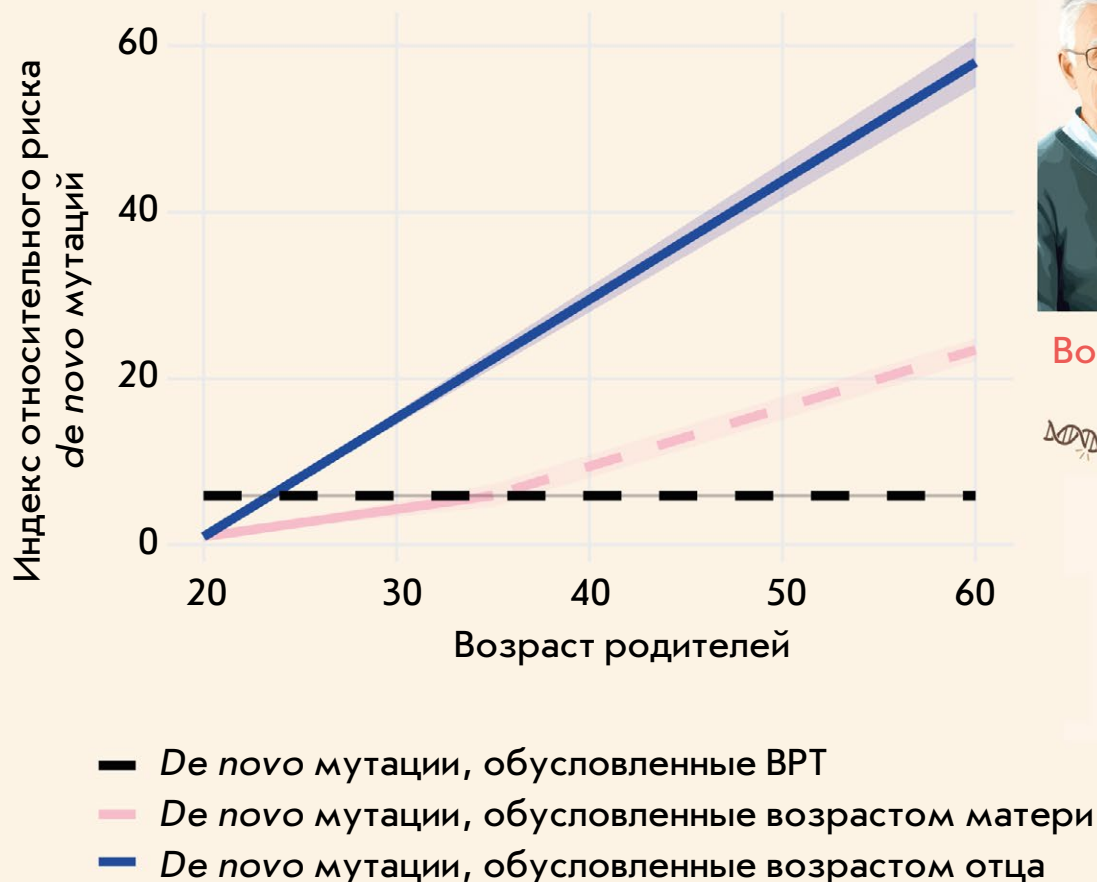


Acta Naturae

Вспомогательные репродуктивные технологии и *de novo* мутации

Относительный риск *de novo* мутаций



Возраст родителей



или

BPT



ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ДЛЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ИММУНОТЕРАПИИ: ТЕКУЩЕЕ СОСТОЯНИЕ И ВЫЗОВЫ

СТР. 15

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ В ДИАГНОСТИКЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

СТР. 28

Цис-регуляторная функция промотора гена *Pou5f1* в МНС-локусе мыши

В. В. Ермакова, Е. В. Александрова, А. А. Кузьмин, А. Н. Томилин

Ген *Pou5f1* кодирует белок Oct4 – один из ключевых транскрипционных факторов, необходимых для поддержания плюрипотентного состояния клеток эпибласта и жизнеспособности половых клеток. На основе эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши создана генетическая модель, позволяющая оценить влияние промотора гена *Pou5f1* на транскрипцию окружающих его генов Major Histocompatibility Complex (МНС)-локуса. Показано, что делеция этого промотора не оказывает существенного влияния на экспрессию ряда генов данного локуса ни в ЭСК, ни в трофобластных производных этих клеток. Важное исключение составил ген *Tcf19*, который активировался при такой делеции и который может быть ассоциирован с патологией атеросклероза через свое провоспалительное действие. При дальнейшем использовании разработанная генетическая модель позволит оценить вклад цис-регуляторной связи *Pou5f1* с *Tcf19* и, возможно, с другими генами в описанный ранее атеросклеротический фенотип мышей, несущих делецию промотора гена *Pou5f1* в гладкомышечных и эндотелиальных клетках кровеносных сосудов.

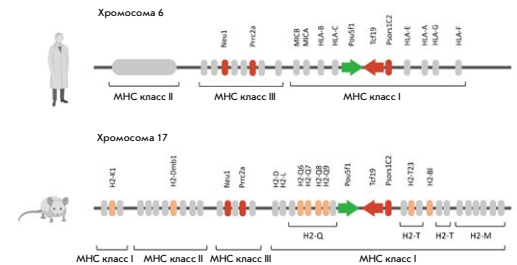
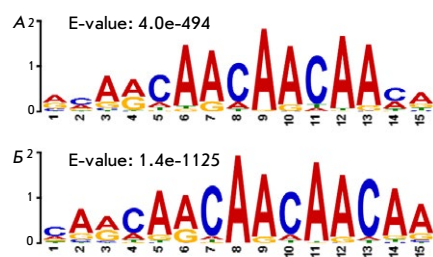


Схема локусов *Pou5f1*-МНС человека и мыши

Белок Aef1 дрозофилы, содержащий домены цинковых пальцев, колокализуется с энхансерами и участвует в регуляции транскрипции многих генов



Потенциальная консенсусная последовательность связывания белка Aef1, идентифицированная на промоторных сайтах (A) и вне промоторов (B)

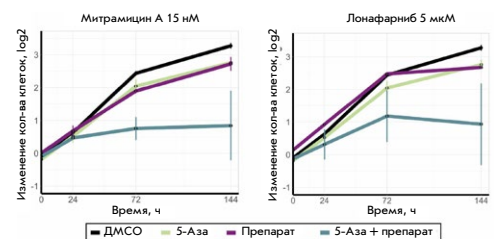
Н. Е. Воробьева, Ю. В. Николенко, А. Н. Краснов

Установлено, что сайты связывания белка Aef1 в клетках S2 дрозофилы, расположенные вне промоторов генов, являются областями с пониженной плотностью нуклеосом и колокализируются с комплексами SAGA, dSWI/SNF и ORC. Сайты связывания Aef1 колокализируются с белком CBP и гистоновой меткой H3K27Ac, что считается меткой активных энхансеров. С целью изучения роли белка Aef1 в регуляции транскрипции проведен RNA-Seq-эксперимент в нормальных клетках S2 дрозофилы и в клетках с РНК-интерференцией Aef1. Показано, что белок Aef1 влияет на транскрипцию 342 генов, причем более половины из них (178) содержат Aef1 на своих промоторах или энхансерах. Таким образом, белок Aef1 может привлекаться как на промоторы, так и на энхансеры и участвовать в регуляции транскрипции соответствующих генов как прямо, так и опосредованно.

Гипометилирующий агент 5-азациитидин усиливает действие ингибиторов RAS и Sp1 в клетках нейробластомы

К. А. Иваненко, А. В. Снежкина, М. А. Золотовская, П. В. Спирин, О. Г. Леонова, В. И. Попенко, А. В. Кудрявцева, А. А. Буздин, В. С. Прасолов, Т. Д. Лебедев

Нейробластома – злокачественная солидная опухоль, возникающая в результате трансформации клеток нервного гребня. Увеличение уровня метилирования ДНК, обнаруженное в клетках нейробластомы, указывает на потенциальную возможность использования гипометилирующих агентов в комбинированной терапии этого заболевания. Анализ изменения транскриптома клеток под действием 5-азациитидина (5-Аза) позволил выявить препараты, оказывающие синергический эффект на гибель клеток нейробластомы, в частности, синергичность комбинации 5-Аза с митрамицином А и лонафарнибом в отношении клеток нейробластомы SH-SY5Y. Дальнейшее исследование эффективности сочетаний препаратов может быть направлено на более детальное изучение механизма совместного действия этих препаратов и тестирования на других моделях нейробластомы.



Эффективность комбинаций 5-Аза с противоопухолевыми препаратами для клеток нейробластомы человека SH-SY5Y

Acta Naturae

ТОМ 17, № 2 (65), АПРЕЛЬ—ИЮНЬ 2025
издается с апреля 2009 года

Учредители:

ООО «Акта Натурэ»,
Национальный исследовательский университет
«Высшая школа экономики»

Редакционный совет:

Главные редакторы: А.Г. Габибов, С.Н. Кочетков

В.В. Власов, П.Г. Георгиев, М.П. Кирпичников,
А.А. Макаров, А.И. Мирошников, В.А. Ткачук,
М.В. Угрюмов

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

К.В. Анохин (Москва, Россия),
И. Безпрозванный (Даллас, Техас, США),
И.П. Биленкина (Москва, Россия),
М. Блэкбёрн (Шеффилд, Великобритания),
Дж. Ву (Шанхай, Китай),
В.М. Говорун (Москва, Россия),
С.М. Деев (Москва, Россия),
О.А. Донцова (Москва, Россия),
К. Драуз (Ганау-Вольфганг, Германия),
М. Зуали (Париж, Франция),
М. Исагулянц (Стокгольм, Швеция),
М. Лукич (Аль Айн, ОАЭ),
П. Массон (Гренобль, Франция),
В.О. Попов (Москва, Россия),
И.А. Тихонович (Москва, Россия),
А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния, США),
А. Фрибуле (Компьень, Франция),
В.К. Швядас (Москва, Россия),
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Н.В. Соболева

Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева

Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин

Верстка: К.К. Опарин

Корректур: Р.С. Шаймарданова

Дизайн-проект: Х. Шнайдер

WEB-редактор: О.Б. Семина

Адрес редакции: 101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 4

Телефон/факс: +7 (495) 727 38 60

E-mail: actanaturae@gmail.com

При перепечатке материалов ссылка на журнал
Acta Naturae обязательна. Любое воспроизведение опубликованных
материалов без письменного согласия редакции не допускается.
Редакция не несет ответственность за достоверность информации,
опубликованной в рекламных материалах.

© ACTA NATURAE, 2025

Номер подписан в печать 29 июня 2025 г.

Тираж 25 экз. Цена свободная.

Отпечатано в типографии: НИУ ВШЭ,
г. Москва, Измайловское шоссе, 44, стр. 2



Основатель и председатель
редакционного совета (с 2009 по 2023 г.)
журнала *Acta Naturae*
академик Григорьев Анатолий Иванович

Журнал *Acta Naturae* входит в Перечень ведущих
периодических изданий Высшей аттестационной
комиссии Минобрнауки России

Включен в базы данных PubMed,
Web of Science, Scopus, РИНЦ

Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 2.0 (WOS); 3.5 (Scopus)

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Н. А. Аракелян, Е. Василевская, Е. И. Рогаев
Вспомогательные репродуктивные технологии
и *de novo* мутации 4

Д. В. Кузнецова, Т. В. Петрова
Получение клеточных продуктов на основе
опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов
для противоопухолевой иммунотерапии:
текущее состояние и вызовы 15

Л. А. Овчинникова, Я. А. Ломакин
Внеклеточные везикулы в диагностике
онкологических заболеваний 28

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

О. К. Анисимова, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева,
М. А. Филюшин

Идентификация генов халконсинтаз чеснока (*Allium sativum* L.) и уровень их экспрессии в ответ на стрессовые факторы 41

К. В. Богданов, Е. С. Кудрявцева, Ю. Н. Лобачева,
О. В. Мерзликина, Ю. В. Миролубова,
Р. А. Власик, Р. Ш. Бадаев, Е. Г. Ломаиа

Возникновение новой инсерционной мутации в онкогене *BCR::ABL/p210* при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе (В-ОЛЛ) коррелирует с развитием резистентности к нескольким ингибиторам тирозинкиназ 52

Н. Е. Воробьева, Ю. В. Николенко, А. Н. Краснов
Белок Aef1 дрозофилы, содержащий домены цинковых пальцев, колокализуется с энхансерами и участвует в регуляции транскрипции многих генов 58

В. В. Ермакова, Е. В. Александрова,
А. А. Кузьмин, А. Н. Томилин

Цис-регуляторная функция промотора гена *Pou5f1* в МНС-локусе мыши 64

Л. Г. Завилейский, Е. А. Чернявская,
М. А. Власенок, Д. Д. Первушин

Классификация и количественная оценка событий непродуктивного сплайсинга 75

К. А. Иваненко, А. В. Снежкина,
М. А. Золотовская, П. В. Спирин, О. Г. Леонова,
В. И. Попенко, А. В. Кудрявцева, А. А. Буздин,
В. С. Прасолов, Т. Д. Лебедев

Гипометилирующий агент 5-азацитидин усиливает действие ингибиторов RAS и Sp1 в клетках нейробластомы 86

И. С. Ильницкий, Г. К. Рябых, Д. А. Маракулина,
А. А. Миронов, Ю. А. Медведева

Интеграция HiMoRNA и RNA-Chrom: подтверждение функциональной роли длинных некодирующих РНК в эпигенетической регуляции генов человека с помощью данных РНК-хроматинового интерактома 98

Д. А. Орлова, А. А. Кудряева,
Н. А. Колотьева, Е. О. Иванова, Е. Ю. Федотова,
П. П. Трегуб, А. Б. Салмина, С. Н. Иллариошкин,
А. А. Белогулов

Индукцированная конверсия мономерного α -синуклеина в реальном времени: новый подход к диагностике нейродегенеративных заболеваний из группы синуклеинопатий со слабо выраженной активностью в тесте RT-QulC 110

Д. А. Ручкин, А. С. Гавриков, Д. В. Колесов,
А. Ю. Гороховатский, Т. В. Чепурных,
А. С. Мишин, Е. Г. Максимов, Н. В. Плетнева,
В. З. Плетнев, А. М. Павлова, В. А. Никитин,
А. М. Богданов

Две ключевые замены в хромоформном окружении белка mKate2 для получения улучшенного FusionRed-подобного красного флуоресцентного белка 118

Правила для авторов 132



РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Аракелян и др.)

УДК 577.24

Вспомогательные репродуктивные технологии и *de novo* мутации

Н. А. Аракелян^{1†}, Е. Василевская^{1†}, Е. И. Погаев^{1,2**}¹Центр генетики и наук о жизни, Научно-технологический университет «Сириус», Краснодарский край, пгт. Сириус, 354340 Россия²Медицинская школа Чан Массачусетского университета, департамент психиатрии, Шрусбери, МА 01545 США

†Равный вклад.

*E-mail: arakelyan.na@talantiuspeh.ru, **e-mail: evivrecc@gmail.com

Поступила в редакцию 11.12.2024

Принята к печати 13.02.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27589

РЕФЕРАТ Недавние достижения в области вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) произвели революцию в репродукции человека, предоставив надежду миллионам пар, сталкивающимся с проблемами бесплодия. Тем не менее с ростом популярности этих методов возникли опасения относительно их потенциального воздействия на целостность генома потомства, зачатого с помощью ВРТ. Особенно важен вопрос о влиянии этих технологий на частоту *de novo* мутаций – генетических изменений, которые возникают спонтанно в зародышевой линии или в раннем эмбриогенезе и могут быть связаны с различными заболеваниями человека. Степень, в которой ВРТ может напрямую влиять на частоту *de novo* мутаций, остается предметом научных споров. В данном обзоре рассмотрены последние исследования, посвященные связи между ВРТ и частотой *de novo* мутаций, подчеркнута необходимость дальнейших исследований для выяснения клинической значимости этих мутаций и их долгосрочных последствий для здоровья потомства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вспомогательные репродуктивные технологии, *de novo* мутации, старение, возраст отца, возраст матери.

ВВЕДЕНИЕ

С момента рождения первого ребенка, зачатого с помощью экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) более 45 лет назад, эта технология превратилась в рутинную процедуру в медицинских центрах вспомогательной репродукции. В последние десятилетия распространенность бесплодия неуклонно возрастает, во многом это связано с тем, что все больше людей решают отложить рождение ребенка на более поздний возраст. Значительное количество таких пар в конечном итоге обращается к методам искусственного оплодотворения. По последним оценкам во всем мире благодаря вспомогательным репродуктивным технологиям (ВРТ) родилось свыше 10 млн младенцев. Кроме того, по приблизительным данным ежегодно проводится около 4 млн циклов ВРТ [1, 2].

К ВРТ относят все методы лечения бесплодия, предполагающие обработку *in vitro* ооцитов, спермы или эмбрионов человека с целью достижения беременности [3]. При этом во время процедур ВРТ гаметы и зиготы подвергаются воздействию ряда культурных сред и нефизиологических условий.

Хотя большинство младенцев, зачатых с помощью ВРТ, рождаются здоровыми, сохраняются опасения относительно безопасности этих технологий и потенциальных долгосрочных эффектов ВРТ на рост, развитие и общее состояние здоровья будущего поколения [4]. Спонтанно возникающие в зародышевой линии или на раннем этапе эмбрионального развития *de novo* мутации могут сказываться на генетических особенностях потомства, зачатого с помощью ВРТ, поэтому всестороннее понимание механизмов, лежащих в основе их возникновения и происхождения, имеет решающее значение для решения вопросов безопасности и эффективности ВРТ. Такие знания способствуют разработке стратегий, направленных на снижение рисков и улучшение процедур ВРТ, с целью минимизации потенциальных неблагоприятных последствий для генетической целостности и здоровья последующих поколений. Исследование взаимосвязи между ВРТ и *de novo* мутациями не только расширяет наше понимание основных молекулярных механизмов, но и подчеркивает важность принятия обоснованных решений относительно репродуктивных вмешательств [5, 6].

Учитывая широкое применение ВРТ и его потенциальное влияние на генетическую целостность, в настоящем обзоре рассмотрены актуальные исследования, посвященные взаимосвязи между ВРТ и *de novo* мутациями. Цель работы – предоставить информацию, необходимую для совершенствования клинической практики и дальнейших исследований в области репродуктивной генетики.

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ РЕПРОДУКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ (ВРТ)

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) – это широкий спектр процедур, направленных на решение проблем бесплодия как у женщин, так и у мужчин. За последние годы использование этих технологий значительно возросло, что связано с увеличением числа пар, сталкивающихся с трудностями зачатия. Этот комплексный подход включает ряд сложных этапов, таких как стимуляция овуляции, подготовка ооцитов и сперматозоидов, манипуляции с гаметатами и эмбрионами, криоконсервация, культивирование *in vitro* и, в конечном итоге, перенос эмбриона. Степень вмешательства может существенно варьировать – от гормональной терапии пациентов до более сложных процедур *in vitro*. Рассматриваемые вмешательства охватывают широкий спектр методик, начиная с тонких манипуляций с гаметатами, таких как оплодотворение *in vitro* (ЭКО), и заканчивая более инвазивными процедурами, включая интрацитоплазматическую инъекцию сперматозоида (ИКСИ) и получение сперматозоидов из яичка в сочетании с ИКСИ (testicular sperm extraction in conjunction with intracytoplasmic sperm injection, TESE-ICSI). Кроме того, эти вмешательства предполагают прямое воздействие на эмбрионы, что может включать такие процедуры, как биопсия трофобластической оболочки (trophoblast biopsy, ТВ) или биопсия бластомеров (blastomere biopsy, ВВ). Эти критически важные этапы совпадают с ключевыми фазами развития, характеризующимися значительной эпигенетической перестройкой генома и повышенной уязвимостью к внешним факторам. Любое нарушение в этот период способно негативно сказаться на программе развития [7, 8]. Одним из основных факторов, повышающих риск, связанный с процедурой ИКСИ, является процесс отбора сперматозоидов. В отличие от классического ЭКО, при котором сперматозоиды самостоятельно проникают сквозь защитные оболочки яйцеклетки, ИКСИ обходит эти естественные механизмы отбора за счет ручного выбора и введения одного сперматозоида прямо в ооцит. Это может непреднамеренно приводить к оплодотворению сперматозоидами с аномалиями ДНК. Кроме того, при ИКСИ нередко

используют сперму, извлеченную непосредственно из яичка или придатка яичка (эпидидимиса), минуя ее естественное созревание, которое обычно происходит при прохождении через мужские половые пути. В результате возрастает вероятность генетических нарушений у потомства. Также инвазивный характер процедуры ИКСИ может повышать риск повреждения ооцита или веретена деления во время инъекции, что способно нарушать процессы репликации и репарации ДНК, потенциально влияя на дальнейшее развитие эмбриона [9, 10]. Несмотря на то что большинство детей, рожденных с помощью ВРТ, здоровы, результаты многих исследований указывают на возможную связь между ВРТ и различными неблагоприятными последствиями [11–16], включая врожденные пороки сердца [17] и онкологические заболевания детского возраста [18]. Также весьма противоречивы данные о повышенных рисках когнитивных нарушений, нарушений развития нервной системы [19], о проблемах с метаболическим здоровьем и негативным влиянием на репродуктивную функцию, связанным с ВРТ [20–22]. Несмотря на существование этих рисков для здоровья, по-прежнему неясно, обусловлены ли они конкретными аспектами ВРТ, такими как метод получения спермы, стимуляция яичников, способ оплодотворения или лабораторные условия, либо они связаны с исходными родительскими факторами и усиливаются из-за обхода естественного отбора. Более того, взаимодействие эпигенетических и генетических факторов в отношении этих последствий для здоровья еще не полностью изучено. В то время как исследования эпигенетических изменений при ВРТ активно расширяются, изучение *de novo* мутаций все еще находится на ранних этапах и продолжают исследования, направленные на всестороннее выяснение их роли у потомства, зачатого с помощью ВРТ [23–26].

МУТАЦИИ DE NOVO

Мутации *de novo* определяются как появление новых генетических изменений, которые возникают в зародышевой линии в пределах одного поколения. Зародышевые *de novo* мутации (germline *de novo* mutations, gDNM) формируются в гаметах одного из родителей и передаются потомству в момент зачатия. В отличие от них постзиготические *de novo* мутации появляются на ранних стадиях эмбрионального развития и могут затрагивать значительную часть клеток организма потомка. Влияние новых генетических мутаций может варьировать от нейтральных или даже полезных изменений, способствующих эволюции, до серьезных нарушений ключевых генетических последовательностей, кото-

рые способны приводить к тяжелым заболеваниям. Мутации *de novo* считаются наиболее опасным типом редких генетических вариаций, поскольку они в меньшей степени подвергаются эволюционному отбору и зачастую оказываются более вредными, чем наследуемые изменения, поскольку они в меньшей степени проходят через эволюционный отбор [5, 27]. Установлена связь мутаций *de novo* с целым рядом заболеваний [28], включая нарушения развития нервной системы [29–31], патологии сердца [32] и раннюю тяжелую миопию [33], а также с редкими спорадическими синдромами пороков развития, такими как синдромы Шинцеля–Гидеона, Кабуки и Боринга–Опица [34]. Более того, недавние исследования также указывают на их ключевую роль в мужском и женском бесплодии [35, 36].

Мутации *de novo* могут возникать на различных этапах развития, в том числе до оплодотворения – в половых клетках, а также в период дробления эмбриона и на стадии бластоцисты. К спектру мутаций *de novo* относятся разнообразные типы мутаций: точечные (однонуклеотидные) варианты (single nucleotide variants, SNV), вставки и делеции (indel) разного размера, а также более крупные вариации числа копий (copy number variations, CNV) и структурные перестройки. Обычно мутации *de novo* выявляют путем анализа образцов ДНК, полученных от трио «отец–мать–ребенок». Предполагается, что в геноме человека в среднем содержится от 44 до 82 *de novo* однонуклеотидных вариантов, из которых 1–2 располагаются в кодирующих областях [37–39]. При этом распределение мутаций *de novo* по геному не является случайным: такие геномные характеристики, как содержание гуанина и цитозина, наличие нуклеосом, повторяющиеся последовательности, частота рекомбинации, уровень транскрипционной активности, время репликации и состояние хроматина, существенно влияют на уязвимость отдельных регионов для мутаций. У одного и того же индивида множество *de novo* мутаций могут располагаться в непосредственной близости, образуя так называемые мутационные кластеры. Напротив, если одинаковые *de novo* мутации возникают у разных людей, они формируют так называемые «горячие точки». Показано, что частота генетических мутаций в зародышевой линии человека по всему геному определяется конкретным классом генетических вариантов [40]. Распространенность зародышевых *de novo* мутаций в человеческой популяции заметно варьирует как внутри одной семьи, так и между разными семьями, причем на эти колебания влияет пол родителей. Считается, что уровень зародышевых *de novo* мутаций может изменяться под воздействием как внутренних,

так и внешних факторов. Одним из важнейших открытий стало обнаружение того, что количество зародышевых *de novo* мутаций возрастает по мере увеличения возраста обоих родителей в момент зачатия, причем у отцов этот эффект особенно выражен. Приблизительно отмечается прирост от 1.35 до 1.5 новых мутаций на каждый дополнительный год возраста отца, тогда как у матерей эта величина намного ниже и составляет около 0.24–0.42 мутаций [41–47]. Примерно 2–3% всех *de novo* мутаций у потомства располагаются на расстоянии менее 20 т.п.н. друг от друга, формируя кластерные *de novo* мутации (clustered *de novo* mutations, cDNM). При этом материнские кластерные *de novo* мутации встречаются чаще, чем отцовские, что связывают с неэффективной репарацией разрывов обеих цепей ДНК по механизму гомологичной рекомбинации в стареющих ооцитах. Подобные нарушения способствуют появлению нерегулируемых горячих точек рекомбинации, в результате чего мутации возникают ближе друг к другу, чем ожидалось бы в норме. Стоит отметить, что 58.4% материнских зародышевых *de novo* мутаций локализуются в определенных районах хромосом 8, 9 и 16, где также регистрируется более высокая частота и одиночных (некластерных) *de novo* мутаций. У мужчин же частота кластерных *de novo* мутаций коррелирует с длиной хромосомы. Эта разница связана с различиями механизмов, лежащих в основе возникновения *de novo* мутаций у представителей разных полов [5, 45].

Основная гипотеза, объясняющая зависимость возникновения мутаций от возраста отца, заключается в том, что мутации накапливаются в результате случайных ошибок при репликации генома в мужской зародышевой линии, обеспечивающей непрерывное формирование сперматозоидов. Сперматогонии, являющиеся стволовыми клетками сперматогенеза, многократно делятся, одновременно самообновляясь и образуя сперматоциты, которые впоследствии превращаются в сперматозоиды. С возрастом мужчины общее число делений в сперматогониях увеличивается, что повышает вероятность появления новых мутаций вследствие ошибок репликации. Соответственно, мутации накапливаются в сперматогониях с течением времени, объясняя так называемый «эффект возраста отца». Хотя модель «эгоистичного сперматогонияльного отбора» позволяет понять происхождение таких доминантных нарушений развития, как ахондроплазия и синдром Аперта, она не охватывает большинство *de novo* мутаций, не дающих очевидного селективного преимущества. В качестве альтернативы недавние исследования выдвинули гипотезу, ставящую под сомнение традиционную точку зрения о том, что репликатив-

ные ошибки являются первоисточником мутаций в мужской зародышевой линии. Согласно этой новой модели, стабильное, но невысокое число спонтанных мутаций, обусловленных репликацией у пожилых отцов, может возрастать за счет нарушений систем репарации ДНК [5, 37, 48, 49].

Механизмы, объясняющие возрастной эффект у матерей, не могут основываться на репликации генома, поскольку образование ооцитов прекращается еще в пренатальном периоде, и дальнейшая репликация ДНК в них не происходит. Следовательно, механизмы, лежащие в основе возрастных *de novo* мутаций у матерей, принципиально отличаются от отцовских. Имеются данные о том, что возраст матери на момент зачатия влияет на частоту мутаций, чему может способствовать накопление повреждений в ооцитах, а также мутации, возникающие на постзиготических этапах развития эмбриона. После оплодотворения у ооцита существует лишь ограниченное время для коррекции повреждений ДНК, внесенных сперматозоидом, прежде чем наступит S-фаза первого митотического деления. Неточная или неполная репарация в этот период способна приводить к мутациям, которые будут определять здоровье потомства – этот механизм получил название «гипотеза о влиянии постмейотического ооцита» (в оригинале на английском «post-meiotic oocyte collusion hypothesis») [50–52]. Подобное объяснение согласуется с данными, согласно которым использование вспомогательных репродуктивных технологий может увеличивать мутационную нагрузку у детей, зачатых с их помощью [52].

Мутации *de novo*, ассоциированные с ВРТ

Существует множество исследований, посвященных изучению естественного зачатия и распространенности *de novo* мутаций [53–55], однако количество исследований, рассматривающих взаимосвязь между оплодотворением с помощью ВРТ и возникновением *de novo* мутаций, весьма ограничено (табл. 1). Хотя многие исследования в целом подтверждают безопасность ВРТ [56–59], недавние данные указывают на возможное увеличение мутационной нагрузки у детей, зачатых с использованием этих методов [6, 20, 35, 60, 61].

В рамках исследования, проведенного Wang и соавт., изучена возможная связь между ВРТ и частотой врожденных пороков сердца (congenital heart defects, CHD) у потомства, с особым вниманием к *de novo* мутациям как возможному фактору риска. Проведено полногеномное секвенирование 1137 человек из 160 семей, у которых оплодотворение произошло спонтанно, и 205 трио семей, воспользо-

зовавшихся услугами ВРТ. Оказалось, что у детей, зачатых с помощью ВРТ, частота зародышевых мутаций *de novo* была существенно выше, чем у детей, зачатых естественным путем, в том числе после коррекции на различные дополнительные факторы, включая возраст родителей, курение, употребление алкоголя и уровень физической активности. В частности, потомство, зачатое с применением ВРТ, продемонстрировало увеличение частоты зародышевых мутаций *de novo* в 4.59 раза, из которых 3.32 мутации имели отцовское происхождение, а 1.26 – материнское [6]. Данный результат согласуется с исследованием Wong и соавт., в котором сообщается, что в геноме ребенка, зачатого при использовании ВРТ, наблюдается в среднем 4.25 дополнительных *de novo* мутаций по сравнению с естественным зачатием [56]. Примечательно, что отцовские мутации *de novo* у потомства, зачатого с помощью ВРТ, характеризовались специфическими заменами C>T в CpG-сайтах, ассоциированными с повышенным риском ишемической болезни сердца. Кроме того, установлено, что большинство этих мутаций (87.9%) передается от отца. Стоит отметить, что использование рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона, а также инъекция высокой дозы хорионического гонадотропина человека связаны с увеличением числа материнских *de novo* мутаций [6]. В другом исследовании, результаты которого противоречат перечисленным, не выявлено существенных различий при прямом сравнении вариантов митохондриальной ДНК (мтДНК, mtDNA) в ооцитах, полученных естественным путем, и в ооцитах, извлеченных после циклов стимуляции яичников. Тем не менее в этом же исследовании обнаружена взаимосвязь между присутствием несинонимичных гетероплазматических вариантов мтДНК в белоккодирующих участках и локусах rРНК и снижением массы тела при рождении. Эти варианты чаще встречались у детей, рожденных от более возрастных матерей, прошедших курсы лечения с применением ВРТ. Предполагается, что эти варианты могут приводить к легким, но существенным митохондриальным дисфункциям, способствующим снижению массы тела при рождении. Этот факт служит предварительным свидетельством того, что митохондриальные генетические факторы могут объяснять различия между детьми, зачатыми с помощью ВРТ и естественным способом [61].

Как отмечалось ранее, процедура ИКСИ вызывает больше опасений по сравнению с другими методами ВРТ из-за ее инвазивного характера и потенциальных рисков, связанных с отбором и манипуляциями со сперматозоидами. Однако данные по этому вопросу противоречивы [23, 63, 64].

Таблица 1. Исследования, посвященные ВРТ и мутациям *de novo*

Исследуемая группа (n)*	Контрольная группа (n)	Основные результаты исследования	Исследование
12 ИКСИ	30 СБ	У 6 из 12 детей, зачатых с помощью ИКСИ, выявлено 10 <i>de novo</i> «изменений числа копий генома в одном направлении». Они характеризовались одновременным увеличением или уменьшением числа копий относительно обоих родителей, причем чаще встречались именно потери копий.	[20]
25 трио ВРТб	693 трио СБ	Применение ВРТ продемонстрировало статистически значимое ($P=3.86 \times 10^{-3}$) увеличение количества <i>de novo</i> мутаций в среднем на 4.25 мутации по сравнению с естественным зачатием с учетом прочих факторов.	[56]
49 квартетов ² ЭКО	62 квартета ² СБ	Частота возникновения <i>de novo</i> хромосомных aberrаций или крупных структурных ДНК-нарушений оказалась сопоставимой при ЭКО и при естественном зачатии.	[57]
2505 ИКСИ: 1114 пренатальных тестов плода, 1391 постнатальный тест плода	-	Частота <i>de novo</i> хромосомных аномалий (как на пренатальной, так и на постнатальной стадии) у детей, зачатых с помощью ИКСИ, оказалась выше, чем в общей популяции. Рост этого показателя ассоциирован с параметрами спермы.	[60]
116 трио, 86 квартетов (близнецы) ВРТб	205 трио СБ	У детей, зачатых с помощью ВРТ, в среднем выявлено на 4.59 больше зародышевых <i>de novo</i> мутаций по сравнению с детьми, зачатыми естественным путем. При этом 3.32 мутации приходились на отцовский геном и 1.26 — на материнский, в том числе после учета факторов, таких как возраст родителей на момент зачатия, курение, употребление алкоголя и особенности физической активности.	[6]
49 трио и 2 квартета ВРТб (17 ЭКО, 18 ИКСИ+ИКСИ-TESE)	18 трио ВРТб	Не выявлено статистически значимых различий в количестве <i>de novo</i> мутаций у ребенка при разных методах зачатия, независимо от возраста родителей на момент зачатия.	[58]
1496 ВРТб (ЭКО/ИКСИ)	1396 СБ	В группе ЭКО/ИКСИ наблюдалось незначительное повышение общей частоты <i>de novo</i> хромосомных аномалий по сравнению с группой, где зачатие произошло естественным путем. Однако данная разница не достигла уровня статистической значимости.	[62]
535 ВРТб с подозрением на генетические заболевания	1316 СБ с подозрением на генетические заболевания	Доля мутаций <i>de novo</i> у детей из группы ВРТ оказалась сопоставимой с аналогичной долей у детей, зачатых без применения ВРТ.	[59]
270 ВРТб, 67 ВРТб пар «мать–ребенок», 113 ооцитов, полученных в естественных менструальных циклах	181 СБ, 90 СБ пар «мать–ребенок», 113 ооцитов, полученных после стимуляции яичников	У детей, зачатых с помощью ВРТ, чаще встречаются <i>de novo</i> несинонимичные варианты мтДНК по сравнению с детьми, зачатыми естественным путем.	[61]

Трио – мать, отец и ребенок.

Квартет¹ – мать, отец и двое братьев/сестер.

Квартет² – отец, мать, плацента и пуповинная кровь новорожденного.

ВРТб – беременности благодаря вспомогательным репродуктивным технологиям (ЭКО + ИКСИ).

СБ – спонтанные беременности.

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение.

ИКСИ – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида.

ИКСИ-TESE – экстракция сперматозоидов из яичка с последующей ИКСИ (testicular sperm extraction in conjunction, TESE).

*Участники не имели диагностированных генетических заболеваний, если не указано иное.

Влияние ИКСИ на мутации *de novo* исследовали несколько научных групп, и в одном из них, проведенном Woldringh и соавт., выявлено относительное увеличение «однонаправленных изменений числа копий» (same direction copy number changes) в условиях ИКСИ в 5 раз по сравнению с контрольной группой.

Однако из-за ограниченного размера выборки необходимы дальнейшие исследования на большей выборке, чтобы подтвердить эти результаты [20]. При рождении детей посредством ИКСИ также зафиксирован значительно более высокий уровень *de novo* хромосомных аномалий, включая

анеуплоидии по половым хромосомам и структурные хромосомные перестройки, особенно реципрокные транслокации [65]. Частота *de novo* аномалий кариотипа у плодов составила 3.2%, в основном это были новые аутомсомные аномалии, а не аномалии половых хромосом. Кроме того, установлено, что частота *de novo* хромосомных нарушений среди детей, зачатых с помощью ИКСИ, составляет 1.9%, что значительно превышает аналогичные показатели в общей популяции. Эти нарушения выявлялись как до, так и после рождения и зависели от концентрации сперматозоидов у отцов. В частности, установлено, что более высокий уровень *de novo* хромосомных аномалий наблюдается у плодов и детей от пар, где у мужчин показатели концентрации спермы и общее количество сперматозоидов были ниже референсных значений. Важно отметить, что частота *de novo* аномальных результатов при пренатальных тестах не показала статистически значимых различий при сравнении использования эякулята и спермы, полученной путем пункции (не-эякулированной), а также при сравнении свежей и размороженной спермы. Однако отсутствие контрольной группы в исследовании могло повлиять на более высокую выявляемость аномалий кариотипа. Помимо этого, широко известно, что при наступлении беременности, полученной с помощью ВРТ, проводится более тщательная пренатальная диагностика по сравнению с беременностями, возникшими естественным путем. Следовательно, чтобы проверить, действительно ли более высокий уровень аномалий кариотипа после ИКСИ связан с повышенным уровнем наблюдения, авторы указывают на то, что оптимальная контрольная группа должна состоять из спонтанно зачатых беременностей, в которых применялись те же протоколы скрининга, что позволит провести более точный сравнительный анализ [60].

С другой стороны, ряд исследований не подтвердил наличие связи между количеством *de novo* мутаций и применением ВРТ. Huang и соавт. изучали молекулярные дефекты у новорожденных, зачатых с помощью ВРТ и поступивших в отделение интенсивной терапии с подозрением на генетические патологии. Полученные данные сравнивали с генетическими профилями новорожденных, зачатых без использования ВРТ. Согласно результатам анализа, не выявлено статистически значимых различий в генетических характеристиках двух групп, в том числе на уровне диагностированных аномалий и доле *de novo* вариантов (*de novo variants*, DNV), а также в процентном соотношении однонуклеотидных вариантов (SNV) и вариаций числа копий (CNV). При этом, как отмечают авторы, исследо-

вание имело ряд ограничений: включало только живорожденных детей, исключая мертворожденных плодов и прерванные беременности. Это может ограничивать оценку возможных летальных для плода однонуклеотидных замен или вариаций числа копий. Кроме того, в работе не были учтены такие известные факторы риска, как пожилой возраст отцов, нездоровый образ жизни родителей и наличие бесплодия [59]. Тем не менее указанные результаты согласуются с данными, полученными Smits и соавт., которые также не обнаружили существенных различий в количестве *de novo* вариантов между 53 детьми и их родителями [58]. Однако Smits и соавт. не рассматривали влияние ВРТ на распространенность соматических *de novo* мутаций у потомства, а также не изучали вариации числа копий. Esteki и соавт. проанализировали распространенность и масштаб крупных *de novo* вариаций числа копий размером более 100 т.п.н. у новорожденных, зачатых с помощью ЭКО, по сравнению с зачатиями естественным путем. Авторы исследовали геномный профиль плода и плаценты после родов, чтобы оценить частоту и сохранность крупных геномных аномалий, которые могут быть связаны с хромосомной нестабильностью (*chromosomal instability*, CIN), возникающей при использовании ЭКО. Показано, что примерно в 10.8% случаев беременности наблюдались спорадические геномные aberrации *de novo*, распределенные по всему геному, что указывает на то, что эти события являются случайными и редкими проявлениями эмбриональной хромосомной нестабильности без заметных функциональных последствий для биологии плаценты или здоровья плода [57]. Важно также подчеркнуть, что ВРТ нередко применяются для снижения риска патогенных *de novo* мутаций, которые могут встречаться чаще из-за повышенного мозаицизма у родителей. Это состояние повышает вероятность повторного появления мутации, увеличивая риск того, что у следующего ребенка будет такая же *de novo* мутация, как и у предыдущего [66].

Несмотря на то что основной акцент в приведенном обзоре сделан на процедурах ВРТ у человека, следует отметить неоднозначность результатов, полученных в исследованиях на животных моделях. Например, в экспериментах с трансгенными мышами не выявлено существенных различий ни в частоте, ни в спектре *de novo* мутаций между плодами, зачатыми естественным путем, и теми, что были получены с использованием различных методов ВРТ [67]. Тем не менее следует учитывать дополнительные данные, в частности, о крупном рогатом скоте, у которого родословные отслеживаются на протяжении многих поколений, а случаи многочисленно-

го одно- и разноотцовского потомства встречаются довольно часто. Такое всеобъемлющее ведение записей предоставляет уникальные возможности для создания больших родословных, которые особенно хорошо подходят для идентификации *de novo* мутаций. Более того, в разведении крупного рогатого скота широко используют ВРТ, в том числе искусственное осеменение (применение замороженной спермы), ЭКО и ИКСИ, что предоставляет уникальную возможность оценить влияние методов ВРТ на появление *de novo* мутаций. В исследованиях на крупном рогатом скоте, представляющем особый интерес для анализа данной проблемы, прослеживается заметная связь между возникновением *de novo* мутаций и применением ВРТ. В частности, показано, что ЭКО увеличивает частоту возникновения *de novo* структурных вариантов (*de novo structural variation*, dnSV) примерно в 5 раз. Эти мутации появляются на самых ранних стадиях развития эмбриона, а именно, на стадии одной или двух клеток [68]. При этом вклад ВРТ в формирование *de novo* мутаций, по имеющимся данным, оказывается менее существенным, чем влияние возраста родителей и других факторов внешней среды (обобщение представлено на рис. 1). Таким образом, несмотря на существующие ограничения в исследованиях данной области, наблюдения на крупном рогатом скоте указывают на необходимость дальнейших, более масштабных исследований для детального выяснения роли ВРТ в формировании *de novo* мутаций.

