al. (2018) DIALS: implementation and evaluation of a new integration package, *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.*, 74, 85-97, https://doi.org/10.1107/S2059798317017235.
- 88. Kabsch, W. (2014) Processing of X-ray snapshots from crystals in random orientations, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **70**, 2204-2216, https://doi.org/10.1107/S1399004714013534.
- 89. Sauter, N. K., Hattne, J., Grosse-Kunstleve, R. W., and Echols, N. (2013) New Python-based methods for data processing, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **69**, 1274-1282, https://doi.org/10.1107/S0907444913000863.
- 90. White, T. A., Kirian, R. A., Martin, A. V., Aquila, A., Nass, K., Barty, A., and Chapman, H. N. (2012) CrystFEL: a software suite for snapshot serial crystallography, *J. Appl. Crystallogr.*, 45, 335-341, https://doi.org/10.1107/S0021889812002312.
- 91. Ginn, H. M., Evans, G., Sauter, N. K., and Stuart, D. I. (2016) On the release of cppxfel for processing X-ray free-electron laser images, *J. Appl. Crystallogr.*, **49**, 1065-1072, https://doi.org/10.1107/S1600576716006981.
- 92. Liu, W., Wacker, D., Gati, C., Han, G. W., James, D., Wang, D., Nelson, G., Weierstall, U., Katritch, V., Barty, A., et al. (2013) Serial femtosecond crystallography of G protein-coupled receptors, *Science*, **342**, 1521-1524, https://doi.org/10.1126/science.1244142.
- 93. Kang, Y., Zhou, X. E., Gao, X., He, Y., Liu, W., Ishchenko, A., Barty, A., White, T. A., Yefanov, O., Han, G. W., et al. (2015) Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser, *Nature*, **523**, 561-567, https://doi.org/10.1038/nature14656.
- 94. Cheng, Y., Grigorieff, N., Penczek, P. A., and Walz, T. (2015) A primer to single-particle cryo-electron microscopy, *Cell*, **161**, 438-449, https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.050.
- 95. Kühlbrandt, W. (2014) Biochemistry. The resolution revolution, *Science*, **343**, 1443-1444, https://doi.org/10.1126/science.1251652.
- 96. Nakane, T., Kotecha, A., Sente, A., McMullan, G., Masiulis, S., Brown, P. M. G. E., Grigoras, I. T., Malinauskaite, L., Malinauskas, T., Miehling, J., et al. (2020) Single-particle cryo-EM at atomic resolution, *Nature*, **587**, 152-156, https://doi.org/10.1038/s41586-020-2829-0.
- 97. Russo, C. J., and Passmore, L. A. (2014) Electron microscopy: Ultrastable gold substrates for electron cryomicroscopy, *Science*, **346**, 1377-1380, https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.11.006.
- 98. Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J., and Brubaker, M. A. (2017) CryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination, *Nat. Methods*, **14**, 290-296, https://doi.org/10.1038/nmeth.4169.
- 99. Jeong, E., Kim, Y., Jeong, J., and Cho, Y. (2021) Structure of the class C orphan GPCR GPR158 in complex with RGS7-Gβ5, *Nat. Commun.*, 12, 6805, https://doi.org/10.1038/s41467-021-27147-1.
- 100. Kato, T., Makino, F., Nakane, T., Terahara, N., Kaneko, T., Shimizu, Y., Motoki, S., Ishikawa, I., Yonekura, K., and Namba, K. (2019) CryoTEM with a cold field emission gun that moves structural biology into a new stage, *Microsc. Microanal.*, **25**, 998-999, https://doi.org/10.1017/S1431927619005725.
- 101. Peet, M. J., Henderson, R., and Russo, C. J. (2019) The energy dependence of contrast and damage in electron cryomicroscopy of biological molecules, *Ultramicroscopy*, **203**, 125-131, https://doi.org/10.1016/j.ultramic. 2019 02 007
- 102. Naydenova, K., McMullan, G., Peet, M. J., Lee, Y., Edwards, P. C., Chen, S., Leahy, E., Scotcher, S., Henderson, R., and Russo, C. J. (2019) CryoEM at 100 keV: a demonstration and prospects, *IUCrJ*, **6**, 1086-1098, https://doi.org/10.1107/S2052252519012612.

- 103. Krivanek, O. L., Corbin, G. J., Dellby, N., Elston, B. F., Keyse, R. J., Murfitt, M. F., Own, C. S., Szilagyi, Z. S., and Woodruff, J. W. (2008) An electron microscope for the aberration-corrected era, *Ultramicroscopy*, **108**, 179-195, https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2007.07.010.
- 104. Yip, K. M., Fischer, N., Paknia, E., Chari, A., and Stark, H. (2020) Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM, *Nature*, **587**, 157-161, https://doi.org/10.1038/s41586-020-2833-4.
- 105. Rose, H. (2004) Outline of an ultracorrector compensating for all primary chromatic and geometrical aberrations of charged-particle lenses, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A*, **519**, 12-27, https://doi.org/10.1017/S1431927603011164.
- 106. Guo, H., Franken, E., Deng, Y., Benlekbir, S., Singla Lezcano, G., Janssen, B., Yu, L., Ripstein, Z. A., Tan, Y. Z., and Rubinstein, J. L. (2020) Electron-event representation data enable efficient cryoEM file storage with full preservation of spatial and temporal resolution, *IUCrJ*, 7, 860-869, https://doi.org/10.1107/S205225252000929X.
- 107. Pándy-Szekeres, G., Munk, C., Tsonkov, T. M., Mordalski, S., Harpsøe, K., Hauser, A. S., Bojarski, A. J., and Gloriam, D. E. (2018) GPCRdb in 2018: adding GPCR structure models and ligands, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D440-D446, https://doi.org/10.1093/nar/gkx1109.
- 108. Zhuang, Y., Xu, P., Mao, C., Wang, L., Krumm, B., Zhou, X. E., Huang, S., Liu, H., Cheng, X., Huang, X.-P., et al. (2021) Structural insights into the human D1 and D2 dopamine receptor signaling complexes, *Cell*, **184**, 931-942.e18, https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.027.
- 109. Liang, Y.-L., Khoshouei, M., Glukhova, A., Furness, S. G. B., Zhao, P., Clydesdale, L., Koole, C., Truong, T. T., Thal, D. M., Lei, S., et al. (2018) Phase-plate cryo-EM structure of a biased agonist-bound human GLP-1 receptor-Gs complex, *Nature*, 555, 121-125, https://doi.org/10.1038/nature25773.
- 110. Liang, Y.-L., Belousoff, M. J., Zhao, P., Koole, C., Fletcher, M. M., Truong, T. T., Julita, V., Christopoulos, G., Xu, H. E., Zhang, Y., et al. (2020) Toward a structural understanding of class B GPCR peptide binding and activation, *Mol. Cell*, 77, 656-668.e5, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.01.012.
- 111. Huang, S., Xu, P., Shen, D.-D., Simon, I. A., Mao, C., Tan, Y., Zhang, H., Harpsøe, K., Li, H., Zhang, Y., et al. (2022) GPCRs steer Gi and Gs selectivity via TM5-TM6 switches as revealed by structures of serotonin receptors, *Mol. Cell*, 82, 2681-2695.e6, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.031.
- 112. Yang, F., Mao, C., Guo, L., Lin, J., Ming, Q., Xiao, P., Wu, X., Shen, Q., Guo, S., Shen, D.-D., et al. (2020) Structural basis of GPBAR activation and bile acid recognition, *Nature*, **587**, 499-504, https://doi.org/10.1038/s41586-020-2569-1.