ВОЗРАСТ КАК ОГРАНИЧИВАЮЩИЙ ФАКТОР ВРТ

Одним из наиболее спорных вопросов является возможность ограничения доступа к ВРТ на основе возраста родителей. Например, в публикации Bewley и соавт. подчеркнута важность предоставления женщинам всеобъемлющей информации о репродуктивности и фертильности, а также об ограничениях ВРТ как средства достижения беременности в пожилом возрасте. Несмотря на то, что их рассуждения сосредоточены в первую очередь на влиянии биологических факторов на фертильность и перспективах здоровой беременности, в конечном итоге они передают идею о том, что существует определенный хронологический период времени, в течение которого деторождение наиболее целесообразно. Действительно, в их подзаголовке утверждается, что наиболее безопасным возрастом для деторождения остается 20–35 лет, в отличие от потенциальных рисков, связанных с ВРТ, для женщин, превышающих этот возрастной диапазон [69].

Возрастные ограничения для применения ВРТ различаются в разных странах. Например, в США

Факторы окружающей среды



ВРТ

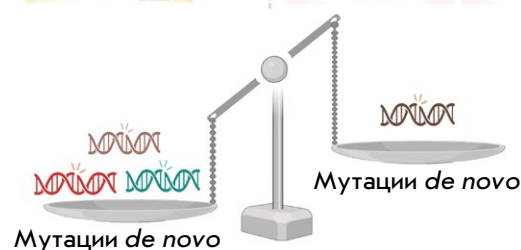


Рис. 1. Факторы, способствующие возникновению мутаций *de novo*. Проиллюстрированы две категории факторов, которые влияют на накопление *de novo* мутаций: факторы окружающей среды (левая панель) и вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) (правая панель)

нет строгих законов, ограничивающих возраст, но существуют рекомендации от Этического комитета Американского общества репродуктивной медицины. Этот комитет настоятельно советует не предоставлять донорские ооциты или эмбрионы женщинам старше 55 лет даже при отсутствии каких-либо сопутствующих заболеваний. Авторы обосновывают установление возрастного предела в 55 лет, ссылаясь на ограниченные данные о безопасности для матери и плода, а также на опасения, связанные с долголетием и необходимостью достаточной психосоциальной поддержки для воспитания ребенка до взрослого возраста.

Законодательство, регулирующее ВРТ по всей Европе, свидетельствует, что в большинстве стран установлен хронологический возрастной предел для потенциальных матерей, обычно в диапазоне от 45 до 50 лет. Например, в Чешской Республике женщины, желающие получить доступ к ВРТ,



Рис. 2. Влияние родительского возраста и ВРТ на относительный риск возникновения *de novo* мутаций. По оси абсцисс — возраст родителей, по оси ординат — индекс относительного риска для *de novo* мутаций, нормализованный по минимальному уровню риска, наблюдаемому в возрасте 20 лет. Увеличение индекса указывает на повышенную вероятность мутаций *de novo*. Затененные области вокруг линий иллюстрируют диапазон потенциальных рисков, зависящих от изменчивости коэффициентов, применяемых в расчетах. Пунктирный сегмент линии материнских *de novo* мутаций для женщин старше 35 лет указывает на заметное повышение риска, однако это увеличение остается неподтвержденным [56, 68].

Расчет индекса включает следующие формулы:

$\Delta_{\text{отцовский}}$: Вклад возраста отца в риск возникновения *de novo* мутаций:

$$\Delta_{\text{отцовский}} = (\text{Возраст} - 20) \times k_{\text{отцовский}}, \text{ где } k_{\text{отцовский}} = 1.35 - 1.5 [41 - 47].$$

$\Delta_{\text{материнский}}$: Вклад возраста матери в риск возникновения *de novo* мутаций:

Для возраста до 35 лет:

$$\Delta_{\text{материнский}} = (\text{Возраст} - 20) \times k_{\text{низкий_материнский}}, \text{ где } k_{\text{низкий_материнский}} = 0.24 - 0.42 [41 - 47].$$

Для возраста старше 35 лет:

$$\Delta_{\text{материнский}} = \Delta_{\text{материнский}}(35) + (\text{Возраст} - 35) \times k_{\text{высокий_материнский}}, \text{ где } \Delta_{\text{материнский}}(35) - \text{это значение риска в возрасте 35 лет, рассчитанное с использованием первой формулы, а } k_{\text{высокий_материнский}} = 0.61 [42].$$

Риск, связанный с ВРТ, рассчитывали как фиксированный дополнительный вклад, который добавляется к общему родительскому риску независимо от возраста и составляет приблизительно 4.25 [56].

должны быть моложе 49 лет [70]. В Бельгии будущие матери должны быть моложе 45 лет, чтобы запросить доступ к ВРТ, а имплантация эмбриона или инсеминация не разрешены после достижения ими возраста 48 лет [71]. Отчет Шведского национального совета по медицинской этике указывает на то, что в Швеции нет законодательно установленных верхних возрастных пределов для ЭКО. Однако отмечается, что советы графств обычно устанавливают верхние возрастные ограничения в диапазоне от 37 до 41 года. В отчете утверждается, что по крайней мере один из родителей должен быть достаточно молодым, чтобы взять на себя

ответственность за ребенка до достижения им совершеннолетия [72]. Это утверждение согласуется с позицией Швейцарии, которая предусматривает, что оба будущих родителя должны быть в возрасте, который позволяет им адекватно заботиться о своем ребенке до достижения ребенком совершеннолетия [71]. Эстония, Греция и Нидерланды устанавливают предельный возраст матери на уровне 50 лет [70]. Примечательно, что социальное исследование, изучающее общественное восприятие материнского возраста, показало, что 43% участников считают, что женщины должны прекратить деторождение до достижения 50 лет [73].

Примечательно также, что, несмотря на повышенные риски проблем со здоровьем у потомства, тесно связанные с пожилым возрастом родителей, отцы, как правило, сталкиваются с меньшим количеством ограничений в отношении применения ВРТ. В Швеции потенциальным отцам не разрешается быть старше 56 лет, в то время как в Финляндии и Португалии возрастной предел установлен на уровне 60 лет [71]. Недавнее социальное исследование, проведенное в Соединенных Штатах, показало, что предпочтительный верхний возрастной предел для мужчин – 64 года [74].

На основе анализа научных исследований и законодательных подходов в разных странах можно сделать вывод, что родительский возраст является существенным фактором, влияющим на доступ к ВРТ, особенно женщин. Многочисленные исследования и правительственные постановления подчеркивают риски, связанные с пожилым возрастом матери, которые могут привести к потенциальным осложнениям как для матери, так и для ребенка. Несмотря на растущие ограничения, крайне важно информировать потенциальных родителей о том, что успешное зачатие в пожилом возрасте все еще может иметь потенциальные последствия для здоровья ребенка, такие как повышенная вероятность *de novo* мутаций. Следовательно, фокус должен выходить за рамки простого регулирования доступа к ВРТ; он также должен охватывать предоставление всеобъемлющей информации о потенциальных рисках и их последствиях для семьи.

ВЫВОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Влияние ВРТ на *de novo* мутации у людей по-прежнему остается спорным вопросом, тем не менее, старение, особенно отцовское, оказывает наибольшее влияние на количество *de novo* мутаций, наряду с репродуктивными нарушениями, связанными также с факторами окружающей среды

(рис. 2). Однако ограничения, связанные с малым размером выборки, и преимущественное применение ВРТ у пар, испытывающих проблемы с фертильностью, могут скрыть его прямое влияние на *de novo* мутации. Более того, многие исследования не учитывают мертворождения и прерывания беременности, что усложняет оценку летальных *de novo* мутаций. Ценную информацию для устранения этих ограничений могут предоставить исследования на модельных организмах, таких как крупный рогатый скот, а также исследования мутаций у детей, зачатых с помощью ВРТ, с использованием различных питательных сред и протоколов. В данном обзоре основное внимание уделяется связи между *de novo* мутациями и ВРТ, однако потенциальные последствия ВРТ в виде эпигенетических изменений также имеют место и требуют более детального изучения. Таким образом, мы стремимся получить представление о последствиях для будущих поколений и подчеркнуть постоянную необходимость изучения долгосрочных последствий ВРТ. ●

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Результаты получены при финансовой поддержке исследования, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (Соглашение № 18-03 от 10.09.2024, Е. Василевская).

Рисунки были сделаны с использованием BioRender.com. Кроме того, некоторые элементы рисунков созданы с поддержкой инструментов искусственного интеллекта, включая DALL-E и MidJourney. Мы признаем вклад этих платформ в визуальное представление данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ESHRE, 2023. ART fact sheet, data 2019 [Press release]. <https://www.eshre.eu/Press-Room/Resources>.
2. Wyns C., De Geyter C., Calhaz-Jorge C., Kupka M.S., Motrenko T., Smeenk J., Bergh C., Tandler-Schneider A., Rugesu I.A., et al. // Hum. Reprod. Open. 2022. V. 2022. № 3. P. hoac022. doi: 10.1093/hropen/hoac022.
3. Zegers-Hochschild F., Adamson G.D., Dyer S., Racowsky C., de Mouzon J., Sokol R., Rienzi L., Sunde A., Schmidt L., Cooke I.D., et al. // Fertil Steril. 2017. V. 108. № 3. P. 393–406. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.06.005.
4. Ahmadi H., Aghebati-Maleki L., Rashidiani S., Csabai T., Nnaemeka O.B., Szekeres-Bartho J. // Internat. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. № 17. P. 13564. doi: 10.3390/ijms241713564.
5. Goldmann J.M., Veltman J.A., Gilissen C. // Trends Genet. 2019. V. 35. № 11. P. 828–839. doi: 10.1016/j.tig.2019.08.005.
6. Wang C., Lv H., Ling X., Li H., Diao F., Dai J., Du J., Chen T., Xi Q., Zhao Y., et al. // Cell Res. 2021. V. 31. № 8. P. 919–928. doi: 10.1038/s41422-021-00521-w.
7. Heber M.F., Ptak G.E. // Biol. Reprod. 2021. V. 104. № 4. P. 734–744. doi: 10.1093/biolre/iaaa224.
8. Jain M., Singh M. // StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publ. 2023. Bookshelf ID: NBK576409.
9. Chamayou S., Giaccone F., Cannarella R., Guglielmino A. // J. Clin. Med. 2023. V. 12. № 2. P. 671. doi: 10.3390/jcm12020671.
10. Berntsen S., Laivuori H., la Cour Freiesleben N., Loft A., Söderström-Anttila V., Oldereid N., et al. // Hum. Reprod. Update. 2021. V. 27. P. 801–847. doi: 10.1093/humupd/dmab005.

11. Zhu J.L., Basso O., Obel C., Bille C., Olsen J. // *BMJ*. 2006. V. 333. № 7570. P. 679. doi: 10.1136/bmj.38919.495718.AE.
12. Hansen M., Kurinczuk J.J., Bower C., Webb S. // *N. Engl. J. Med.* 2002. V. 346. № 10. P. 725–730. doi: 10.1056/NEJMoa010035.
13. Rumbold A.R., Moore V.M., Whitrow M.J., Oswald T.K., Moran L.J., Fernandez R.C., Barnhart K.T., Davies M.J. // *Hum. Reprod.* 2017. V. 32. № 7. P. 1489–1507. doi: 10.1093/humrep/dex085.
14. Wijs L.A., Fusco M.R., Doherty D.A., Keelan J.A., Hart R.J. // *Hum. Reprod Update.* 2021. V. 28. № 1. P. 132–148. doi: 10.1093/humupd/dmab031.
15. Zhang Z., Liu X., Wei C., Luo J., Shi Y., Lin T., He D., Wei G. // *J. Ped. Urol.* 2021. V. 17. № 1. P. 9–20. doi: 10.1016/j.jpuro.2020.11.005.
16. Hart R.J., Wijs L.A. // *Front. Reprod. Hlth.* 2022. V. 4. P. 1045762. doi: 10.3389/frph.2022.1045762.
17. Giorgione V., Parazzini F., Fesslova V., Cipriani S., Candiani M., Inversetti A., Sigismondi C., Tiberio F., Cavoretto P. // *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018. V. 51. № 1. P. 33–42. doi: 10.1002/uog.18932.
18. La Rovere M., Franzago M., Stuppia L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 17. P. 4169. doi: 10.3390/ijms20174169.
19. Briana D.D., Malamitsi-Puchner A. // *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2019. V. 32. № 13. P. 2256–2261. doi: 10.1080/14767058.2018.1425834.
20. Woldringh G.H., Janssen I.M., Hehir-Kwa J.Y., van den Elzen C., Kremer J.A.M., de Boer P., Schoenmakers E.F.P.M. // *Hum. Reprod.* 2009. V. 24. № 1. P. 233–240. doi: 10.1093/humrep/den323.
21. Heber M.F., Ptak G.E. // *Biol. Reprod.* 2021. V. 104. № 4. P. 734–744. doi: 10.1093/biolre/iaaa224.
22. Catford S.R., Halliday J., Lewis S., O'Bryan M.K., Handelsman D.J., Hart R.J., McBain J., Rombauts L., Amor D.J., Saffery R., et al. // *Fertility Sterility.* 2022. V. 117. № 4. P. 727–737. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.12.026.
23. Cannarella R., Crafa A., Mongioi L.M., Leggio L., Iraci N., La Vignera S., Condorelli R.A., Calogero A.E. // *J. Clin. Med.* 2022. V. 11. № 17. P. 5056. doi: 10.3390/jcm11175056.
24. Koeck R.M., Busato F., Tost J., Consten D., van Echten-Arends J., Mastenbroek S., Wurth Y., Remy S., Langie S., Nawrot T.S., et al. // *NPJ Genom. Med.* 2022. V. 7. № 1. P. 1–11. doi: 10.1038/s41525-022-00310-3.
25. Novakovic B., Lewis S., Halliday J., Kennedy J., Burgner D.P., Czajko A., Kim B., Sexton-Oates A., Juonala M., Hammarberg K., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 3922. doi: 10.1038/s41467-019-11929-9.
26. Sciorio R., Manna C., Fauque P., Rinaudo P. // *J. Clin. Med.* 2023. V. 12. № 13. P. 4444. doi: 10.3390/jcm11082135.
27. Lopes-Marques M., Mort M., Carneiro J., Azevedo A., Amaro A.P., Cooper D.N., Azevedo L. // *Hum. Genom.* 2024. V. 18. № 1. P. 20. doi: 10.1186/s40246-024-00587-8.
28. Mohiuddin M., Kooy R.F., Pearson C.E. // *Front Genet.* 2022. V. 13. P. 983668. doi: 10.3389/fgene.2022.983668.
29. Awadalla P., Gauthier J., Myers R.A., Casals F., Hamdan F.F., Griffing A.R., Côté M., Henrion E., Spiegelman D., Tarabeux J., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2010. V. 87. № 3. P. 316–324. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.07.019.
30. Satterstrom F.K., Kosmicki J.A., Wang J., Breen M.S., De Rubeis S., An J.-Y., Peng M., Collins R., Grove J., Klei L., et al. // *Cell.* 2020. V. 180. № 3. P. 568–584. doi: 10.1016/j.cell.2019.12.036.
31. An J.-Y., Lin K., Zhu L., Werling D.M., Dong S., Brand H., Wang H.Z., Zhao X., Schwartz G.B., Collins R.L., et al. // *Science.* 2018. V. 362. № 6420. P. 6576. doi: 10.1126/science.aat6576.
32. Jin S.C., Homsy J., Zaidi S., Lu Q., Morton S., DePalma S.R., Zeng X., Qi H., Chang W., Sierant M.C., et al. // *Nat. Genet.* 2017. V. 49. № 11. P. 1593–1601. doi: 10.1038/ng.3970.
33. Jin Z.-B., Wu J., Huang X.-F., Feng C.-Y., Cai X.-B., Mao J.-Y., Xiang L., Wu K.-C., Xiao X., Kloss B.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 16. P. 4219–4224. doi: 10.1073/pnas.1615970114.
34. Veltman J.A., Brunner H.G. // *Nat. Rev. Genet.* 2012. V. 13. № 8. P. 565–575. doi: 10.1038/nrg3241.
35. Li Q., Zhao L., Zeng Y., Kuang Y., Guan Y., Chen B., Xu S., Tang B., Wu L., Mao X., et al. // *Genome Biol.* 2023. V. 24. № 1. P. 68. doi: 10.1186/s13059-023-02894-0.
36. Oud M.S., Smits R.M., Smith H.E., Mastroiusta F.K., Holt G.S., Houston B.J., de Vries P.F., Alobaidi B.K.S., Batty L.E., Ismail H., et al. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 154. doi: 10.1038/s41467-021-27132-8.
37. Acuna-Hidalgo R., Veltman J.A., Hoischen A. // *Genome Biol.* 2016. V. 17. № 1. P. 241. doi: 10.1186/s13059-016-1110-1.
38. Zhao G., Li K., Li B., Wang Z., Fang Z., Wang X., Zhang Y., Luo T., Zhou Q., Wang L., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2020. V. 48. № D1. P. D913–D926. doi: https://academic.oup.com/nar/article/48/D1/D913/5603227.
39. Turner T.N., Yi Q., Krumm N., Huddleston J., Hoekzema K.F., Stessman H.A., Doebley A.-L., Bernier R.A., Nickerson D.A., Eichler E.E. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № D1. P. D804–D811. doi: 10.1093/nar/gkw865.
40. Campbell C.D., Eichler E.E. // *Trends Genet.* 2013. V. 29. № 10. P. 575–584. doi: 10.1016/j.tig.2013.04.005.
41. Sasani T.A., Pedersen B.S., Gao Z., Baird L., Przeworski M., Jorde L.B., Quinlan A.R. // *eLife.* 2019. V. 8. P. e46922. doi: 10.7554/eLife.46922.
42. Wong W.S.W., Solomon B.D., Bodian D.L., Kothiyal P., Eley G., Huddleston K.C., Baker R., Thach D.C., Iyer R.K., Vockley J.G., et al. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 10486. doi: 10.1038/ncomms10486.
43. Kong A., Frigge M.L., Masson G., Besenbacher S., Sulem P., Magnusson G., Gudjonsson S.A., Sigurdsson A., Jonasdottir A., Jonasdottir A., et al. // *Nature.* 2012. V. 488. № 7412. P. 471. doi: 10.1038/nature11396.
44. Wood K.A., Goriely A. // *Fertility Sterility.* 2022. V. 118. № 6. P. 1001. doi: 10.1016/j.fertnstert.2022.10.017.
45. Goldmann J.M., Veltman J.A., Gilissen C. // *Trends Genet.* 2019. V. 35. № 11. P. 828–839. doi: 10.1038/ng.3597.
46. Jónsson H., Sulem P., Kehr B., Kristmundsdottir S., Zink F., Hjartarson E., Hardarson M.T., Hjorleifsson K.E., Eggerthsson H.P., Gudjonsson S.A., et al. // *Nature.* 2017. V. 549. № 7673. P. 519–522. doi: 10.1038/nature24018.
47. Kessler M.D., Loesch D.P., Perry J.A., Heard-Costa N.L., Taliun D., Cade B.E., Wang H., Daya M., Ziniti J., Datta S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. № 5. P. 2560–2569. doi: 10.1073/pnas.1902766117.
48. Xia B., Yan Y., Baron M., Wagner F., Barkley D., Chiodin M., Kim S.Y., Keefe D.L., Alukal J.P., Boeke J.D., et al. // *Cell.* 2020. V. 180. № 2. P. 248–262.e21. doi: 10.1016/j.cell.2019.12.015.
49. Choufani S., Turinsky A.L., Melamed N., Greenblatt E., Brudno M., Bérard A., Fraser W.D., Weksberg R., Trasler J., Monnier P., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2019. V. 28. № 3. P. 372–385. doi: 10.1093/hmg/ddy321.
50. Aitken R.J. // *Hum. Reprod.* 2023. V. 38. № 10. P. 1861–1871. doi: 10.1093/humrep/dead157.
51. Gao Z., Moorjani P., Sasani T.A., Pedersen B.S., Quinlan A.R., Jorde L.B., Amster G., Przeworski M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. № 19. P. 9491–9500. doi: 10.1073/pnas.1901259116.

52. Aitken R.J. // *Reprod. BioMed. Online*. 2022. V. 45. № 1. P. 109–124. doi: 10.1016/j.rbmo.2022.03.012.
53. Crow J.F. // *Nat. Rev. Genet.* 2000. V. 1. № 1. P. 40–47. doi: 10.1038/35049558.
54. Jónsson H., Sulem P., Arnadottir G.A., Pálsson G., Eggertsson H.P., Kristmundsdóttir S., Zink F., Kehr B., Hjorleifsson K.E., Jensson B.Ö., et al. // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. № 12. P. 1674–1680. doi: 10.1038/s41588-018-0259-9.
55. Belyeu J.R., Brand H., Wang H., Zhao X., Pedersen B.S., Feusier J., Gupta M., Nicholas T.J., Brown J., Baird L., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2021. V. 108. № 4. P. 597–607. doi: 10.1016/j.ajhg.2021.02.012.
56. Wong W.P., Hassed C., Chambers R., Coles J. // *Front Aging Neurosci.* 2016. V. 8. P. 156. doi: 10.3389/fnagi.2016.00156.
57. Zamani Esteki M., Viltrop T., Tšuiiko O., Tiirats A., Koel M., Nõukas M., Žilina O., Teearu K., Marjonen H., Kahila H., et al. // *Nat. Med.* 2019. V. 25. № 11. P. 1699–1705. doi: 10.1038/s41591-019-0620-2.
58. Smits R.M., Xavier M.J., Oud M.S., Astuti G.D.N., Meijerink A.M., de Vries P.F., Holt G.S., Alobaidi B.K.S., Batty L.E., Khazeeva G., et al. // *Hum. Reprod.* 2022. V. 37. № 6. P. 1360–1369. doi: 10.1093/humrep/deac068.
59. Huang Z., Xiao F., Xiao H., Lu Y., Yang L., Zhuang D., Chen L., Wei Q., Jiang Y., Li G., et al. // *JAMA Netw Open.* 2023. V. 6. № 4. P. e236537. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2023.6537.
60. Belva F., Bonduelle M., Buysse A., van den Bogaert A., Hes F., Roelants M., Verheyen G., Tournaye H., Keymolen K. // *Hum. Reprod.* 2020. V. 35. № 9. P. 2149–2162. doi: 10.1093/humrep/deaa162.
61. Mertens J., Belva F., van Montfoort A.P.A., Regin M., Zambelli F., Seneca S., Couvreur de Deckersberg E., Bonduelle M., Tournaye H., Stouffs K., et al. // *Nat. Commun.* 2024. V. 15. № 1. P. 1232. doi: 10.1038/s41467-024-45446-1.
62. Yuan S., Guo L., Cheng D., Li X., Hu H., Hu L., Lu G., Lin G., Gong F., Tan Y.-Q. // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2022. V. 39. № 7. P. 1683–1689. doi: 10.1007/s10815-022-02500-5.
63. Sciorio R., Esteves S.C. // *J. Clin. Med.* 2022. V. 11. № 8. P. 2135. doi: 10.3390/jcm11082135.
64. Oud M.S., Smits R.M., Smith H.E., Mastroianni F.K., Holt G.S., Houston B.J., de Vries P.F., Alobaidi B.K.S., Batty L.E., Ismail H., et al. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 154. doi: 10.1038/s41467-021-27132-8.
65. Bonduelle M., van Assche E., Joris H., Keymolen K., Devroey P., Van Steirteghem A., Liebaers I. // *Hum. Reprod.* 2002. V. 17. № 10. P. 2600–2614. doi: 10.1093/humrep/17.10.2600.
66. Xu N., Shi W., Cao X., Zhou X., Jin L., Huang H.-F., Chen S., Xu C. // *J. Med. Genet.* 2023. V. 60. № 9. P. 910–917. doi: 10.1136/jmg-2022-108920.
67. Caperton L., Murphey P., Yamazaki Y., McMahan C.A., Walter C.A., Yanagimachi R., McCarrey J.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 12. P. 5085–5090. doi: 10.1073/pnas.0611642104.
68. Lee Y.-L., Bouwman A.C., Harland C., Bosse M., Costa Monteiro Moreira G., Veerkamp R.F., Mullaart E., Cambisano N., Groenen M.A.M., Karim L., et al. // *Genome Res.* 2023. V. 33. № 9. P. 1455–1464. doi: 10.1101/gr.277884.123.
69. Martin L.J. // *Women's Stud. Internat. Forum.* 2017. V. 62. P. 91–98. doi: 10.1016/j.wsif.2017.04.004.
70. Bewley S., Davies M., Braude P. // *BMJ.* 2005. V. 331. № 7517. P. 588–589. doi: 10.1136/bmj.331.7517.588.
71. Kocourková J., Konečná H., Burcin B., Kučera T. // *Reprod. Biomed. Online.* 2015. V. 30. № 5. P. 482–492. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.01.017.
72. Martani A., De Clercq E., De Geyter C., Pennings G., Wangmo T., Elger B.S. // *J. Law Biosci.* 2022. V. 9. № 2. P. lsac036. doi: 10.1093/jlb/lsac036.
73. Londra L., Wallach E., Zhao Y. // *Semin. Fetal Neonat. Med.* 2014. V. 19. № 5. P. 264–271. doi: 10.1016/j.siny.2014.07.003.
74. Bowman M.C., Saunders D.M. // *Hum. Reprod.* 1994. V. 9. № 1. P. 167–171. doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138309.

УДК 57.085.23

Получение клеточных продуктов на основе опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов для противоопухолевой иммунотерапии: текущее состояние и вызовы

Д. В. Кузнецова*, Т. В. Петрова

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, 119435 Россия

*E-mail: dashakuz23@gmail.com

Поступила в редакцию 26.11.2024

Принята к печати 11.02.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27559

РЕФЕРАТ Опухоль-инфильтрирующие Т-лимфоциты (ОИЛ) – это популяция Т-лимфоцитов, присутствующая в ткани опухоли и обогащенная клонами, специфичными к опухолевым антигенам. ОИЛ участвуют в адаптивном противоопухолевом иммунном ответе, что делает их перспективными для иммунотерапии рака. Концепция данного вида терапии предполагает извлечение Т-лимфоцитов из опухоли пациента, их экспансию *ex vivo* и последующее введение в организм того же пациента в большом количестве. Такой подход позволяет усилить противоопухолевый иммунный ответ и воздействовать на опухолевые клетки, устойчивые к другим видам лечения. В 2024 году был одобрен первый препарат на основе ОИЛ, предназначенный для лечения меланомы. Изучается возможность использования ОИЛ при других солидных опухолях, разрабатываются новые методики, направленные на увеличение эффективности получения культур ОИЛ из опухолевых тканей *ex vivo*. Тем не менее, несмотря на значительный прогресс в данной области, существуют нерешенные вопросы и проблемы, в том числе отсутствие стандартизированных протоколов получения, экспансии и криоконсервации ОИЛ, сложность и длительность процесса их выделения, недостаточная эффективность. В представленном обзоре мы обсудим концепцию иммунотерапии с использованием ОИЛ, основные этапы производства клеточного продукта на основе ОИЛ, сопутствующие проблемы, а также дальнейшие шаги в производстве культур ОИЛ, направленные на улучшение эффективности их получения и более широкое применение данной терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА опухоль-инфильтрирующие Т-лимфоциты, иммунотерапия, ОИЛ-терапия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ОИЛ – опухоль-инфильтрирующие Т-лимфоциты (Т-клетки); CTLA-4 – гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4; PD-1 – мембранный белок запрограммированной клеточной гибели; PD-L1 – лиганд белка запрограммированной клеточной гибели; CAR – химерный антигенный рецептор; CAR-T – Т-лимфоциты, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (англ. – himeric antigen receptor T-cell); CAR-NK – NK-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор; TCR – Т-клеточный рецептор; FDA – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов; pre-REP – процедура получения культур ОИЛ из опухолевой ткани (англ. pre-rapid expansion protocol); REP – вторичная экспансия ОИЛ (англ. rapid expansion protocol); ПГЕ2 – простагландин E2; IL-2 – интерлейкин-2; IL-2Ra/β – альфа- и бета-цепи рецептора интерлейкина-2; ortho-hIL-2 – ортогональный генно-инженерный интерлейкин-2 человека; ortho-hIL-2Rβ – ортогональный генно-инженерный рецептор интерлейкина-2 человека; IL-7 – интерлейкин-7; IL-12 – интерлейкин-12; IL-12Rb1 – рецептор интерлейкина 12, субъединица бета 1; IL-15 – интерлейкин-15; mIL15 – мембраносвязанный IL-15; IL-21 – интерлейкин-21; 4-1BB (CD137 или TNFRSF9) – мембранный белок, член надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли; IFN-γ – интерферон-гамма; ПМК – мононуклеарные клетки периферической крови; ДМСО – диметилсульфоксид; Treg – регуляторные Т-лимфоциты; NK-клетки – естественные киллерные клетки (тип лимфоцитов); МНС – главный комплекс гистосовместимости (англ. major histocompatibility complex); pMHC – пептид-МНС.

ВВЕДЕНИЕ

Иммунотерапия опухолей является одним из наиболее инновационных и перспективных направлений современной онкологии. По мере появления новых данных о взаимодействии иммунной системы с опухолью иммунотерапия в разных формах (терапия с помощью ингибиторов контрольных точек иммунной системы, в том числе антител к молекулам CTLA-4, PD-1, PD-L1 и др.; CAR-T, CAR-NK-терапия, терапия дендритными клетками, *in vitro* культивирование и последующее введение обратно пациенту аутологичных опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов (ОИЛ), вакцинация неоантигенными пептидами, полученными путем химического синтеза) стала оцениваться как перспективный новый метод лечения различных видов злокачественных опухолей, поскольку позволила персонализировать и улучшить эффективность лечения опухолей, даже неконтролируемых и метастатических.

В настоящее время иммунотерапия опухолей представляет собой активно развивающееся поле для исследований и создания новых лекарственных препаратов.

Опухоль-инфильтрирующие Т-лимфоциты представляют собой популяцию Т-лимфоцитов, присутствующих в ткани опухоли и обогащенных опухоль-специфичными клонами. Однако наличие иммуносупрессивных факторов в микроокружении опухоли, активно подавляющих противоопухолевый иммунный ответ, снижает способность ОИЛ уничтожать опухолевые клетки. Концепция ОИЛ-терапии заключается в том, что противоопухолевый иммунный ответ можно восстановить путем выделения ОИЛ из фрагмента опухоли, культивирования *ex vivo* для увеличения их общего количества (минимум до 10^9 клеток) и последующего введения пациенту. В отличие от других методов клеточной иммунотерапии, ОИЛ получают от самого пациента без генетической модификации [1].

Исследования 1950-х годов, направленные на возможность использования Т-лимфоцитов для подавления роста опухолевых клеток, были вдохновлены работами, показавшими, что отторжение солидного трансплантата опосредовано клеточным иммунитетом [2]. Работы на животных моделях показали, что Т-лимфоциты иммунизированных доноров, перенесенные сингенным реципиентам, способны опосредовать регрессию опухоли, а IL-2 может использоваться для увеличения их количества [3]. Позднее на мышинной модели установили, что одновременное введение IL-2 и Т-лимфоцитов *in vivo* усиливает противоопухолевую эффективность Т-лимфоцитов. Однако потребность в иммунизированном сингенном доноре в качестве источника опухоль-специфичных

Т-лимфоцитов оставалась препятствием для реализации этого подхода у людей, у которых нет такого источника ОИЛ.

В 1986 году этот барьер был преодолен, когда Розенберг и его коллеги из хирургического отделения Национального института онкологии (США) впервые продемонстрировали на мышинной модели, что комбинация аутологичных ОИЛ и циклофосфамида может вызывать регрессию метастазов [4]. За этим последовала знаменательная публикация 1988 года – первого исследования, показавшего, что введение ОИЛ пациентам с метастатической меланомой может приводить к регрессии опухоли [5]. На октябрь 2024 года на ресурсе Clinicaltrials.gov зарегистрировано 266 клинических исследований по тематике ОИЛ-терапии. Из них 26 имеют статус «активно», 103 – «в процессе набора пациентов», а 82 завершены [6]. Ежегодно в течение последних 5 лет регистрируются 15–30 новых клинических исследований ОИЛ-терапии солидных опухолей разных нозологий с превалированием меланомы (40% от всех клинических исследований) [7].

Выборочный перечень клинических исследований, находящихся в настоящий момент на стадии I/II, охватывающих практически все виды солидных опухолей, приведен в табл. 1.

16 февраля 2024 года FDA одобрило полученный в итоге 30-летней работы лифилеуцел (Амтагви) как препарат для первого вида терапии, в котором используются ОИЛ. Препарат одобрен для взрослых пациентов с неоперабельной или метастатической меланомой кожи, ранее получавших стандартное лечение. Лифилеуцел производится путем *ex vivo* культивирования опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов, выделенных из хирургически удаленных аутологичных фрагментов опухоли [8].

Стоит отметить, что метастатическая меланома кожи считается высокоиммуногенной злокачественной опухолью. Частота объективного ответа на ОИЛ-терапию составляет 36–56%, выживаемость без прогрессирования – 3.7–7.5 месяцев, а общая выживаемость – 15.9–21.8 месяцев [9]. Более низкоиммуногенные («холодные») опухоли хуже реагируют на ОИЛ-терапию, что, с одной стороны, является препятствием, с другой, открывает простор для поиска решений по оптимизации ОИЛ-терапии.

ПОЛУЧЕНИЕ И ЭКСПАНСИЯ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ EX VIVO

Экспансию опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов *ex vivo* можно разделить на два этапа: получение культур ОИЛ из опухолевой ткани (этап pre-REP) и масштабная экспансия Т-лимфоцитов (этап REP) (рис. 1).

Таблица 1. Избранные клинические исследования ОИЛ-терапии, зарегистрированные в Clinicaltrials.gov по состоянию на октябрь 2024 г.

Нозология	Номер клинического испытания	Стадия испытания	Количество пациентов	Доза введения
Меланома, IIIb, IIIc или IV стадии	NCT03374839	I/II	11	Когорта 1: 5×10^8 ОИЛ (три пациента)/ Когорта 2: $1-20 \times 10^9$ ОИЛ на 14 и 18 неделях
Меланома, IV стадия	NCT03475134	I	10	Не указано
Измеримая метастатическая меланома	NCT03166397	II	30	Не указано
Неоперабельная меланома III/IV стадии или рак яичников, резистентный к платине	NCT03158935	Ib	24	$1 \times 10^{10}-1.6 \times 10^{11}$ ОИЛ
Неоперабельная меланома кожи или слизистых оболочек III/IV стадии	NCT02652455	Пилот	12	Не уточнено, рост клеток через 4–8 недель при использовании антитела, активирующего CD137
Измеримая метастатическая меланома	NCT02621021	II	170	Не указано, молодой ОИЛ
Неоперабельная метастатическая меланома	NCT02360579	II	60	Не указано
Метастатическая меланома или транзитное, подкожное или регионарное узловое заболевание III стадии	NCT01740557	Пилот	15	До 1.5×10^{11} ОИЛ
Неоперабельная меланома, III/IV стадии	NCT02354690	I/II	12	$1 \times 10^9-2 \times 10^{11}$ ОИЛ
Неоперабельная меланома, III/IV стадии	NCT02278887	III	168	Не указано
Метастатическая меланома или транзитное, подкожное или регионарное узловое заболевание III стадии	NCT01955460	Пилот	15	До 1.5×10^{11} ОИЛ
Метастатическая меланома	NCT01993719	II	64	Не указано
Неоперабельная меланома, III или IV стадии	NCT01946373	I	10	До 5×10^{10} ОИЛ
Неоперабельная меланома, III/IV стадии	NCT01883323	II	12	$1 \times 10^{10}-1.6 \times 10^{11}$ ОИЛ
Метастатическая меланома, увеальная меланома или транзитная стадия III или поражение регионарных узлов	NCT00338377	II	189	Когорта 1–3: до 1.5×10^{11} ОИЛ. Когорта 4: 5.0×10^9 ОИЛ на 1-й день, 10×10^{10} ОИЛ на 15-й день
Метастатическая увеальная меланома	NCT03467516	II	59	$1 \times 10^9-2 \times 10^{11}$ ОИЛ
Метастатическая меланома	NCT01995344	II	90	Не указано
Неоперабельная меланома, III/IV стадии	NCT02379195	I/II	12	Не указано
Меланома, III/IV стадии	NCT01807182	II	13	Не указано
Неоперабельная меланома, III/IV стадии	NCT01701674	Пилот	13	Не указано
Неоперабельная метастатическая меланома IV стадии или интранзитное или регионарное узловое заболевание III стадии	NCT01659151	II	17	Не указано
Метастатическая меланома	NCT01319565	II	102	Когорта 1 + 2: $1 \times 10^9-2 \times 10^{11}$ молодых ОИЛ
Неоперабельная меланома, III/IV стадии	NCT01005745	I/II	19	Не указано
Местно-распространенным, рецидивирующим или метастазирующим заболеванием. Рак желчевыводящих путей	NCT03801083	II	59	2×10^{11} ОИЛ (минимум 1×10^9 клеток)
Метастатическая увеальная меланома	NCT03467516	II	47	2×10^{11} ОИЛ (минимум 1×10^9 клеток)
Рак молочной железы	NCT05142475	I	50	$1 \times 10^9-5 \times 10^{10}$ ОИЛ
Злокачественные солидные опухоли	NCT05649618	I	42	$2.5 \times 10^9-5 \times 10^{10}$ ОИЛ
Прогрессирующие солидные опухоли	NCT03935893	II	240	2×10^{11} ОИЛ (минимум 1×10^9 клеток)
Злокачественные солидные опухоли	NCT05902520	I	18	Не указано
Уротелиально-клеточная карцинома (UCC) и немышечно-инвазивный рак мочевого пузыря (NMIBC)	NCT05768347	I	12	Не указано
Поздняя стадия меланомы	NCT05098184	I	50	$1 \times 10^9-5 \times 10^{10}$ ОИЛ
Меланома III и IV стадии с метастазами	NCT01883323	II	12	1.0×10^6 клеток/мл и размножали максимум в течение 28 дней перед криоконсервацией
Меланома	NCT02360579	II	66	26.1×10^9 (диапазон 3.3–72) ОИЛ
Немелкоклеточный рак легкого	NCT04614103	II	170	$1 \times 10^9-150 \times 10^9$ ОИЛ
Карцинома шейки матки	NCT03108495	II	27	28×10^9 ОИЛ

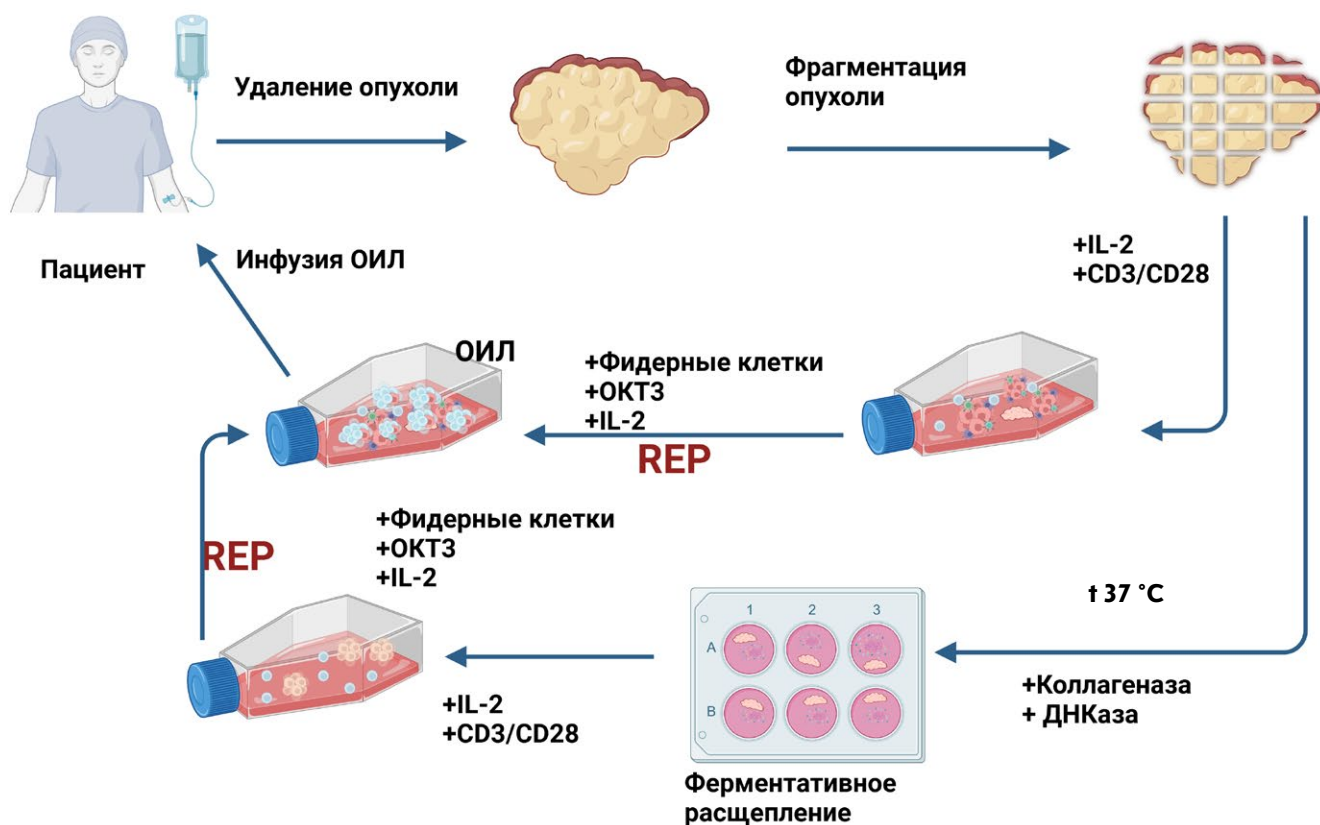


Рис. 1. Процесс подготовки и инфузии ОИЛ, полученных из свежей опухолевой ткани. Показаны два самых распространенных варианта получения ОИЛ из фрагментов опухоли и путем ферментативного расщепления. Вне зависимости от типа pre-REP-этапа получения ОИЛ, на втором этапе (REP) для масштабной экспансии перед инфузией клеточного продукта пациенту необходимо добавление фидерных клеток

Свежеиссеченную опухолевую ткань, полученную после хирургического вмешательства, быстро (в течение нескольких часов после операции) доставляют в лабораторию в стерильном сосуде в среде для транспортировки, состоящей из среды культивирования клеток с антибиотиком. Полученный биоматериал сразу же разрезают на небольшие фрагменты примерно $1.5 \times 1.5 \text{ мм}^2$ и помещают в среду для культивирования с добавлением IL-2 (500–6000 МЕ/мл). Другим способом получения культур ОИЛ является предварительное переваривание фрагментов опухоли в коктейле ферментов с добавлением коллагеназы и ДНКазы в течение 30–60 мин при температуре 37°C. Полученную клеточную суспензию также помещают в среду для культивирования с добавлением IL-2 (500–6000 МЕ/мл) [10–13]. Для дополнительной активации ОИЛ вносят не только IL-2, но иногда добавляют также антитела к CD3/CD28 [14–18]. Стоит отметить, что поскольку в клинических исследованиях изучают возможность получения ОИЛ из опухолей разных локализаций,

в том числе кожи и кишечника, необходимо учитывать возможность бактериального обсеменения опухолевых фрагментов и предусмотреть дополнительную отмывку опухолевых фрагментов и/или проводить культивирование *ex vivo* с антибиотиком и антимикотиком. Некоторые методики предусматривают также предварительную инкубацию опухолевого фрагмента в среде с 10% антибиотиком при комнатной температуре в течение 30 мин перед дальнейшими манипуляциями, например, при работе с колоректальным раком или меланомой [19]. Когда количество клеток в первичной культуре ОИЛ достигает примерно 1 млн/мл суспензии, первый этап считается завершенным. ОИЛ далее могут подвергаться криоконсервации или использоваться на втором этапе: масштабной экспансии (REP) для получения клинически значимого количества клеток. Согласно клиническим исследованиям, а также инструкции по применению зарегистрированного препарата лифилеуцел, необходимое количество ОИЛ для введения составляет от 1×10^9

до 2×10^{11} клеток, а общий объем инфузии может составлять 100–400 мл [12, 20]. Для масштабной экспансии ОИЛ на втором этапе используют фидерные клетки (моноклеарные клетки периферической крови здоровых доноров (аллогенные) или пациента (сингенные), облученные предварительно дозой 40 Гр), которые культивируют вместе с ОИЛ до достижения последними клинически значимых количеств в среде с IL-2 (500–6000 МЕ/мл) [19]. Поскольку успех экспансии ОИЛ в условиях *ex vivo* во многом зависит от количества фидерных клеток, в основных протоколах рекомендуется использовать соотношение фидерных клеток : ОИЛ = 100 : 1 или даже 200 : 1 [21]. Принято считать, что использование меньшего количества фидерных клеток может привести к значительному снижению выхода ОИЛ, что подчеркивает их важность для эффективной экспансии ОИЛ [15]. Стоит отметить, что в связи с необходимостью использования большого количества фидерных клеток часто прибегают к использованию фидерных клеток донора и пулированию биоматериала от нескольких доноров [12]. Этот метод является уникальным для ОИЛ-терапии в сравнении с более распространенным методом получения CAR-T, в котором для масштабной экспансии Т-лимфоцитов фидерные клетки не используют, а добавляют в культуральную среду не только высокие дозы IL-2, но и антитела к CD3/CD28, активирующие Т-лимфоциты [22, 23].