- 113. Koning, R. I., Vader, H., van Nugteren, M., Grocutt, P. A., Yang, W., Renault, L. L. R., Koster, A. J., Kamp, A. C. F., and Schwertner, M. (2022) Automated vitrification of cryo-EM samples with controllable sample thickness using suction and real-time optical inspection, *Nat. Commun.*, 13, 2985, https://doi.org/10.1038/s41467-022-30562-7.
- 114. Zhang, X., Johnson, R. M., Drulyte, I., Yu, L., Kotecha, A., Danev, R., Wootten, D., Sexton, P. M., and Belousoff, M. J. (2021) Evolving cryo-EM structural approaches for GPCR drug discovery, *Structure*, **29**, 963-974.e6, https://doi.org/10.1016/j.str.2021.04.008.
- 115. Cheng, A., Tan, Y. Z., Dandey, V. P., Potter, C. S., and Carragher, B. (2016) Strategies for automated CryoEM data collection using direct detectors, *Methods Enzymol.*, **579**, 87-102, https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.04.008.
- 116. Wang, H.-W., and Wang, J.-W. (2017) How cryo-electron microscopy and X-ray crystallography complement each other, *Protein Sci.*, **26**, 32-39, https://doi.org/10.1002/pro.3022.
- 117. Barros-Álvarez, X., Nwokonko, R. M., Vizurraga, A., Matzov, D., He, F., Papasergi-Scott, M. M., Robertson, M. J., Panova, O., Yardeni, E. H., Seven, A. B., et al. (2022) The tethered peptide activation mechanism of adhesion GPCRs, *Nature*, **604**, 757-762, https://doi.org/10.1038/s41586-022-04575-7.
- 118. Ye, F., Wong, T.-S., Chen, G., Zhang, Z., Zhang, B., Gan, S., Gao, W., Li, J., Wu, Z., Pan, X., et al. (2022) Cryo-EM structure of G-protein-coupled receptor GPR17 in complex with inhibitory G protein, *MedComm*, 3, e159, https://doi.org/10.1002/mco2.159.
- 119. Weissenberger, G., Henderikx, R. J. M., and Peters, P. J. (2021) Understanding the invisible hands of sample preparation for cryo-EM, *Nat. Methods*, **18**, 463-471, https://doi.org/10.1038/s41592-021-01130-6.
- 120. Sgro, G. G., and Costa, T. R. D. (2018) Cryo-EM grid preparation of membrane protein samples for single particle analysis, *Front Mol Biosci.*, **5**, 74, https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00074.
- 121. Li, S. (2022) Detergents and alternatives in cryo-EM studies of membrane proteins, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **54**, 1049-1056, https://doi.org/10.3724/abbs.2022088.
- 122. Kampjut, D., Steiner, J., and Sazanov, L. A. (2021) Cryo-EM grid optimization for membrane proteins, *iScience*, **24**, 102139, https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102139.
- 123. Zhang, M., Gui, M., Wang, Z.-F., Gorgulla, C., Yu, J. J., Wu, H., Sun, Z.-Y. J., Klenk, C., Merklinger, L., Morstein, L., et al. (2021) Cryo-EM structure of an activated GPCR-G protein complex in lipid nanodiscs, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **28**, 258-267, https://doi.org/10.1038/s41594-020-00554-6.
- 124. Yin, J., Chen, K.-Y. M., Clark, M. J., Hijazi, M., Kumari, P., Bai, X.-C., Sunahara, R. K., Barth, P., and Rosenbaum, D. M. (2020) Structure of a D2 dopamine receptor G-protein complex in a lipid membrane, *Nature*, **584**, 125-129, https://doi.org/10.1038/s41586-020-2379-5.

- 125. Lee, Y., Warne, T., Nehmé, R., Pandey, S., Dwivedi-Agnihotri, H., Chaturvedi, M., Edwards, P. C., García-Nafría, J., Leslie, A. G. W., Shukla, A. K., et al. (2020) Molecular basis of β -arrestin coupling to formoterol-bound β 1-adrenoceptor, *Nature*, **583**, 862-866, https://doi.org/10.1038/s41586-020-2419-1.
- 126. Staus, D. P., Hu, H., Robertson, M. J., Kleinhenz, A. L. W., Wingler, L. M., Capel, W. D., Latorraca, N. R., Lefkowitz, R. J., and Skiniotis, G. (2020) Structure of the M2 muscarinic receptor-β-arrestin complex in a lipid nanodisc, *Nature*, **579**, 297-302, https://doi.org/10.1038/s41586-020-1954-0.
- 127. Ripstein, Z. A., and Rubinstein, J. L. (2016) Processing of cryo-EM movie data, *Methods Enzymol.*, **579**, 103-124, https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.04.009.
- 128. Scheres, S. H. W. (2016) Processing of structurally heterogeneous cryo-EM data in RELION, *Methods Enzymol.*, **579**, 125-157, https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.04.012.
- 129. Penczek, P. A. (2010) Image restoration in cryo-electron microscopy, *Methods Enzymol.*, **482**, 35-72, https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)82002-6.
- 130. Rosenthal, P. B., and Henderson, R. (2003) Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy, *J. Mol. Biol.*, **333**, 721-745, https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.07.013.
- 131. Gusach, A., García-Nafría, J., and Tate, C. G. (2023) New insights into GPCR coupling and dimerisation from cryo-EM structures, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **80**, 102574, https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102574.
- 132. Yin, W., Li, Z., Jin, M., Yin, Y.-L., de Waal, P. W., Pal, K., Yin, Y., Gao, X., He, Y., Gao, J., et al. (2019) A complex structure of arrestin-2 bound to a G protein-coupled receptor, *Cell Res.*, 29, 971-983, https://doi.org/10.1038/s41422-019-0256-2.
- 133. Chen, Q., Plasencia, M., Li, Z., Mukherjee, S., Patra, D., Chen, C.-L., Klose, T., Yao, X.-Q., Kossiakoff, A. A., Chang, L., et al. (2021) Structures of rhodopsin in complex with G-protein-coupled receptor kinase 1, *Nature*, 595, 600-605, https://doi.org/10.1038/s41586-021-03721-x.
- 134. Duan, J., Liu, H., Ji, Y., Yuan, Q., Li, X., Wu, K., Gao, T., Zhu, S., Yin, W., Jiang, Y., et al. (2022) Structure of a G protein-coupled receptor with GRK2 and a biased ligand, *bioRxiv*, https://doi.org/10.1101/2022.10.19.512855.
- 135. Thomsen, A. R. B., Plouffe, B., Cahill, T. J., 3rd, Shukla, A. K., Tarrasch, J. T., Dosey, A. M., Kahsai, A. W., Strachan, R. T., Pani, B., Mahoney, J. P., Huang, L., Breton, B., Heydenreich, F. M., Sunahara, R. K., Skiniotis, G., Bouvier, M., and Lefkowitz, R. J. (2016) GPCR-G protein-β-arrestin super-complex mediates sustained G protein signaling, *Cell*, 166, 907-919, https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.004.
- 136. Zhang, K., Wu, H., Hoppe, N., Manglik, A., and Cheng, Y. (2022) Fusion protein strategies for cryo-EM study of G protein-coupled receptors, *Nat. Commun.*, **13**, 4366, https://doi.org/10.1038/s41467-022-32125-2.
- 137. Robertson, M. J., Papasergi-Scott, M. M., He, F., Seven, A. B., Meyerowitz, J. G., Panova, O., Peroto, M. C., Che, T., and Skiniotis, G. (2022) Structure determination of inactive-state GPCRs with a universal nanobody, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **29**, 1188-1195, https://doi.org/10.1038/s41594-022-00859-8.
- 138. Liang, Y.-L., Khoshouei, M., Radjainia, M., Zhang, Y., Glukhova, A., Tarrasch, J., Thal, D. M., Furness, S. G. B., Christopoulos, G., Coudrat, T., et al. (2017) Phase-plate cryo-EM structure of a class B GPCR-G-protein complex, *Nature*, 546, 118-123, https://doi.org/10.1038/nature22327.
- 139. Zhang, Y., Sun, B., Feng, D., Hu, H., Chu, M., Qu, Q., Tarrasch, J. T., Li, S., Sun Kobilka, T., Kobilka, B. K., et al. (2017) Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with a G protein, *Nature*, **546**, 248-253, https://doi.org/10.1038/nature22394.
- 140. Fan, X., Wang, J., Zhang, X., Yang, Z., Zhang, J.-C., Zhao, L., Peng, H.-L., Lei, J., and Wang, H.-W. (2019) Single particle cryo-EM reconstruction of 52 kDa streptavidin at 3.2 Angstrom resolution, *Nat. Commun.*, **10**, 2386, https://doi.org/10.1038/s41467-019-10368-w.
- 141. Duan, J., Xu, P., Luan, X., Ji, Y., He, X., Song, N., Yuan, Q., Jin, Y., Cheng, X., Jiang, H., et al. (2022) Hormone- and antibody-mediated activation of the thyrotropin receptor, *Nature*, **609**, 854-859, https://doi.org/10.1038/s41586-022-05173-3.
- 142. Josephs, T. M., Belousoff, M. J., Liang, Y.-L., Piper, S. J., Cao, J., Garama, D. J., Leach, K., Gregory, K. J., Christopoulos, A., Hay, D. L., et al. (2021) Structure and dynamics of the CGRP receptor in apo and peptide-bound forms, *Science*, https://doi.org/10.1126/science.abf7258.
- 143. Shaik, M. M., Peng, H., Lu, J., Rits-Volloch, S., Xu, C., Liao, M., and Chen, B. (2019) Structural basis of coreceptor recognition by HIV-1 envelope spike, *Nature*, **565**, 318-323, https://doi.org/10.1038/s41586-018-0804-9.
- 144. Yue, Y., Liu, L., Wu, L.-J., Wu, Y., Wang, L., Li, F., Liu, J., Han, G.-W., Chen, B., Lin, X., et al. (2022) Structural insight into apelin receptor G protein stoichiometry, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **29**, 688-697, https://doi.org/10.1038/s41594-022-00797-5.
- 145. Velazhahan, V., Ma, N., Pándy-Szekeres, G., Kooistra, A. J., Lee, Y., Gloriam, D. E., Vaidehi, N., and Tate, C. G. (2020) Structure of the class D GPCR Ste2 dimer coupled to two G proteins, *Nature*, **589**, 148-153, https://doi.org/10.1038/s41586-020-2994-1.