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Как уже упомянуто, краеугольным камнем в успехе ОИЛ-терапии является получение культур ОИЛ из фрагментов опухолей. Изучение работ разных авторов (см. табл. 2) показало, что вероятность получения жизнеспособных культур ОИЛ из фрагментов опухоли пациента слабо зависит от типа солидной опухоли и варьирует в зависимости от исследовательского центра, где проводились такие работы. Культуры ОИЛ удавалось получать от 18–100% пациентов, взятых в конкретное исследование. Анализируя данные, представленные в табл. 2, можно заключить, что отчасти подобные вариации могут быть объяснены отсутствием стандартизации процедуры получения культур ОИЛ, отчасти тем, что для некоторых нозологий (колоректального рака, меланомы) большую угрозу представляет микробиологическая контаминация. Кроме того, не последнюю роль играют количество стартового биоматериала опухоли и степень его инфильтрации иммунными клетками (как в увеальной меланоме и глиобластоме). К сожалению, небольшой размер выборок в большинстве работ негативным образом

влияет на надежность и обоснованность приведенных данных и может искажать оценку эффективности получения культур ОИЛ как в большую, так и в меньшую сторону. Нам удалось найти только одну работу, где была проанализирована эффективность получения культур ОИЛ для большого количества пациентов (более 1000). Из результатов этой работы следует, что эффективность получения ОИЛ из опухолей пациентов варьировала от года к году и, в среднем, за 11 лет культуры ОИЛ удалось получить у менее чем 70% пациентов [33].

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ПОЛУЧЕНИЮ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Эффективность получения культур ОИЛ, несмотря на значительный прогресс, далека от 100%. Кроме того, для получения оптимального противоопухолевого ответа *in vivo* желательна обогащение культур ОИЛ цитотоксическими CD8+ Т-лимфоцитами. В то же время, если обратиться к табл. 2, то можно заметить, что доля CD8+ Т-лимфоцитов сильно варьирует и, вероятно, зависит как от исходного соотношения Т-лимфоцитов в опухолевой ткани, так и от условий культивирования.

На данный момент ведутся исследования, направленные на оптимизацию протоколов получения культур ОИЛ путем добавления в среду культивирования различных коктейлей интерлейкинов; на использование генной инженерии на разных этапах получения Т-лимфоцитов; а также на работу с иммуносупрессивным микроокружением опухоли, способным нивелировать весь потенциал противоопухолевой клеточной терапии.

Как один из способов повышения эффективности получения культур ОИЛ из опухолевой ткани *ex vivo* рассматривают добавление в среду культивирования модуляторов контрольных точек иммунной системы. В работах нескольких исследовательских групп было показано, что добавление агонистического антитела анти-4-1BB к культивируемым фрагментам меланомы способствовало сокращению времени экспансии и повышало процентное соотношение CD8+ Т-лимфоцитов в культуре ОИЛ по сравнению с классической средой культивирования, содержащей только IL-2 [35, 36]. Аналогичные эффекты данного антитела показаны на 16 образцах немелкоклеточного рака легкого. Добавление IL-2 в сочетании с агонистическими антителами к молекулам CD3 и 4-1BB (Урелумаб) в среду культивирования ОИЛ приводило к уменьшению времени до получения культур ОИЛ и увеличивало долю CD8+ Т-клеток как в ходе pre-REP, так и в ходе REP-этапов культивирования ОИЛ [37]. Таким способом удалось достичь 100% эффективности полу-

Таблица 2. Особенности и эффективность получения культур ОИЛ из солидных опухолей

Нозология	Состояние исходного образца опухоли-вой ткани	Количество образцов опухолевой ткани в исследовании	Особенности получения культур ОИЛ	Эффективность получения культур ОИЛ, %	Доля популяций CD4+, CD8+ Т-лимфоцитов от общего числа клеток в культуре ОИЛ, %	Доля контаминированных культур ОИЛ	Ссылка
Меланома	Свежий материал	90 опухолей, 710 отдельных культур	1) ОИЛ из фрагментов опухоли. Среда для культивирования ОИЛ: RPMI 1640, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 ммоль/ L-глутамина, 10% человеческой сыворотки, IL-2 (6000 МЕ/мл). 2) ОИЛ из ферментативно диссоциированных фрагментов опухоли. Раствор для ферментативного расщепления: коллагеназа, гиалуронидаза, ДНКаза в RPMI 1640. Инкубация фрагментов 18 ч на орбитальном шейкере. Культивирование полученной клеточной суспензии в среде для ОИЛ.	1) 69.9 2) 94.1	CD4+ 31.4 (0.3–70) CD8+ 62.4 (37.2–97.6)	Не указано	[12]
Рак молочной железы	Свежий материал	42 опухоли	Не указано	100	CD4+ 55.6 (9.1–94.0)	Не указано	[24]
Колоректальный рак, рак желудка	Свежий материал	33 опухоли колоректального рака, 8 опухолей рака желудка	ОИЛ из ферментативно диссоциированных фрагментов опухоли. Культивирование фрагментов опухоли в течение 4 недель.	64 колоректальный рак, 43 рак желудка	Не указан	Не указано	[25]
Колоректальный рак	Свежий материал	12 опухолей	ОИЛ из фрагментов опухоли. Среда культивирования: CellCenex GMP DC, 10% человеческой сыворотки, 1% раствора антибиотика – антимикотика, IL-2 (1000 МЕ/мл). Добавка 10 нг/мл IL-12 при переносе культуры ОИЛ в перфузионный биореактор для масштабной экспансии.	100	Первая фаза экспансии 28.8 (0.6–55.3) CD4 + 64.6 (32.5–84.5) CD8 + Во вторую фазу экспансия CD8+ 85, CD4+ 12.4 (1.7–40.5).	Не указано	[26]
Увеальная меланома	Свежий материал	30 опухолей	1) ОИЛ из фрагментов опухоли (22 опухоли). Культивирование 1–4 фрагментов опухоли в 2 мл среды для ОИЛ с IL-2. Смена половины среды каждые 2–3 дня. 2) ОИЛ из ферментативно диссоциированных фрагментов опухоли (12 опухолей). Состав раствора для ферментативного расщепления: коллагеназа D 10 мг/мл, ДНКаза I 3 мг/мл. Время инкубации – 30 мин с использованием томотенизатора gentleMACS. 3) ОИЛ из ферментативно диссоциированных фрагментов опухоли с дополнительной положительной селекцией по маркеру CD3 магнитными бусами Dynabeads (25 опухолей).	1) 18 2) 42 3) 68	CD4 + 25 (0–91) CD8 + 39 (6–84)	Не указано	[27]
Саркома мягких тканей	Свежий материал	64 опухоли	1) ОИЛ из фрагментов опухоли. Культивирование по одному фрагменту опухоли в лунке 24-луночного планшета в культуральной среде, содержащей IL-2 (6000 МЕ/мл). 2) ОИЛ из ферментативно диссоциированных фрагментов опухоли. Состав раствора для ферментативного расщепления: ДНКаза IV (30 000 ед./л), гиалуронидаза V (100 мг/л), коллагеназа IV (1000 мг/л), гентамицин (500 мг/л), пенициллин-стрептомицин (5000 ед./мл), L-глутамин (292 мг/л), амфотерицин В (62.5 мг/л). Культивирование суспензии клеток в среде, содержащей IL-2 (6000 МЕ/мл).	91%	CD8 + 54.2 (3–95.4), CD4+ 2.5 (0.03–44.73)	1.60	[28]

Нозология	Состояние исходного образца опухолевой ткани	Количество образцов опухолевой ткани в исследовании	Особенности получения культур ОИЛ	Эффективность получения культур ОИЛ, %	Доля контаминированных культур ОИЛ	Ссылка
Первичный рак поджелудочной железы и метастатическая меланома	Свежий и замороженный материал	31 рак поджелудочной железы и 32 метастатические меланомы	ОИЛ из фрагментов опухоли. Среда культивирования: X-Vivo 15 или RPMI 1640, антибиотик, 2% человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), либо 10% аутологичной сыворотки.	80	Не указано	[19]
Плоскоклеточный рак головы и шеи	Свежий материал	47 образцов	ОИЛ из фрагментов опухоли. Среда культивирования: RPMI 1640, 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1 × ZellShield, 400 мкг/мл гентамицина, 50 нМ 2-меркаптоэтанол, IL-2 (1000 ME/мл).	36.20	ОИЛ показали преобладание CD4 + Т-клеток в 9 случаях (69.2) и CD8 + Т-клеток в 4 случаях (30.7)	[29]
Метастатический немелкоклеточный рак легкого	Свежий материал	34 образца	ОИЛ из фрагментов опухоли. Длительность 22 дня с соблюдением GMP. Среда культивирования: IL-2, OKT3 и фидерные клетки.	82.3	CD4+ 44.5 (6–88) CD8+ 46 (1–92)	[30]
10 различных видов солидной опухоли	Свежий материал	25 образцов	ОИЛ из фрагментов опухоли. Среда культивирования: RPMI 1640, 10% фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллина/стрептомицина и 0.5% Фунгизона, IL-2 (6000 ME/мл).	97	CD4+ 59.1 (2–95.8) CD8+ 32 (2.5–65.6) (у 10 пациентов преобладающим подмножеством Т-клеток был CD8+ (> 50%), тогда как подмножество CD4+ доминировало у 14 пациентов)	[31]
Метастазы колоректального рака в печени	Свежий материал	15	ОИЛ из фрагментов опухоли	66.7	CD4+ 69.4 CD8+ 32.5	[32]
Метастатическая меланома	Свежий материал	1135	1) ОИЛ из фрагментов опухоли. Среда культивирования: 6000 ME/мл IL-2. 2) ОИЛ из фрагментов опухоли. Среда культивирования: 30 нг/мл OKT3, 10 мкг/мл агонистического антигена 4-1BB и 6000 ME/мл IL-2.	50–80 (среднее – 62 за 11 лет, 68 за последние 5 лет)	1) CD8+ 74.7 ± 28.1, 2) CD8+ 84.9 ± 9.6	[33]
Глиобластома, рак легкого, метастатический колоректальный рак, метастазы меланомы в печень	Свежий материал	Глиобластома (7 пациентов), рак легкого (2 пациента), метастатический колоректальный рак (2 пациента)	ОИЛ из фрагментов опухоли	100	CD8+ аденокарцинома (16–36), глиобластома (2–20)	[34]

чения культур ОИЛ для 12 образцов увеальной меланомы [33]. Поскольку увеальная меланома характеризуется слабой инфильтрацией иммунными клетками, получение культур ОИЛ из опухоли этого типа представляет собой сложную задачу. Количество ОИЛ, полученное в этой работе всего из пяти фрагментов размером менее 3 мм³, было эквивалентным или превышало количество, полученное из 20 фрагментов стандартным методом (только с IL-2) [33].

Другой подход к взаимодействию с микроокружением опухоли представила группа ученых, показавшая эффективность ингибирования сигнального пути простагландина E2 (ПГЕ2) для стимуляции противоопухолевого ответа *in vivo* [38]. Опираясь на результаты этой работы, Morotti и соавт. обнаружили, что повысить эффективность получения культур ОИЛ из образцов меланомы (NCT03475134) можно путем ингибирования сигнального пути ПГЕ2. Ингибирование этого сигнального пути повышало восприимчивость ОИЛ к действию IL-2, снижая воздействие окислительного стресса на Т-лимфоциты и их гибель путем ферроптоза [39].

Добавление в среду культивирования различных коктейлей интерлейкинов является еще одним перспективным способом увеличения эффективности получения культур ОИЛ, в том числе с заданными свойствами, например, культур ОИЛ с преобладающей долей CD8⁺ Т-лимфоцитов или ОИЛ, в которых преобладают клетки памяти, а не эффекторные Т-клетки. Применение коктейлей интерлейкинов подразумевает отход от классического использования исключительно IL-2 для активации Т-лимфоцитов и позволяет изучить влияние различных цитокинов (IL-4, IL-7, IL-15 и IL-21) и их комбинаций на конечный клеточный продукт. Стоит отметить, что применение коктейлей интерлейкинов изначально широко применялось при получении другого клеточного продукта – CAR-T [40–42]. В дальнейшем показали, что CAR-T-клетки, культивируемые в среде с добавлением IL-7 и IL-15, имеют более высокую скорость пролиферации и повышенную противоопухолевую активность по сравнению с клетками, культивируемыми в среде, содержащей только IL-2 [43]. Кроме того, установили, что при добавлении комбинации IL-2, IL-15, IL-21 увеличивается соотношение CD8⁺/CD4⁺ Т-лимфоцитов [44], что имеет важное значение для CAR-T-терапии.

Благодаря успешному использованию различных комбинаций интерлейкинов в CAR-T-терапии подобные подходы стали применять и для получения Т-клеточных продуктов с использованием

ОИЛ. На PD-1+CD8⁺ Т-лимфоцитах, выделенных из крови здоровых доноров и пациентов с подтвержденным онкологическим диагнозом, был показан эффект добавления в среду культивирования коктейля из двух цитокинов IL-7 и IL-15 и антител к CD3/CD28. Использование такого коктейля способствовало увеличению пролиферации Т-лимфоцитов в суспензии [45]. Комбинированное воздействие антитела к анти-CD3, панобиностата, IL-2 и IL-21 способствовало увеличению доли CD62L+CD28+CD8⁺ Т-лимфоцитов в культуре ОИЛ по сравнению с ОИЛ, которые были культивированы без данного коктейля [46].

На этом работы в области применения интерлейкинов для улучшения экспансии Т-лимфоцитов не останавливаются, активно разрабатываются модифицированные формы интерлейкинов. Так, на стадии разработки находится генно-модифицированный IL-2 (STK-012), первый в своем классе частичный агонист альфа- и бета-цепей рецептора IL-2 (IL-2Rα/β), необходимый для селективной активации CD25⁺ антиген-активированных Т-клеток в отсутствие неспецифической активации NK-клеток и наивных Т-лимфоцитов. Доклинические испытания *in vivo* на мышах с использованием mSTK-012 (мышинный сурогат STK-012) продемонстрировали значительное снижение ОИЛ с истощенным фенотипом и увеличение системной и внутриопухолевой экспансии CD25+PD-1+CD8⁺ популяции Т-лимфоцитов, специфичных к опухолевому антигену. При этом наблюдалось снижение количества внутриопухолевых регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), то есть противоопухолевые свойства mSTK-012 были лучше, чем у IL-2 [47, 48].

При изучении модификаций интерлейкинов были разработаны ортогональные пары цитокин-рецептор IL-2 человека, обеспечивающие взаимодействие только между собой. Важно отметить, что эти пары не взаимодействуют со своими природными аналогами – цитокином IL-2 и рецептором IL-2. Введение orthoIL-2Rβ в суспензию Т-лимфоцитов позволило осуществить селективное воздействие orthoIL-2 на генетически модифицированные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки как *in vitro*, так и *in vivo*. Этот подход может обеспечить снижение побочных эффектов и минимизировать токсичность по сравнению с каноничной формой IL-2 [49].

Следующим потенциальным кандидатом, модифицирующим противоопухолевую активность Т-лимфоцитов, является IL-12, провоспалительный цитокин, играющий важную роль в активации CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов и NK-клеток. Клиническое применение IL-12 сдерживается его высокой токсичностью. Согласно результатам доклинических

испытаний, токсичность IL-12 связана с активацией NK-клеток. Преодолеть эту проблему попытались с помощью частичного агониста IL-12 (STK-026), обладающего более низкой способностью к связыванию с $\beta 1$ -субъединицей рецептора интерлейкина-12 (IL-12Rb1). STK-026 воздействовал на активированные Т-лимфоциты, характеризующиеся повышенной экспрессией рецептора IL-12Rb1, в то время как NK-клетки или покоящиеся Т-лимфоциты с умеренными уровнями IL-12Rb1 не подвергались значимому влиянию STK-026 [50]. В настоящее время компания «Синтекин» проводит доклинические испытания STK-026, в которых, как полагают, будет продемонстрирована способность STK-026 активировать опухоль-инфильтрирующие CD8⁺ Т-клетки и миелоидные клетки, его противоопухолевая активность и фармакодинамика.

Одним из возможных решений проблемы эффективного получения культур ОИЛ и повышения их функциональности, как уже сказано, является генная модификация Т-лимфоцитов.

Недавно показали перспективность создания Т-лимфоцитов, несущих индуцируемый мембраносвязанный IL-12. Такие Т-лимфоциты обладали превосходной цитотоксической активностью *in vitro* с выраженной продукцией IFN- γ [51].

Компанией Obsidian Therapeutics в настоящий момент ведется многоцентровое клиническое исследование, в котором изучается возможность использования генно-модифицированных ОИЛ OBX-115, экспрессирующих мембраносвязанный IL-15 (mbIL15). Это позволяет избежать введения высоких доз IL-2 *in vivo*, снизить токсичность и расширить возможность применения ОИЛ у большего числа пациентов [52].

«Омоложение» опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов представляет собой еще одну интересную стратегию усиления их противоопухолевой активности с использованием методов генной инженерии. Этот подход позволяет «омолодить» ОИЛ, восстанавливая их первоначальную функциональность и потенциал, путем частичного репрограммирования с использованием транзиторной экспрессии набора транскрипционных факторов. «Омоложденные» ОИЛ сохраняют разнообразие своих Т-клеточных рецепторов (ТКР), что обеспечивает широкий спектр антигенной специфичности. Ключевые преимущества «омоложения» ОИЛ состоят в снижении эпигенетического возраста Т-лимфоцитов, повышении скорости экспансии, приобретении фенотипа, сходного с фенотипом стволовых клеток, и повышении секреции цитокинов при активации целевыми антигенами. Важно отметить, что положительные результаты получе-

ны не только с «омоложенными» ОИЛ, но и с «омоложенными» периферическими мононуклеарными клетками крови (ПМК), ТКР и CAR-Т-клетками, что указывает на широкую применимость технологии «омоложения» в иммунотерапии опухолей [51].

Последним из рассмотренных здесь направлений генной инженерии, направленных на оптимизацию ОИЛ-терапии, является разработка векторов для доставки генов для модификации опухоль-специфичных Т-лимфоцитов *in vivo*. Современные исследования в области создания вирусных векторов для *in vivo* доставки генов фокусируются на ограничении тропизма вируса к определенным маркерам Т-лимфоцитов, в частности к CD3, CD8, CD4, CD62L и CD5 [53–55]. Так, в опубликованной недавно в виде нерцензированного препринта работе изучали эффективность ретровирусов, нацеленных на комплекс пептид-МНС (рМНС), для доставки генов (в том числе интерлейкина-12) в антигенспецифичные Т-лимфоциты и их *in vivo* экспансии. Предварительные результаты, полученные в опытах на мышах, показывают эффективность вирусов, нацеленных на рМНС, как векторов для перепрограммирования и экспансии популяций опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов *in vivo*.

Таким образом, как можно судить по рассмотренным исследованиям, ведутся разнонаправленные работы по оптимизации производства Т-клеточных продуктов, что позволит расширить возможности их применения [56].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ В ПРОЦЕССЕ ПРОИЗВОДСТВА ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Упомянутая ранее криоконсервация ОИЛ является крайне желательной, а в некоторых случаях и необходимой процедурой как в производственном процессе, так и в случае возникновения потребности в повторной инфузии ОИЛ пациенту через некоторый промежуток времени. Под криоконсервацией понимают медленную заморозку (со скоростью 1°C/мин) клеточных продуктов в культуральной среде, содержащей криопротекторы, наиболее популярным из которых является ДМСО, и хранение таких криоконсервированных клеточных продуктов в жидком азоте до востребования. Однако криоконсервация негативно влияет на все клеточные продукты, в том числе и на ОИЛ, внося изменения в продукцию ими цитокинов, цитотоксическую активность, пролиферацию и выживаемость [17].

В то же время терапевтическая эффективность клеточных продуктов напрямую зависит от способности клеток восстанавливать жизнеспособность и функциональность после разморозки.

Несмотря на то, что принятые FDA на данный момент протоколы как ОИЛ-терапии [57], так и CAR-T-терапии [58] включают возможность использования не только свежих клеточных продуктов, но и вышедших из криоконсервации, продолжается изучение активности Т-клеточных продуктов, поскольку выживаемость и активность Т-лимфоцитов после разморозки далеки от 100%. Следует отметить, что, в отличие от CAR-T, количество антигенспецифичных Т-лимфоцитов в Т-клеточном продукте невелико и составляет от 0.1 до 9% [59], поэтому любое уменьшение количества живых клеток после цикла заморозки-разморозки может критично сказаться на качестве Т-клеточного продукта. В связи с новизной ОИЛ-терапии данных по влиянию криоконсервации на качество клеточных продуктов ОИЛ чрезвычайно мало. Существуют три одобренных патента, предметом которых является оптимизация процесса криоконсервации ОИЛ [60–62]. Криоконсервированные после этапа pre-REP ОИЛ использовали также для получения клеточного продукта в клиническом исследовании 1-й фазы NCT03215810 ОИЛ-терапии рака легкого [63]. Кроме того, как уже сказано, одобренный препарат лифилеуцел поставляется, согласно рекомендациям производителя, в криоконсервированном виде.

Если обратиться к данным по влиянию криоконсервации на CAR-T-терапию, применяющуюся в течение достаточно длительного времени, то результаты выглядят несколько разнородными. Так, по данным, представленным одними из производителей CAR-T-клеток, жизнеспособность после размораживания составила 47.2–68.9% [64]. В то же время согласно результатам другой научной группы средняя жизнеспособность ранее размороженной фракции CAR-T составила $97 \pm 17.4\%$. Проанализировано 79 готовых инфузионных продуктов CAR-T-клеток, в которых CAR-T-клетки были экспандированы в среднем до 1×10^6 клеток на 1 кг массы тела (диапазон от 1×10^5 до 1×10^7 клеток/кг). Медианная продолжительность криоконсервации составила 9 дней (диапазон 1–408). Несмотря на высокую выживаемость, обнаружили, что в размороженных CAR-T увеличена экспрессия ранних маркеров апоптоза [65]. Еще одно исследование показало, что криоконсервация во время фазы экспансии не препятствует пролиферации клеток после разморозки. В 86% случаев CAR-T-клетки продолжали делиться [66]. Также в исследовании, изучающем стабильность криоконсервированных контролей CAR/TCR Т-клеток, показано, что криоконсервированные клетки стабильны в течение не менее 1 года, после разморозки.

Через 12 месяцев жизнеспособность размороженных клеток составляла около 80% и оставалась стабильной как минимум в течение 6 ч после [67].

Изучение устойчивости лимфоцитов периферической крови к криоконсервации после масштабной экспансии в присутствии высоких доз IL-2 показало, что такие Т-лимфоциты теряют сразу после размораживания способность реагировать на неспецифическую стимуляцию фитогемагглютинином, однако их реактивность восстанавливается в течение 48 ч. Жизнеспособность клеток при этом остается высокой ($> 80\%$), хотя при каждом новом раунде криоконсервации образцов наблюдается потеря около 10–15% клеток [68].

Сравнение с другими типами иммунных клеток показывает, что криоконсервацию плохо переносят также Treg- и NK-клетки. Спустя сутки после выхода из заморозки доля жизнеспособных NK-клеток уменьшается с 64–91% до 34% [69]. Такая же тенденция наблюдается для Treg: при выходе из заморозки доля живых клеток составляет 58–75%, а через 24 ч снижается до 20–48% [70].

В качестве возможного решения проблемы выживаемости Т-лимфоцитов после криоконсервации было предложено криоконсервировать непосредственно сами фрагменты опухоли [71–75]. В недавней работе по выделению опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов из замороженных фрагментов колоректального рака было показано, что эффективность получения культур ОИЛ из отдельных аликвот криоконсервированных частей одной и той же опухоли была схожа при разморозке и анализе, производимом в разные моменты времени, что указывает на достоверность полученных данных. Также отмечено сходное соотношение CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов в культурах ОИЛ, полученных как из замороженных, так и из свежих фрагментов [76]. Сравнение получения ОИЛ из образцов «свежей» и замороженной опухоли показало, что, несмотря на первоначально более быструю экспансию ОИЛ из свежей ткани, общее количество жизнеспособных клеток выравнивалось примерно через неделю культивирования [77]. В австралийском исследовании, в ходе которого свежие и криоконсервированные фрагменты меланомы, полученные от одних и тех же пациентов, транспортировали в течение 4 дней в лабораторию для дальнейшей экспансии ОИЛ, показано, что только из замороженных фрагментов можно получить культуры ОИЛ в 100% случаев [78]. Наряду с этим, в одном из патентов сообщается об отсутствии различий в фенотипе свежих ОИЛ и замороженными [59]. Таким образом, использование крио-

консервированных фрагментов опухолей является жизнеспособной стратегией, которая позволяет сохранять источник ОИЛ для последующей их экспансии, решает логистические задачи по передаче биоматериала из больницы, где была иссечена опухоль, в производственный центр, в том числе и удаленный. В то же время требуется стандартизация как криоконсервации уже прошедших экспансию ОИЛ, так и фрагментов опухолей, а также, возможно, новых криосред, которые будут способствовать улучшению выживаемости ОИЛ и более эффективному получению клеточного продукта на основе ОИЛ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунотерапия с использованием опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов демонстрирует значительный потенциал в борьбе с различными видами рака. ОИЛ, обладающие уникальной специфичностью к опухолевым антигенам, могут эффективно уничтожать опухолевые клетки, особенно в случае меланомы, где данная терапия уже зарекомендовала себя.

Несмотря на многообещающие результаты, ОИЛ-терапия в настоящее время находится на ранних стадиях клинического развития. Существуют нерешенные вопросы, касающиеся эффективности этой терапии для различных типов опухолей, а также отсутствует единый стандарт протоколов получения, экспансии и криоконсервации ОИЛ. Для повышения эффективности терапии необходимо продолжать исследования, направленные на разработку унифицированных протоколов и оптимизацию процессов, касающихся всех нерешенных на данный момент вопросов.

Важен также поиск новых стратегий усиления противоопухолевого иммунного ответа, направленных на преодоление иммуносупрессивной среды микроокружения опухоли. Достижение этих целей обеспечит более широкое применение ОИЛ-терапии и улучшит прогноз для пациентов с различными видами рака. ●

Данная работа выполнена в рамках государственного задания «Т-клетки», номер государственного учета НИОКТР 123032900030-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lee S., Margolin K. // Curr. Oncol. Rep. 2012. V. 14. № 5. P. 468–474. doi: 10.1007/s11912-012-0257-5.
- Mitchison N.A. // J. Exp. Med. 1955. V. 102. № 2. P. 157–177. doi: 10.1084/jem.102.2.157.
- Tang Y., Zhang A.X.J., Chen G., Wu Y., Gu W. // Mol. Ther. Oncolytics. 2021. V. 22. P. 410–430. doi: 10.1016/j.omto.2021.07.006.
- Rosenberg S.A., Spiess P., Lafreniere R. // Science. 1986. V. 233. № 4770. P. 1318–1321. doi: 10.1126/science.3489291.
- Rosenberg S.A., Packard B.S., Aebersold P.M., Solomon D., Topalian S.L., Toy S.T., Simon P., Lotze M.T., Yang J.C., Seipp C.A., et al. // New Engl. J. Med. 1988. V. 319. № 25. P. 1676–1680. doi: 10.4049/jimmunol.1490019.
- Search for: TIL, Active, not recruiting studies | Card Results | ClinicalTrials.gov [Electronic resource]. URL: <https://clinicaltrials.gov/search?intr=TIL&aggFilters=status:act> (accessed: 13.11.2024).
- Qiu X., Li S., Fan T., Zhang Y., Wang B., Zhang B., Zhang M., Zhang L. // Discover Oncol. 2024. V. 15. № 1. P. 1–18. doi: 10.1007/s12672-024-01410-5.
- FDA grants accelerated approval to lifileucel for unresectable or metastatic melanoma | FDA [Electronic resource]. URL: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-lifileucel-unresectable-or-metastatic-melanoma> (accessed: 13.11.2024).
- Matsueda S., Chen L., Li H., Yao H., Yu F. // Cancer Immunol. Immunother. 2024. V. 73. № 11. P. 1–20. doi: 10.1007/s00262-024-03793-4.
- Zhao Y., Deng J., Rao S., Guo S., Shen J., Du F., Wu X., Chen Y., Li M., Chen M., et al. // Cancers. 2022. V. 14. № 17. P. 4160. doi: 10.3390/cancers14174160.
- Wu R., Forget M.A., Chacon J., Bernatchez C., Haymaker C., Chen J.Q., Hwu P., Radvanyi L.G. // Cancer J. 2012. V. 18. № 2. P. 160–175. doi: 10.1097/PP0.0b013e31824d4465.
- Dudley M.E., Wunderlich J.R., Shelton T.E., Even J., Rosenberg S.A. // J. Immunother. 2003. V. 26. № 4. P. 332–342. doi: 10.1097/00002371-200307000-00005.
- Hall M.L., Liu H., Malafa M., Centeno B., Hodul P.J., Pimiento J., Pilon-Thomas S., Sarnaik A.A. // J. Immunother. Cancer. 2016. V. 4. № 1. P. 61. doi: 10.1186/s40425-016-0164-7.
- Kongkaew T., Thaiwong R., Tudsamran S., Sae-jung T., Sengprasert P., Vasuratna A., Suppipat K., Reantragoon R. // J. Immunol. Methods. 2022. V. 503. P. 113229. doi: 10.3390/vaccines10030457.
- Nijhuis E.W.P., v/d Wiel-van Kemenade E., Figdor C.G., van Lier R.A.W. // Cancer Immunol. Immunother. 1990. V. 32. № 4. P. 245–250. doi: 10.1007/BF01741708.
- Flens M.J., Mulder W.M.C., Bril H., von Blomberg van de Flier M.B.E., Scheper R.J., van Lier R.A.W. // Cancer Immunol. Immunother. 1993. V. 37. № 5. P. 323–328. doi: 10.1007/BF01518455.
- Wickström S., Lövgren T. // Meth. Mol. Biol. 2019. V. 1913. P. 105–118. doi: 10.1007/978-1-4939-8979-9_7.
- Poch M., Hall M., Joerger A., Kodumudi K., Beatty M., Innamarato P.P., Bunch B.L., Fishman M.N., Zhang J., Sexton W.J., et al. // Oncoimmunology. 2018. V. 7. № 9. doi: 10.1080/2162402X.2018.1476816.
- Poschke I.C., Hassel J.C., Rodriguez-Ehrenfried A., Lindner K.A.M., Heras-Murillo I., Appel L.M., Lehmann J., Lovgren T., Wickstrom S.L., Lauenstein C., et al. // Clin. Cancer Res. 2020. V. 26. № 16. P. 4289–4301. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3845.
- Rohaam M.W., van den Berg J.H., Kvistborg P., Haanen J.B.A.G. // J. Immunother. Cancer. 2018. V. 6. № 1. P. 102. doi: 10.1186/s40425-018-0391-1.
- Turcotte S., Gros A., Hogan K., Tran E., Hinrichs C.S., Wunderlich J.R., Dudley M.E., Rosenberg S.A. // J. Immu-

- nol. 2013. V. 191. № 5. P. 2217–2225. doi: 10.4049/jimmunol.1300538.
22. Levine B.L., Miskin J., Wonnacott K., Keir C. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2017. V. 4. P. 92–101. doi: 10.1016/j.omtm.2016.12.006.
 23. Ghorashian S., Kramer A.M., Onuoha S., Wright G., Bartram J., Richardson R., Albion S.J., Casanovas-Company J., Castro F., Popova B., et al. // *Nat. Med.* 2019. V. 25. № 9. P. 1408–1414. doi: 10.1038/s41591-019-0549-5.
 24. Zacharakis N., Huq L.M., Seitter S.J., Kim S.P., Gartner J.J., Sindiri S., Hill V.K., Li Y.F., Paria B.C., Ray S., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2022. V. 40. № 16. P. 1741–1754. doi: 10.1200/JCO.21.02170.
 25. Beatty M., Rodriguez-Valentin M., Hall M., Khambati F., Hall A., Pikor L., Langer T.J., Sennino B., Teer J., Fleming J., et al. // *J. Immunother. Cancer.* 2023. V. 11. № Suppl 1. P. A395–A395. doi: 10.1136/jitc-2023-SITC2023.0346.
 26. Albrecht H.C., Gustavus D., Schwanemann J., Dammernann W., Lippek F., Weylandt K.H., Hoffmeister H., Gretschesel S. // *Cytotherapy.* 2023. V. 25. № 5. P. 537–547. doi: 10.1016/j.jcyt.2023.01.009.
 27. Gezgin G., Visser M., Ruano D., Santegoets S.J., de Miranda N.F.C.C., van der Velden P.A., Luyten G.P.M., van der Burg S.H., Verdegaal E.M., Jager M.J. // *Ophthalmol. Sci.* 2022. V. 2. № 2. P. 100132. doi: 10.3390/biomedicines12081758.
 28. Mullinax J.E., Hall M., Beatty M., Weber A.M., Sanna-sardo Z., Svrdlin T., Hensel J., Bui M., Richards A., Gonzalez R.J., et al. // *J. Immunother. Cancer.* 2021. V. 44. № 2. P. 63–70. doi: 10.1097/CJI.0000000000000355.
 29. Choi S., Hossain M., Lee H., Baek J., Park H.S., Lim C.L., Han D.Y., Park T., Kim J.H., Gong G., et al. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2024. V. 73. № 6. P. 1–14. doi: 10.1007/s00262-024-03691-9.
 30. Schoenfeld A.J., Lee S.M., Doger de Spéville B., Gettinger S.N., Häfliger S., Sukari A., Papa S., Rodriguez-Moreno J.F., Graf Finckenstein F., Fiaz R., et al. // *Cancer Discov.* 2024. V. 14. № 8. P. 1389–1402. doi: 10.1158/2159-8290.CD-23-1334.
 31. Kverneland A.H., Chamberlain C.A., Borch T.H., Nielsen M., Mørk S.K., Kjeldsen J.W., Lorentzen C.L., Jørgensen L.P., Riis L.B., Yde C.W., et al. // *J. Immunother. Cancer.* 2021. V. 9. № 10. P. e003499. doi: 10.1136/jitc-2021-003499.
 32. Baek J., Lee H., Gong G., Lim C.-L., Lee H.J. // *J. Immunother. Cancer.* 2022. V. 10. № Suppl 2. P. A209–A209. doi: 10.1136/jitc-2022-SITC2022.0196.
 33. Tavera R.J., Forget M.A., Kim Y.U., Sakellariou-Thompson D., Creasy C.A., Bhatta A., Fulbright O.J., Ramachandran R., Thorsen S.T., Flores E., et al. // *J. Immunother. Cancer.* 2018. V. 41. № 9. P. 399–405. См. ссылку 39 doi: 10.1097/CJI.0000000000000230.
 34. Yusubalieva G.M., Maratovna Y.G., Petrichuk S.V., Valentinivna P.C., Krivoschapkin A.L., Leonidovich K.A., Kedrova A.G., Genrihovna K.A., Ivanov Yu.V., Viktorovich I.Y., et al. // *Клиническая практика.* 2020. V. 11. № 1. P. 49–58. doi: 10.17816/clinpract33974.
 35. Hernandez-Chacon J.A., Li Y., Wu R.C., Bernatchez C., Wang Y., Weber J.S., Hwu P., Radvanyi L.G. // *J. Immunother. Cancer.* 2011. V. 34. № 3. P. 236–250. doi: 10.1097/CJI.0b013e318209e7ec.
 36. Chacon J.A., Sarnaik A.A., Chen J.Q., Creasy C., Kale C., Robinson J., Weber J., Hwu P., Pilon-Thomas S., Radvanyi L. // *Clin. Cancer Res.* 2015. V. 21. № 3. P. 611–621. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1934.
 37. Shah P., Forget M.A., Frank M.L., Jiang P., Sakellariou-Thompson D., Federico L., Khairullah R., Neutzler C.A., Wisnuta I., Chow C.W.B., et al. // *J. Immunother. Cancer.* 2022. V. 10. № 2. P. e003082. doi: 10.1136/jitc-2021-003082.
 38. Bonavita E., Bromley C.P., Jonsson G., Pelly V.S., Sahoo S., Walwyn-Brown K., Mensurado S., Moeini A., Flanagan E., Bell C.R., et al. // *Immunity.* 2020. V. 53. № 6. P. 1215–1229.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2020.10.020.
 39. Morotti M., Grimm A.J., Hope H.C., Arnaud M., Desbuisson M., Rayroux N., Barras D., Masid M., Murgues B., Chap B.S., et al. // *Nature.* 2024. V. 629. № 8011. P. 426–434. doi: 10.1038/s41586-024-07352-w.
 40. Golubovskaya V., Wu L. // *Cancers.* 2016. V. 8. № 3. P. 36. doi: 10.3390/cancers8030036 36.
 41. Gust J., Ponce R., Liles W.C., Garden G.A., Turtle C.J. // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. P. 577027. doi: 10.3389/fimmu.2020.577027.
 42. Quintarelli C., Orlando D., Boffa I., Guercio M., Polito V.A., Petretto A., Lavarello C., Sinibaldi M., Weber G., Del Bufalo F., et al. // *Oncoimmunology.* 2018. V. 7. № 6. P. e1433518. doi: 10.1080/2162402X.2018.1433518.
 43. Zhou J., Jin L., Wang F., Zhang Y., Liu B., Zhao T. // *Protein Cell.* 2019. V. 10. № 10. P. 764–769. doi: 10.1007/s13238-019-0643-y.
 44. Simpson-Abelson M.R., Mosychuk C., Frank I., Ritthipichai K., Chartier C. // *J. Immunotherapy Cancer.* 2017. V. 5. Suppl. 2. P. 87. doi: 10.1186/s40425-017-0288-4.
 45. Qiu C., Wang J., Zhu L., Cheng X., Xia B., Jin Y., Qin R., Zhang L.X., Hu H., Yan J., et al. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022. V. 10. P. 1027619. doi: 10.3389/fbioe.2022.1027619.
 46. Ni J., Griffiths T., Forget M.-A., Sakellariou-Thompson D., Bernatchez C. // *Summer Experience.* 2021. V. 3. P. 57. doi: 10.52519/00004 <https://doi.org/10.52519/00004>
 47. <https://www.synthekine.com/news/synthekine-presents-positive-initial-results-from-phase-1a-1b-clinical-trial-of-%CE%B1-%CE%B2-biased-il-2-stk-012-for-treatment-of-advanced-solid-tumors/>. (Accessed November 14, 2024)
 48. Izar B., Zamarin D., Spigel D.R., Hoimes C.J., McDermott D.F., Sehgal K., Najjar Y.G., Schoenfeld A.J., Garon E.B., Sulivan R.J., et al. // *Cancer Res.* 2024. V. 84. № 7_Supplement. P. CT183–CT183. doi: 10.1158/1538-7445.AM2024-CT183.
 49. Sockolosky J.T., Trotta E., Parisi G., Picton L., Su L.L., Le A.C., Chhabra A., Silveria S.L., George B.M., King I.C., et al. // *Science.* 2018. V. 359. № 6379. P. 1037–1042. doi:10.1126/science.aar3246.
 50. Koliesnik Z., Totagrande M., Burgess R., Tran K.Q., Bauer M., Jayaraman B., Buffone C., Balasubrahmanyam P., Emermerich J., Chaturvedi D., et al. // *J. Immunother. Cancer.* 2023. V. 11. Suppl 1. P. A1160–A1160. https://jitc.bmj.com/content/11/Suppl_1/A1160
 51. Vizcardo R., Huang Y., Fioravanti J., Maeda T., Tamaoki N., Yamazaki Y., Kutlu B., Bahl K., Wang B., Zhong Z., et al. // *Cancer Res.* 2024. V. 84. № 6_Suppl. P. 6593–6593. doi: 10.1158/1538-7445.AM2024-6593.
 52. Schoenfeld A.J., Betof Warner A., Chesney J.A., Thomas S.S., Hamid O., In G.K., Shoushtari A.N., Samhouri Y., Hari P.N., Ramsingh G., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2024. V. 42. № 16_suppl. P. TPS9599–TPS9599. doi: 10.1200/JCO.2024.42.16_suppl.TPS9599.
 53. Agarwal S., Hanauer J.D.S., Frank A.M., Riechert V., Thalheimer F.B., Buchholz C.J. // *Mol. Ther.* 2020. V. 28. № 8. P. 1783–1794. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.05.005.
 54. Streibinger D., Frangieh C.J., Friedrich M.J., Faure G., Macrae R.K., Zhang F. // *Nat. Commun.* 2023. V. 14. № 1. P. 1–18. doi: 10.1038/s41467-023-40788-8.
 55. Hamilton J.R., Chen E., Perez B.S., Sandoval Espinoza C.R., Kang M.H., Trinidad M., Ngo W., Doudna J.A. // *Nat. Biotechnol.* 2024. V. 42. № 11. P. 1684–1692. doi: 10.1038/s41587-

- 023-02085-z.
56. Xu E.J.K., Smith B.E., Alberto W.D.C., Walsh M.J., Lim B., Hoffman M.T., Qiang L., Dong J., Garmilla A., Zhao Q.H., et al. // *bioRxiv* [Preprint]. 2024. 2024.09.18.613594. doi: 10.1101/2024.09.18.613594
 57. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/approved-blood-products/amtagvi>. (Accessed December 17, 2024)
 58. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/kymriah>. (Accessed December 17, 2024)
 59. Lowery F.J., Krishna S., Yossef R., Parikh N.B., Chatani P.D., Zacharakis N., Parkhurst M.R., Levin N., Sindiri S., Sachs A., et al. // *Science*. 2022. V. 375. № 6583. P. 877–884. doi: 10.1126/science.abl5447.
 60. Ryan GuestJoanne McCaffrey; WO2021123832A1; United States; Devices and methods for isolating tumor infiltrating lymphocytes and uses thereof; C12N5/0636; awaiting approval
 61. Ian FRANKMichael T. Lotze. WO2018081473A1; United States; Restimulation of cryopreserved tumor infiltrating lymphocytes, A61K35/17; awaiting approval.
 62. Ian FrankMichael T. Lotze. Patent; US10517894B2. United States; Restimulation of cryopreserved tumor infiltrating lymphocytes; A61K35/17; 2019.
 63. Creelan B.C., Wang C., Teer J.K., Toloza E.M., Yao J., Kim S., Landin A.M., Mullinax J.E., Saller J.J., Saltos A.N., et al. // *Nat. Med.* 2021. V. 27. № 8. P. 1410. doi: 10.1038/s41591-021-01462-y.
 64. Hanley P.J. // *Mol. Ther.* 2019. V. 27. № 7. P. 1213–1214. doi: 10.1016/j.jymthe.2019.06.001.
 65. Panch S.R., Srivastava S.K., Elavia N., McManus A., Liu S., Jin P., Highfill S.L., Li X., Dagur P., Kochenderfer J.N., et al. // *Mol. Ther.* 2019. V. 27. № 7. P. 1275–1285. doi: 10.1016/j.jymthe.2019.05.015.
 66. Brezinger-Dayan K., Itzhaki O., Melnichenko J., Kubi A., Zeltzer L.A., Jacoby E., Avigdor A., Shapira Frommer R., Besser M.J. // *Front. Oncol.* 2022. V. 12. P. 1024362. doi: 10.3389/fonc.2022.1024362.
 67. Cai Y., Prochazkova M., Jiang C., Song H.W., Jin J., Moses L., Gkitsas N., Somerville R.P., Highfill S.L., Panch S., et al. // *J. Transl. Med.* 2021. V. 19. № 1. P. 1–14. doi: 10.1186/s12967-021-03193-7.
 68. Sadeghi A., Ullenhag G., Wagenius G., Tötterman T.H., Eriksson F. // *Acta Oncol. (Madr.)*. 2013. V. 52. № 5. P. 978–986. doi: 10.3109/0284186X.2012.737020.
 69. Saultz J.N., Otegbeye F. // *Front. Immunol.* 2023. V. 14. P. 1304689. doi: 10.3389/fimmu.2023.1304689.
 70. Kaiser D., Otto N.M., McCallion O., Hoffmann H., Zarrinrad G., Stein M., Beier C., Matz I., Herschel M., Hester J., et al. // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 750286. doi: 10.3389/fcell.2021.750286.
 71. Kuznetsova D., Petrova T., Sharova E., Astrelina T., Varlamova S., Lazarev V. // *Ann. Oncol.* 2024. V. 35. P. S226. doi: 10.1016/j.annonc.2024.08.047.
 72. Poschke I.C., Hassel J.C., Rodriguez-Ehrenfried A., Lindner K.A.M., Heras-Murillo I., Appel L.M., Lehmann J., Lovgren T., Wickstrom S.L., Lauenstein C., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2020. V. 26. № 16. P. 4289–4301. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3845.
 73. Donlin L.T., Rao D.A., Wei K., Slowikowski K., McGeachy M.J., Turner J.D., Meednu N., Mizoguchi F., Gutierrez-Arcelus M., Lieb D.J., et al. // *Arthritis Res. Ther.* 2018. V. 20. № 1. P. 1–15. doi: 10.1186/s13075-018-1631-y.
 74. Crookes H., McCaffrey J., Hawkins R., Guest R. // *Cytotherapy*. 2020. V. 22. № 5. P. S142. doi: 10.1016/j.jcyt.2020.03.284.
 75. Kobayashi T., Kumagai S., Doi R., Afonina E., Koyama S., Nishikawa H. // *STAR Protoc.* 2022. V. 3. № 3. P. 101557. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101557.
 76. Liang F., Rezapour A., Falk P., Angenete E., Yrlid U. // *Cancers (Basel)*. 2021. V. 13. № 10. P. 2428. doi: 10.3390/cancers13102428.
 77. Anand Veerapathran Kenneth ONIMUS; WO2020061429A1; WIPO (PCT); Expansion of tils from cryopreserved tumor samples; A01N1/0221; 2019.
 78. Onimus K., Wells A., Herman C., Tawashi A., Long G.V., Scolyer R.A., Velickovic R., Saw R.P., Pennington T.E., Menzies A.M., et al. // *Transplant. Cell. Ther.* 2022. V. 28. № 3. P. S226–S227. doi: 10.1016/S2666-6367(22)00447-X

УДК 57.083

Внеклеточные везикулы в диагностике онкологических заболеваний

Л. А. Овчинникова*, Я. А. Ломакин

Государственный научный центр Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

*E-mail: leyla_ovchinnikova@yahoo.com

Поступила в редакцию 11.12.2024

Принята к печати 30.12.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27591

РЕФЕРАТ Внеклеточные везикулы (ВВ) секретируются практически всеми клетками млекопитающих и переносят различные активные биомолекулы, участвуя в межклеточных взаимодействиях. Патологические ВВ способствуют прогрессии опухоли, участвуя в таких процессах, как метастазирование, ангиогенез и уход опухолевых клеток из-под иммунного контроля. С другой стороны, выявлен потенциал ВВ как неинвазивных биомаркеров. В этом обзоре рассмотрены последние достижения в методах выделения и характеристики ВВ, молекулярные механизмы их биогенеза и роль в прогрессии рака. Кроме того, обсуждаются новые стратегии изучения молекулярного состава и профилирования ВВ для использования в диагностике методом жидкостной биопсии. Возможность использования ВВ для диагностики рака и мониторинга эффективности терапии подчеркивает их растущую значимость как универсальных диагностических инструментов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА внеклеточные везикулы, ВВ, онкология, экзосомы, жидкостная биопсия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВВ – внеклеточные везикулы; ВВ-ДНК – ДНК, ассоциированная с внеклеточными везикулами; ВВ-РНК – РНК, ассоциированная с внеклеточными везикулами; вкДНК – внеклеточная ДНК; ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома; КРР – колоректальный рак; РПЖЖ – рак поджелудочной железы; РЛ – рак легкого; РМЖ – рак молочной железы; РПЖ – рак предстательной железы; circRNA – кольцевая РНК; CAF (англ. cancer-associated fibroblasts) – фибробласты, ассоциированные с опухолью; CDE (англ. CAF-derived exosomes) – экзосомы, происходящие от фибробластов, ассоциированных с опухолью; EE (англ. Early Endosome) – ранние эндосомы; ESCRT (англ. Endosomal Sorting Complex Required for Transport) – эндосомный сортировочный комплекс, необходимый для транспортировки; IDL (англ. Intermediate-Density Lipoproteins) – липопротеины промежуточной плотности; ILV (англ. intraluminal vesicles) – внутрипросветные везикулы; MVB (англ. Multivesicular bodies) – мультивезикулярные тельца; piRNA – PIWI-взаимодействующие РНК; PSA (англ. Prostate-specific antigen) – специфический антиген простаты.

ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой сферические частицы, окруженные билипидным слоем, которые секретируются всеми типами клеток. Чаще всего ВВ подразделяют на экзосомы и микровезикулы (или эктосомы) в зависимости от их происхождения. Однако разнообразие ВВ выходит за рамки этой классификации. Недавние исследования выявили множество других подтипов ВВ, таких как малые эктосомы, апоптотические тельца, миграсомы, крупные онкосомы и экзоферы (англ. exophers) [1]. Кроме того, клетки могут выделять внеклеточные наночастицы, не относящиеся к везикулам, такие как супермеры (англ. supermeres), экзомеры (англ. exomeres), и супрамолекулярные атакующие частицы (англ. supramolecular attack

particles) [2]. Для создания единой стандартизированной классификации Международное общество по изучению внеклеточных везикул (ISEV) регулярно публикует и обновляет свои рекомендации (MISEV). Эти рекомендации являются важным ресурсом для исследователей, обеспечивая согласованность и точность при характеристике ВВ.

Экзосомы – наиболее широко изученный тип ВВ, имеют диаметр от 30 до 150 нм. Они формируются в процессе выделения внутрипросветных везикул (ILV) при слиянии мультивезикулярных телец (MVB) с плазматической мембраной, что приводит к секреции этих частиц во внеклеточное пространство [3, 4]. В то время как экзосомы нормальных клеток способствуют межклеточной коммуникации, транспортируя различные молекулы (например,

белки, ДНК, РНК, липиды), экзосомы, выделяемые опухолевыми клетками, участвуют в прогрессии опухоли, метастазировании, ангиогенезе, а в некоторых случаях способствуют хеморезистентности [5].

В этом обзоре проанализированы современные данные о ВВ, выделяемых опухолевыми клетками, роль ВВ в прогрессии рака и потенциал ВВ как биомаркеров.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Эффективное выделение ВВ является важным этапом их исследования, но часто представляет собой нетривиальную задачу. Было разработано множество методов очистки ВВ, каждый из которых имеет свои преимущества и ограничения. При этом универсального метода выделения везикул не существует; выбор подхода зависит от конкретных целей исследования. Методы выделения ВВ можно классифицировать следующим образом: (i) методы с высоким выходом, но низкой чистотой (полимерная преципитация, ультрафильтрация); (ii) методы с умеренным выходом и чистотой (дифференциальное ультрацентрифугирование и гель-фильтрационная хроматография); (iii) методы с низким выходом, но высокой чистотой (градиентное ультрацентрифугирование, аффинное выделение, проточная цитометрия и микрофлюидные подходы) [6]. Часто комбинирование этих методов позволяет повысить выход и чистоту ВВ [7]. При этом постоянно разрабатываются новые методы выделения ВВ из биологических жидкостей. Один из таких подходов – EchoArc, использует высокопроизводительное устройство на основе инерционной микрофлюидики, которое эффективно изолирует свободную от клеток плазму крови для комплексного анализа РНК и ВВ. В сочетании с гель-фильтрационной хроматографией эта техника обеспечивает выход препарата ВВ, превышающий выход при использовании методов ультрацентрифугирования в 10 раз [8].

Для характеристики ВВ используются различные методы. Один из самых распространенных подходов – прямая визуализация ВВ с использованием микроскопии, включая трансмиссионную электронную микроскопию (ТЭМ), сканирующую электронную микроскопию (СЭМ), криоэлектронную микроскопию (крио-ЭМ) и атомно-силовую микроскопию (АСМ). Использование ТЭМ для визуализации ВВ часто приводит к получению изображений, где ВВ обладают чашеобразной формой из-за дегидратации образца, тогда как АСМ и крио-ЭМ помогают сохранить исходную сферическую морфологию ВВ, представляя их структуры более точно [4]. Другой метод характеристики ВВ – динамическое светорассеяние

(ДСР), основан на броуновском движении диспергированных частиц. ДСР измеряет флуктуации интенсивности рассеяния света, вызванные движением частиц, что позволяет определить их распределение по размерам. Этот метод полезен для изучения гидродинамического диаметра ВВ, предоставляя данные об их размерах и однородности в растворе. ДСР широко используется для анализа ВВ в их естественном окружении [9]. По сравнению с ДСР метод анализа траектории наночастиц (НТА) позволяет отслеживать отдельные наночастицы, что делает его особенно эффективным для анализа размеров частиц в сложных образцах. Значительным преимуществом НТА является возможность использования флуоресцентных меток, что позволяет различать частицы на основе их сигналов флуоресценции. Таким образом, НТА позволяет одновременно анализировать размеры различных индивидуальных ВВ, меченных разными флуоресцентными маркерами [10]. Хотя метод ДСР проще в использовании и позволяет получить результаты быстрее, НТА обеспечивает более высокую точность, особенно для гетерогенных образцов. Перечисленные методы дают представление о морфологии и размерах ВВ, в то время как исследование поверхностных молекул не менее важно и может указывать на происхождение ВВ. Для анализа поверхностных маркеров ВВ можно использовать проточную цитометрию, однако диаметр ВВ меньше порога обнаружения стандартных цитометров, и для преодоления этих ограничений применяют специализированные наборы. Принцип действия таких наборов основан на позитивной селекции при помощи антител к везикулярным маркерам (например, CD63, CD81), сорбированных на поверхности микрочастиц. ВВ, связавшиеся с антителами, остаются на микрочастицах и становятся видимыми для стандартных цитометров. Благодаря использованию таких наборов возможно более точно характеризовать различные подтипы ВВ по уровню экспрессии поверхностных маркеров и оценивать их функциональные свойства.

БИОГЕНЕЗ И МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СОСТАВ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Биогенез двух основных типов ВВ – экзосом и эктосом – включает различные клеточные процессы (рис. 1). Биогенез экзосом начинается с формирования ранних эндосом путем инвагинации плазматической мембраны. Эти ранние эндосомы могут либо переносить поступающие в клетку (макро)молекулы и надмолекулярные комплексы во внутрипросветные везикулы (ILV), являющиеся предшественниками экзосом, либо транспортировать их обратно к плазматической мембране. По мере со-

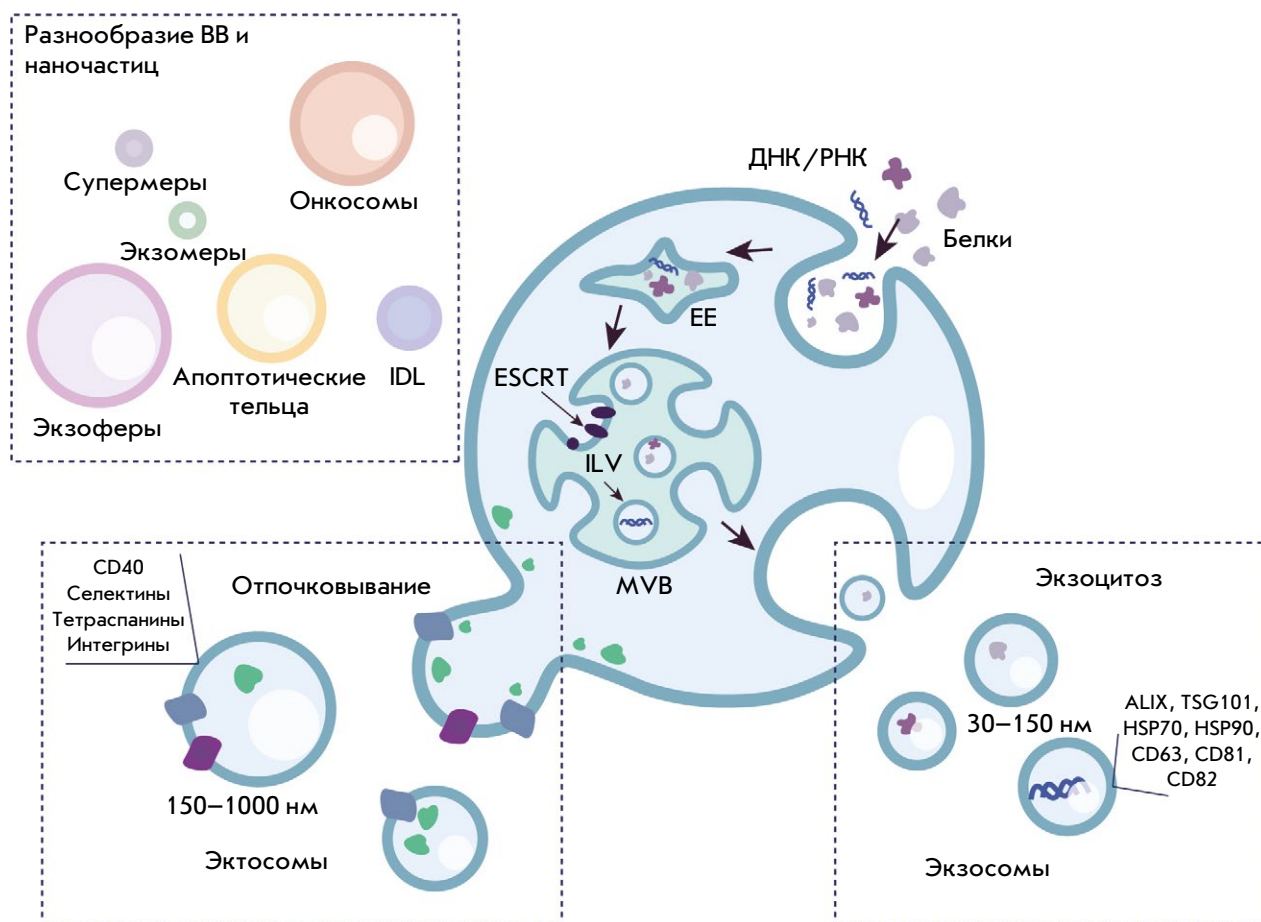


Рис. 1. Схематическое изображение биогенеза экзосом и микровезикул. Экзосомы формируются в эндоцитарном пути, который начинается с инвагинации плазматической мембраны и формирования ранних эндосом (англ. Early Endosome – EE). Эти эндосомы созревают в мультивезикулярные тельца (англ. Multivesicular bodies – MVB), содержащие внутрипросветные везикулы (англ. intraluminal vesicles – ILV). После слияния MVB с плазматической мембраной, ILV выделяются в виде экзосом (30–150 нм) во внеклеточное пространство. Микровезикулы образуются путем прямого выпячивания и отпочковывания от плазматической мембраны, формируя более крупные везикулы (150–1000 нм). IDL (Intermediate-Density Lipoproteins) – липопротеины промежуточной плотности; ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) – эндосомный сортировочный комплекс, необходимый для транспортировки

зревания ранние эндосомы преобразуются в мультивезикулярные тельца (MVB), которые взаимодействуют с другими органеллами, такими как аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, митохондрии и фагосомы. Мультивезикулярные тельца могут сливаться с плазматической мембраной, что приводит к секреции экзосом, или сливаться с лизосомами и подвергаться деградации [11].

Существуют различные пути формирования внутрипросветных везикул внутри мультивезикулярных телец. Такие пути разделяют на связанные с комплексами белков ESCRT и на не зависящие от ESCRT. Существует четыре комплекса ESCRT (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II и ESCRT-III), которые взаимодействуют с ферментами на мембране

эндосом в процессе биогенеза экзосом. Классический путь, зависящий от ESCRT, включает распознавание убиквитинированных белков в мембране эндосом субкомплексом ESCRT и опосредованное белком VPS4 образование внутрипросветных везикул. Альтернативный путь – это путь синдеканин-ALIX, при котором отпочкование везикул и сортировка грузов могут происходить независимо от ESCRT, а VPS4 играет ключевую роль на этапе финального отделения. Путь, не зависящий от ESCRT, использует церамид, генерируемый из сфингомиелина посредством nSMase2, формирующий домены липидных рафтов и инициирующий созревание внутрипросветных везикул внутри мультивезикулярных телец. Таким образом, молекуляр-

ный состав выделяемых экзосом зависит от путей, через которые они проходят в процессе своего формирования. Однако существует ряд общих белков, характерных для большинства изученных экзосом. К ним относятся белки, участвующие в транспорте и слиянии мембран (семейство GTPаз Rab и аннексыны), белки, связанные с биогенезом экзосом (белки комплекса ESCRT, ALIX, TSG101), белки теплового шока (HSP70 и HSP90), тетраспанины (CD63, CD81 и CD82), а также белки цитоскелета [12]. Помимо белков, в экзосомах могут обнаруживаться характерные липиды. Липидный состав экзосом зависит от типа клеток-продуцентов, их стадии развития и функций. Например, показано, что фосфолипид BMP (бис(моноацилглицерол)фосфат) стимулирует формирование внутрипросветных везикул [13], а холестерин участвует в сборке системы ESCRT [14]. В число липидов, наиболее распространенных в мембране экзосом, входят сфингомиелин, фосфолипиды, ганглиозид GM3 и холестерин [15]. Некоторые мембранные липиды экзосом могут служить полезными диагностическими инструментами: например, экзосомы с фосфатидилсерином на поверхности происходят из злокачественных клеток [16].

Экзосомы (микровезикулы), в отличие от экзосом, отпочковываются непосредственно от плазматической мембраны клетки-продуцента (рис. 1). Молекулярные механизмы биогенеза экзосом менее изучены, однако известно, что этот процесс включает участие комплекса ESCRT и белков малых GTPаз, таких как ARF1, ARF6 и RhoA. Эти белки играют важную роль в регуляции динамики цитоскелета и ремоделировании мембран [17]. Более того, входящий кальциевый ток и перестройка бислоя играют ключевую роль в формировании экзосом, влияя на процесс их отпочкования от плазматической мембраны [18]. Экзосомы переносят широкий спектр биомолекул, включая белки, липиды и РНК, которые они передают клеткам-реципиентам, тем самым участвуя в межклеточной коммуникации [19]. Данные ВВ редко имеют специфические маркеры, однако выявлена их ассоциация с CD40, селектинами, тетраспанинами и интегринами [20]. Кроме того, их мембраны могут содержать белки и липиды клетки-продуцента [20].

ВКЛАД ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ В ПРОГРЕССИЮ РАКА

Секретируемые всеми типами клеток ВВ вовлечены во многие патологические процессы в организме человека, включая прогрессию опухолей. Микроокружение опухоли, состоящее из иммунных клеток и стромальных клеток, кровеносных сосудов и внеклеточного матрикса, играет активную роль

в прогрессии опухоли [21]. Взаимодействие между микроокружением опухоли и раковыми клетками частично осуществляется через ВВ [22]. ВВ и их содержимое способны стимулировать рост и прогрессию опухоли, вызывать воспаление и способствовать уходу опухоли из-под надзора иммунной системы [23].

Один из основных источников патогенных опухолевых ВВ – фибробласты, ассоциированные с опухолью (от англ. cancer-associated fibroblasts – CAF), – являются важными компонентами микроокружения опухоли в солидных опухолях. Эти фибробласты секретируют цитокины и факторы роста, играющие ключевую роль в росте опухоли, ангиогенезе, воспалении и метастазировании [24]. Экзосомы, происходящие из фибробластов, ассоциированных с опухолью (англ. CAF-derived exosomes (CDE)), обогащены биоактивными молекулами, включая многочисленные сигнальные факторы, нуклеиновые кислоты, функциональные белки и малые метаболиты, они играют значительную роль в модуляции микроокружения опухоли, стимулируя рост опухоли, метастазирование и устойчивость к терапии [25]. Показано, что CDE, выделяемые CAF, ингибируют окислительное фосфорилирование в митохондриях, изменяют углеводный метаболизм и способствуют росту опухоли [26]. Эти ВВ содержат метаболиты, включая аминокислоты, липиды и промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот, которые могут использоваться опухолевыми клетками [26]. Кроме того, такие ВВ усиливают миграционные и инвазивные способности раковых клеточных линий, таких как SKOV-3 и CAOV-3, а также стимулируют эпителиально-мезенхимальный переход, что в значительной степени обусловлено повышенным содержанием TGFβ1 [27]. В модели рака молочной железы (РМЖ) на животных было показано, что CDE способствовали повышению подвижности и инвазивной активности клеток опухоли [28]. Эти экзосомы поглощались клетками опухоли, доставляя в них Wnt11, сигнальный белок, связанный с опухолевой прогрессией. В случае рака поджелудочной железы ВВ, выделяемые фибробластами, ассоциированными с опухолью, повышали уровень фактора, индуцирующего хеморезистентность (Snail), в эпителиальных клетках-реципиентах, способствуя их пролиферации и лекарственной устойчивости. Ингибирование выделения CDE показало снижение выживаемости кокультивируемых эпителиальных клеток, подчеркивая их значительную роль в поддержании лекарственной устойчивости [29].

Патогенная роль фибробластов, ассоциированных с опухолью, и выделяемых ими ВВ хорошо известна; однако механизмы, посредством которых нормальные фибробласты перепрограммируют

ся в ассоциированные с опухолью, изучены недостаточно. Одним из возможных объяснений может быть транспорт патогенных микроРНК с помощью ВВ. Установлен новый возможный путь межклеточной коммуникации, в котором клетки меланомы индуцируют трансформацию фибробластов через микроРНК, транспортируемые ВВ [30]. Показано, что ВВ, выделенные клетками меланомы, доставляют miR-92b-3p в нормальные фибробласты, и накопление этой микроРНК клетками коррелировало с их трансформацией в ассоциированные с опухолью фибробласты [29].

Асцит, представляющий собой скопление жидкости в брюшной полости, часто развивается при различных патологических состояниях, включая рак, и является еще одним компонентом микроокружения опухоли, а также важным источником ВВ [31]. Показано, что при серозном раке яичников высокой степени злокачественности асцитная жидкость содержит ВВ, происходящие преимущественно из макрофагов и фибробластов, а не из опухолевых клеток [32]. Протеомный анализ показал, что специфические маркеры ВВ в асцитной жидкости способны более точно предсказать выживаемость пациентов по сравнению с традиционными клеточными маркерами. ВВ, полученные из асцита (EXO^{Ascites}) пациентов с раком желудка, стимулировали инвазивность и ангиогенез в трехмерной аутологичной микрофлюидной системе опухолевых сфероидов. EXO^{Ascites} доставляют онкоген MET в опухолевые клетки, стимулируя онкогенные сигналы. Модифицированные ВВ, лишенные MET, снижали прогрессию опухоли, что указывает на потенциал для таргетной терапии [33].

ВВ играют значительную роль в стимуляции ангиогенеза опухоли. Например, известный индуктор ангиогенеза – Е-кадгерин – выделяется в форме экзосом [34]. Кроме того, miR-21, которая присутствует в ВВ фибробластов, ассоциированных с опухолью, доставляется в эндотелиальные клетки при множественной миеломе, где регулирует ангиогенез [35]. ВВ также способствуют формированию преметастатической ниши – микро среды, подготовленной для колонизации циркулирующих опухолевых клеток в определенных органах. ВВ, выделенные из протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, идентифицированы как переносчики фактора ингибирования миграции (MIF), ключевого элемента в формировании преметастатической ниши в печени. Блокирование MIF в этих ВВ эффективно предотвращало как образование преметастатической ниши, так и последующие метастазы в печени. Эти ВВ активировали звездчатые клетки печени и стимулировали ремоделирование внеклеточного матрикса. Данный процесс

приводил к накоплению фибронектина, который привлекает макрофаги, тем самым создавая микро среду, поддерживающую метастазы в печени [36].

Еще одно свойство ВВ в прогрессии опухолей – способность модулировать иммунный ответ. ВВ, выделенные из клеток пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом, индуцировали иммунодепрессивный фенотип у моноцитов. Эти ВВ стимулировали высвобождение CCL2, CCL4 и интерлейкина-6, а также индуцировали экспрессию PD-L1, доставляя некодирующую РНК hY4 [37]. PD-L1 обнаружен также на поверхности выделенных из глиобластомы экзосом, которые демонстрировали PD-L1-зависимое ингибирование активации Т-клеток [38]. Показано, что ВВ опухоли могут быть переносчиками жирных кислот к дендритным клеткам, что приводило к накоплению липидов и усилению окисления жирных кислот, вызывая дисфункцию иммунного ответа дендритных клеток [39].

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА. ЖИДКОСТНАЯ БИОПСИЯ

ВВ могут быть выделены из всех типов биологических жидкостей человека, в том числе из крови, слез, мочи, слюны, спинномозговой жидкости (ликвор) и других. Эта универсальность делает ВВ перспективным инструментом для диагностики рака, особенно в рамках жидкостной биопсии. Жидкостная биопсия представляет собой инновационный метод анализа циркулирующих клеток опухоли, внеклеточных нуклеиновых кислот и ВВ (рис. 2). Этот малоинвазивный метод позволяет в реальном времени отслеживать прогрессию опухоли [40]. Преимуществами анализа ВВ методом жидкостной биопсии являются: (1) более высокая концентрация ВВ в биологических жидкостях по сравнению с циркулирующими опухолевыми клетками; (2) ВВ дают лучшее представление о клетках-продуцентах, чем циркулирующая ДНК; и (3) высокая биологическая стабильность ВВ в агрессивной опухолевой среде [41]. ВВ, выделенные из опухолевых клеток, несут широкий спектр цитозольных и поверхностных белков, ДНК, РНК, а также различные липиды и гликаны, в связи с чем имеют потенциал для использования при проведении скрининга ранних стадий рака, в мониторинге рака и прогнозировании ответа на терапию. Далее мы рассмотрим применение анализа ВВ для диагностики самых распространенных типов рака в рамках метода жидкостной биопсии.

Рак предстательной железы

Один из видов рака, для диагностики которого с успехом применяется жидкостная биопсия, – рак

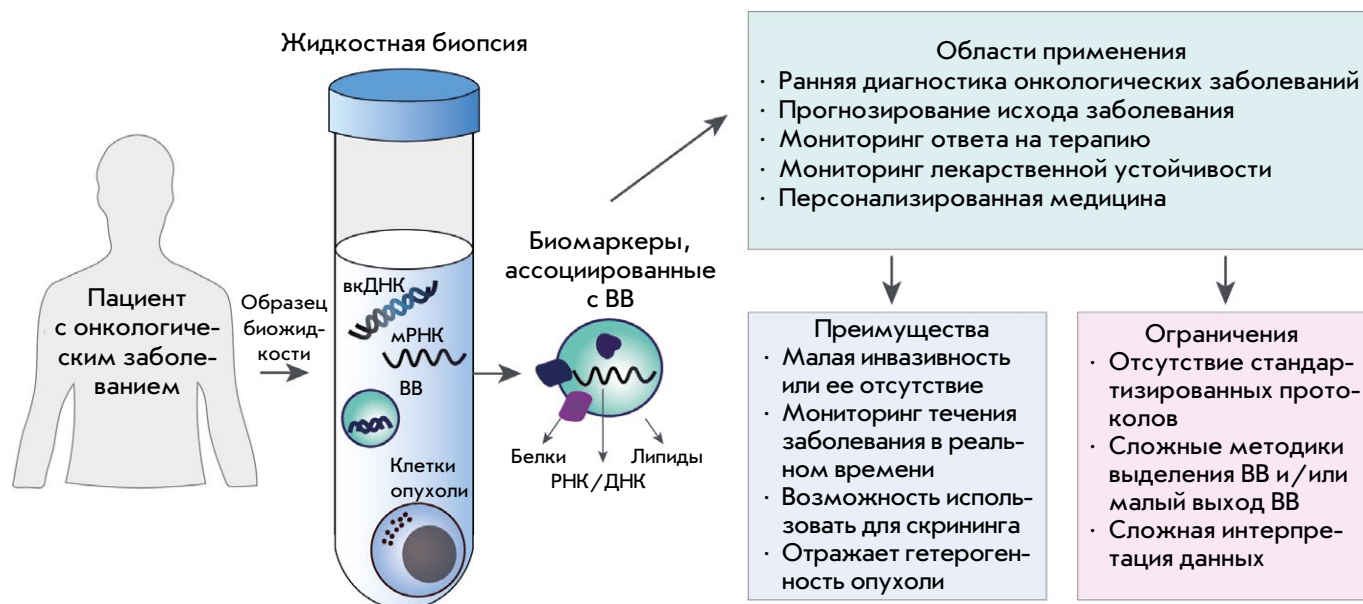


Рис. 2. Использование ВВ для диагностики рака методом жидкостной цитологии. Ключевые элементы, которые можно анализировать при помощи жидкостной цитологии, включают циркулирующую внеклеточную ДНК (вкДНК), внеклеточные везикулы (ВВ), мРНК, циркулирующие опухолевые клетки и метаболиты опухолевого происхождения

предстательной железы (РПЖ). Хотя внедрение теста на специфический антиген простаты (PSA) привело к существенному улучшению диагностики, остается потребность в биомаркерах, которые помогут точнее отслеживать прогрессирование заболевания [42]. В исследовании с использованием плазмы пациентов с РПЖ геномное профилирование ДНК, ассоциированной с ВВ (ВВ-ДНК), позволило изучить характеристики опухоли и коррелировало с прогрессированием заболевания, тогда как изучение РНК, ассоциированной с ВВ (ВВ-РНК), позволило получить представление об ответе опухоли на ранних стадиях терапии [43]. Специфические микроРНК, присутствующие в ВВ, также могут рассматриваться как потенциальные биомаркеры РПЖ. В частности, miR-375, miR-21 и miR-574 обнаружили в ВВ, выделенных из сыворотки крови пациентов с РПЖ [44]. Кроме того, miR-21 и miR-375 выявлены также в ВВ, выделенных из мочи, что свидетельствует о возможности использования данных маркеров для неинвазивной диагностики [45]. Еще одна микроРНК, ассоциированная с ВВ, miR-141, обнаружена также как в сыворотке, так и в моче пациентов с РПЖ, что еще больше подчеркивает возможность использования таких маркеров для мониторинга РПЖ [46, 47]. Необходимо заметить, что и PSA также найден в ВВ, выделенных у пациентов с РПЖ, что подтверждает возможность использования ВВ в качестве источников клинически

значимой информации [48]. Наличие этих специфических микроРНК и белковых маркеров в ВВ подчеркивает их потенциальную роль как биомаркеров для раннего выявления, мониторинга прогрессирования и оценки ответа на лечение при РПЖ.

Колоректальный рак

Колоректальный рак (КРР) занимает третье место по распространенности среди злокачественных опухолей в мире [49]. Традиционные методы диагностики КРР являются инвазивными и зачастую болезненными. Разработка новых неинвазивных методов диагностики может снизить уровень смертности за счет более ранней диагностики [50]. Большинство биомаркеров КРР, ассоциированных с ВВ, представляют собой РНК (в частности, микроРНК). Метаанализ 159 публикаций позволил выявить три микроРНК, общих для всех стадий заболевания: miR-146a-5p, miR-22-3p и miR-23b-3p [51]. Кроме того, обнаружены семь микроРНК, специфичных для определенных стадий КРР: стадия I – miR-301a-3p и miR-548i; стадия IIIA – miR-23a-3p; стадия IV – miR-194-3p, miR-33a-3p, miR-485-3p и miR-194-5p [51]. Однако содержание данных маркеров в биологических жидкостях заметно варьирует, что подчеркивает необходимость их дальнейшей валидации. Выявлено несколько типов ВВ-микроРНК в сыворотке крови, включая let-7a-5p, let-7c-5p, let-7f-5p, let-7d-3p, miR-423-5p,

miR-584-5p, miR-30a-5p, miR-99-5p, miR-150-5p, miR-26-5p и miR-204-5p [52]. С помощью биоинформатического анализа показано, что семейство микроРНК let-7 нацелено на ключевые гены в сигнальном пути TGF- β , включая TGF β RI и SMAD2, которые играют значительную роль в опухолевом процессе. Кроме того, выделены еще пять ВВ-микроРНК (hsa-miR-126, hsa-miR-139, hsa-miR-141, hsa-miR-29c и hsa-miR-423), обладающих высоким потенциалом в качестве маркеров КРР. При помощи базы данных miRDIIP выявлены связи между этими микроРНК и их мРНК-мишенями, участвующими в регуляции ключевых путей, таких как сигнальный путь В-клеточного рецептора и биосинтез гликосфинголипидов [53]. Длинные некодирующие РНК (lncRNA) также могут вносить вклад в прогрессию КРР и служить прогностическими маркерами заболевания [54, 55]. Потенциальными маркерами заболевания могут быть не только ВВ-РНК, но и некоторые белки, присутствующие в ВВ. Так, прионный белок PrPC, обнаруженный в ВВ при КРР, участвует в формировании условий для метастазирования. Это происходит за счет увеличения проницаемости эндотелия и усиления секреции ангиогенных факторов. Потенциально новым терапевтическим подходом, позволяющим контролировать метастазирование КРР, является сочетание химиотерапии с анти-PrPC-терапией [56].

Гепатоцеллюлярная карцинома

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) – один из самых распространенных видов первичного рака печени, прогноз при котором, несмотря на достижения в лечении, остается в большинстве случаев неблагоприятным. Все больше данных свидетельствует о том, что ВВ могут служить специфическими диагностическими и даже прогностическими биомаркерами ГЦК [57]. Среди наиболее изученных экзосомных биомаркеров ГЦК выделяются микроРНК. Некоторые экзосомные микроРНК могут также использоваться для выбора стратегии лечения на поздних стадиях ГЦК [58]. Например, панель микроРНК, выявленных как потенциальные биомаркеры, включает микроРНК, гиперэкспрессируемые у пациентов с ГЦК: miR-224, miR-21, miR-210-3p, miR-93, miR-92b, miR-155, miR-665 [59]. Напротив, уровень экспрессии микроРНК как miR-718, miR-744, miR-9-3p и miR-125b снижен у пациентов с ГЦК. Объединение нескольких микроРНК в диагностические панели может повысить точность диагностики. В одном из исследований показано, что комбинация miR-26a, miR-29c и miR-199a позволяет эффективно различать пациентов с ГЦК и здоровых людей (AUC = 0.994), а также пациентов

с ГЦК и пациентов с циррозом печени (AUC = 0.965) [60]. Прогностический потенциал при ГЦК демонстрируют также и такие РНК, переносимые ВВ, как кольцевые РНК (circRNA). Например, по уровню hsa_circ_0029325 в ВВ можно предсказывать исход заболевания [61]. Другим типом РНК из ВВ, которые могут использоваться для диагностики ГЦК, являются PIWI-взаимодействующие РНК (piRNA), участвующие в прогрессии рака. Экспрессия piRNA ВВ, выделенных из сыворотки, повышена у пациентов с ГЦК, а некоторые из них (например, piR-15254, piR-1029, novel-piR-35395, novel-piR-32132 и novel-piR-43597) потенциально могут использоваться для диагностики ГЦК даже у пациентов с низкой опухолевой нагрузкой [62].

Белки ВВ также могут служить ценными прогностическими биомаркерами при ГЦК. Например, снижение уровня CD31 в ВВ пациентов с ГЦК коррелировало с рецидивом ГЦК через 12 месяцев после хирургического вмешательства [63]. Протеомное профилирование позволило сформировать панель дифференциально экспрессируемых белков – VWF, LGALS3BP, TGFB1, SERPINC1, HPX, HP, HBA1, FGA, FGG и FGB – которые могут составить основу диагностической панели ГЦК [64]. МикроРНК, circRNA, piRNA и белки ВВ представляют собой многообещающие неинвазивные биомаркеры для улучшения диагностики, прогноза и мониторинга лечения ГЦК, открывая новые возможности для персонализированного подхода к лечению пациентов.