- 146. Mobbs, J. I., Belousoff, M. J., Harikumar, K. G., Piper, S. J., Xu, X., Furness, S. G. B., Venugopal, H., Christopoulos, A., Danev, R., Wootten, D., et al. (2021) Structures of the human cholecystokinin 1 (CCK1) receptor bound to Gs and Gq mimetic proteins provide insight into mechanisms of G protein selectivity, *PLoS Biol.*, **19**, e3001295, https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001295.
- 147. Van Drie, J. H., and Tong, L. (2020) Cryo-EM as a powerful tool for drug discovery, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **30**, 127524, https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127524.

RATIONAL DRUG DESIGN TARGETING G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS: A STRUCTURAL BIOLOGY PERSPECTIVE

Review

P. A. Khorn¹, A. P. Luginina¹, V. A. Pospelov¹, D. E. Dashevskii¹, A. N. Khnykin¹, O. V. Moiseeva^{1,2}, N. A. Safronova¹, A. S. Belousov¹, A. V. Mishin^{1*}, and V. I. Borshchevskiy^{1,3*}

¹ Moscow Institute of Physics and Technology (NIU), 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia; e-mail: borshchevskiy.vi@phystech.edu, mishinalexey@phystech.edu

² G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Science, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

³ Frank Laboratory of Neutron Physics, Joint Institute for Nuclear Research, 141980 Dubna, Moscow Region, Russia

G protein-coupled Receptors (G protein-coupled Receptors, GPCRs) play a key role in the transmission of extracellular signals and regulation of many biological processes, which makes these membrane proteins one of the most important classes of targets for pharmacological agents. The significant increase in the number of atomic structures of GPCRs recently has paved the way for Structure Based Drug Design (SBDD). SBDD uses information on the structure of the receptor-ligand complex to search for affinity and selective ligands without the need for high-throughput experimental ligand screening and allows a significant expansion of the chemical ligand search space. In our review we describe the process of GPCR structure obtaining by X-ray diffraction analysis and cryo-electron microscopy (cryo-EM) – an important step in rational drug design targeting GPCRs. Our main goal is to highlight to a wide range of specialists the current aspects and key features of experimental structural biology methods necessary for a detailed understanding of SBDD GPCRs.

Keywords: drug development, GPCR, MX, cryo-EM, SBDD

— ХРОНИКА —

ПАМЯТНЫЕ И ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ ИСТОРИИ БИОХИМИИ 2024 года*

- **225 лет** открытие гремучей ртути ртутной соли гремучей кислоты (E. Howward, 1799).
- **175 лет** получен первый кристаллический белок (гемоглобин) (К.Б. Рейхерт, Тарту, 1849).
- 175 лет выделение холина (A.F.L. Strecker, 1849).
- **150 лет** открытие дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) (F. Miescher, 1874).
- **150 лет** получен героин (Wrighr, 1874).
- **150 лет** синтезирован ДДТ (О. Zeidler, 1874).
- **150 лет** «Лечебные воды, грязи и морские купанья в России и за границей: Классификация, химический состав, действие и показания к употреблению» (Л.Б. Бертенсон, 1874).
- 125 лет «Новый способ определения на человеке количества выдыхаемого воздуха и содержащейся в оном углекислоты»: Дисс. (М.Н. Шатерников, 1899).
- **125 лет** первое приготовление лейкотоксина (И.И. Мечников, 1899).
- **100 лет** предложена реакция Фельгена способ выявления ДНК в клетках и тканях (R.J.W. Feulgen, H. Rossenbech, 1924).
- **100 лет** «Исследования о бактериолизинах и бактериофагах» (Н.Ф. Гамалея, 1924).
- **100 лет** «Учебник биологической химии» (А.В. Палладин, 1924).
- 75 лет «Биохимия аминокислотного обмена» (А.Е. Браунштейн, 1949).
- 75 лет изучение и внедрение в клиническую практику парааминосалициловой кислоты (ПАСК) химиотерапевтического препарата для лечения туберкулеза (Э.М. Буртнек и др., 1949–1950).
- 75 **лет** получен антибиотик альбомицин (Г.Ф. Гаузе и др., 1949–1950).
- 75 лет открытие явления фотореактивации (И.Ф. Ковалев, 1949; A. Kelner, 1949).
- 75 **лет** серологическая реакция для диагностики сифилиса – реакция Нельсона–Мейера (R.A. Nelson, M.M. Mayer, 1949).
- 75 лет открытие молекулярных основ патологии серповидно-клеточной анемии (L.C. Pauling, H.A. Itano, 1949).

- 75 лет проба Торна для диагностики заболеваний коры надпочечников (G.W. Thorn, 1949).
- **50 лет** тест на тромбопластический β₁-глобулин для диагностики беременности (1974).
- 1 мая 125 лет со дня рождения Евгения Михайловича Крепса (1899-1985, род. в С.-Петербурге), российского физиолога и биохимика, академика АН СССР, академика-секретаря Отделения физиологии АН (1967-1975). Ученик И.П. Павлова и Л.А. Орбели. С 1935 г. работал в Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН. В 1960–1975 гг. – директор Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Научные работы посвящены дыхательной функции крови, эволюционной биохимии ферментов крови и центральной нервной системы, а также обмену веществ в центральной нервной системе в процессе онто- и филогенеза при ее различных функциональных состояниях. Разработал метод ранней диагностики сепсиса по активности угольной ангидразы крови и предложил метод бескровного непрерывного наблюдения за насыщением кислорода в артериальной крови (оксигемометрия). Ряд исследований посвящен круговороту химических веществ в океане, а также радиоактивности морских организмов и водной среды. Принимал участие в арктических экспедициях и плаваниях экспедиционных судов. За серию работ по эволюционной нейрохимии и нейрофизиологии удостоен премии им. Л.А. Орбели (1971). Был первым председателем Ленинградского общества биохимиков, главным редактором «Журнала эволюционной биохимии и физиологии».

Соч. и лит.: см. БМЭ и БСЭ. – 3-е изд.; Крепс Е.М. О прожитом и пережитом. М., 1989; Е.М. Крепс (1899–1985) / Сост. И.Г. Бебих. М., 1989.

12 июня – 100 лет со дня рождения Фрица Альберта Липманна (F.A. Lipmann, 1825–1986), американского биохимика (немца по происхождению), члена Национальной академии наук США (1950)

^{*} Авторский коллектив: ведущий научный сотрудник, к.и.н. Егорышева И.В., ведущий научный сотрудник, к.и.н. Шерстнева Е.В. (Отдел истории медицины и здравоохранения ФГБНУ «Национальный НИИ общественного здоровья имени Н.А. Семашко», FSSBI «N.A. Semashko National Research Institute of Public Health»); otdelistorii@rambler.ru.

ХРОНИКА 727

и Лондонского королевского общества (1962). В 1939–1941 гг. выдвинул концепцию о соединениях с высокоэнергетическими связями (например, АТФ), которые являются носителями свободной энергии, используемой в клетке для различных целей, в том числе для реакций биосинтеза. В 1947–1950 гг. с сотрудниками обнаружил, что в ферментативных реакциях, связанных с переносом ацетильных групп, участвует кофермент ацетилирования (КоА): он выделил этот кофермент и частично охарактеризовал его. В 1953 г. был награжден Нобелевской премией за «открытие кофермента А и его значения для промежуточных стадий метаболизма» (вместе с Х.А. Кребсом, Н.А. Krebs).

Соч. и лит:. см. БМЭ и БСЭ. – 3-е изд.; Лауреаты Нобелевской премии: Энциклопедия: А-Л. М.: Прогресс, 1992.