Рак поджелудочной железы

Рак поджелудочной железы (РПЖЖ) занимает третье место среди причин смертности, связанных с онкологическими заболеваниями [65]. Протоковая аденокарцинома поджелудочной железы – наиболее распространенная форма рака поджелудочной железы, составляет более 90% всех случаев этого заболевания. РПЖЖ отличается высокой летальностью с пятилетней выживаемостью менее 10% [66]. Решающее значение для улучшения прогноза данного заболевания имеет ранняя диагностика. Недавние достижения в области машинного обучения способствовали идентификации новых потенциальных биомаркеров на основе ВВ, которые могут помочь в ранней диагностике РПЖЖ. Использование машинного обучения для анализа белков ВВ позволило выявить панель из семи потенциальных биомаркеров РПЖЖ (муцин-1, сialiрированный х-антиген Льюиса, ферритин, фактор роста фибробластов 2, эпидермальный фактор роста человека 3, лептин и пролактин, AUC = 0.971) [67]. Еще одним перспективным биомаркером РПЖЖ,

концентрация которого повышается в ВВ, является глипикан-1. Обнаружение глипикана-1 в ВВ продемонстрировало 100% чувствительность и специфичность для диагностики всех стадий РПЖЖ, позволяя эффективно отличить пациентов с раком поджелудочной железы от здоровых доноров или пациентов с хроническим панкреатитом ($AUC = 1.0$) [68]. Кроме того, miR-21, представленная в ВВ пациентов с РПЖЖ, также может использоваться в качестве биомаркера и прогностического фактора общей выживаемости. Показан высокий потенциал повышенных уровней miR-21 в сочетании с miR-4525 и miR-451a как биомаркеров, позволяющих идентифицировать пациентов с высоким риском рецидива и неблагоприятным прогнозом [69]. Также у пациентов с РПЖЖ обнаружен повышенный (по сравнению с контрольной группой) уровень miR-191 [70]. Некоторые гликаны и липиды ВВ также, по-видимому, обладают потенциалом в качестве диагностических инструментов РПЖЖ, что подчеркивает значимость разнообразных молекул ВВ для жидкостной биопсии этого типа рака [71].

Рак легкого

Рак легкого (РЛ), поражающий миллионы людей ежегодно, остается одним из наиболее часто диагностируемых видов рака и ведущей причиной смертности, связанной с онкологическими заболеваниями [72]. Недавние достижения в области мультиплексного профилирования ВВ и машинного обучения открыли новые возможности для изучения ВВ, выделяемых клетками рака легкого [73]. Так, на основе явления Ферстеровского резонансного переноса энергии была разработана система для детекции мембранных белков ВВ. С использованием этой системы были обнаружены потенциальные диагностические маркеры ранних стадий РЛ (CEA, PD-L1, EpCAM и CA125) [74]. Другой метод, основанный на использовании диэлектрофоретического чипа, позволил выявить повышенные уровни miR-21, miR-191 и miR-192 в ВВ, выделенных из плазмы крови пациентов с раком легких [75]. Дополнительные панели, состоящие из микроРНК, обнаруженных в ВВ, показали свою эффективность в диагностике различных подтипов РЛ на ранних стадиях. Например, miR-483-3p предложена в качестве биомаркера ранних стадий мелкоклеточного рака легкого, а miR-152-3p и miR-1277-5p – ранних стадий немелкоклеточного рака легкого [76]. Кроме того, профилирование гликанов ВВ также может использоваться для диагностики рака легкого. При помощи теста EV-GLYPH, основанного на использовании микрофлюидных подходов, идентифицированы уникальные гликаные сигналы ВВ нетрансформированных и злокачественно

трансформированных клеток легкого. В клиническом исследовании этот тест позволил успешно различать пациентов с ранними стадиями злокачественных новообразований в легких от пациентов с доброкачественными узлами [77].

Рак молочной железы

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным видом рака у женщин. Считается, что в странах с высоким уровнем дохода РМЖ будет диагностирован у каждой восьмой женщины до 85 лет [78]. Определение молекулярного профиля ВВ при РМЖ обладает высоким потенциалом в качестве ранней неинвазивной диагностики, прогноза и мониторинга заболевания [79]. Показано, что протеомное профилирование ВВ, выделенных из клеточных линий РМЖ, позволяет дифференцировать различные подтипы РМЖ более эффективно, чем профилирование самих опухолевых клеток [80]. Отмечено также, что белковый состав ВВ, секретируемых клетками РМЖ, в значительной степени отражает их молекулярный подтип (например, HER2-положительный или трижды негативный РМЖ) [80]. В другом исследовании анализ ВВ из плазмы пациентов с РМЖ выявил 10 кандидатных биомаркеров, уровни которых у пациентов с РМЖ были выше, чем у здоровых доноров (CD3, CD56, CD2, CD25, CD9, CD44, CD326, CD133/1, CD142 и CD14). Показано, что липидный профиль ВВ, включая сфинголипиды и фосфолипиды, значительно отличается от профиля выделяющих их опухолевых клеток, которые сильнее обогащены триглицеридами и жирными кислотами. ВВ, выделенные из плазмы пациентов с РМЖ, охарактеризованы как источники липидных биомаркеров для раннего выявления РМЖ и его подтипов (ER/PR+, HER2+ и трижды негативный РМЖ) [81]. Кроме того, микроРНК, полученные из ВВ, также могут использоваться для диагностики РМЖ [82].

Основные маркеры, упомянутые в данном обзоре, перечислены в *табл. 1*.

ИННОВАЦИОННЫЕ МЕТОДЫ УЛУЧШЕНИЯ ДЕТЕКЦИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ

Эффективный поиск биомаркеров на основе ВВ требует увеличения чувствительности детекции таких маркеров по сравнению с существующими классическими методами, такими как масс-спектрометрия и вестерн-блоттинг. Применение искусственного интеллекта и методов машинного обучения способно существенно улучшить предел детекции биомаркеров на основе ВВ методом жидкостной биопсии. Один из подходов, улучшающих детекцию ВВ, – FluoPADE (англ. Fluorescence po-

Таблица 1. ВВ-ассоциированные маркеры для диагностики онкологических заболеваний

Тип биомаркера	Название	Ассоциированные патологии	Ссылка
РНК	miR-21 ↑	РПЖ	[44, 45]
		ГЦК	[59]
		РПЖЖ	[69, 70]
		РЛ	[75]
		РМЖ	[82]
	miR-141 ↑	РПЖ	[46, 47]
	miR-146a-5p ↑ miR-22-3p ↑ miR-23b-3p ↑ miR-301a-3p ↑ miR-548i ↑ miR-23a-3p ↑ miR-194-3p ↑ miR-33a-3p ↑ miR-485-3p ↑ miR-194-5p ↑	КРР	[51]
	let-7a-5p ↑ let-7c-5p ↑ let-7f-5p ↑ let-7d-3p ↑ miR-423-5p ↑ miR-584-5p ↑ miR-30a-5p ↑ miR-99-5p ↑ miR-150-5p ↑ miR-26-5p ↑ miR-204-5p ↑	КРР	[52]
	miR-126 ↑ miR-139 ↑ miR-141 ↑ miR-29c ↑ miR-423 ↑	КРР	[53]
	miR-224 ↑ miR-21 ↑ miR-210-3p ↑ miR-93 ↑ miR-92b ↑ miR-155 ↑ miR-665 ↑	ГЦК	[59]
	miR-718 ↓ miR-744 ↓ miR-9-3p ↓ miR-125b ↓	ГЦК	[59]
	miR-26a ↑ miR-29c ↑ miR-199a ↑	ГЦК	[60]
	hsa_circ_0029325 ↑	ГЦК	[61]
	piR-15254 ↑ piR-1029 ↑ novel-piR-35395 ↑ novel-piR-32132 ↑ novel-piR-43597 ↑	ГЦК	[62]
	miR-4525 ↑ miR-451a ↑	РПЖЖ	[69]
	miR-191 ↑ miR-192 ↑	РЛ	[75]
	miR-483-3p ↑ miR-152-3p ↑ miR-1277-5p ↑	РЛ	[76]
	miR-375 ↑	РПЖ	[44, 45]
	miR-574 ↑	РПЖ	[44]

Тип биомаркера	Название	Ассоциированные патологии	Ссылка
Белки	Клеточный прионный белок	KPP	[56]
	CD31	ГЦК	[63]
	Фактор Виллебранда Белок, связывающий галектин-3 Трансформирующий фактор роста бета 1 Антитромбин III Гемопексин Гаптоглобин Субъединица гемоглобина альфа 1 Фибриноген, альфа-цепь Фибриноген, гамма-цепь Фибриноген, бета-цепь	ГЦК	[64]
	Муцин-1 Сиалированный x-антиген Льюиса Ферритин Фактор роста фибробластов 2 Эпидермальный фактор роста 3 Лептин Пролактин	РПЖЖ	[67]
	Глипикан-1	РПЖЖ	[68]
	CEA PD-L1 EpcAM CA125	РЛ	[74]
	PSA	РПЖ	[48]
	Церамиды Сфингомиелины Гексозилцерамиды Лизофосфатидилхолины Лизофосфатидилэтаноламины Фосфатидилхолины Плазмалогены – фосфатидилэтаноламины с простой эфирной связью	РМЖ	[81]

Примечание. ВВ – внеклеточные везикулы; KPP – колоректальный рак; РПЖЖ – рак поджелудочной железы; РЛ – рак легкого; РМЖ – рак молочной железы; ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома; РПЖ – рак предстательной железы; CA125 – антиген рака 125. CEA – раковоэмбриональный антиген; EpcAM (молекула адгезии эпителиальных клеток); PD-L1 – лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1; PSA (англ. Prostate-specific antigen) – специфический антиген простаты.

Стрелка вверх (↑) указывает на повышение, стрелка вниз (↓) – на снижение содержания РНК во внеклеточных везикулах в образцах пациентов с онкологическими заболеваниями относительно образцов здоровых доноров.

larization using aptamers for the detection of extracellular nanovesicles – поляризация флуоресценции с использованием аптамеров для обнаружения внеклеточных нановезикул [83]. Этот метод основан на использовании ДНК-аптамеров и флуоресцентной поляризации для детекции ВВ в плазме человека и культуральной среде. Специфичность анализа достигается фиксацией ВВ с помощью антител и последующей детекцией с использованием ДНК-аптамера, который нацелен на специфический биомаркер ВВ. Этот метод можно использовать для раннего выявления рака, определения микрометастазов и мониторинга минимальной остаточной болезни. Другой подход включает ДНК-кодирование ВВ для изучения их поверхностного белкового состава [84]. Преимуществом этой технологии является возможность изучения состава отдельных

экзосом. Разработан также метод, использующий наноструктурированные 3D-сенсоры, для молекулярного и функционального профилирования ВВ стволовых опухолевых клеток. Эти высокочувствительные сенсоры позволили детектировать до 10 отдельных ВВ в 10 мкл, а при подключении алгоритмов искусственного интеллекта удалось со 100% чувствительностью и специфичностью отличить опухолевые образцы от нормальных [85]. Еще один метод, DCR-IEVN (англ. – DNA cascade reaction-triggered individual EV nanoencapsulation – индивидуальная наноинкапсуляция ВВ, вызванная каскадной реакцией ДНК), позволяет инкапсулировать субпопуляции ВВ напрямую из клинических образцов сыворотки крови. При интеграции с алгоритмами машинного обучения этот подход показал высокую диагностическую точность для ГЦК [86].

Хошино и соавт. провели масштабный протеомный анализ ВВ из различных тканей, клеток и биологических жидкостей [87]. Показано, что классические маркеры ВВ, такие как CD63, TSG101, флотиллины и ALIX, недостаточно представлены в ВВ плазмы человека. Вместо них были предложены альтернативные маркеры для выделения ВВ, такие как MSN, FLNA, STOM и RAP1B. Затем, с использованием методов машинного обучения была определена панель белков ВВ, специфичных для определенных типов опухолей, которая также может применяться для диагностики рака неизвестной первичной локализации. Детектировать белки и специфические РНК в индивидуальных ВВ можно с использованием методики SPIRFISH, объединяющей технологию сенсоров интерферометрического отражения с флуоресцентной гибридизацией *in situ*, что обеспечивает высокую чувствительность и специфичность определения [88].

В современных исследованиях ВВ активно используется искусственный интеллект. Так, алгоритмы глубокого обучения применили для профилирования микроРНК на уровне отдельных ВВ [89]. Этот метод сочетает TIRF-изображение (англ. total internal reflection fluorescence microscope – метод флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения), которое одновременно обнаруживает несколько микроРНК *in situ* в индивидуальных ВВ, с алгоритмом для автоматизированного анализа изображений. Другой алгоритм глубокого обучения использует наноплазмонные спектры для анализа мутированных экзосомальных белков, что может быть перспективным для мониторинга эффективности терапии опухолей [90].

Ограниченная доступность некоторых биологических жидкостей побудила исследователей к разработке инновационных методов выделения ВВ. Предложено использовать наноллисты целлюлозы, которые способны эффективно захватывать ВВ из малого объема жидкости, что позволяет про-

водить последующее секвенирование малых РНК [91]. Использование жидкостной биопсии ВВ имеет множество преимуществ перед классическими методами диагностики. Во-первых, это неинвазивный метод, который способен свести к минимуму потребность в таких процедурах, как пункция или биопсия тканей, предоставляя пациентам больше вариантов и помогая отслеживать прогрессирование болезни и эффективность терапии. Также плюсом данного метода является возможность его использования для анализа всех биологических жидкостей, что позволяет всесторонне охарактеризовать различные опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВВ являются ключевыми участниками опухолевой прогрессии. Способность переносить биологически активные молекулы и изменять микроокружение опухоли делает ВВ мощными медиаторами прогрессии опухолей, метастазирования и уклонения от иммунного надзора. При этом ВВ являются перспективными инструментами для ранней диагностики и мониторинга онкологических заболеваний с помощью методов жидкостной биопсии. Недавние достижения в области выделения и характеристики ВВ значительно улучшили точность и эффективность их изучения, особенно в контексте онкологии. Разработка инновационных методов, таких как высокопроизводительные микрофлюидные установки и алгоритмы машинного обучения, позволила повысить возможности детекции и анализа ВВ, более глубоко определить их молекулярный состав и функциональные свойства. Таким образом, изучение отклонений в молекулярном составе ВВ при онкологических заболеваниях открывает огромный потенциал для будущего персонализированного лечения и диагностики опухолей. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда № 22-14-00219.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Buzas E.I. // Nat. Rev. Immunol. 2023. V. 23. № 4. P. 236–250. doi: 10.1038/s41577-022-00763-8
2. Jeppesen D.K., Zhang Q., Franklin J.L., Coffey R.J. // Trends Cell Biol. 2023. V. 33. № 8. P. 667–681. doi: 10.1016/j.tcb.2023.01.002
3. Doyle L.M., Wang M.Z. // Cells. 2019. V. 8. № 7. P. 727. doi: 10.3390/cells8070727
4. Chuo S.T.-Y., Chien J.C.-Y., Lai C.P.-K. // J. Biomed. Sci. 2018. V. 25. № 1. P. 91. doi: 10.1186/s12929-018-0494-5
5. Dai J., Su Y., Zhong S., Cong L., Liu B., Yang J., Tao Y., He Z., Chen C., Jiang Y. // Signal Transduct. Target. Ther. 2020. V. 5. № 1. P. 145. doi: 10.1038/s41392-020-00261-0
6. Clos-Sansalvador M., Monguió-Tortajada M., Roura S., Franquesa M., Borràs F.E. // Eur. J. Cell Biol. 2022. V. 101. № 3. P. 151227. doi: 10.1016/j.ejcb.2022.151227
7. Ovchinnikova L.A., Tanygina D.Y., Dzhelad S.S., Evtushenko E.G., Bagrov D.V., Gabibov A.G., Lomakin Y.A. // Heliyon. 2024. V. 10. № 24. P. e40940. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e40940
8. Leong S.Y., Lok W.W., Goh K.Y., Ong H.B., Tay H.M., Su C., Kong F., Upadya M., Wang W., Radnaa E., et al. // ACS Nano. 2024. V. 18. № 8. P. 6623–6637. doi: 10.1021/acsnano.3c12862
9. Lyu T.S., Ahn Y., Im Y.-J., Kim S.-S., Lee K.-H., Kim J., Choi Y., Lee D., Kang E., Jin G., et al. // PLoS One. 2021. V. 16. № 1. P. e0231994. doi: 10.1371/journal.pone.0231994
10. Wu S., Zhao Y., Zhang Z., Zuo C., Wu H., Liu Y. //

- Photonics. 2024. V. 11. № 2. P. 101. doi: 10.3390/photonics11020101
11. Han Q.-F., Li W.-J., Hu K.-S., Gao J., Zhai W.-L., Yang J.-H., Zhang S.-J. // *Mol. Cancer*. 2022. V. 21. № 1. P. 207. doi: 10.1186/s12943-022-01671-0
 12. Lee Y.J., Shin K.J., Chae Y.C. // *Exp. Mol. Med.* 2024. V. 56. № 4. P. 877–889. doi: 10.1038/s12276-024-01209-y
 13. Rabia M., Leuzy V., Soulage C., Durand A., Fourmaux B., Errazuriz-Cerda E., Köffel R., Draeger A., Colosetti P., Jalabert A., et al. // *Biochimie*. 2020. V. 178. P. 26–38. doi: 10.1016/j.biochi.2020.07.005
 14. Ghadami S., Dellinger K. // *Front. Mol. Biosci.* 2023. V. 10. P. 1198044. doi: 10.3389/fmolb.2023.1198044
 15. Donoso-Quezada J., Ayala-Mar S., González-Valdez J. // *Traffic*. 2021. V. 22. № 7. P. 204–220. doi: 10.1111/tra.12803
 16. Lea J., Sharma R., Yang F., Zhu H., Ward E.S., Schroit A.J. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 9. P. 14395–14407. doi: 10.18632/oncotarget.14795
 17. Teng F., Fussenegger M. // *Adv. Sci. (Weinh)*. 2020. V. 8. № 1. P. 2003505. doi: 10.1002/adv.202003505
 18. Sun M., Xue X., Li L., Xu D., Li S., Li S.C., Su Q. // *Quant. Imaging Med. Surg.* 2021. V. 11. № 11. P. 4604–4616. doi: 10.21037/qims-20-1015
 19. Surman M., Stepień E., Hoja-Łukowicz D., Przybyło M. // *Clin. Exp. Metastasis*. 2017. V. 34. № 3–4. P. 273–289. doi: 10.1007/s10585-017-9844-z
 20. Ratajczak M.Z., Ratajczak J. // *Leukemia*. 2020. V. 34. № 12. P. 3126–3135. doi: 10.1038/s41375-020-01041-z
 21. Anderson N.M., Simon M.C. // *Curr. Biol.* 2020. V. 30. № 16. P. R921–R925. doi: 10.1016/j.cub.2020.06.081
 22. Guo Z., Wang G., Yun Z., Li Y., Huang B., Jin Q., Chen Y., Xu L., Lv W. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2023. V. 149. № 19. P. 17581–17595. doi: 10.1007/s00432-023-05450-2
 23. Paskeh M.D.A., Entezari M., Mirzaei S., Zabolian A., Saleki H., Naghdi M.J., Sabet S., Khoshbakht M.A., Hashemi M., Hushmandi K., et al. // *J. Hematol. Oncol.* 2022. V. 15. № 1. P. 83. doi: 10.1186/s13045-022-01305-4
 24. Zhou L., Yang K., Andl T., Wickett R.R., Zhang Y. // *J. Cancer*. 2015. V. 6. № 8. P. 717–726. doi: 10.7150/jca.10865
 25. Peng Z., Tong Z., Ren Z., Ye M., Hu K. // *Mol. Med.* 2023. V. 29. № 1. P. 66. doi: 10.1186/s10020-023-00665-y
 26. Zhao H., Yang L., Baddour J., Achreja A., Bernard V., Moss T., Marini J.C., Tudawe T., Seviour E.G., San Lucas F.A., et al. // *eLife*. 2016. V. 5. P. e10250. doi: 10.7554/eLife.10250
 27. Li W., Zhang X., Wang J., Li M., Cao C., Tan J., Ma D., Gao Q. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 56. P. 96035–96047. doi: 10.18632/oncotarget.21635
 28. Luga V., Zhang L., Vilorio-Petit A.M., Ogunjimi A.A., Inanlou M.R., Chiu E., Buchanan M., Hosein A.N., Basik M., Wrana J.L. // *Cell*. 2012. V. 151. № 7. P. 1542–1556. doi: 10.1016/j.cell.2012.11.024
 29. Richards K.E., Zeleniak A.E., Fishel M.L., Wu J., Lit- tlepage L.E., Hill R. // *Oncogene*. 2017. V. 36. № 13. P. 1770–1778. doi: 10.1038/onc.2016.353
 30. Kewitz-Hempel S., Windisch N., Hause G., Müller L., Sunderkötter C., Gerloff D. // *J. Extracell. Vesicles*. 2024. V. 13. № 9. P. e12509. doi: 10.1002/jev.212509
 31. Geng Z., Pan X., Xu J., Jia X. // *J. Cell Commun. Signal*. 2023. V. 17. № 3. P. 391–407. doi: 10.1007/s12079-022-00698-8
 32. Vyhľádalová Kotrbová A., Gömöryová K., Mikulová A., Plešingerová H., Sladeček S., Kravec M., Hrachovinová Š., Potěšil D., Dunsmore G., Blériot C., et al. // *J. Extracell. Vesicles*. 2024. V. 13. № 3. P. e12420. doi: 10.1002/jev.212420
 33. Hyung S., Ko J., Heo Y.J., Blum S.M., Kim S.T., Park S.H., Park J.O., Kang W.K., Lim H.Y., Klempner S.J., et al. // *Sci. Adv.* 2023. V. 9. № 47. P. eadk1098. doi: 10.1126/sciadv.adk1098
 34. Tang M.K.S., Yue P.Y.K., Ip P.P., Huang R.-L., Lai H.-C., Cheung A.N.Y., Tse K.Y., Ngan H.Y.S., Wong A.S.T. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 2270. doi: 10.1038/s41467-018-04695-7
 35. Miaomiao S., Xiaoqian W., Yuwei S., Chao C., Chenbo Y., Yinghao L., Yichen H., Jiao S., Kuisheng C. // *Sci. Rep.* 2023. V. 13. № 1. P. 9671. doi: 10.1038/s41598-023-36092-6
 36. Costa-Silva B., Aiello N.M., Ocean A.J., Singh S., Zhang H., Thakur B.K., Becker A., Hoshino A., Mark M.T., Molina H., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2015. V. 17. № 6. P. 816–826. doi: 10.1038/ncb3169
 37. Haderk F., Schulz R., Iskar M., Cid L.L., Worst T., Willmund K.V., Schulz A., Warnken U., Seiler J., Benner A., et al. // *Sci. Immunol.* 2017. V. 2. № 13. P. eaah5509. doi: 10.1126/sciimmunol.aah5509
 38. Ricklefs F.L., Alayo Q., Krenzlin H., Mahmoud A.B., Speranza M.C., Nakashima H., Hayes J.L., Lee K., Balaj L., Passaro C., et al. // *Sci. Adv.* 2018. V. 4. № 3. P. eaar2766. doi: 10.1126/sciadv.aar2766
 39. Yin X., Zeng W., Wu B., Wang L., Wang Z., Tian H., Wang L., Jiang Y., Clay R., Wei X., et al. // *Cell Rep.* 2020. V. 33. № 3. P. 108278. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108278
 40. Poulet G., Massias J., Taly V. // *Acta Cytol.* 2019. V. 63. № 6. P. 449–455. doi: 10.1159/000499337
 41. Yu D., Li Y., Wang M., Gu J., Xu W., Cai H., Fang X., Zhang X. // *Mol. Cancer*. 2022. V. 21. № 1. P. 56. doi: 10.1186/s12943-022-01509-9
 42. Ramirez-Garrastacho M., Bajo-Santos C., Line A., Martens-Uzunova E.S., de la Fuente J.M., Moros M., Soekmadji C., Tasken K.A., Llorente A. // *Br. J. Cancer*. 2022. V. 126. № 3. P. 331–350. doi: 10.1038/s41416-021-01610-8
 43. Casanova-Salas I., Aguilar D., Cordoba-Terreros S., Agundez L., Brandariz J., Herranz N., Mas A., Gonzalez M., Morales-Barrera R., Sierra A., et al. // *Cancer Cell*. 2024. V. 42. № 7. P. 1301–1312.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2024.06.003
 44. Li M., Rai A.J., DeCastro G.J., Zeringer E., Barta T., Magdaleno S., Setterquist R., Vlassov A.V. // *Methods*. 2015. V. 87. P. 26–30. doi: 10.1016/j.jymeth.2015.03.009
 45. Foj L., Ferrer F., Serra M., Arévalo A., Gavagnach M., Giménez N., Filella X. // *Prostate*. 2017. V. 77. № 6. P. 573–583. doi: 10.1002/pros.23295
 46. Li W., Dong Y., Wang K.J., Deng Z., Zhang W., Shen H.F. // *Neoplasma*. 2020. V. 67. № 6. P. 1314–1318. doi: 10.4149/neo_2020_191130N1234
 47. Li Z., Ma Y.-Y., Wang J., Zeng X.-F., Li R., Kang W., Hao X.-K. // *Onco Targets Ther.* 2016. V. 9. P. 139–148. doi: 10.2147/OTT.S95565
 48. Logozzi M., Angelini D.F., Iessi E., Mizzoni D., Di Raimo R., Federici C., Lugini L., Borsellino G., Gentilucci A., Pierella F., et al. // *Cancer Lett.* 2017. V. 403. P. 318–329. doi: 10.1016/j.canlet.2017.06.036
 49. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. // *CA Cancer J. Clin.* 2021. V. 71. № 3. P. 209–249. doi: 10.3322/caac.21660
 50. Brenne S.S., Madsen P.H., Pedersen I.S., Hveem K., Skorpén F., Krarup H.B., Giskeødegård G.F., Laugsand E.A. // *Br. J. Cancer*. 2023. V. 129. № 5. P. 861–868. doi: 10.1038/s41416-023-02337-4
 51. Long F., Tian L., Chai Z., Li J., Tang Y., Liu M. // *Front. Med. (Lausanne)*. 2022. V. 9. P. 881788. doi: 10.3389/fmed.2022.881788,

52. Bakhsh T., Alhazmi S., Farsi A., Yusuf A.S., Alharthi A., Qahl S.H., Alghamdi M.A., Alzahrani F.A., Elgaddar O.H., Ibrahim M.A., et al. // *Sci. Rep.* 2024. V. 14. № 1. P. 8902. doi: 10.1038/s41598-024-58536-3
53. Ma J., Wang P., Huang L., Qiao J., Li J. // *BMC Med. Genomics.* 2021. V. 14. № 1. P. 60. doi: 10.1186/s12920-021-00905-2
54. Hu D., Zhan Y., Zhu K., Bai M., Han J., Si Y., Zhang H., Kong D. // *Cell. Physiol. Biochem.* 2018. V. 51. № 6. P. 2704–2715. doi: 10.1159/000495961
55. Yu M., Song X.-G., Zhao Y.-J., Dong X.-H., Niu L.-M., Zhang Z.-J., Shang X.-L., Tang Y.-Y., Song X.-R., Xie L. // *Front. Oncol.* 2021. V. 11. P. 618967. doi: 10.3389/fonc.2021.618967
56. Yun C.-W., Lee J.-H., Go G., Jeon J., Yoon S., Lee S.-H. // *Cancers (Basel).* 2021. V. 13. № 9. P. 2144. doi: 10.3390/cancers13092144
57. Sasaki R., Kanda T., Yokosuka O., Kato N., Matsuoka S., Moriyama M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 6. P. 1406. doi: 10.3390/ijms20061406
58. Liu M., Lai Z., Yuan X., Jin Q., Shen H., Rao D., Huang D. // *Mol. Med.* 2023. V. 29. № 1. P. 136. doi: 10.1186/s10020-023-00731-5
59. Sorop A., Constantinescu D., Cojocaru F., Dinischiotu A., Cucu D., Dima S.O. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 9. P. 4997. doi: 10.3390/ijms22094997
60. Yang J., Dong W., Zhang H., Zhao H., Zeng Z., Zhang F., Li Q., Duan X., Hu Y., Xiao W. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. V. 10. P. 927251. doi: 10.3389/fcell.2022.927251
61. Yin K.-L., Sun T., Duan Y.-X., Ye W.-T., Ming Li, Liao R. // *Discov. Oncol.* 2024. V. 15. № 1. P. 212. doi: 10.1007/s12672-024-01060-7
62. Rui T., Wang K., Xiang A., Guo J., Tang N., Jin X., Lin Y., Liu J., Zhang X. // *Int. J. Nanomedicine.* 2023. V. 18. P. 1989–2001. doi: 10.2147/IJN.S398462
63. Juratli M.A., Pollmann N.S., Oppermann E., Mohr A., Roy D., Schnitzbauer A., Michalik S., Vogl T., Stoecklein N.H., Houben P., et al. // *Sci. Rep.* 2024. V. 14. № 1. P. 5322. doi: 10.1038/s41598-024-55888-8
64. Zhao L., Shi J., Chang L., Wang Y., Liu S., Li Y., Zhang T., Zuo T., Fu B., Wang G., et al. // *ACS Omega.* 2021. V. 6. № 1. P. 827–835. doi: 10.1021/acsomega.0c05408
65. Ilic I., Ilic M. // *World J. Gastroenterol.* 2022. V. 28. № 32. P. 4698–4715. doi: 10.3748/wjgv28.i32.4698
66. Connor A.A., Gallinger S. // *Nat. Rev. Cancer.* 2022. V. 22. № 3. P. 131–142. doi: 10.1038/s41568-021-00418-1
67. Hinestrosa J.P., Sears R.C., Dhani H., Lewis J.M., Schroeder G., Balcer H.I., Keith D., Sheppard B.C., Kurzrock R., Billings P.R. // *Commun. Med. (London).* 2023. V. 3. № 1. P. 146. doi: 10.1038/s43856-023-00351-4
68. Melo S.A., Luecke L.B., Kahlert C., Fernandez A.F., Gammon S.T., Kaye J., LeBleu V.S., Mittendorf E.A., Weitz J., Rahbari N., et al. // *Nature.* 2015. V. 523. № 7559. P. 177–182. doi: 10.1038/nature14581
69. Kawamura S., Iinuma H., Wada K., Takahashi K., Minezaki S., Kainuma M., Shibuya M., Miura F., Sano K. // *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 2019. V. 26. № 2. P. 63–72. doi: 10.1002/jhbp.601
70. Goto T., Fujiya M., Konishi H., Sasajima J., Fujibayashi S., Hayashi A., Utsumi T., Sato H., Iwama T., Ijiri M., et al. // *BMC Cancer.* 2018. V. 18. № 1. P. 116. doi: 10.1186/s12885-018-4006-5
71. Zhang W., Campbell D.H., Walsh B.J., Packer N.H., Liu D., Wang Y. // *J. Nanobiotechnology.* 2022. V. 20. № 1. P. 446. doi: 10.1186/s12951-022-01641-0
72. Thai A.A., Solomon B.J., Sequist L.V., Gainor J.F., Heist R.S. // *Lancet.* 2021. V. 398. № 10299. P. 535–554. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00312-3
73. Huang G., Zheng W., Zhou Y., Wan M., Hu T. // *Acta Pharm. Sin. B.* 2024. V. 14. № 9. P. 3855–3875. doi: 10.1016/j.apsb.2024.06.010
74. Xiao S., Yao Y., Liao S., Xu B., Li X., Zhang Y., Zhang L., Chen Q., Tang H., Song Q., et al. // *Nano Lett.* 2023. V. 23. № 17. P. 8115–8125. doi: 10.1021/acs.nanolett.3c02193
75. Chen J., Xu Y., Wang X., Liu D., Yang F., Zhu X., Lu Y., Xing W. // *Lab. Chip.* 2019. V. 19. № 3. P. 432–443. doi: 10.1039/c8lc01193a
76. Jiang Y.-F., Wei S.-N., Geng N., Qin W.-W., He X., Wang X.-H., Qi Y.-P., Song S., Wang P. // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 17201. doi: 10.1038/s41598-022-22194-0
77. Zhou Q., Niu X., Zhang Z., O'Byrne K., Kulasinghe A., Fielding D., Möller A., Wuethrich A., Lobb R.J., Trau M. // *Adv. Sci. (Weinh).* 2024. V. 11. № 33. P. e2401818. doi: 10.1002/advs.202401818
78. Britt K.L., Cuzick J., Phillips K.-A. // *Nat. Rev. Cancer.* 2020. V. 20. № 8. P. 417–436. doi: 10.1038/s41568-020-0266-x
79. Bandu R., Oh J.W., Kim K.P. // *Proteomics.* 2024. V. 24. № 11. P. e2300062. doi: 10.1002/pmic.202300062
80. Rontogianni S., Synadaki E., Li B., Liefwaard M.C., Lips E.H., Wesseling J., Wu W., Altelaar M. // *Commun. Biol.* 2019. V. 2. P. 325. doi: 10.1038/s42003-019-0570-8
81. Dorado E., Doria M.L., Nagelkerke A., McKenzie J.S., Maneta-Stavarakaki S., Whittaker T.E., Nicholson J.K., Coombes R.C., Stevens M.M., Takats Z. // *J. Extracell. Vesicles.* 2024. V. 13. № 3. P. e12419. doi: 10.1002/jev2.12419
82. Lee Y., Ni J., Beretov J., Wasinger V.C., Graham P., Li Y. // *Mol. Cancer.* 2023. V. 22. № 1. P. 33. doi: 10.1186/s12943-023-01741-x
83. Pham C.V., Chowdhury R., Patel S., Jaysawal S.K., Hou Y., Xu H., Jia L., Zhang Y.-M., Wang X., Duan W., et al. // *J. Extracell. Vesicles.* 2024. V. 13. № 9. P. e12502. doi: 10.1002/jev2.12502
84. Wu D., Yan J., Shen X., Sun Y., Thulin M., Cai Y., Wik L., Shen Q., Oelrich J., Qian X., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 3854. doi: 10.1038/s41467-019-11486-1
85. Haldavnekar R., Venkatakrishnan K., Tan B. // *ACS Nano.* 2022. V. 16. № 8. P. 12226–12243. doi: 10.1021/acsnano.2c02971
86. Li X., Liu Y., Fan Y., Tian G., Shen B., Zhang S., Fu X., He W., Tao X., Ding X., et al. // *ACS Nano.* 2024. V. 18. № 17. P. 11389–11403. doi: 10.1021/acsnano.4c01310
87. Hoshino A., Kim H.S., Bojmar L., Gyan K.E., Cioffi M., Hernandez J., Zambirinis C.P., Rodrigues G., Molina H., Heissel S., et al. // *Cell.* 2020. V. 182. № 4. P. 1044–1061.e18. doi: 10.1016/j.cell.2020.07.009
88. Troyer Z., Gololobova O., Koppula A., Liao Z., Horns F., Elowitz M.B., Tosar J.P., Batish M., Witwer K.W. // *ACS Nano.* 2024. V. 18. № 39. P. 26568–26584. doi: 10.1021/acsnano.4c03679
89. Zhang X.-W., Qi G.-X., Liu M.-X., Yang Y.-F., Wang J.-H., Yu Y.-L., Chen S. // *ACS Sens.* 2024. V. 9. № 3. P. 1555–1564. doi: 10.1021/acssensors.3c02789
90. Kim S., Choi B.H., Shin H., Kwon K., Lee S.Y., Yoon H.B., Kim H.K., Choi Y. // *ACS Sens.* 2023. V. 8. № 6. P. 2391–2400. doi: 10.1021/acssensors.3c00681
91. Yokoi A., Yoshida K., Koga H., Kitagawa M., Nagao Y., Iida M., Kawaguchi S., Zhang M., Nakayama J., Yamamoto Y., et al. // *Nat. Commun.* 2023. V. 14. № 1. P. 6915. doi: 10.1038/s41467-023-42593-9

УДК 581.1.577.21:575.113.12

Идентификация генов халконсинтаз чеснока (*Allium sativum* L.) и уровень их экспрессии в ответ на стрессовые факторы

О. К. Анисимова, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева, М. А. Филюшин*

Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, 119071 Россия

*E-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 19.02.2025

Принята к печати 13.03.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27639

РЕФЕРАТ Защитный ответ растений ассоциирован с накоплением флавоноидов, путь биосинтеза которых в растениях чеснока *Allium sativum* L. не охарактеризован. В данной работе в геноме *A. sativum* идентифицированы восемь генов халконсинтаз *AsCHS1–8*, предположительно катализирующих первую стадию синтеза флавоноидов в растениях чеснока. Установлено, что эти гены локализованы на четырех хромосомах. Гены *AsCHS2*, 6–8 содержат 1–2 интрона, тогда как *AsCHS1*, 3–5 безинтронные. Анализ органо-специфичных профилей экспрессии генов выявил значимый уровень транскриптов только *AsCHS3* и 8. И только для *AsCHS8* показано изменение уровня экспрессии при воздействии абиотических стрессоров (засоление, засуха, холод) и экзогенных фитогормонов (абсцизовая кислота, метилжасмонат). Полученные результаты позволяют предположить, что два гена из восьми – *AsCHS3* и 8 могут определять синтез флавоноидов повсеместно в процессе развития растения чеснока; из них *AsCHS8* экспрессируется существенно выше и участвует в ответе растения на стрессовые факторы. Остальные шесть генов (*AsCHS1*, 2, 4–7) могут участвовать в биосинтезе флавоноидов в узкоспециализированных клетках/тканях/органах или на отдельных стадиях развития растения чеснока. Проведенные нами идентификация и характеристика генов *AsCHS1–8* халконсинтаз чеснока может стать основой для дальнейшего анализа механизмов регуляции стрессовой адаптации *A. sativum*, а также других видов *Allium*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биосинтез флавоноидов, халконсинтаза *CHS*, стрессовый ответ, чеснок *Allium sativum* L.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ *CHS* – халконсинтаза; АБК – абсцизовая кислота; MeJA – метилжасмонат; ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени.

ВВЕДЕНИЕ

Защитный ответ растений ассоциирован с накоплением флавоноидов – класса растительных полифенолов, состоящего более чем из 6900 вторичных метаболитов с широким спектром функций в развитии растения [1, 2]. Обладая антиоксидантной активностью [3, 4], флавоноиды играют важную роль в защите растений от биотических и абиотических стрессовых факторов [5, 6], а также способны оказывать на организм человека антиоксидантное, иммуномодулирующее, антибактериальное и другие действия [7].

Путь биосинтеза флавоноидов высококонсервативен, и у многих видов растений к настоящему времени идентифицированы как структурные (ферменты) гены, определяющие разные стадии биосинтеза, так и гены, координирующие активность структур-

ных генов [8–12]. Ключевыми ферментами пути являются халконсинтазы (*CHS*; [К.Ф. 2.3.1.74]), с которых начинается биосинтез флавоноидов и которые структурно консервативны у растений [7, 13–15]. На примере множества видов растений показано, что гены *CHS* представлены в геноме семейством паралогичных копий, возникших в результате эволюционных дупликаций и мутаций генов-предшественников [16–21]. Количество членов семейства *CHS* значительно варьирует у разных видов растений, что объясняется эволюционными событиями дупликации и мутациями генов *CHS* с последующей функциональной диверсификацией паралогов [10, 22, 23].

Один из экономически значимых видов однодольных растений – чеснок *Allium sativum* L. (семейство Amaryllidaceae, порядок Asparagales), является не только важной овощной культурой, но и исполь-

зуется в медицине, благодаря своим антиоксидантным свойствам [24]. Луковицы чеснока богаты, в числе прочих антиоксидантов, флавоноидами (особенно кверцетином) [24].

Уникальность вида *A. sativum* заключается в свойственном ему бесполом размножении; редкие фертильные образцы, собранные в Центральной Азии, при искусственном культивировании быстро теряют репродуктивную способность [25]. Новые генотипы чеснока возникают как результат мутаций в вегетативных клонах, приводящих к фенотипическим изменениям [26]. Успеху отбора способствует свойственная *A. sativum* высокая скорость изменчивости морфофизиологических признаков [25, 27], в том числе при адаптации к различным неблагоприятным условиям [25], что связывают с эволюцией флавоноидного пути [28].

Таким образом, изучение генов пути биосинтеза флавоноидов у *A. sativum*, в частности, генов семейства халконсинтаз, *CHS*, может стать вкладом в понимание регуляции данного метаболического пути, а также эволюции и особенностей онтогенеза этого вида. Кроме того, это откроет новые возможности в характеристике мировых коллекций чеснока и отборе стрессоустойчивых генотипов с одновременно улучшенной диетической составляющей для создания сортов. Гены *CHS* у чеснока ранее не изучались. Если рассматривать другие виды *Allium*, то только у лука репчатого (*A. cepa*) идентифицированы гомологи *CHS-A* и *CHS-B*, ассоциированные с окраской луковицы [29], и выявлена активация экспрессии гена *CHS* в ответ на грибную инфекцию [30]. Полное семейство *CHS* (шесть генов) идентифицировано только у одного из видов, наиболее близких к роду *Allium* – *Asparagus officinalis* (порядок Asparagales) [18]. В то же время в 2020 г. был секвенирован и собран геном *A. sativum*, а также секвенированы транскриптомы отдельных органов растения чеснока [31], что делает возможной идентификацию и характеристику генных семейств.

В представленной работе идентифицировано и охарактеризовано семейство генов *CHS*, кодирующих халконсинтазы чеснока, а также изучена динамика экспрессии этих генов в ответ на воздействие абиотических стрессоров (засуха, засоление, холод) и обработку фитогормонами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Идентификация и структурная характеристика генов *CHS* чеснока

Поиск генов проводили в геноме и транскриптомах *A. sativum* сорта Ershuizao (PRJNA606385, Garlic.V2.fa; AlliumDB, <https://allium.qau.edu.cn/>). В ка-

честве референсных использовали халконсинтазы *Arabidopsis thaliana* L. (AT1G02050, AT4G00040, AT4G34850 и AT5G13930).