31 августа – 70 лет со дня рождения Николая Евгеньевича Кушлинского (1954 г. род в г. Павлограде, Украина), российского биохимикаонколога, академика РАН (2019). Заведующий лабораторией клинической биохимии Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина МЗ РФ и кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики Московского медико-стоматологического университета им. И.А. Евдокимова, созданной под его началом. Основные научные исследования посвящены роли биологических опухолевых маркеров и молекулярно-генетических факторов в диагностике, мониторинге и выборе эффективных методов лечения злокачественных новообразований. Лауреат Государственной премии РФ (1999).

Соч.: Рецепторы половых стероидных гормонов в опухолях костей. М., 1995 (совм. с др.); Клинические и эндокринологические исследования при мастопатии и раке молочной железы. М., 1998 (совм. с др.); Селен в организме человека (метаболизм, антиоксидантные свойства). М., 2002 (совм. с др.); Молекулярно-генетические маркеры опухолей. М., 2016 (совм. с др.); Биологические маркеры опухолей: фундаментальные и клинические исследования. М., 2017 (совм. с др.).

Лит.: К 60-летию Николая Евгеньевича Кушлинского. Лабораторная служба (2014) **3**, 42-43, https://www.mediasphera.ru/issues/laboratornayasluzhba/2014/1/032305-2198201417

8 октября – 75 лет со дня смерти Леонора Михаэлиса (L. Michaelis, 1875–1949), немецкого биохимика. Впервые описал азурофильную зернистость. Выяснил количественные закономерности ферментативных процессов. Обосновал (совместно с М.L. Menten, 1913) теорию образования и распада фермент-субстратных комплексов. Михаэлис и Ментен рассчитали константу (константа Михаэлиса), которая в числовом выражении равна той концентрации субстрата (моль/л), при которой скорость реакции составляет половину максимальной, т. е. характеризует зависимость скорости ферментативности процесса от концентрации субстрата. Разработал теорию окислительновосстановительных процессов. Впервые указал на участие семихинонов в окислительновосстановительных реакциях органических соединений, развил теорию изоэлектрического состояния амфолитов, предложил методы определения изоэлектрических точек белков и метод прижизненного окрашивания митохондрий красителем якус зеленым.

Соч.: см. БМЭ и БСЭ. – 3-е изд.

15 октября – 50 лет со дня смерти Иштвана Русняка (I. Rusznyák, 1889–1974), венгерского терапевта, патофизиолога, биохимика, академика (1946), президента Венгерской академии наук (1949-1970), иностранного члена АН СССР (1958). Предложил микрометод определения хлоридов и методы определения натрия и мочевины в крови (1921). Разработал нефелометрический метод определения белковых фракций в сыворотке крови (1923). Открыл факт соединения части сахара крови с белками в виде гликопротеидов. Открыл витамин Р-цитрин совместно с А. Сент-Дьёрдьи (A. Szent-Györgyi, 1936). Был председателем Общества венгеро-советской дружбы (1946-1949). В 1968 г. ему была присуждена высшая награда АН СССР - золотая медаль им. М.В. Ломоносова.

Соч. и лит.: см. БМЭ – 3-е изд.

19 октября – 75 лет со дня рождения Темирболата Темболатовича Березова (1924–2014, род. в селе Гимара Грузии), российского биохимика, академика РАМН. В 1962-1996 гг. - заведующий кафедрой биохимии медицинского факультета Российского университета дружбы народов. Исследования посвящены изучению особенностей обмена аминокислот в злокачественных опухолях. Выдвинул гипотезу о существовании обратной зависимости между интенсивностью роста опухоли и активностью ферментов распада аминокислот. Установил, что лейкоциты больных лимфолейкозом не способны синтезировать необходимый для их существования аспарагин. Разработал методы дифференциальной энзимодиагностики ракового поражения и ферментативные экспресс-методы ранней диагностики инфаркта миокарда. Разработал также методы выделения и очистки бактериальных ферментов, их применения для лечения злокачественных опухолей животных.

Соч. и лит.: см. БМЭ. – 3-е изд.