Выравнивание последовательностей выполняли в MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>). Экзон-интронную структуру генов *AsCHS* определяли, сравнивая геномные и транскриптомные данные (PRJNA606385, Garlic.V2.fa), *cis*-регуляторные элементы в промоторах генов *AsCHS* (2 т.п.н. до старт-кодона) – с помощью PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Для характеристики белков *AsCHS* определяли: консервативные домены и мотивы (NCBI-CDD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>; Multiple Expectation maximizations for Motif Elicitation (MEME) 5.5.7, <http://meme-suite.org/tools/meme>; опубликованные данные [10]); молекулярную массу (Mw), изоэлектрическую точку (pI) и индекс гидропатичности (grand average of hydrophobicity index, GRAVY) (ExpASy, <https://web.expasy.org/protparam/>); функции *AsCHS* (PANNZER, <http://ekhidna2.biocenter.helsinki.fi/sanspanz/>). Филогенетический анализ халконсинтаз проводили (MEGA 7.0, Neighbor-Joining, бутстреп 1000), используя сравнение аминокислотных последовательностей *AsCHS* с гомологами из *A. thaliana*, *Solanum lycopersicum* L. (томат), *Capsicum annuum* L. (перец) (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), *A. cepa* (лук репчатый) и *A. fistulosum* (лук-батун) (AlliumDB, <https://allium.qau.edu.cn/>).

Анализ профиля экспрессии генов *CHS* в различных органах растения чеснока

Экспрессию идентифицированных генов *AsCHS* в органах чеснока определяли *in silico* на основе доступных транскриптомных данных *A. sativum* сорта Ershuizao [31] и визуализировали в виде тепловой карты (Heatmapper, <http://www.heatmapper.ca/expression/>). Экспрессию выражали в значениях FPKM (Fragments per kilo base of transcript per million mapped fragments).

Профиль экспрессии генов *AsCHS* методом ПЦР-РВ анализировали в корнях, донце, луковице, ложном стебле и листьях растений чеснока сорта Сармат, выращенных в открытом грунте в 2024 г. (Федеральный научный центр овощеводства, Московская область). Материал растирали в жидком азоте и использовали для получения суммарной РНК (RNeasy Plant Mini Kit, RNase free DNasey set; QIAGEN, Германия) и кДНК (GoScript™ Reverse Transcription System, Promega, США). На основе идентифицированных последовательностей *AsCHS* разрабатывали специфичные праймеры (табл. 1). В качестве референсных генов использовали

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров для проведения ПЦР-РВ

Ген	Последовательности праймеров (5'→3')*
<i>AsCHS1</i>	F-CGAAGGCCAGCCACCATT R-CGGTCATGTGCTCGCTGTTG
<i>AsCHS2</i>	F-CACCAACTGCAACAACCTTGAC R-CTCCGGGTATGTGGCCAGT
<i>AsCHS3</i>	F-CAAGACGAATACCCAGACTACTAT R-GATGTCTTCGGACAGGTGCATA
<i>AsCHS4</i>	F-GTACCCAGACTACTACTTCCGT R-ATCTTCGGACAGGTGCATGTAC
<i>AsCHS5</i>	F-GTACCCAGACTACTACTTCCGT R-CAGGTGCATGTAGCGTTTCTG
<i>AsCHS6</i>	F-CTCTTCTGGATTCCGCATCCT R-CTGCCATTGACCTCTTCTCA
<i>AsCHS7</i>	F-GCACCGATCTCGCCATGAG R-TAAGCGCTGTTTGATGGTTCGG
<i>AsCHS8</i>	F-CTATCGGTACAGCCGTGCCT R-CATGTAGGCCGTCATGTTTGG
<i>GAPDH</i>	F-CCATGTTTGTGTTGGTGTGAATGAG R-TGGTGCAGCTAGCGTTGGAGAC
<i>UBQ</i>	F-AAGCCAAGATACAGGACAAG R-GCATACCACCTCTCAATCTC

*F – прямой праймер, R – обратный праймер.

GAPDH и *UBQ* [32, 33]. Реакционная смесь включала 3 нг кДНК и набор «Реакционная смесь для проведения РВ-ПЦР в присутствии SYBR GreenI и ROX» (ООО «Синтол», Россия). Реакцию проводили в системе CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, США), в двух биологических и трех технических повторах; программа: 95°C 5 мин; 40 циклов (95°C 15 с, 62°C 50 с). Данные статистически обрабатывали (Two-way ANOVA) и визуализировали в GraphPad Prism v. 8 (<https://www.graphpad.com>).

Симуляция стрессовых условий (засуха, засоление, холод, абсцизовая кислота, метилжасмонат, затемнение) для растений чеснока и анализ ответной динамики экспрессии генов *AsCHS*

В эксперименте использовали 10-дневные растения сорта Сармат, выращенные (ЭУИК, ФИЦ Биотехнологии РАН; день/ночь – 16/8 ч, 22/16°C; освещенность 190 мкМ/(м² · с)) в прозрачных стеклянных стаканах в воде; зубки луковицы закрепляли так, чтобы в воде находилась только зона корней. Опытные растения помещали в растворы, соответствующие моделируемым стрессам (100 мМ NaCl – засоление; 10% PEG-6000 – засуха) и экзогенному воздействию фитогормонов (100 мкМ АБК; 100 мкМ MeJA). Контрольные растения оставались в воде. Холодовой стресс имитировали, помещая

растения в холодильную камеру (4°C, без освещения); контроль – в темноте при 22°C. Через 6 и 24 ч воздействия стресса/гормона отбирали корни и побеги с трех случайно выбранных растений в опыте и контроле; хранили при -80°C.

В опыте с отсутствием освещения растения накрывали светонепроницаемой коробкой (опыт) (10:00); контроль находился при освещении 190 мкМ/(м² · с) (ЭУИК, день/ночь – 16/8 ч). Через 6 ч (16:00) и 24 ч (10:00 следующих суток) отбирали корни и листья в опыте и контроле (по два биологических повтора на каждую точку), хранили при -80°C.

Собранные пробы использовали для выделения РНК/кДНК и проведения ПЦР-РВ как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификация и структурная характеристика генов *AsCHS* чеснока

Халконсинтазы входят в семейство поликетидсинтаз типа III, состоят из двух консервативных доменов *Chal_sti_synt_N* (PF00195.16) и *Chal_sti_synt_C* (PF02797.12) и в составе гомодимера катализируют присоединение трех молекул малонил-КоА к 4-кумароил-КоА с образованием халкона [3, 14]. Каждый компонент димера имеет активный центр, катализирующий одну или несколько реакций конденсации [14]. Каталитический центр CHS содержит четыре высококонсервативных а.о. (Cys164, His303, Asn336, Phe215 у *CHS1 Glycin max*) [7, 15], где Cys164 также является сайтом связывания с субстратом 4-кумароил-КоА [14]. В связывании с 4-кумароил-КоА участвуют Gly259 и Ser345, а с субстратом малонил-КоА – консенсусная последовательность из 17 а.о. [10]. Кроме того, для халконсинтаз предложена сигнатурная последовательность из 17 а.о. в домене *Chal_sti_synt_C* [10].

В геноме чеснока *A. sativum* сорта Ershuizao [31] нами идентифицированы восемь генов халконсинтаз – *AsCHS1–8* (1182–2010 п.н.), которые содержали от одного до трех экзонов и располагались на хромосомах Chr1 (*AsCHS1*), Chr4 (*AsCHS2*, 3), Chr5 (*AsCHS4*, 5) и Chr6 (*AsCHS6–8*) (табл. 2) (рис. 1А).

Белки *AsCHS1–8* незначительно различались размером (375–397 а.о.). Согласно функциональным предсказаниям в терминах Gene Ontology (GO), все *AsCHS1–8* имеют ацилтрансферазную активность (GO:0016747) и участвуют в процессах биосинтеза поликетидов (GO:0030639) и флавоноидов (GO:0009813). При этом белки *AsCHS2* и 7 имели сходство 75% и значительно отличались от халконсинтаз *AsCHS1*, 3–6, 8 (идентичность 56–61%).

Таблица 2. Характеристика генов халконсинтаз чеснока *A. sativum* сорта Ershuizao

Ген ¹	Ген/ транскрипт ID ²	Локализация в геноме ²	Ген, п.н.	Число экзонов/ интронов	кДНК, п.н.	Белок, а.о.	Mw, кДа	pI	GRAVY
<i>AsCHS1</i>	Asa1G03363.1/ Asa2G01293.1	chr1: 913472045..913473226	1182	1/0	1182	393	43.26	6.22	-0.139
<i>AsCHS2</i>	Asa4G02924.1/ Asa4G00890.1	chr4: 781174614..781176037	1424	3/2	1128	375	41.06	6.96	-0.084
<i>AsCHS3</i>	Asa4G06151.1/ Asa4G03387.1	chr4: 1682101557..1682102738	1182	1/0	1182	393	43.15	6.48	-0.121
<i>AsCHS4</i>	Asa5G04529.1/ Asa5G01644.1	chr5: 1227135621..1227136805	1185	1/0	1185	394	43.46	6.1	-0.179
<i>AsCHS5</i>	Asa5G04530.1/ Asa5G01645.1	chr5: 1227252338..1227253522	1185	1/0	1185	394	43.43	6.1	-0.177
<i>AsCHS6</i>	Asa6G02586.1/ Asa6G05452.1	chr6: 656216362..656217943	1582	3/2	1173	390	43.32	5.75	-0.126
<i>AsCHS7</i>	Asa6G03080.1/ Asa1G04064.1	chr6: 787943706..787944950	1245	2/1	1155	384	42.27	5.57	-0.155
<i>AsCHS8</i>	Asa6G03715.1/ Asa6G04348.1	chr6: 973362901..973364911	2010	2/1	1194	397	43.78	6.48	-0.186

¹Номера в названиях генов соответствуют их хромосомной локализации.
²Определено по данным секвенирования генома и транскриптомов чеснока [31].

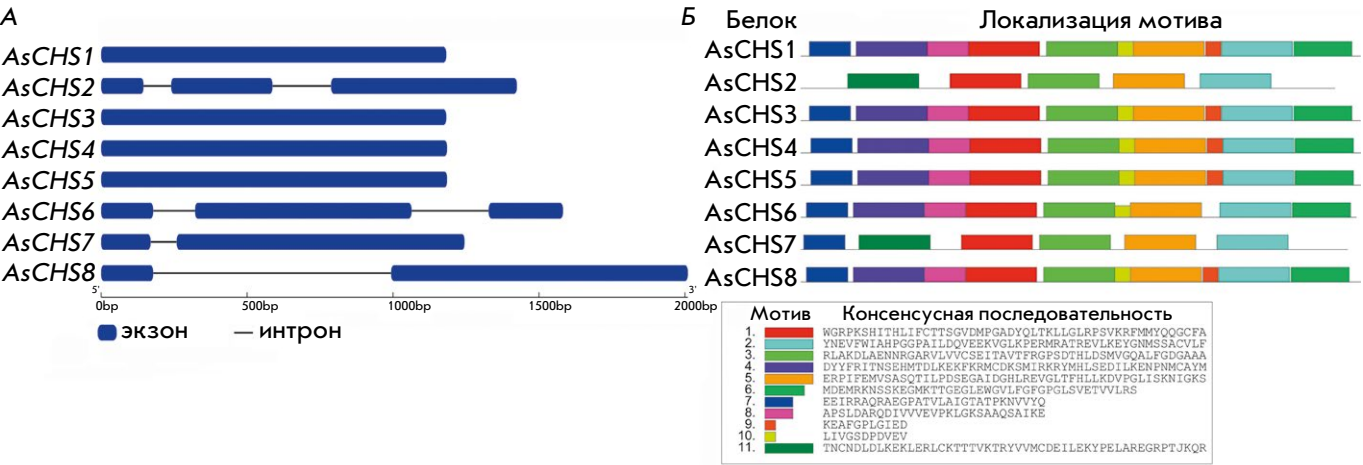


Рис. 1. Экзон-интронная структура генов *AsCHS1–8* (А), состав и распределение консервативных мотивов в последовательностях белков *AsCHS1–8* (Б)

Структурный анализ аминокислотных последовательностей *AsCHS1–8* установил положение халконсинтазных доменов *Chal_sti_synt_N* (PF00195.16) и *Chal_sti_synt_C* (PF02797.12) (рис. 1). В доменах найдены консервативные остатки (Cys167, Phe218 (*Chal_sti_synt_N*); His309, Asn342 (*Chal_sti_synt_C*)), характерные для активного центра фермента [15], за исключением *AsCHS3* (Phe218→Cys). Сайты связывания с субстратом 4-кумароил-КоА – Cys167 [14], Gly259 и Ser345 [10] присутствовали у всех *AsCHS1–8*, за исключением мутации Gly259→Lys у *AsCHS6*. В домене *Chal_sti_synt_C* все *AsCHS1–8* содержали консенсус связывания с субстратом малонил-КоА и сигнатурную последовательность халконсинтаз (рис. 2).

Последовательности белков *AsCHS1–8* охарактеризованы по профилю консервативных мотивов/

консенсусов (рис. 1Б). Большинство халконсинтаз (*AsCHS1*, 3–5, 8) содержали 10 из 11 найденных мотивов; *AsCHS6* отличался только отсутствием мотива 9. Исключение составили *AsCHS2* и *AsCHS7* (пять и шесть мотивов вместо 10–11), однако в последовательности именно этих белков специфично присутствовал мотив 11, соответствующий измененному (в сравнении с другими белками) началу домена *Chal_sti_synt_N*; консенсус 7 отсутствовал у *AsCHS2* по причине делеции начала домена *Chal_sti_synt_N*. Мотивы 6 и 8–10 были утрачены *AsCHS2* и *AsCHS7* вследствие того, что консервативность данных участков составила <50% в сравнении с остальными халконсинтазами (рис. 1, 2).

С целью исследования филогении халконсинтаз *AsCHS1–8* чеснока в базах данных AlliumDB и NCBI были идентифицированы последователь-

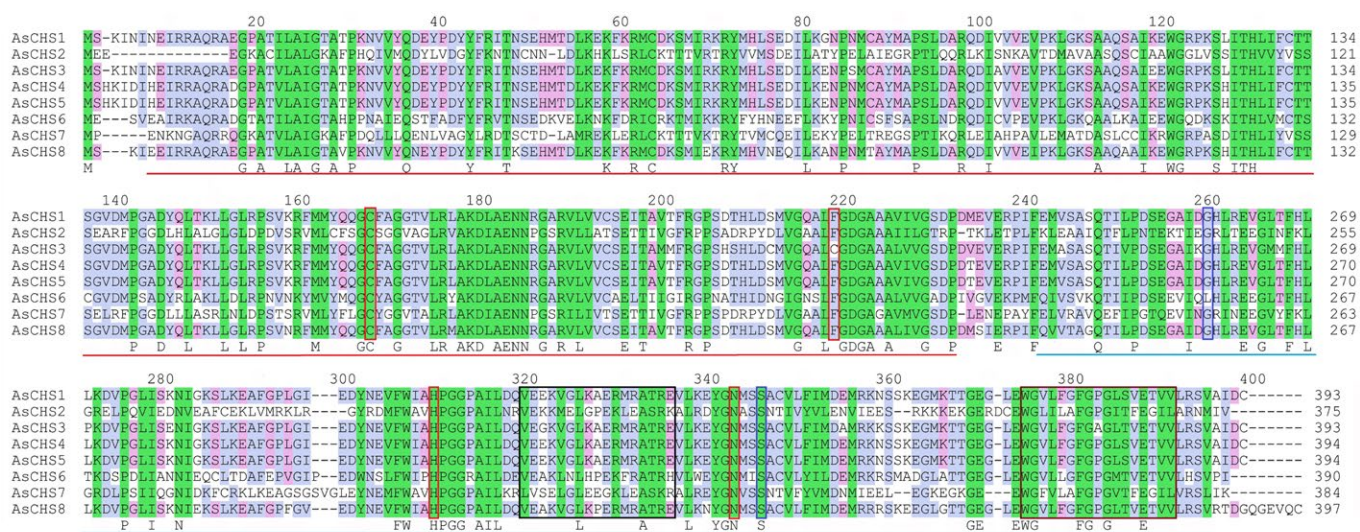


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей AsCHS1–8. Подчеркнуты домены *Chal_sti_synt_N* (красным) и *Chal_sti_synt_C* (голубым). Четыре остатка (Cys167, Phe218, His309, Asn342) активного центра фермента выделены красной рамкой (согласно [15]). Остатки Ser345 и Gly259, участвующие в связывании субстрата 4-кумароил-КоА [10], выделены синей рамкой. Черной и коричневой рамками отмечены консенсусы связывания малонил-КоА и сигнатурная последовательность халконсинтаз соответственно [10]. Цвет фона указывает на высокую степень консервативности аминокислотных остатков в белках AsCHS1–8 (зеленый – 100%, голубой – 80%, розовый – 60%)

ности этих ферментов у наиболее родственных *A. sativum* видов – лука репчатого *A. cepa* (6 CHS), лука-батюна *A. fistulosum* (5) и спаржи *As. officinalis* (6), а также отдаленных видов – перца *C. annuum* (9), томата *S. lycopersicum* (7) и *A. thaliana* (4).

На построенной дендрограмме (рис. 3) белки AsCHS1–8 группировались с представителями других видов однодольных (*A. cepa*, *A. fistulosum*, *As. officinalis*). Ортологи AsCHS6–8 выявлены у всех трех видов, AsCHS2 – только у *A. cepa*, тогда как AsCHS1, 3–5 группировались отдельно от представителей и однодольных, и двудольных (рис. 3).

В геномах двудольных (*C. annuum*, *S. lycopersicum*, *A. thaliana*) найдены ортологи только халконсинтаз AsCHS2 и 7 чеснока (рис. 3).

Определение профиля экспрессии генов AsCHS в растениях чеснока

Профили экспрессии генов халконсинтаз определяли, используя результаты транскриптомного анализа отдельных органов *A. sativum* сорта Ershuizao [31], включая восемь стадий развития луковицы (рис. 4).

Оказалось, что гены AsCHS2 и AsCHS7 не экспрессируются, за исключением следовых количеств транскриптов в цветках (оба гена), корнях и луковице на отдельных стадиях развития (AsCHS7). Экспрессия остальных шести генов крайне незначительна в корнях, листьях, ложном стебле, цвет-

ках и в процессе развития луковицы (AsCHS1, 3–6), а также в бутонах (кроме AsCHS5) и проростках (кроме AsCHS1). Среди генов AsCHS1–7, несмотря на низкий уровень их экспрессии, можно выделить AsCHS3 (FPKM значимо выше, чем у других пяти генов, но <10) (рис. 4).

Только у гена AsCHS8 выявлены существенные уровни транскриптов (FPKM>10). Ген AsCHS8 экспрессируется во всех проанализированных органах с наибольшими значениями FPKM в ложном стебле, листьях, цветках и проростках; в луковице экспрессия минимальна на протяжении всех восьми стадий развития; в корнях FPKM в ~9 раз меньше, чем в листьях (рис. 4).

Методом ПЦР-РВ нами определены профили экспрессии генов AsCHS1–8 в корнях, донце (видоизмененный стебель), луковице, ложном стебле и листьях чеснока сорта Сармат. Обнаружена экспрессия двух из восьми генов, AsCHS3 и 8. Транскрипты AsCHS3 присутствуют во всех анализируемых органах (максимум в луковице, листьях и ложном стебле), тогда как AsCHS8 – только в корнях, листьях и ложном стебле (максимум в ложном стебле и листьях). В корнях оба гена экспрессируются на следовом уровне, но экспрессия AsCHS3 в 26 раз ниже, чем AsCHS8. В ложном стебле и листьях уровни транскриптов AsCHS8 в ~41 раз выше, чем у AsCHS3 (рис. 5А).

Рис. 3. Дендрограмма, основанная на аминокислотных последовательностях халконсинтаз

A. sativum (As; красный шрифт), *A. cepa* (синий), *A. fistulosum* (зеленый), *As. officinalis* (голубой), *A. thaliana* (AT; черный), *C. annuum* (оранжевый) и *S. lycopersicum* (фиолетовый). Значимые значения бутстреп (>50%) указаны в основании ветвей, длина которых соответствует количеству мутаций в ходе эволюции

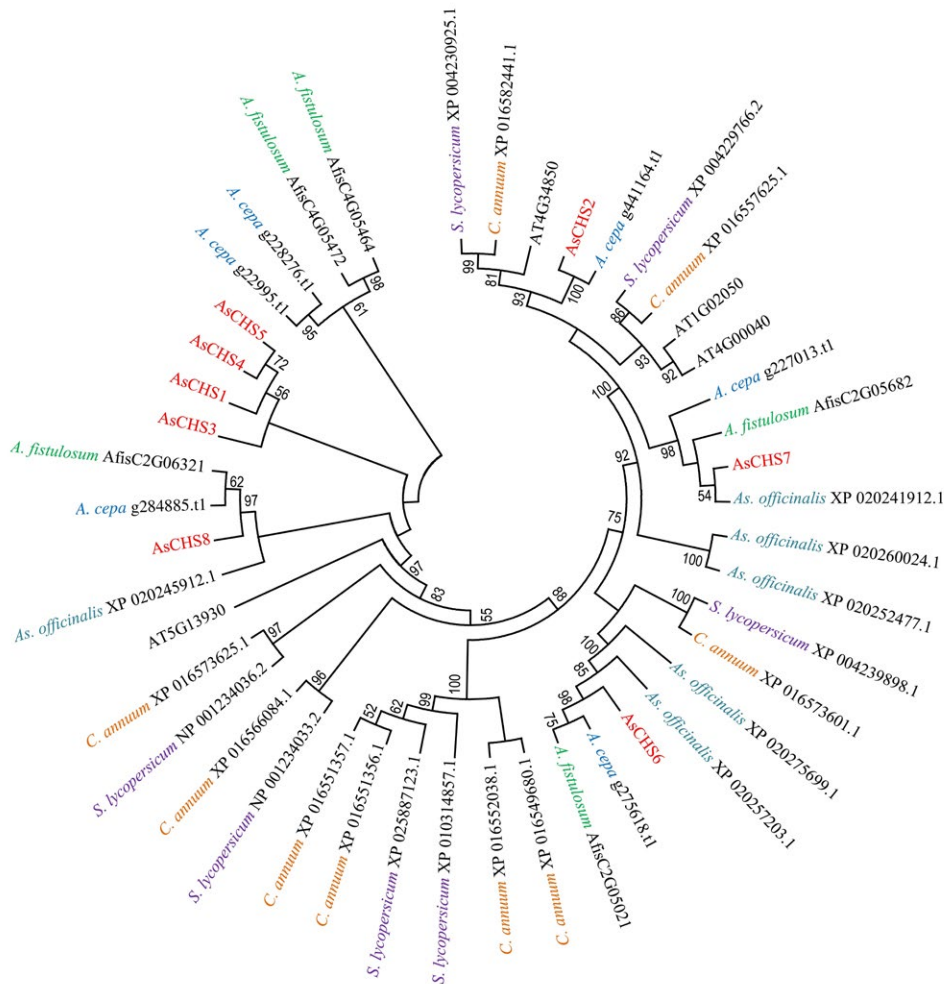
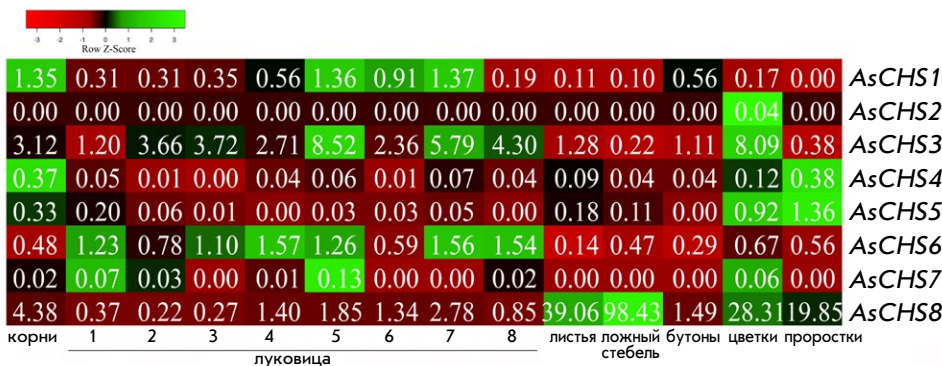


Рис. 4. Тепловая карта экспрессии генов *AsCHS1–8* в разных органах *A. sativum* сорта Ershuizao, построенная по транскриптомным данным [31]. В прямоугольниках – средние значения ФРКМ по трем биологическим повторам. Приведены стадии развития (1–8) луковиц, возраст которых составил 192, 197, 202, 207, 212, 217, 222 и 227 дней соответственно [31]



Динамика экспрессии генов *CHS* в растениях чеснока в ответ на стрессоры и фитогормоны

С целью определения возможного участия халконсинтаз *AsCHS1–8* в стрессовом ответе чеснока сорта Сармат мы провели серию экспериментов по симуляции воздействия на растения засоления, засухи и низкой положительной температуры, а также экзогенной обработки абсцизовой кислотой и метил-

жасмонатом, проанализировали экспрессию генов *AsCHS1–8* в корнях и листьях в динамике.

Показано, что только ген *AsCHS8* значимо экспрессируется как в контроле, так и в опыте (рис. 5Б). В листьях в ответ на холодостресс появляются следовые количества транскриптов *AsCHS2–4* (в связи с незначительностью индукции генов рисунки не приведены и эффект не обсуждается).

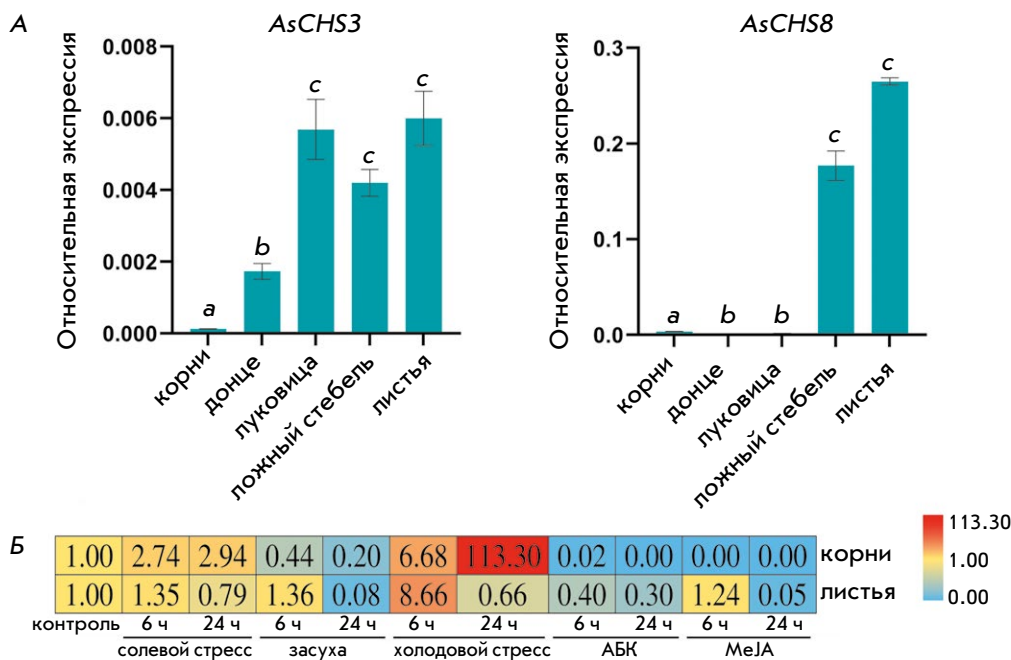


Рис. 5. А — профиль экспрессии генов *AsCHS3* и *8* в разных органах взрослого растения чеснока сорта Сармат ($a-c p < 0.05$ — значимые различия уровня экспрессии в разных органах). Экспрессии генов *AsCHS1, 2, 4–7* не обнаружено. Б — динамика экспрессии гена *AsCHS8* в корнях и листьях растений чеснока в ответ на абиотические стрессы (засоление, засуха, холод) и экзогенные фитогормоны (АБК, MeJA)

Профиль экспрессии гена *AsCHS8* в ответ на стрессовые воздействия зависит как от типа стрессора, так и от органа растения (корни или листья).

Избыток соли в основном стимулирует экспрессию *AsCHS8* и в корнях, и в листьях. В корнях экспрессия гена возрастает в 2.7 (6 ч) и 2.9 (24 ч) раза в сравнении с контролем; в листьях — повышается в 1.3 раза (6 ч), но понижается в 1.2 раза к концу воздействия (24 ч) (рис. 5Б).

В условиях засухи экспрессия *AsCHS8* в корнях стабильно снижается (6 и 24 ч), тогда как в листьях сначала наблюдается активация экспрессии в 1.3 раза (6 ч) и затем резкое снижение почти до нулевых значений (24 ч) (рис. 5Б).

Холодовой стресс стимулирует экспрессию *AsCHS8* в начале воздействия (6 ч) в корнях (в 6.6 раз) и листьях (8.6). В конце воздействия (24 ч) уровень транскриптов гена в корнях возрастает в 113.3 раз, а в листьях уменьшается в 1.5 раза (рис. 5Б).

Таким образом, если говорить о тенденции изменения экспрессии гена, то все три вида абиотических стрессоров сходным образом влияют на экспрессию *AsCHS8* в листьях, в то время как эффект, оказываемый на корни, специфичен для каждого стрессора.

Экзогенная обработка растений чеснока абсцизовой кислотой и метилжасмонатом подавляет экспрессию *AsCHS8* в корнях до нулевых значений. В листьях экспрессия гена существенно снижается на протяжении 24 ч при воздействии АБК,

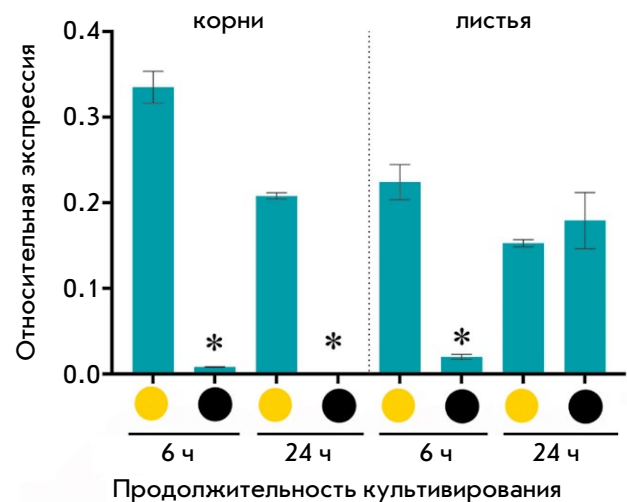


Рис. 6. Экспрессия гена *AsCHS8* в корнях и листьях растений чеснока спустя 6 и 24 ч культивирования при наличии освещения (желтый круг) и в темноте (черный круг). ($p < 0.05$ — значимые различия уровня экспрессии, темнота vs. освещение)

в то время как MeJA вызывает сначала увеличение уровня транскриптов в 1.2 раза (6 ч) и затем уменьшение до следовых количеств (24 ч) (рис. 5Б).

Также проведен анализ зависимости экспрессии гена *AsCHS8* от наличия освещения корней и листьев растений, помещенных в стандартные условия освещения (контроль) и темноту (опыт) (рис. 6). Обнаружено, что в корнях контрольных (освещенных) растений ген *AsCHS8* экспрессируется, тогда

как в темноте следовые количества транскриптов регистрируются только спустя 6 ч воздействия. В листьях *AsCHS8* экспрессируется и в контроле, и в опыте: в точке 6 ч уровень транскриптов гена в 11.2 раза ниже в условиях темноты в сравнении с освещенными листьями; спустя сутки (24 ч) уровни транскриптов *AsCHS8* в контроле и опыте сходны (рис. 6).

Определение цис-регуляторных элементов в промоторах генов *AsCHS1–8*

С целью интерпретации профилей экспрессии генов *AsCHS1–8* их промоторы (-2000 п.н. от стартового кодона) охарактеризованы по профилю цис-регуляторных элементов (рис. 7). Найдены 44 элемента, которые распределены на четыре группы: элементы ответа на фитогормоны (7) и стрессовые факторы (11), а также светочувствительные (13) и другие (13) элементы. К последним отнесены сайты связывания с белками и транскрипционными факторами, элементы, ассоциированные с процессами развития, и потенциальные регуляторные мотивы с неизвестной функцией.

Показано, что в промоторах большинства генов (кроме *AsCHS3*) присутствуют фитогормон-чувствительные элементы с преобладанием среди них сайтов ответа на абсцизовую кислоту и метилжасмонат. Гены *AsCHS1*, 2 и 7 содержат наибольшее количество элементов ответа на АБК (3 'ABRE');

AsCHS2 – на MeJA (4 'CGTCA'). Элементы, ассоциированные с ауксинами ('TGA'), гиббереллинами ('P-box', 'GARE'), салициловой кислотой ('TCA') и этиленом ('ERE'), представлены в промоторах отдельных генов в одной-двух копиях (рис. 7).

В промоторах всех генов *AsCHS1–8* выявлены элементы, связанные с ответом на стресс в целом ('MBS', 'W-box', 'TC-rich repeats'), на анаэробные условия ('ARE', особенно *AsCHS7* с 6 сайтами), фитопатогены ('Wun', 'WRE3', 'box S'), холод ('LTR'), засуху ('DRE1'), осмотический стресс, жару и дефицит питательных элементов ('STRE'). Наибольшее число элементов (14) найдено у *AsCHS8*. Учитывая стрессовые факторы, использованные в нашей работе, отметим, что элементы 'LTR' (ответ на холод) обнаружены у *AsCHS2*, 4, 5 и 7; 'DRE1' и/или 'STRE' (ответ на осмотический стресс) – у всех генов, кроме *AsCHS4* и 5 (рис. 7).

Проведенный анализ показал, что промоторные области *AsCHS1–8* содержат от 4 (*AsCHS4*) до 14 (*AsCHS8*) светочувствительных элементов (рис. 7).

У всех генов найдены сайты связывания со стресс-ассоциированными факторами транскрипции семейств MYB ('MRE', 'MYB', 'MBS1') и MYC ('MYC') – 5–14 и 2–8 элементов соответственно. MYB-связывающими сайтами наиболее обогащены промоторы генов *AsCHS2* (14), 7 (10) и 4 (9); промоторы *AsCHS2–5* содержат 'MBS1', ассоциированный с регуляцией биосинтеза флавоноидов (рис. 7).

А

	Ответ на гормоны										Ответ на стрессы										Элементы ответа на свет										Другие элементы														
	ABRE	CGTCA-motif	TCA-element	ERE	P-box	GARE-motif	TGA-box	ARE	LTR	STRE	TC-rich-repeats	W-box	Wun-motif	box S	WRE3	DRE 1	GC-motif	MBS	AE-box	Box 4	Box II	G-Box	I-box	GA-motif	GATA-motif	GT1-motif	TCT-motif	dhc-CMA1a	TCCC-motif	AT1-motif	MRE	MYB	MBS1	MYC	AAGA-motif	TCA	Box III	HD-Zip 3	AT-rich element	CTAG-motif	A-box	MSA-like	GCm4-motif	CAT-box	
AsCHS1	3	1		2	1			1	2			3				1		3	1	3		2			1	1					1	6		5								1	1		
AsCHS2	3	4	2			2		1	1	1		1	1					2	1			2	5		2					1	1	13	1	7											
AsCHS3								1		1								1	1	3		1	1		1			1	1	1	5	1	2	4	4	1	1	1							
AsCHS4		1						1	1	1		3						1		3									1				4	1	7	1									
AsCHS5	2	1		2	1			1	1			1						2	2	2		2		2	3		2					1	5	1	2	1	1								
AsCHS6	1		2	1	1			2		1		2						1				1				3	1				1	5	5												
AsCHS7	3	1					1	6	2	2					1			2	3	2						1						10	4												
AsCHS8	2	1	1	1				2	2			2	2	1	2	1	1	1		4	1	4			1	1	2				1	6	4		1										

Б

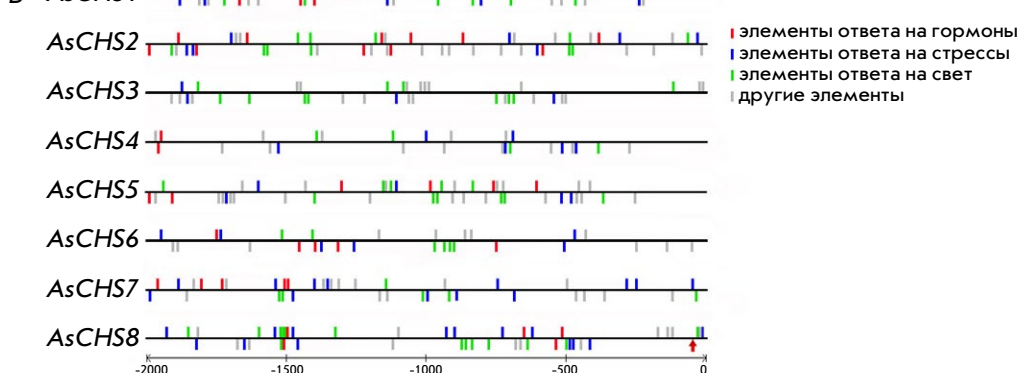


Рис. 7. Содержание и состав цис-регуляторных элементов в промоторах (2 т.п.н. до стартового кодона, включая предположительную 5'-не-транспируемую область (5'-UTR)) генов *AsCHS1–8* (А) и их распределение по последовательности промотора (Б). Красной стрелкой указан предполагаемый сайт начала транскрипции гена *AsCHS8* (на основании анализа транскриптомных данных)

ОБСУЖДЕНИЕ

Защитный ответ растений ассоциирован с накоплением метаболитов с антиоксидантными свойствами, в частности флавоноидов [5, 6]. У чеснока *A. sativum*, утратившего в процессе эволюции и доместикации фертильность, возникли, как следствие, серьезные изменения генетической регуляции адаптации к стрессу [34]. Флавоноидный путь у чеснока не охарактеризован. Поэтому целью нашего исследования стали идентификация и структурно-функциональная характеристика генов *A. sativum*, кодирующих халконсинтазы, которые катализируют первую стадию пути биосинтеза флавоноидов [12].

Анализ генома и транскриптомов *A. sativum* сорта Ershuizao позволил выявить восемь генов халконсинтаз *AsCHS1–8* (табл. 2). Число генов этого семейства в геноме чеснока отличалось от числа генов у других однодольных, таких как пшеница *T. aestivum* (49 или 87 генов) или кукуруза *Z. mays* (17). Однако размеры этого семейства у *A. sativum* и у одного из видов, наиболее близких роду *Allium* – *As. officinalis* (шесть генов), оказались близкими [18, 21]. Поскольку высокая фенотипическая вариабельность современного чеснока считается следствием перекрестных скрещиваний фертильных диких предков в центре происхождения вида [25, 34], можно предположить, что семейство *AsCHS* появилось в геноме чеснока еще до утраты видом способности к половому размножению.

Опираясь на результаты структурно-филогенетического анализа (табл. 2, рис. 1, 3), можно было бы предположить, что высокоомологичные белки *AsCHS1*, 3–5 функционально избыточны и могут работать с частичным перекрытием в разных тканях/органах растения, что определяется специфичностью промоторов генов. Соответствующие гены значительно различаются набором *цис*-регуляторных элементов в промоторной области (рис. 7) и профилем органоспецифичной экспрессии (рис. 4), основанным на транскриптомных данных *A. sativum* сорта Ershuizao [31]. Участие генов в биосинтезе флавоноидов может быть ограничено отдельными узкоспециализированными клетками/тканями/органами/стадиями развития растения чеснока. Выявленные мутации значимых аминокислотных остатков у *AsCHS3* и 6 (рис. 2), необходимых для формирования субстрат-связывающих сайтов, могут также свидетельствовать о возможных различиях ферментативной активности этих белков [10, 15].

В целом, если рассматривать экспрессию всех анализируемых генов *AsCHS* (рис. 4), то можно говорить о существенной экспрессии только *AsCHS8*

($FPKM > 10$) и, в меньшей степени, *AsCHS3* (рис. 4). Это полностью подтверждается результатами ПЦР-РВ, согласно которым экспрессируются только гены *AsCHS3* и 8 с весомым преобладанием транскриптов *AsCHS8* в корнях, ложном стебле и листьях чеснока сорта Сармат (рис. 5А).

Отсутствие или низкая экспрессия остальных генов *AsCHS1*, 2 и 4–7 еще не является свидетельством их нефункциональности. Все эти гены структурно полноценны, включая профиль *цис*-регуляторных элементов в промоторной области (табл. 2, рис. 7), они могут иметь узкую специализацию, участвуя в флавоноидном пути в конкретных клетках/тканях/органах на отдельных стадиях развития растения. К примеру, у пшеницы ряд генов халконсинтаз экспрессируется исключительно в клетках пыльников при развитии пыльцевой экины [21].

Нами проведен дополнительный анализ экспрессии генов *AsCHS1–8* в ответ на основные абиотические стрессоры (засоление, засуха, холод), а также на экзогенную обработку фитогормонами (абсцизовая кислота и метилжасмонат), которые опосредуют сигнальные пути стрессовых ответов в растении [35]. В результате обнаружено, что только экспрессия гена *AsCHS8* значительно изменяется в ответ на воздействие всех использованных нами стрессоров (рис. 5Б).

Показанное нами стимулирующее воздействие холода на активность гена *AsCHS8* (рис. 5Б) соответствует данным подобных исследований, проведенных, например, на растениях *Coelogyne ovalis* [36] или *Oryza sativa* [37]. Повышение экспрессии гена *AsCHS8* при засолении (рис. 5Б) согласуется с данными, полученными при изучении реакции растений риса [37], а также с положительной ассоциацией между экспрессией генов халконсинтаз и солеустойчивостью растений *Eupatorium adenophorum* [38].

В отличие от солевого и холодового эффектов ответ на другой осмотический стресс – засуху, сопровождается снижением экспрессии гена *AsCHS8* (рис. 5Б). С одной стороны, это соответствует данным анализа растений *Camellia sinensis*, у которых в ответ на засуху уменьшалось содержание белка халконсинтаз [39]. С другой стороны, эффект *AsCHS8* противоположен реакции трех генов халконсинтаз *Silybum marianum*, экспрессия которых увеличилась в ответ на засуху [40].

Примечательно, что обработка растений чеснока абсцизовой кислотой и метилжасмонатом подавляет экспрессию гена *AsCHS8* как в корнях, так и в листьях (рис. 5Б). У видов *Vitis* sp. такие воздействия, напротив, стимулируют экспрессию генов халкон-

синтаз [41, 42]; в случае MeJA это ассоциировано с активацией жасмонатами биосинтеза антимикробных фитоалексинов для защиты от патогенов [41]. Возможно, противоположный эффект связан с тем, что растения чеснока богаты сераорганическими биологически активными соединениями, обладающими высокими антиоксидантными и противомикробными свойствами [43], и с тем, что для защитного ответа синтез флавоноидов, запускаемый у других видов растений жасмонатным сигнальным путем, не так важен. Более того, на примере *Salvia miltiorrhiza* показано, что обработка растений MeJA может и стимулировать (*SmCHS1–5*), и подавлять (*SmCHS6*), и не влиять (*SmCHS7*) на экспрессию генов халконсинтаз [44].

Известно, что флавоноиды участвуют в фотозащите растений [1, 2], при этом биосинтез флавоноидов находится в положительной зависимости от освещения [45], с чем ассоциированы светочувствительные *cis*-регуляторные элементы в промоторах генов халконсинтаз [7, 46]. Мы также обнаружили значительное количество светочувствительных сайтов в промоторах всех генов *AsCHS* и, в частности, *AsCHS8* (рис. 7), что согласуется с показанным нами подавлением экспрессии *AsCHS8* в затемненных растениях (рис. 6). Сходный профиль экспрессии генов халконсинтаз при наличии освещения и в темноте характерен и для других видов растений, например для *Sinapis alba* [45].

Таким образом, из всего семейства *AsCHS* только один ген (*AsCHS8*) участвует в защитных реакциях в листьях и корнях растения чеснока, причем ответная динамика экспрессии гена зависит от типа стрессора и часто противоположна. Эти данные могут косвенно подтверждать, что в процессе эволюции и доместикации в растениях чеснока возникли серьезные изменения в генетической регуляции адаптации к стрессу, отличные от других видов растений [34], что требует дополнительных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы идентифицировали и охарактеризовали восемь генов халконсинтаз (*AsCHS1–8*) в геноме чеснока *A. sativum* сорта Ershuizao, сравнили профили их органоспецифичной экспрессии с профилями у сорта Сармат и проанализировали экспрессию генов в ответ на абиотические стрессоры (засоление, засуха, холод), экзогенные фитогормоны (АБК, MeJA) (все гены) и освещенность (только *AsCHS8*). Полученные результаты позволяют предположить, что только два гена из восьми – *AsCHS3* и 8, могут определять синтез флавоноидов во всех проанализированных органах в процессе развития растения чеснока, и основная халконсинтазная активность определяется *AsCHS8*, экспрессия которого в отдельных органах не только наиболее значима, но и чувствительна к воздействию стрессовых факторов. Остальные шесть генов (*AsCHS1, 2, 4–7*) могут участвовать в биосинтезе флавоноидов в узкоспециализированных клетках/тканях/органах или на отдельных стадиях развития растений чеснока. Проведенная идентификация и характеристика генов халконсинтаз *AsCHS1–8* чеснока могут стать основой для дальнейшего анализа механизмов регуляции стрессовой адаптации *A. sativum*, а также других видов *Allium*. ●

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 24-76-10005; характеристика и анализ генов, экспрессионный анализ) и Министерства науки и высшего образования РФ (анализ экспрессии на основе данных транскриптомного анализа).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных и человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Taylor L.P., Grotewold E. // Curr. Opin. Plant Biol. 2005. V. 8. P. 317–323. doi: 10.1016/j.pbi.2005.03.005
2. Mouradov A., Spangenberg G. // Front. Plant Sci. 2014. V. 5. Article 620. doi: 10.3389/fpls.2014.00620
3. Petrusa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Vianello A. // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. P. 14950–14973. doi: 10.3390/ijms140714950
4. Shen N., Wang T., Gan Q., Liu S., Wang L., Jin B. // Food Chem. 2022. V. 383. Article 132531. doi: 10.1016/j.foodchem.2022.132531
5. Han Y.Y., Ming F., Wang W., Wang J.W., Ye M.M., Shen D.L. // Genetica. 2006. V. 128. P. 429–438. doi: 10.1007/s10709-006-7668-x
6. Khlestkina E. // Cereal Res. Commun. 2013. V. 41. P. 185–198. doi: 10.1556/CRC.2013.0004
7. Dao T.T., Linthorst H.J., Verpoorte R. // Phytochem. Rev. 2011. V. 10. № 3. P. 397–412. doi: 10.1007/s11101-011-9211-7
8. Shih C.H., Chu H., Tang L.K., Sakamoto W., Maekawa M., Chu I.K., Wang M., Lo C. // Planta. 2008. V. 228. № 6. P. 1043–1054. doi: 10.1007/s00425-008-0806-1
9. Liu W., Feng Y., Yu S., Fan Z., Li X., Li J., Yin H. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 23. Article 12824. doi: 10.3390/ijms222312824
10. Zhu L., Ding Y., Wang S., Wang Z., Dai L. // Genes. 2022. V. 13. Article 2145. doi: 10.3390/genes13112145
11. Abe I., Morita H. // Nat. Prod. Rep. 2010. V. 27. № 6. P. 809–838. doi: 10.1039/b909988n

12. Singh B., Kumar A., Malik A.K. // *Electrophoresis*. 2017. V. 38. P. 820–832. doi: 10.1002/elps.201600334
13. Imaizumi R., Mameda R., Takeshita K., Kubo H., Sakai N., Nakata S., Takahashi S., Kataoka K., Yamamoto M., Nakayama T., et al. // *Proteins*. 2020. V. 89. № 1. P. 126–131. doi: 10.1002/prot.25988
14. Jez J.M., Bowman M.E., Noel J.P. // *Biochemistry*. 2001. V. 40. № 49. P. 14829–14838. doi: 10.1021/bi015621z
15. Noel J.P., Ferrer J.-L., Jez J.M., Bowman M.E., Dixon R.A. // *Nat. Struct. Biol.* 1999. V. 6. P. 775–784. doi: 10.1038/11553
16. Wu X., Zhang S., Liu X., Shang J., Zhang A., Zhu Z., Zha D. // *PLoS One*. 2020. V. 15. № 4. Article e0226537. doi: 10.1371/journal.pone.0226537
17. Jia Y.H., He F., Shen Z.L., Xie X.H., Lv S.J., Jiang B.X., Yang G.X., Yan Y.C., Wu Z.H., Wu Y.Y. // *Gene*. 2023. V. 857. Article 147176. doi: 10.1016/j.gene.2023.147176
18. Yang L., Zhang S., Chu D., Wang X. // *Front. Genet.* 2024. V. 15. Article 1368358. doi: 10.3389/fgene.2024.1368358
19. Han Y., Ding T., Su B., Jiang H. // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. № 2. Article 161. doi: 10.3390/ijms17020161
20. Glagoleva A.Y., Ivanisenko N.V., Khlestkina E.K. // *BMC Genet.* 2019. V. 20. Article 30. doi: 10.1186/s12863-019-0727-y
21. Liu Y., Bai J., Yuan S., Gao S., Liu Z., Li Y., Zhang F., Zhao C., Zhang L. // *Gene*. 2023. V. 888. Article 147740. doi: 10.1016/j.gene.2023.147740
22. Deng X., Bashandy H., Ainasoja M., Kontturi J., Pietiäinen M., Laitinen R.A.E., Albert V.A., Valkonen J.P.T., Elomaa P., Teeri T.H. // *New Phytol.* 2014. V. 201. № 4. P. 1469–1483. doi: 10.1111/nph.12610
23. Des Marais D.L., Rausher M.D. // *Nature* 2008. V. 454. P. 762–765. doi: 10.1038/nature07092
24. El-Saber Batiha G., Magdy Beshbishy A., Wasef L.G., Elewa Y.H.A., Al-Sagan A.A., Abd El-Hack M.E., Taha A.E., Abd-Elhakim Y.M., Prasad Devkota H. // *Nutrients*. 2020. V. 12. № 3. Article 872. doi: 10.3390/nu12030872
25. Shemesh E., Scholten O., Rabinowitch H.D., Kamenetsky R. // *Planta*. 2008. V. 227. P. 1013–1024. doi: 10.1007/s00425-007-0675-z
26. Kırac H., Dalda Şekerci A., Coşkun Ö.F., Gülşen O. // *Genet. Resour. Crop Evol.* 2022. V. 69. P. 1833–1841. doi: 10.1007/s10722-022-01343-4
27. Casals J., Rivera A., Campo S., Aymerich E., Isern H., Fenner D., Garriga A., Palou A., Monfort A., Howad W., et al. // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 13. Article 1004069. doi: 10.3389/fpls.2022.1004069
28. Buitrago S., Yang X., Wang L., Pan R., Zhang W. // *Plant Mol. Biol.* 2024. V. 115. № 1. Article 6. doi: 10.1007/s11103-024-01540-y
29. Kim S., Yoo K.S., Pike L.M. // *Euphytica*. 2005. V. 142. P. 273–282. doi: 10.1007/s10681-005-2239-2
30. Mollavali M., Perner H., Rohn S., Riehle P., Hanschen F.S., Schwarz D. // *Mycorrhiza*. 2018. V. 28. № 1. P. 59–70. doi: 10.1007/s00572-017-0799-3
31. Sun X., Zhu S., Li N., Cheng Y., Zhao J., Qiao X., Lu L., Liu S., Wang Y., Liu C., et al. // *Mol. Plant*. 2020. V. 13. № 9. P. 1328–1339. doi: 10.1016/j.molp.2020.07.019
32. Liu M., Wu Z., Jiang F. // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2015. V. 122. P. 435–444. doi: 10.1007/s11240-015-0780-9
33. Schwinn K.E., Ngo H., Kenel F., Brummell D.A., Albert N.W., McCallum J.A., Pither-Joyce M., Crowhurst R.N., Eady C., Davies K.M. // *Front. Plant. Sci.* 2016. V. 7. Article 1865. doi: 10.3389/fpls.2016.01865
34. Shemesh-Mayer E., Faigenboim A., Sherman A., Gao S., Zeng Z., Liu T., Kamenetsky-Goldstein R. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 23. Article 16777. doi: 10.3390/ijms242316777
35. Waadt R., Seller C.A., Hsu P.K., Takahashi Y., Munemasa S., Schroeder J.I. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022. V. 23. № 10. P. 680–694. doi: 10.1038/s41580-022-00479-6
36. Singh N., Kumaria S. // *Gene*. 2020. V. 762. Article 145104. doi: 10.1016/j.gene.2020.145104
37. Wang J., Zhang C., Li Y. // *Genes (Basel)*. 2022. V. 13. № 3. Article 410. doi: 10.3390/genes13030410
38. Lijuan C., Huiming G., Yi L., Hongmei C. // *Plant Cell Rep.* 2015. V. 34. № 5. P. 885–894. doi: 10.1007/s00299-015-1751-7
39. Gu H., Wang Y., Xie H., Qiu C., Zhang S., Xiao J., Li H., Chen L., Li X., Ding Z. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. Article 15504. doi: 10.1038/s41598-020-72596-1
40. ElSayed A.I., El-Hamahmy M.A.M., Rafudeen M.S., Mohamed A.H., Omar A.A. // *Plants (Basel)*. 2019. V. 8. № 12. Article 611. doi: 10.3390/plants8120611
41. Nopo-Olazabal C., Condori J., Nopo-Olazabal L., Medina-Bolivar F. // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 74. P. 50–69. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.10.035
42. Yang M., Wang L., Belwal T., Zhang X., Lu H., Chen C., Li L. // *Molecules*. 2019. V. 25. № 1. P. 12. doi: 10.3390/molecules25010012
43. Shang A., Cao S.Y., Xu X.Y., Gan R.Y., Tang G.Y., Corke H., Mavumengwana V., Li H.B. // *Foods*. 2019. V. 8. № 7. Article 246. doi: 10.3390/foods8070246
44. Deng Y., Li C., Li H., Lu S. // *Molecules*. 2018. V. 23. № 6. Article 1467. doi: 10.3390/molecules23061467
45. Ehmann B., Ocker B., Schafer E. // *Planta*. 1991. V. 183. P. 416–422. doi: 10.1007/BF00197741
46. Hartmann U., Sagasser M., Mehrstens F., Stracke R., Weisshaar B. // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 57. № 2. P. 155–171. doi: 10.1007/s11103-004-6910-0

УДК 616.155.392

Возникновение новой инсерционной мутации в онкогене *BCR::ABL/p210* при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе (В-ОЛЛ) коррелирует с развитием резистентности к нескольким ингибиторам тирозинкиназ

К. В. Богданов*, Е. С. Кудрявцева, Ю. Н. Лобачева, О. В. Мерзликина, Ю. В. Миролубова, Р. А. Власик, Р. Ш. Бадаев, Е. Г. Ломаиа

Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, 197341 Россия

*E-mail: kvbogdanov@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.10.2024

Принята к печати 13.02.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27539

РЕФЕРАТ У больного с иммунофенотипом, характерным для В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), обнаружили хромосомную транслокацию $t(9;22)(q34;q11)$, или филадельфийскую (Ph) хромосому и менее распространенный вариант химерного онкогена *BCR::ABL/p210*. При этом в дебюте заболевания с повышенным уровнем бластных клеток (77.6%) и лейкоцитов ($48 \times 10^9/\text{л}$) каких-либо дополнительных мутаций в гене *BCR::ABL*, включая точечные мутации, вставки или делеции, выявлено не было. После проведения химиотерапии «Ph+ALL-2012m» с добавлением иматиниба (600 мг) и двух фаз консолидации отмечали развитие полной гематологической ремиссии и глубокого молекулярного ответа. Однако спустя 6 месяцев у пациента развился рецидив (бласты: 15%, *BCR::ABL/p210*: 105%). Через 3 недели после начала терапии дазатинибом (100 мг) количество бластов уменьшилось до 4.8%, а уровень экспрессии *BCR::ABL/p210* снизился до 11.8%. Секвенирование по Сэнгеру позволило идентифицировать два варианта мутаций в гене *BCR::ABL*, а именно, точечную мутацию F317L и новую вставку из 9 нуклеотидов, ранее не обнаруженную. В последнем случае остаток лизина в позиции 294 был замещен на четыре новых аминокислотных остатка: K294SPSQ. После терапии бозутинибом и инотузумабом наблюдалось исчезновение одного лейкозного клона с мутацией F317L, однако сохранялось присутствие другого клона, несущего вставку из 9 нуклеотидов. Смена курса химиотерапии на понатиниб+блинатумомаб оказалась эффективной. Это привело к исчезновению инсерции. После аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) от неродственного HLA-совместимого донора наблюдалось развитие полной клинико-гематологической ремиссии и полного молекулярного ответа. Мониторинг минимальной остаточной болезни спустя 6 месяцев после алло-ТГСК показал сохранение ремиссии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА В-ОЛЛ, *BCR::ABL/p210*, инсерция, K294SPSQ, резистентность к ингибиторам тирозинкиназы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ В-ОЛЛ – В-клеточный острый лимфобластный лейкоз; ХМЛ – хронический миелоидный лейкоз; ИТК – ингибитор тирозинкиназы; ИМ – иматиниб; алло-ТГСК – аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

ВВЕДЕНИЕ

Острый В-лимфобластный лейкоз (В-ОЛЛ) – это клональное пролиферативное заболевание системы крови, вызванное генетическими нарушениями в В-клетках-предшественниках, чаще встречается

у детей и реже у взрослых. У взрослых с В-ОЛЛ к редко выявляемым мутациям (<3%) относятся: $t(v;11q23)/MLL$, или KMT2A, включая $t(4;11)(q21;q23)/KMT2A-AF4$, $t(1;19)(q23;p13)/E2A-PBX1$ (TCF3-PBX1), $t(5;14)(q31;q32)/IL3-IGH$, $t(12;21)(p13;q22)/TEL-AML1$

(ETV6-RUNX1), а также мутации с перестройкой гена *c-MYC*: t(8;14)(q24;q32), t(8;22)(q24;q11) или t(2;8)(p22;q23). Напротив, при В-ОЛЛ у взрослых часто встречается (до 30%) филадельфийская хромосома (Ph-хромосома), которая образуется в результате реципрокной транслокации t(9;22)(q34;q11), приводящей к образованию химерного онкогена *BCR::ABL*. У взрослых больных ($\geq 20\%$) также выявляют вариант Ph-подобного В-ОЛЛ, молекулярный профиль генной экспрессии при котором сходен с профилем, характерным для Ph-позитивного В-ОЛЛ, но отличается отсутствием хромосомной транслокации t(9;22)(q34;q11) и преобладанием высокой частоты встречаемости делеций в гене *IKZF1* [1]. Большинство названных мутаций коррелирует с плохим прогнозом, за исключением хромосомных транслокаций t(1;19)(q23;p13)/E2A-PBX1 и t(12;21)(p13;q22)/TEL-AML1, которые связаны с промежуточным и благоприятным прогнозом соответственно. Известно, что обнаружение у пациентов В-ОЛЛ хромосомной транслокации t(9;22)(q34;q11) коррелирует с неблагоприятным прогнозом и способствует накоплению онкобелка *BCR::ABL* с конститутивной тирозинкиназной активностью. Повышенная способность *BCR::ABL* к фосфорилированию белков-мишеней приводит к трансформации гемопоэтических стволовых клеток, в результате которой изменяются многочисленные сигнальные пути, способствующие повышению их выживаемости и пролиферации [2–4]. В зависимости от места локализации точки разрыва в гене *BCR* или варианта альтернативного сплайсинга мРНК *BCR::ABL* могут возникать разные слитые продукты. Наиболее распространенными среди них являются следующие изоформы *BCR::ABL*: e1a2 (p190), e13a2 и e14a2 (обе p210). При этом большинство больных В-ОЛЛ (77%), как правило, экспрессирует *BCR::ABL/p190*, тогда как меньшая часть пациентов (20%) экспрессирует *BCR::ABL/p210*, а остальные пациенты (3%) коэкспрессируют оба варианта: *BCR::ABL/p190* и *BCR::ABL/p210* [5]. Следует отметить, что, несмотря на неблагоприятное течение Ph-позитивного В-ОЛЛ в целом, прогноз хуже у носителей мутации *BCR::ABL/p210* по сравнению с носителями мутации *BCR::ABL/p190*. Появление иматиниба (ИМ), ингибитора тирозинкиназы (ИТК) *BCR::ABL*, позволило значительно улучшить гематологические, цитогенетические и молекулярно-генетические показатели Ph-позитивных пациентов [6]. Однако у большинства пациентов с диагнозом В-ОЛЛ (Ph+) часто развивается резистентность к ИМ, обусловленная как *BCR-ABL*-зависимыми, так и *BCR-ABL*-независимыми механизмами [7–12]. Для преодоления этой резистентности были разработаны и внедрены в клиническую практику ИТК второго

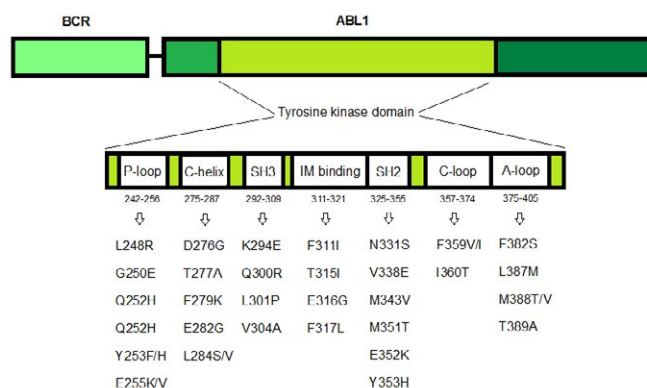


Рис. 1. Мутации тирозинкиназного домена *BCR::ABL*, выявленные у пациентов с Ph-позитивным лейкозом

(нилотиниб, дазатиниб, бозутиниб), третьего (пона-тиниб) и четвертого (асциминиб) поколения [13, 14]. К *BCR-ABL*-зависимым факторам, вызывающим устойчивость к ИТК, относятся мутации, возникающие в участке онкогена *BCR::ABL*, кодирующем тирозинкиназный домен, в том числе точечные мутации, инсерции и делеции. Такие аномалии могут быть обнаружены как в начале заболевания, так и во время лечения. В дебюте заболевания эти мутации встречаются редко ($\leq 12\%$), однако их появление может возрасти в период лечения ИТК и способствовать возникновению устойчивости. К настоящему времени известно более 100 точечных мутаций онкогена *BCR::ABL*, описанных ранее как при В-ОЛЛ, так и при хроническом миелолейкозе (ХМЛ) [15–17]. Эти мутации затрагивают разные области киназного домена *BCR::ABL*, среди которых: 1) фосфатсвязывающая Р-петля (P-loop); 2) С-спиральный сайт (C-helix), отвечающий за аллостерическую регуляцию; 3) сайт связывания АТФ/ИМ; 4) каталитический сайт (SH2-контакт, SH3-контакт, С-петля, или C-loop); 5) петля активации (A-loop) (рис. 1).

Чаще всего мутации обнаруживают в двух участках киназного домена, а именно, в Р-loop и сайте связывания АТФ/ИМ. К наиболее распространенным точечным мутациям относится T315I (C>T), которая приводит к замене треонина на изолейцин, что вызывает устойчивость к четырем разным ИТК – иматинибу, дазатинибу, nilотинибу и бозутинибу [18]. Среди инсерционных мутаций киназного домена *BCR::ABL* у больных В-ОЛЛ чаще выявляют вставки длиной от 2 до 12 аминокислотных остатков, локализуемые, как правило, между позициями I293 и K294, а также K294 и H295. В обоих случаях в результате мутаций нарушается структура контактного сайта SH3, составляющего тирозинкиназный домен онкобелка *BCR::ABL*. Это приводит к развитию резистентности к иматинибу [19, 20]. И, наконец, в число делеций онкогена *BCR::ABL* при В-ОЛЛ

Таблица 1. Основные характеристики пациента в дебюте В-ОЛЛ

Мужчина	Периферическая кровь						Костный мозг (бласты, %)
	гемоглобин, г/л	лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	лимфоциты, %	моноциты, %	бласты, %	
Пациент	101	48	30	15	3	67	77.6
Здоровый человек	130–160	4–9	150–400	19–37	3–11	0	0.1–1.1

входит мутация $\Delta 184-274$, которая связана с потерей 90 аминокислотных остатков. В частности, это нарушение затрагивает область P-loop из состава тирозинкиназного домена BCR::ABL, что коррелирует с устойчивостью к ИТК, включая понатиниб [21].

В настоящем исследовании у больного В-ОЛЛ (Ph+) на фоне терапии дазатинибом обнаружена повышенная экспрессия химерного онкогена BCR::ABL/p210 и две мутации в киназном домене BCR::ABL. Первая из них – это хорошо известная точечная мутация F317L, а вторая мутация представляет собой ранее не описанную вставку 9 нуклеотидов. Эта инсерция приводит к замене лизина в позиции K294 на четыре аминокислотных остатка SPSQ, которые являются частью SH3-контактного сайта тирозинкиназного домена BCR::ABL.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациент и образцы

Мужчина 42 лет поступил в Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова с болью в коленном суставе и температурой до 38°. По данным клинического анализа (табл. 1) у пациента выявлено повышенное количество лейкоцитов ($48 \times 10^9/\text{л}$), а также бластных клеток в периферической крови (67%) и костном мозге (77.6%). Иммунофенотипирование выявило популяцию бластных клеток, характерных для В-ОЛЛ: CD 34+CD19+cytCD79a+CD10+CD38+sCD22+cytIgM-HLADR-CD13+MPO-CD33-CD117-. Таким образом, у больного диагностировали В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (вариант В II) с коэкспрессией миелоидного маркера CD13+. Следует отметить, что все проведенные люмбальные пункции показали отсутствие лейкозных клеток в спинномозговой жидкости пациента.

Цитогенетический анализ

Приготовление препаратов хромосом и последующее дифференциальное окрашивание хромосом проводили по методике, описанной ранее [22]. Патологию кариотипа интерпретировали по результатам анализа 20 митозов методом стандартного кариотипирования и/или 200 интерфазных ядер после выполнения флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH).

Выделение РНК, обратная транскрипция (ОТ), качественная и количественная ПЦР в режиме реального времени (qPCR)

Тотальную РНК выделяли из 2.5 мл периферической крови, проводили элюцию в 30 мкл буфера, свободного от РНКаз, и ОТ с использованием стандартного набора реактивов и протокола производителя («АмплиСенс», Россия). Качественное определение варианта слитого транскрипта BCR::ABL проводили на основе микрочиповой ПЦР и набора реактивов 5× qPCRMix-HS («Евроген», Россия) как описано ранее [23]. Количественную оценку онкогена BCR::ABL/p210 проводили с использованием qPCR и набора реактивов Leucosis Quantum M-bcr-FRT PCR kit («АмплиСенс», Россия). По окончании ПЦР количество (%) мРНК-транскрипта BCR::ABL/p210 рассчитывали по стандартной формуле: количество копий BCR::ABL/p210 делили на количество копий ABL и умножали на 100.

Выделение ДНК

Геномную ДНК выделяли из 0.2 мл периферической крови с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, США) в соответствии с протоколом производителя. Полученную ДНК элюировали в 50 мкл АЕ-буфера (10 mM Трис-НСl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0).

Скрининг мутаций тирозинкиназного домена BCR::ABL

Мутационный статус тирозинкиназы BCR::ABL определяли двумя способами: путем амплификации кДНК вслед за ОТ, а также на основе амплификации участка геномной ДНК. В первом случае выполняли стандартную гнездовую ПЦР с использованием олигонуклеотидов, а также условий амплификации и термоциклирования, как описано ранее [24]. Во втором случае для определения мутаций онкогена BCR::ABL в геномной ДНК проводили амплификацию длинных фрагментов (Long-range PCR) с использованием двухраундовой ПЦР и набора реактивов BioMaster LR HS-PCR («Биолабмикс», Россия). Условия амплификации и термоциклирования были одинаковыми в обоих раундах ПЦР, за исключением использования специфических олигонуклеотидов, подобранных через систему NCBI (табл. 2). При выполнении второго раунда ПЦР амплификационная смесь

Таблица 2. Специфические олигонуклеотиды для ПЦР и прямого секвенирования *BCR::ABL*

Праймер	Первый раунд ПЦР	Второй раунд ПЦР	Секвенирование
Прямой (5'–3')	ACTCGTGTGTGAAACTCCAGACT	AGGACGAGTATGCGCTGAAG	AGGACGAGTATGCGCTGAAG
Обратный (5'–3')	CGAGGTTTTGTGCAGTGAGC	CGAGGTTTTGTGCAGTGAGC	CGAGGTTTTGTGCAGTGAGC

содержала 1× ПЦР-буфер, 2.5 mM каждого dNTP, 10 pM прямого и обратного праймеров, 3 мкл продукта амплификации (после первого раунда ПЦР) и 5 единиц полимеразы Encyclo Taq («Евроген», Россия). Термоциклирование включало удержание при 95°C в течение 10 мин с последующими 50 циклами: 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 1 мин. Размер продукта амплификации после второго раунда ПЦР составлял 293 п.н. Мутационный статус *BCR::ABL* определяли с использованием прямого секвенирования по методу Сэнгера на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ мутаций в дебюте В-ОЛЛ

Стандартное кариотипирование выявило аномальный кариотип клеток костного мозга пациента: {t(9;22)(q34;q11) [15], 46XY [5]}. Ph-хромосома обнаружена в 15 из 20 просмотренных митозов, что составило 75%. Онкоген *BCR::ABL* обнаружили также в 120 из 200 интерфазных ядер, просмотренных методом FISH. Согласно результатам количественной ПЦР, в периферической крови отмечена повышенная экспрессия онкогена *BCR::ABL/p210*, уровень которой не превышал 56% (рис. 2). При этом дополнительных мутаций в участке онкогена *BCR::ABL*, кодирующем тирозинкиназный домен, не обнаружено.

Терапия и мониторинг минимальной остаточной болезни (МОБ)

После получения информированного согласия больному В-ОЛЛ проводили лечение по протоколу «Ph+ALL-2012m» в комбинации с иматинибом (600 мг) [25]. Через 8 месяцев терапии, включающей две фазы индукции и три фазы консолидации, у пациента обнаружили полную гематологическую ремиссию и глубокий молекулярный ответ (*BCR::ABL/p210*: 0.002%). Однако спустя 6 месяцев у пациента отмечали развитие рецидива (бласты: 15%, *BCR::ABL/p210*: 105%). После трехнедельной терапии: дазатииниб (100 мг) + дексаметазон (20 мг) количество бластов уменьшилось до 4.8%, а уровень *BCR::ABL/p210* снизился до 11.8%. Выполнение секвенирования по методу Сэнгера позволило обнаружить нуклеотидную замену Т на С в позиции 949 (NM_005157) гена *ABL*, что ассоциировано с появлением точечной мутации

F317L. Одновременно с этим определили новую 9-нуклеотидную вставку (GCCCTTCCC) в позиции между 1073–1074 (NM_005157) гена *ABL*. Возникновение названной инсерции связано с заменой лизина в положении K294 на четыре аминокислотных остатка, а именно, серин-пролин-серин-глутамин (K294SPSQ), которые предшествовали гистидину в позиции H295 (рис. 3).

После определения мутационного статуса *BCR::ABL* дазатииниб заменили на бозутииниб. Лечение бозутинибом (500 мг) + дексаметазон (40 мг) проводили в сочетании с двумя курсами терапии инотузумабом (0.8 и 0.5 мг/м²). У пациента отмечали снижение количества бластов до 0.2% и уровня экспрессии мРНК *BCR::ABL/p210* до 0.069%. Однако через 1.5 месяца после завершения курса лечения в костном мозге пациента наблюдалось увеличение количества бластов до 75.2% и повышение уровня *BCR::ABL/p210* до 86%. Секвенирование по методу Сэнгера показало отсутствие мутации F317L, но сохранение 9-нуклеотидной вставки. После терапии FLAG+венетоклакс (100 мг)+асциминиб (400 мг)

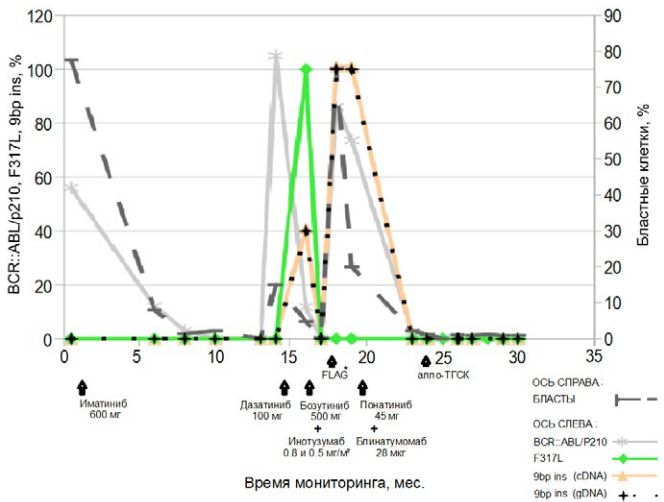


Рис. 2. Анализ биомаркеров в дебюте В-ОЛЛ и во время лечения. Терапия FLAG* включает FLAG+венетоклакс (100 мг)+асциминиб (400 мг). Количество (%) мРНК-транскрипта онкогена *BCR::ABL/p210* (мутаций) оценивали относительно референсного гена *ABL* (дикого типа). Количество (%) бластных клеток определяли, принимая за 100% число всех содержащих ядро элементов в костном мозге

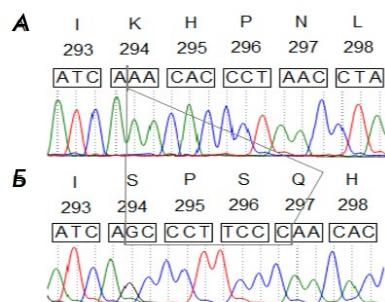


Рис. 3. Последовательность новой инсерции в тирозинкиназном домене BCR::ABL, обнаруженная у больного В-ОЛЛ. А – дебют В-ОЛЛ – мутации не обнаружено. Б – рецидив В-ОЛЛ – обнаружена инсерционная мутация (K294SPSQ)

уровень бластов в костном мозге снизился до 20% (BCR::ABL/p210: 73.5%). Секвенирование вновь подтвердило наличие инсерции. Смена терапии на понатиниб (45 мг)+блинатумомаб (28 мкг) привела к исчезновению лейкозного клона со вставкой, что коррелировало с полным молекулярным ответом и развитием полной клинико-гематологической ремиссии. Спустя 1 месяц после химиотерапии пациенту была проведена алло-ТГСК от неродственного полностью HLA-совместимого донора. Мониторинг экспрессии онкогена BCR::ABL/p210 и его мутационного статуса подтвердил отсутствие каких-либо молекулярно-генетических нарушений в течение последних 6 месяцев после алло-ТГСК. В настоящее время пациент находится в МОБ-отрицательной ремиссии.

ОБСУЖДЕНИЕ

В статье описан редкий клинический случай Ph-позитивного В-ОЛЛ с носительством химерного гена BCR::ABL, как правило, характерного для ХМЛ и отличающегося рядом особенностей. Во-первых, у пациента в дебюте В-ОЛЛ (Ph+, BCR::ABL/p210+) не обнаружили каких-либо мутаций в тирозинкиназном домене BCR::ABL. Во-вторых, развитие резистентности к дазатинибу коррелировало с обнаружением двух опухолевых клонов. Один из них включал точечную мутацию F317L, тогда как другой – новую 9-нуклеотидную вставку, которая приводила к замене лизина в положении K294 на четыре аминокислотных остатка – серин-пролин-серин-глутамин (K294SPSQ). При этом следует отметить, что обнаруженная инсерция не приводила к сдвигу рамки считывания. В-третьих, после возникновения резистентности к дазатинибу у пациента обнаружили рефрактерность к бозутинибу и асциманибу. При этом у больного В-ОЛЛ отмечали редукцию одного лейкозного клона, несущего мутацию F317L, и сохранение другого опухолевого клона, несущего

го вставку из 9 нуклеотидов. Только смена терапии на понатиниб+блинатумомаб привела к исчезновению клона с инсерцией. Согласно более ранним публикациям, точечная мутация F317L локализуется в участке киназного домена онкогена BCR::ABL, который отвечает за связывание иматиниба (IM binding site) [26]. В настоящее время известно, что носители этой мутации резистентны к иматинибу и дазатинибу, но чувствительны к бозутинибу [18]. В нашем случае лечение (бозутиниб+дексаметазон) в сочетании с двумя курсами терапии инотузумабом привело к исчезновению мутации F317L. Однако 9-нуклеотидная вставка при этом сохранялась. Одновременно с этим у пациента обнаружили повышение уровня экспрессии онкогена BCR::ABL/p210 и увеличение количества опухолевых клеток, что коррелировало с прогрессией лейкоза (рис. 2). Интересно отметить, что названная вставка, которая привела к замене лизина на четыре новых аминокислотных остатка, расположена в области SH3-контакта, составляющего тирозинкиназный домен BCR::ABL. Известно, что мутации, способствующие развитию резистентности к ИТК, чаще всего происходят в этом участке, а также в области P-loop [27]. Согласно более ранним исследованиям, контактный сайт SH3 необходим для аутоингибирования тирозинкиназы ABL в нормальной клетке [28]. В тех случаях, когда в этом участке возникают мутации, в частности инсерции, это приводит к значительному нарушению вышеуказанной функции. Кроме того, согласно последним исследованиям, появление в гене BCR::ABL мутаций, приводящих к модификации контактных сайтов (SH2 и SH3), наряду с дестабилизацией специфических третичных структур белка и крупномасштабными конформационными изменениями, рассматривают как дополнительные механизмы приобретения резистентности к ИТК [29].

В нашем случае появление 9-нуклеотидной вставки в области SH3-контакта из состава тирозинкиназного домена BCR::ABL привело к обнаружению нового мотива SPSQ. По-видимому, фосфорилирование этого мотива по серину одной из серин/треониновых киназ, в частности Dyrk1A, может способствовать прогрессии лейкоза. Ранее обнаружили, что Dyrk1A принимает участие в фосфорилировании нескольких таргетных белков, включая Amph1, которые также несут мотив SPSQ [30]. Интересно отметить, что повышенную экспрессию Dyrk1A недавно обнаружили при В-ОЛЛ (BCR::ABL/p190+) [31]. При этом показано, что поддержанию пролиферации лейкозных клеток, сверхэкспрессирующих Dyrk1A, способствует активация JAK/STAT-сигнального пути. Те же исследователи на примере мышинной модели В-ОЛЛ (BCR::ABL/p190+) предположили, что Dyrk1A может вовлекаться в регуляцию экспрессии BCR::ABL.

В частности, установлено, что искусственно вызванный гетерозиготный дефицит Dyrk1A у этих мышей помогает предотвратить выживание лейкемических клеток и способствует нормализации кроветворения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, у больного В-ОЛЛ (BCR::ABL/p210+) нами обнаружено возникновение резистентности к нескольким ИТК (дазатиниб, бозутиниб, асцимидин), а также к полихимиотерапии, включая режим FLAG. Это сопровождалось увеличением экспрессии BCR::ABL/p210+ и обнаружением двух

лейкозных клонов, один из которых включал точечную мутацию F317L, а другой – новую 9-нуклеотидную вставку (GCCCTTCCC), что сопровождалось замещением лизина в положении K294 на четыре аминокислотных остатка (K294SPSQ). В описанном случае В-ОЛЛ повышение устойчивости к ИТК может быть связано с увеличением уровня фосфорилирования серина в новом мотиве SPSQ при участии серин/треониновой киназы DyrkA1. Это может приводить к активации сигнального пути JAK/STAT, что, в конечном итоге, усиливает клеточную пролиферацию и поддерживает лейкемогенез. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ribera J, Morgades M, Zamora L, Montesinos P, Gómez-Seguí I, Pratscorona M, Sarrà J, Guàrdia R, Nomdedeu J, Tormo M, et al. // *Cancer*. 2015. V. 121. № 21. P. 3809–3817. doi: 10.1002/cncr.29579.
- Ishii Y, Nhaiyi M.K., Tse E., Cheng J., Massimino M., Durden D.L., Vigneri P., Wang J.Y. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 10. P. e0140585. doi: 10.1371/journal.pone.0140585.
- Manzella L., Tirro E., Pennisi M.S., Massimino M., Stella S., Romano C., Vitale S.R., Vigneri P. // *Curr. Cancer Drug Targets*. 2016. V. 16. № 7. P. 594–605. doi: 10.2174/1568009616666160105105857.
- Ren R. // *Nat. Rev. Cancer*. 2005. V. 5. № 3. P. 172–183. doi: 10.1038/nrc1567.
- Gleissner B., Gökuş N., Bartram C.R., Janssen B., Rieder H., Janssen J.W., Fonatsch C., Heyl A., Voliotis D., Beck J., et al. // *Blood*. 2002. V. 99. № 5. P. 1536–1543. doi: 10.1182/blood.v99.5.1536.
- Druker B.J., Sawyers C.L., Kantarjian H., Resta D.J., Reese S.F., Ford J.M., Capdeville R., Talpaz M. // *N. Engl. J. Med*. 2001. V. 344. № 14. P. 1038–1042. doi: 10.1056/NEJM200104053441402.
- Chen J., Schmitt A., Chen B., Rojewski M., Rübeler V., Fei F., Yu Y., Yu X., Ringhoffer M., von Harsdorf S., et al. // *J. Cell. Mol. Med*. 2008. V. 12. № 5B. P. 2107–2118. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00234.x.
- Mahon F.X., Deininger M.W., Schultheis B., Chabrol J., Reiffers J., Goldman J.M., Melo J.V. // *Blood*. 2000. V. 96. № 3. P. 1070–1079.
- Kantarjian H., Giles F., Wunderle L., Bhatta K., O'Brien S., Wassmann B., Tanaka C., Manley P., Rae P., Mietlowski W., et al. // *N. Engl. J. Med*. 2006. V. 354. № 24. P. 2542–2551. doi: 10.1056/NEJMoa055104.
- Mishra S., Zhang B., Cunnick J.M., Heisterkamp N., Groffen J. // *Cancer Res*. 2006. V. 66. № 10. P. 5387–5393. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3058.
- Travis J. // *Science*. 2004. V. 305. № 5682. P. 319–321. doi: 10.1126/science.305.5682.319a.
- Wu J., Meng F., Kong L.Y., Peng Z., Ying Y., Bornmann W.G., Darnay B.G., Lamothe B., Sun H., Talpaz M., et al. // *J. Natl. Cancer Inst*. 2008. V. 100. № 13. P. 926–939. doi: 10.1093/jnci/djn188.
- Rossari F., Minutolo F., Orciuolo E. // *J. Hematol. Oncol*. 2018. V. 11. № 1. P. 84. doi: 10.1186/s13045-018-0624-2.
- Jabbour E., Kantarjian H., Cortes J. // *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015. V. 15. № 6. P. 323–334. doi: 10.1016/j.clml.2015.03.006.
- Li H., Zhang W., Yi D., Ye Y., Xiao X. // *Leuk. Lymphoma*. 2017. V. 58. № 4. P. 1005–1007. doi: 10.1080/10428194.2016.1225205.
- Ernst T., La Rosée P., Müller M.C., Hochhaus A. // *Hematol. Oncol. Clin. North Am*. 2011. V. 25. № 5. P. 997–1008. doi: 10.1016/j.hoc.2011.09.005.
- Pfeifer H., Lange T., Wystub S., Wassmann B., Maier J., Binckebanck A., Giagounidis A., Stelljes M., Schmalzing M., Dührsen U., et al. // *Leukemia*. 2012. V. 26. № 7. P. 1475–1481. doi: 10.1038/leu.2012.5.
- Leow B.C.S., Kok C.H., Yeung D.T., Hughes T.P., White D.L., Eadie L.N. // *Sci. Rep*. 2023. V. 13. № 1. P. 13110. doi: 10.1038/s41598-023-40279-2.
- Kuang P., Liu T., Huang Q., Ye Y., Xiang B., Huang J., Diwu L., Wang Y., Meng W., Dong T., et al. // *Leuk. Res*. 2012. V. 36. № 8. P. e159–e162. doi: 10.1016/j.leukres.2012.04.019.
- Hayette S., Chabane K., Tchirkov A., Berger M.G., Nicolini F.E., Tournilhac O., Diwu L., Wang Y., Meng W., Dong T., et al. // *Haematologica*. 2009. V. 94. № 9. P. 1324–1326. doi: 10.3324/haematol.2009.007864.
- Kato K., Takagi S., Takano H., Tsunoda S., Watanabe O., Yamaguchi K., Kageyama K., Kaji D., Taya Y., Nishida A., et al. // *Int. J. Hematol*. 2024. V. 119. № 2. P. 205–209. doi: 10.1007/s12185-023-03691-y.
- Verma R., Babu A. *Human Chromosomes: Manual of Basic Techniques*. New York, 1989. 240 p.
- Bogdanov K.V., Nikulina T.S., Lomaia E.G., Slyadnev M.N., Zaritsky A.Y. // *Russ. J. Bioorg. Chem*. 2017. V. 43. № 5. P. 544–551. doi.org/10.1134/S1068162017040033.
- Branford S., Rudzki Z., Walsh S., Grigg A., Arthur C., Taylor K., Herrmann R., Lynch K.P., Hughes T.P. // *Blood*. 2002. V. 99. № 9. P. 3472–3475. doi: 10.1182/blood.v99.9.3472.
- Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н., Афанасьев Б.В., Троицкая В.В., Алешина О.А., Соколов А.Н., Кузьмина Л.А., Клясова Г.А., Бондаренко С.Н., Капланов К.Д. и др. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых лимфобластных лейкозов взрослых. М.: Национальное гематологическое общество, 2018. 110 с.
- O'Hare T., Eide C.A., Deininger M.W. // *Blood*. 2007. V. 110. № 7. P. 2242–2249. doi: 10.1182/blood-2007-03-066936.
- Wongboonma W., Thongnoppakhun W., Auewarakul C.U. // *Exp. Mol. Pathol*. 2012. V. 92. № 2. P. 259–265. doi: 10.1016/j.yexmp.2012.01.007.
- Chomel J.C., Sorel N., Turhan A.G. *Stem Cells and Cancer Stem Cells* / Ed. Hayat M. Dordrecht, Germany: Springer, 2012. 315 p.
- Azam M., Latek R.R., Daley G.Q. // *Cell*. 2003. V. 112. № 6. P. 831–843. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00190-9.
- Katayama S., Sueyoshi N., Kameshita I. // *Biochemistry*. 2015. V. 54. № 19. P. 2975–2987. doi: 10.1021/bi501308k.
- Bhansali R.S., Rammohan M., Lee P., Laurent A.P., Wen Q., Suraneni P., Yip B.H., Tsai Y.C., Jenni S., Bornhauser B., et al. // *J. Clin. Invest*. 2021. V. 131. № 1. P. E135937. doi: 10.1172/JCI135937.