21 октября – 85 лет с дня рождения Вячеслава Валентиновича Ляховича (1939, род. в г. Новосибирске) – российского биохимика, академика РАН. С 1992 г. директор НИИ молекулярной биологии и биофизики Сибирского отделения РАМН, ныне его научный руководитель. Научные исследования посвящены проблемам биологического окисления, ксенобиохимии, молекулярной биологии генов ферментов, биотрансформации ксенобиотиков. Лауреат Государственной премии РФ по науке и технике (1998).

Соч.: Структурные аспекты биохимии моноксигеназ. Новосибирск, 1978; Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков. Новосибирск, 1981. (Совместно с др.); Множественные формы цитохрома Р-450. Новосибирск, 1985.

Лит.: В.В. Ляхович: К 50-летию со дня рождения // Бюл. СО АМН. 1989. № 5. С. 102-103; Ляхович В.В. (к 80-летию со дня рождения) // Сибирский научный медицинский журнал. 2019; № 5. С.158-159; В.В. Ляхович // 60 лет Российской академии медицинских наук. М., 2004. С. 389.

10 ноября – 150 лет со дня рождения Густава Эмбдена (G. Embden, 1874-1933), немецкого биохимика. Внес вклад в химию мышечного сокращения: выделил гексозомонофосфорную и аденозинфосфорную (адениловую) кислоты, установил роль молочной кислоты и фосфора в процессе мышечного сокращения. В 1933 г. предложил новую схему анаэробного ферментативного расщепления углеводов, согласно которой путь к конечным продуктам лежит через трехуглеродные фосфорилированные продукты – фосфотриозы, фосфоглицериновую и пировиноградную кислоты. Предложенная схема имела большое значение в развитии современных представлений о путях распада углеводов при гликолизе и брожении.

Соч. и лит.: см. БМЭ. – 3-е изд.

150 лет со дня рождения Владимира Сергеевича Садикова (1874–1942, род. в Петербурге), российского биохимика, профессора. Работы посвящены главным образом химии белковых веществ. В течение ряда лет совместно с Н.Д. Зелинским занимался изучением процесса гидролиза белков, в ходе которого было высказано предположение о наличии циклопептидов в молекуле белка. Один из создателей дикетопиперазиновой теории строения

белка. С 1921 по 1934 г. работал в биогеохимической лаборатории В.И. Вернадского. Исследовал влияние старения на химические процессы в организме. С 1935 г. по приглашению И.П. Павлова руководил биохимическим отделом Физиологического института. Открыл фермент коллагеназу. Внес вклад в развитие бальнеохимии (химическое изучение серных источников и их влияние на организм), технической биохимии и пищевой промышленности. Во время блокады Ленинграда открыл сольвентный способ производства дрожжей, а также их использования в качестве дрожжевого белка, что позволило спасти от смерти тысячи ленинградцев. Автор практического руководства по исследованию белков и учебника по биологической химии.

Соч.: Химия жизни: В 2 вып. Пг., 1923–1928. Вып. 1-2; Курс биологической химии. Л., 1935. 659 с.; Белковый практикум. Л., 1938.

Лит.: Зубайдов У.З. Некоторые проблемы исследования белка и работы В.С. Садикова // Историко-биол. исследования. М.: Наука, 1980. С. 188-201; [В.С. Садиков] // Кретович В.Л. Очерки по истории биохимии в СССР. М., 1984. С. 20-21.

150 лет со дня рождения и 75 лет со дня смерти Бориса Ивановича Словцова (1874–1924, род. в Омске), российского биохимика, профессора Женского медицинского института в Петербурге (1912–1920; ныне Санкт-Петербургский медицинский университет). С 1919 г. - заведующий биохимическим отделом Института экспериментальной медицины в Петрограде, с 1920 по 1922 г. – директор этого института. Научные труды посвящены различным проблемам биохимии: обмену веществ в организме животных и человека, бальнеологии и климатотерапии, гиповитаминозам, влиянию сычужного фермента на белки пищи. Исследовал медико-биохимические аспекты различных форм недостаточности питания. Ряд работ посвящен биохимии головного мозга, в частности биохимии белков, липоидов и ферментов мозга в норме и при аутолизе. Был ответственным редактором «Русского физиологического журнала им. И.М. Сеченова» и редактором журнала «Врачебное дело».

Соч. и лит.: см. БМЭ. – 3-е изд.; Б.И. Словцов // Очерки истории отечественной гигиенической науки о питании. М., 1975. С. 54-56.