УДК 577.21

Белок Aef1 дрозофилы, содержащий домены цинковых пальцев, колокализуется с энхансерами и участвует в регуляции транскрипции многих генов

Н. Е. Воробьева¹, Ю. В. Николенко², А. Н. Краснов^{1*}¹Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

*E-mail: krasnov@genebiology.ru

Поступила в редакцию 07.11.2024

Принята к печати 06.03.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27556

РЕФЕРАТ Ранее мы показали, что белок Aef1 дрозофилы, содержащий домены цинковых пальцев, взаимодействует с DUB-модулем комплекса SAGA. Сайты связывания белка Aef1 колокализируются с комплексами модификации и ремоделирования хроматина SAGA и dSWI/SNF, а также с репликационным комплексом ORC. Белок Aef1 преимущественно локализован на промоторах активных генов (55% сайтов) и может участвовать в регуляции транскрипции этих генов. В представленной работе установлено, что сайты связывания белка Aef1 в клетках S2 дрозофилы, расположенные вне промоторов генов, являются областями с пониженной плотностью нуклеосом и колокализируются с комплексами SAGA, dSWI/SNF и ORC. Сайты связывания Aef1 колокализируются с белком CBP и гистоновой меткой H3K27Ac, что считается меткой активных энхансеров. С целью изучения роли белка Aef1 в регуляции транскрипции провели RNA-Seq-эксперимент в нормальных клетках S2 дрозофилы и в клетках с РНК-интерференцией Aef1. Показали, что белок Aef1 влияет на транскрипцию 342 генов, причем более половины из них (178) содержат Aef1 на своих промоторах или энхансерах. Таким образом, белок Aef1 может привлекаться как на промоторы, так и на энхансеры и участвовать в регуляции транскрипции соответствующих генов как прямо, так и опосредованно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА Aef1, SAGA, dSWI/SNF, ORC, CBP, H3K27Ac, энхансеры.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ SAGA – гистонацетилтрансферазный комплекс; SWI/SNF – комплекс ремоделирования хроматина; ORC – комплекс позиционирования точек начала репликации в геноме.

ВВЕДЕНИЕ

Регуляция экспрессии генов эукариот – сложный процесс, который происходит на нескольких последовательных этапах транскрипции, процессинга мРНК, экспорта мРНК из ядра, трансляции и фолдинга белков [1]. Локальная структура хроматина, положение гена относительно функциональных ядерных компартментов и дальнейшие взаимодействия регуляторных элементов являются дополнительным уровнем регуляции генетических процессов в контексте сложной организации эукариотического генома в трехмерном пространстве клеточного ядра [2–5].

Высококонсервативный коактиваторный комплекс SAGA, основной функцией которого является модификация (ацетилирование и деубиквитинирование) гистонов хроматина, содержит более 20

белковых субъединиц [6]. Субъединицы комплекса SAGA взаимодействуют с различными активаторами транскрипции, привлекая таким образом комплекс на промоторы определенных генов [7, 8]. Между комплексами, ремоделирующими и модифицирующими хроматин, существует определенный синергизм действия. Показано, что комплекс SAGA ацетилюет нуклеосомы на промоторах генов в процессе активации транскрипции. Это приводит к привлечению комплекса ремоделирования хроматина dSWI/SNF и стимулированию его ремоделирующей активности [9, 10]. Комплекс ремоделирования хроматина SWI/SNF и ацетилтрансфераза CBP/p300/Nejire, которая ответственна за внесение метки активных энхансеров H3K27Ac, оказывают большой функциональный эффект на активацию

экдизон-зависимых генов *dhr3* и *hr4* в клетках S2 [11–14]. Показано, что ацетилирование гистона H3 (H3K27Ac) на энхансерах необходимо для активации экдизон-зависимых генов [15].

Комплексы SAGA и SWI/SNF дрозофилы локализованы на различных регуляторных элементах генома, включая промоторы, где зачастую колокализуются с репликационным комплексом ORC [16]. Инициация репликации происходит на множестве сайтов, которые называются участками начала (ориджинами) репликации. На ориджины репликации привлекается комплекс ORC, который состоит из шести субъединиц (ORC1–6). Комплекс ORC связывает определенные участки генома [17], однако субъединицы данного комплекса не проявляют явной специфичности к последовательностям ДНК. Поэтому встает вопрос, какие факторы определяют позиционирование ORC-комплексов в геноме.

В ходе предыдущих исследований нами обнаружено, что инсуляторный белок Su(Hw), содержащий домены цинковых пальцев, взаимодействует с белком ENY2 (субъединица комплекса SAGA) и привлекает комплексы SAGA, SWI/SNF и ORC на Su(Hw)-зависимые инсуляторы дрозофилы, участвуя одновременно в регуляции транскрипции и в позиционировании ориджинов репликации [18–22]. Предполагалось, что существуют и другие белки с доменами цинковых пальцев, которые взаимодействуют с комплексом SAGA дрозофилы и функционируют сходным образом на других регуляторных элементах генома, включая промоторы. В ходе дальнейших экспериментов были идентифицированы еще четыре белка с доменами цинковых пальцев: CG9890, CG9609, Aef1 (Adult enhancer factor 1) и CG10543 [23–27]. Эти белки также колокализуются с комплексами SAGA, ORC и dSWI/SNF на своих сайтах связывания, преимущественно на промоторах активных генов и могут принимать участие в регуляции транскрипции. Белок Aef1, как показано ранее, привлекается на энхансеры генов *adh*, *yp1*, *yp2* и влияет на их транскрипцию [28–30]. В предыдущей работе [26] нами установлено, что РНК-интерференция белка Aef1 влияет на транскрипцию нескольких генов. С целью изучения влияния белка Aef1 на транскрипцию всех генов в клетках S2 дрозофилы нами проведен RNA-Seq-эксперимент как в норме, так и при РНК-интерференции белка Aef1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток линии Schneider 2 (S2). РНК-интерференция

Клетки S2 культивировали при 25°C в среде Schneider's insect medium (Sigma, США) с добав-

лением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США). Клетки трансфицировали с использованием Effectene Transfection Reagent (Qiagen, США) по протоколу производителя. Нокдаун гена *Aef1* проводили с помощью РНК-интерференции согласно опубликованному протоколу [22]. В качестве неспецифического контроля для РНК-интерференции использовали дцРНК, соответствующую фрагменту плазмиды pBluescript II SK(-) (Stratagene, США). дцРНК для нокдауна гена *Aef1* и контроля синтезировали с использованием следующих праймеров:

Aef1, GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGATGTCATATCAAAAGCCT и GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGATCCGGGATGCTCGCTATGT; pBluescriptII SK(-), GAATTAATACGACTCACTATAGGAGAGTTACATGATCCCCCATG и GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGATTTCCGCCCGAAGAACG.

В каждый эксперимент по РНК-интерференции дцРНК брали из расчета 30 мкг на 1 млн клеток. Эксперимент выполняли в трех повторах. По прошествии 5 дней инкубации выделяли РНК.

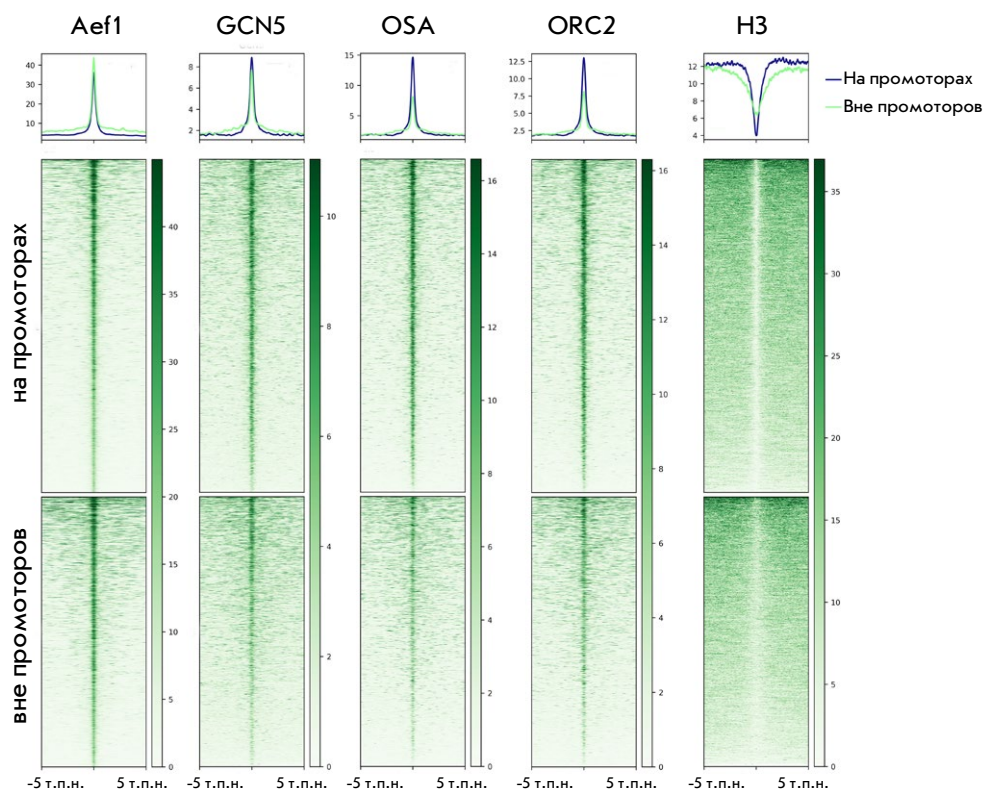
RNA-Seq и идентификация дифференциально экспрессирующихся генов

Библиотеки RNA-Seq получали с использованием набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs). Качество библиотек было проверено с помощью Bioanalyzer. Библиотеки секвенированы на геномном секвенаторе Illumina HiSeq 2000. Исходные риды в формате Fastq выравнивали на геном дрозофилы dmel_r6.54 с помощью программы Hisat2 [31], предварительно удалив адаптеры с помощью программы Atropos [32]. Также устанавливали ключ «-a», который позволяет искать множественные выравнивания, с целью их исключения из анализа. В дальнейшую работу брали только уникально картированные риды, обрабатывая флаг «NH:i» в результатах вывода программы Hisat2. Дифференциально экспрессирующиеся гены определяли с помощью программы CuffDiff2 [33].

Анализ обогащения белковых факторов на сайтах связывания Aef1

Для изучения колокализаций сайтов связывания белка Aef1 с различными белковыми факторами использовали ChIP-Seq-профили белков Aef1, GCN5, OSA, ORC2, H3, CBP, H3K27Ac, полученные нами ранее [14, 24, 26, 27, 34]. Данный анализ и визуализацию результатов выполняли с помощью пакета deepTool2 [35].

Рис. 1. Геномные колокализации сайтов связывания белка Aef1 с белками GCN5 (комплекс SAGA), OSA (комплекс dSWI/SNF), ORC2 (комплекс ORC) и гистона H3. Названия белков приведены вверху панелей. Представлены данные для сайтов Aef1, расположенных на промоторах (средняя панель) и вне их (нижняя панель). На верхней панели приведены усредненные профили. Синим цветом показан профиль белков, расположенных на промоторных сайтах Aef1, зеленым – на сайтах Aef1 вне промоторов



РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сайты связывания белка Aef1 являются областями с пониженной плотностью нуклеосом и колокализуются с комплексами SAGA, dSWI/SNF и ORC независимо от геномной локализации

Ранее мы показали, что белок Aef1 преимущественно локализован на промоторах активных генов (55% сайтов) и участвует в регуляции транскрипции [26]. Сайты связывания Aef1 колокализуются с комплексами модификации и ремоделирования хроматина SAGA и dSWI/SNF, а также с репликационным комплексом ORC. Существенная часть сайтов Aef1 (35%) расположена в теле генов (исключая промоторы) и межгенных областях (10% сайтов). В данной работе мы изучаем свойства сайтов связывания, расположенных вне промоторов генов. В анализе использовали ChIP-Seq-профили белков Aef1, GCN5 (комплекс SAGA), OSA (комплекс SWI/SNF), ORC2 (комплекс ORC) и гистона H3 [14, 24, 26, 27]. Проанализировано обогащение каждым из этих белков на двух группах сайтов – сайтах связывания Aef1, расположенных на промоторах и вне их (рис. 1). Показано, что исследуемые белковые комплексы привлекаются на обе группы сайтов примерно с одинаковой эффективностью, хотя сайты вне промоторов демонстрируют более низкие

уровни белков OSA и ORC2. Анализ распределения гистона H3 показал, что все сайты связывания Aef1 являются областями с пониженной плотностью нуклеосом, что характерно для активных регуляторных элементов, участвующих в регуляции транскрипции [36].

Сайты связывания белка Aef1 колокализуются с активными энхансерами

Чтобы лучше понять природу сайтов связывания белка Aef1, мы решили проанализировать сайты связывания, расположенные вне промоторов. В ряде работ показано, что белок Aef1 привлекается на энхансеры генов *adh*, *yp1*, *yp2* и влияет на их транскрипцию [28–30]. Маркером активных энхансеров является гистоновая метка H3K27Ac, за которую отвечает ацетилтрансфераза CBP/p300/Nejire. Комплекс ремоделирования хроматина SWI/SNF и ацетилтрансфераза CBP/p300/Nejire привлекаются на экдизон-зависимые энхансеры, что необходимо для активации транскрипции [14]. Мы решили проверить геномную колокализацию белка CBP и гистоновой метки H3K27Ac на сайтах связывания Aef1. Использовали ChIP-Seq-профили CBP и H3K27Ac, полученные нами ранее [14, 34]. Как видно из рис. 2, сайты связывания белка Aef1 характеризуются привлечением CBP и H3K27Ac. Таким образом, можно сделать вывод, что значи-

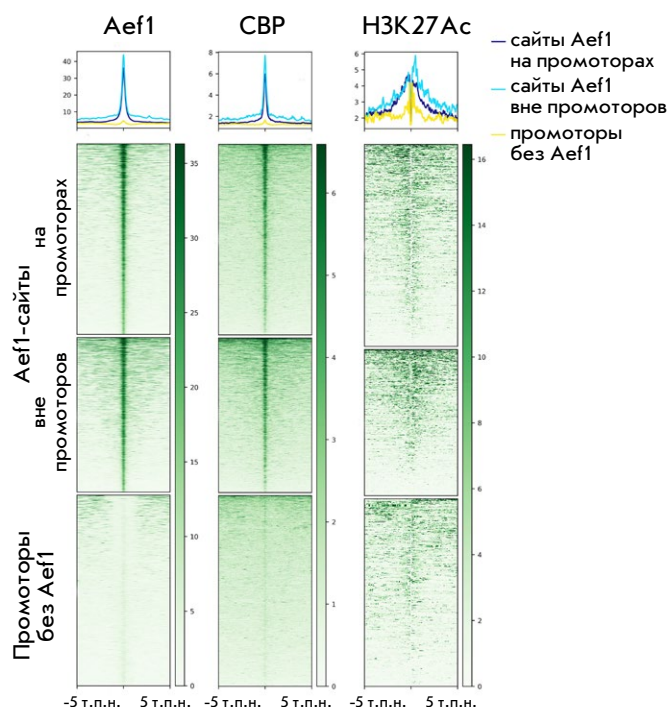


Рис. 2. Геномная колокализация белков Aef1, CBP и H3K27Ac на трех группах сайтов: на сайтах Aef1 на промоторах (верхние панели), на сайтах Aef1 вне промоторов (средние панели), на промоторах без Aef1 (нижние панели). Названия соответствующих белков указаны сверху панелей

тельная часть сайтов связывания Aef1 колокализуется с активными энхансерами.

Мы заметили, что CBP и H3K27Ac также маркируют и сайты связывания Aef1, расположенные на промоторах, и проанализировали еще одну группу сайтов, а именно промоторы, которые не содержат белка Aef1 (рис. 2, нижние панели). Анализ таких сайтов выявил низкий уровень CBP и H3K27Ac. Таким образом, привлечение CBP и высокий уровень сигнала H3K27Ac на Aef1-содержащих промоторах коррелируют с наличием сайта связывания Aef1, а не с промотором как таковым.

Мы решили идентифицировать потенциальный консенсус связывания белка Aef1 на промоторах и вне их с помощью программы MEME-ChIP. В обеих группах сайтов идентифицирован идентичный консенсус (CAA)_n (рис. 3), уже идентифицированный нами ранее на всем пуле сайтов [26]. Можно заключить, что обе группы сайтов образуются за счет ДНК-связывающих свойств белка Aef1, а не являются результатом образования петель от других регуляторных элементов. Это хорошо согласуется

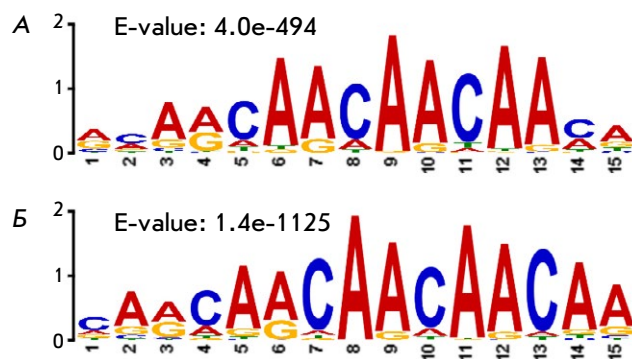


Рис. 3. Потенциальная консенсусная последовательность связывания белка Aef1, идентифицированная на промоторных сайтах (А) и вне промоторов (Б). Величина E-value отображает статистическую значимость результата и представляет собой вероятность случайного совпадения

с данными, согласно которым экспериментально подтвержденный сайт связывания Aef1 в энхансере гена *adh* содержит последовательность СААСАА.

Белок Aef1 участвует в регуляции транскрипции генов

Как уже упоминалось, сайты связывания белка Aef1 локализованы как в промоторных областях генов, так и вне промоторов. Причем обе группы сайтов колокализируются с метками активных энхансеров, что указывает на возможную роль белка Aef1 в регуляции транскрипции. Поэтому был проведен RNA-Seq-анализ в клетках S2 дрозофилы (в нормальных и с РНК-интерференцией белка Aef1). В результате были идентифицированы 342 гена, экспрессия которых значимо ($q\text{-value} < 0.05$) изменялась при РНК-интерференции Aef1. Все гены, на которые влияет РНК-интерференция белка Aef1, были разделены на несколько групп в зависимости от наличия сайтов связывания Aef1 в области гена. Оказалось, что 57 (17%) генов содержат Aef1 только в промоторной области, 52 (15%) содержат Aef1 только на потенциальных энхансерах и 69 (20%) генов содержат Aef1 одновременно на обоих регуляторных элементах. Сайтов связывания Aef1 не содержат 164 (48%) гена. Можно сделать вывод, что белок Aef1, локализованный как на промоторах, так и на энхансерах, принимает участие в регуляции транскрипции. Полученные результаты показывают также, что Aef1 может действовать прямо или косвенно, так как половина генов его не связывают. Можно предположить, что могут существовать петли между сайтами белка Aef1 (потенциальные энхансеры) и удаленными промоторами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе нами показано, что белок Aef1, содержащий цинковые пальцы, принимает участие в регуляции транскрипции. РНК-интерференция белка Aef1 влияет на транскрипцию 342 генов в S2-клетках дрозофилы. Около половины этих генов не содержат сайтов связывания белка Aef1 в промоторной области или теле гена, что может указывать на косвенные механизмы регуляции транскрипции, например, посредством образования петель между энхансерами и промоторами. Анализ сайтов связывания белка Aef1 показал, что они колокализуются с маркерами активных энхансеров: белком CBP и гистоновой меткой H3K27Ac. Это общее свойство сайтов связывания белка Aef1 не зависит от их локализации на промоторах или в межгенных областях. Aef1-содержащие промоторы гораздо сильнее обогащены белком CBP и H3K27Ac по сравнению с промоторами, не содержащими Aef1. Таким образом, можно заключить, что это свойство именно сайтов связывания Aef1, а не промоторов как таковых. Известно, что несколько Aef1-содержащих энхансеров дрозофилы расположены в областях, близких к сайтам начала транскрипции. В качестве примера можно привести энхансер гена *adh* [30]. Можно предположить, что белок Aef1 – это чисто энхансерный белок, а промоторная локализация обусловлена его привлечением на близлежащие энхансеры.

В предыдущих работах [18, 19] мы показали, что белок Su(Hw) привлекает комплекс SAGA и dSWI/SNF на свои сайты связывания, что приводит к формированию областей с низкой плотностью нуклеосом и привлечению репликационного комплекса ORC. В ходе дальнейших экспериментов были идентифицированы еще четыре белка с доменами цинковых пальцев, CG9890, CG9609, Aef1 и CG10543, которые колокализуются с комплексами SAGA, SWI/SNF и ORC [23–27]. Белок Su(Hw) локализуется преимущественно в межгенных областях на инсуляторах. Белки CG9890, CG9609 и CG10543 обладают преимущественно промоторной локализацией. Как показано в нашей работе, сайты связывания белка Aef1 колокализуются с маркерами активных энхансеров. Несмотря на различия в геномной локализации, все эти белки обладают схожими свойствами по отношению к комплексам SAGA, SWI/SNF и ORC. Мы предполагаем, что позиционирование ORC-комплексов в геноме детерминировано ДНК-связывающими белками, которые определяют формирование различных регуляторных элементов, включая инсуляторы, промоторы и энхансеры. Нами показано, что Aef1 может быть примером такого белка. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского
научного фонда, грант № 20-14-00269.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Orphanides G., Reinberg D. // *Cell*. 2002. V. 108. № 4. P. 439–451. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00655-4
- Maksimenko O., Georgiev P. // *Front Genet*. 2014. V. 5. P. 28. doi: 10.3389/fgene.2014.00028
- van Bommel J.G., Pagie L., Braunschweig U., Brugman W., Meuleman W., Kerkhoven R.M., van Steensel B. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 11. P. e15013. doi: 10.1371/journal.pone.0015013
- Rando O.J., Chang H.Y. // *Annu Rev. Biochem*. 2009. V. 78. P. 245–271. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.071107.134639
- Tchurikov N.A., Krasnov A.N., Ponomarenko N.A., Golova Y.B., Chernov B.K. // *Nucleic Acids Res*. 1998. V. 26. № 13. P. 3221–3227. doi: 10.1093/nar/26.13.3221
- Koutelou E., Hirsch C.L., Dent S.Y. // *Curr. Opin Cell Biol*. 2010. V. 22. № 3. P. 374–382. doi: 10.1016/j.ceb.2010.03.005
- Baker S.P., Grant P.A. // *Oncogene*. 2007. V. 26. № 37. P. 5329–5340. doi: 10.1038/sj.onc.1210603
- Brown C.E., Howe L., Sousa K., Alley S.C., Carrozza M.J., Tan S., Workman J.L. // *Science*. 2001. V. 292. № 5525. P. 2333–2337. doi: 10.1126/science.1060214
- Chatterjee N., Sinha D., Lemma-Dechassa M., Tan S., Shogren-Knaak M.A., Bartholomew B. // *Nucleic Acids Res*. 2011. V. 39. № 19. P. 8378–8391. doi: 10.1093/nar/gkr535
- Li B., Carey M., Workman J.L. // *Cell*. 2007. V. 128. № 4. P. 707–719. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.015
- Mazina M.Y., Kovalenko E.V., Derevyanko P.K., Nikolenko J.V., Krasnov A.N., Vorobyeva N.E. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2018. V. 1861. № 2. P. 178–189. doi: 10.1016/j.bbagr.2018.01.016
- Mazina M.Y., Nikolenko J.V., Fursova N.A., Nedil'ko P.N., Krasnov A.N., Vorobyeva N.E. // *Cell Cycle*. 2015. V. 14. № 22. P. 3593–3601. doi: 10.1080/15384101.2015.1100772
- Mazina M.Y., Kocheryzhkina E.V., Nikolenko J.V., Krasnov A.N., Georgieva S.G., Vorobyeva N.E. // *Dokl. Biochem. Biophys*. 2017. V. 473. № 1. P. 145–147. doi: 10.1134/S1607672917020144
- Krasnov A.N., Evdokimova A.A., Mazina M.Y., Erokhin M., Chetverina D., Vorobyeva N.E. // *Int. J. Mol. Sci*. 2023. V. 24. № 14. P. 11844. doi: 10.3390/ijms241411844
- Cheng D., Dong Z., Lin P., Shen G., Xia Q. // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. V. 23. № 18. P. 10791. doi: 10.3390/ijms231810791
- MacAlpine D.M., Rodriguez H.K., Bell S.P. // *Genes Dev*. 2004. V. 18. № 24. P. 3094–3105. doi: 10.1101/gad.1246404
- Eaton M.L., Prinz J.A., MacAlpine H.K., Tretyakov G., Kharchenko P.V., MacAlpine D.M. // *Genome Res*. 2011. V. 21. № 2. P. 164–174. doi: 10.1101/gr.116038.110
- Vorobyeva N.E., Mazina M.U., Golovnin A.K., Kopytova D.V., Gurskiy D.Y., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Georgiev P.G., Krasnov A.N. // *Nucleic Acids Res*. 2013. V. 41. № 11. P. 5717–5730. doi: 10.1093/nar/gkt297
- Mazina M., Vorobyeva N.E., Krasnov A.N. // *Tsitologiya*. 2013. V. 55. № 4. P. 218–224.
- Kurshakova M., Maksimenko O., Golovnin A., Pulina M., Georgieva S., Georgiev P., Krasnov A. // *Mol. Cell*. 2007. V. 27. № 2. P. 332–338. doi: 10.1016/j.molcel.2007.05.035
- Vorobyeva N.E., Erokhin M., Chetverina D., Krasnov

- A.N., Mazina M.Y. // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 16963. doi: 10.1038/s41598-021-96488-0
22. Vorobyeva N.E., Krasnov A.N., Erokhin M., Chetverina D., Mazina M. // *Epigenetics Chromatin*. 2024. V. 17. № 1. P. 17. doi: 10.1186/s13072-024-00541-x
23. Nikolenko J.V., Fursova N.A., Mazina M.Y., Vorobyeva N.E., Krasnov A.N. // *Mol. Biol. (Moscow)*. 2022. V. 56. № 4. P. 557–563. doi: 10.31857/S0026898422040085
24. Fursova N.A., Mazina M.Y., Nikolenko J.V., Vorobyova N.E., Krasnov A.N. // *Acta Naturae*. 2020. V. 12. № 4. P. 114–119. doi: 10.32607/actanaturae.11056
25. Fursova N.A., Nikolenko J.V., Soshnikova N.V., Mazina M.Y., Vorobyova N.E., Krasnov A.N. // *Acta Naturae*. 2018. V. 10. № 4. P. 110–114.
26. Nikolenko J.V., Kurshakova M.M., Kopytova D.V., Vdovina Y.A., Vorobyova N.E., Krasnov A.N. // *Mol. Biol. (Moscow)*. 2024. V. 58. № 4. P. 700–707. doi: 10.1134/S0026893324700286
27. Nikolenko J.V., Kurshakova M.M., Kopytova D.V., Vdovina Y.A., Vorobyova N.E., Krasnov A.N. // *Mol. Biol. (Moscow)*. 2024. V. 58. № 4. P. 693–699. doi: 10.1134/S0026893324700274
28. An W., Wensink P.C. // *Genes Dev.* 1995. V. 9. № 2. P. 256–266. doi: 10.1101/gad.9.2.256
29. Brodu V., Mugat B., Fichelson P., Lepesant J.A., Antoniewski C. // *Development*. 2001. V. 128. № 13. P. 2593–2602. doi: 10.1242/dev.128.13.2593
30. Falb D., Maniatis T. // *Genes Dev.* 1992. V. 6. № 3. P. 454–465. doi: 10.1101/gad.6.3.454
31. Kim D., Paggi J.M., Park C., Bennett C., Salzberg S.L. // *Nat. Biotechnol.* 2019. V. 37. № 8. P. 907–915. doi: 10.1038/s41587-019-0201-4
32. Didion J.P., Martin M., Collins F.S. // *Peer. J.* 2017. V. 5. P. e3720. doi: 10.7717/peerj.3720
33. Trapnell C., Hendrickson D.G., Sauvageau M., Goff L., Rinn J.L., Pachter L. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 1. P. 46–53. doi: 10.1038/nbt.2450
34. Mazina M.Y., Kovalenko E.V., Vorobyeva N.E. // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 172. doi: 10.1038/s41598-020-80650-1
35. Ramirez F., Ryan D.P., Gruning B., Bhardwaj V., Kilpert F., Richter A.S., Heyne S., Dundar F., Manke T. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № W1. P. W160–165. doi: 10.1093/nar/gkw257
36. McKay D.J., Lieb J.D. // *Dev. Cell.* 2013. V. 27. № 3. P. 306–318. doi: 10.1016/j.devcel.2013.10.009

УДК 577.218

Цис-регуляторная функция промотора гена *Pou5f1* в МНС-локусе мыши

В. В. Ермакова[#], Е. В. Александрова[#], А. А. Кузьмин^{*}, А. Н. Томили^{**}

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

^{*}E-mail: a.kuzmin@incras.ru; ^{**}e-mail: a.tomilin@incras.ru[#]Равный вклад.

Поступила в редакцию 24.12.2024

Принята к печати 28.02.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27602

РЕФЕРАТ Ген *Pou5f1* кодирует белок Oct4 – один из ключевых транскрипционных факторов, необходимых для поддержания плюрипотентного состояния клеток эпибласта и жизнеспособности половых клеток. Однако с использованием методов функциональной генетики были получены убедительные данные, свидетельствующие о более широком спектре функций *Pou5f1* в онтогенезе мыши, в частности, в сдерживании атеросклеротических процессов. При изучении данного аспекта акцент делался на функциях белка Oct4, тогда как вклад регуляторных последовательностей, расположенных в границах гена *Pou5f1*, в реализацию этих неканонических функций не рассматривался. В настоящей работе на основе эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши нами создана генетическая модель, позволяющая оценить влияние промотора гена *Pou5f1* на транскрипцию окружающих его генов Major Histocompatibility Complex (МНС)-локуса. Нами показано, что делеция этого промотора не оказывает существенного влияния на экспрессию ряда генов данного локуса ни в ЭСК, ни в трофобластных производных этих клеток. Важное исключение составил ген *Tcf19*, который активировался при такой делеции и который может быть ассоциирован с патологией атеросклероза через свое провоспалительное действие. При дальнейшем использовании разработанная генетическая модель позволит оценить вклад цис-регуляторной связи *Pou5f1* с *Tcf19* и, возможно, с другими генами в описанный ранее атеросклеротический фенотип мышей, несущих делецию промотора гена *Pou5f1* в гладкомышечных и эндотелиальных клетках кровеносных сосудов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Pou5f1*, Oct4, эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), Major Histocompatibility Complex (МНС), трофэктодерма, регуляция экспрессии генов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ТПК – трофобластоподобные клетки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; МЭФ – эмбриональные фибробласты мыши; ММС – митомицин С; *Egf4* – фактор роста фибробластов 4; *IFN γ* – интерферон-гамма; LPS – липополисахарид; МНС – Major Histocompatibility Complex (главный комплекс гистосовместимости); гРНК – гидовая (направляющая) РНК; GR – глюкокортикоидный рецептор.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из ключевых факторов, ответственных за поддержание плюрипотентного состояния клеток эпибласта и их культивируемых аналогов – эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), – является белок Oct4, также известный как компонент «коктейля Яманаки» и используемый для репрограммирования соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) [1]. ЭСК и иПСК, объединенные термином плюрипотентные стволовые клетки (ПСК), обладают способностью к неограниченной пролиферации и дифференцировке в любые типы соматических клеток. Указанные свойства делают эти клетки ценным инструментом для изучения ранних стадий эмбриогенеза, модели-

рования генетических заболеваний *in vitro* и разработки подходов для регенеративной медицины. Самоподдержание и выбор направления дифференцировки ПСК критически зависят от экспрессии Oct4 [2], даже небольшие изменения уровня этого белка оказывают существенное влияние на судьбу ПСК [3, 4].

Транскрипционный фактор Oct4 кодируется геном *Pou5f1*, расположенным в кластере генов главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС). Ген *Pou5f1* находится на коротком плече хромосомы 6 человека и на хромосоме 17 мыши (рис. 1). В обоих случаях рассматриваемый локус является одной из самых плотных областей генома [5], включающей большое количе-

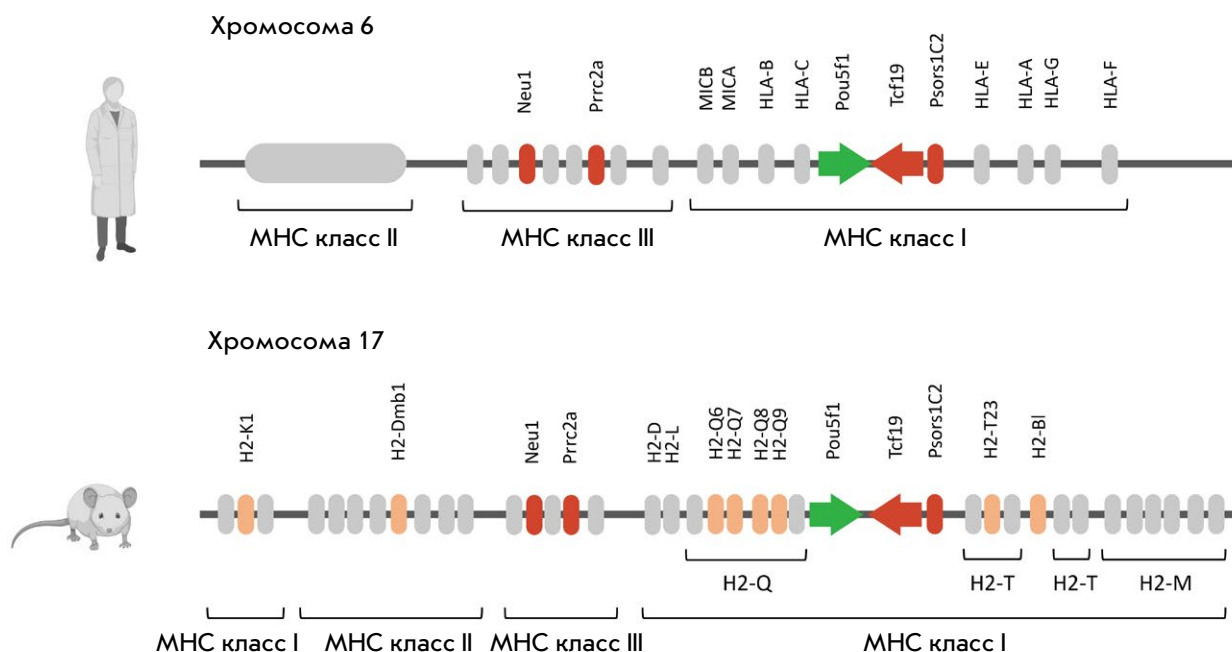


Рис. 1. Схема локуса *Pou5f1*-MHC. Схематическое изображение локусов *Pou5f1*-MHC человека (сверху) и мыши (снизу). Исследуемые в работе гены выделены цветом: *Pou5f1* – зеленым, гены MHC – оранжевым, гены, предположительно взаимодействующие с *Pou5f1*, включая *Tcf19*, – красным. Направление транскрипции генов *Pou5f1* и *Tcf19* обозначено дополнительно стрелками. Рисунок создан с использованием BioRender

ство генов, которые кодируют белки, участвующие в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета, в частности, отвечающих за процессинг и презентацию антигенов [6].

Ранее считалось, что для регуляции уровня экспрессии *Pou5f1* и, как следствие, нормального функционирования ПСК и их корректного выхода из плюрипотентного состояния достаточно дистального энхансера, взаимодействующего с промотором *Pou5f1* в «наивных» ПСК, а также проксимального энхансера, активного в праймированных плюрипотентных клетках [7, 8]. Однако помимо классических регуляторных элементов гена *Pou5f1* (промотора, дистального и проксимального энхансеров), описанных еще в 1996 году Yeom и соавт. [9], развитие высокопроизводительных методов секвенирования привело к открытию множества ранее неизвестных *цис*-регуляторных элементов, влияющих на экспрессию этого гена [10, 11]. Таким образом, стало очевидным, что регуляция гена *Pou5f1* представляет собой значительно более тонко настроенный процесс, чем считалось ранее. В настоящий момент функциональная роль всех регуляторных элементов в системе контроля экспрессии *Pou5f1* остается недостаточно изученной. В исследовании Diao и соавт. показано, что 17 из 41 обнаруженного регуляторного элемента *Pou5f1* являются промоторами других белкокодирующих генов, включая ближайшего сосе-

да *Pou5f1-Tcf19* [10], однако не ясно, существует ли обратная *цис*-регуляторная взаимосвязь между *Pou5f1* и окружающими его генами. На мысль о существовании подобной взаимосвязи наталкивают также результаты работы, в которой обнаружили корреляцию между риском возникновения псориаза и наличием полиморфизмов в области промотора и первого экзона гена *Pou5f1* [12].

Интерес вызывает также отрицательная корреляция между экспрессией генов *Pou5f1* и MHC в ходе развития. Так, считается, что в ЭСК мыши экспрессия генов MHC первого и второго класса находится на низком уровне, возрастая в ходе дифференцировки [13, 14]. При этом экспрессия *Pou5f1*, согласно основной принятой гипотезе, ограничена ПСК и половыми клетками [9]. Исходя из этого можно предположить, что активность гена *Pou5f1* может переключаться с белкокодирующей на *цис*-регуляторную, необходимую для регуляции активирующихся генов MHC. Такой механизм действия согласуется с данными, полученными на животных, у которых делеция промотора *Pou5f1* в гладкомышечных и эндотелиальных клетках приводила к заметному ухудшению атеросклеротического фенотипа, а именно к уменьшению стабильности бляшек, накоплению липидов, воспалению, снижению митохондриального потенциала в эндотелиальных клетках и снижению миграции гладкомышечных клеток [15, 16].

В настоящей работе нами создана генетическая модель, позволяющая оценить *цис*-регуляторную функцию промоторной области *Pou5f1* в отношении генов локуса *Pou5f1*-МНС в ЭСК и их дифференцированных потомках. Добившись дифференцировки ЭСК в трофобластном направлении с помощью форсированной экспрессии *Cdx2*, мы не обнаружили роли промоторной области *Pou5f1* в регуляции экспрессии различных генов МНС-локуса. Однако наши данные выявили репрессорную активность промотора *Pou5f1* в отношении гена *Tcf19* как в ЭСК мыши, так и в трофобластных производных этих клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши

Эмбриональные фибробласты мыши (МЭФ) выделяли в соответствии с действующими зоозащитными актами Российской Федерации при одобрении Совета по этике Института (протокол № 12/23).

МЭФ, полученные из эмбрионов мышей линии C57Bl6 на 12–14-й день развития, культивировали на адгезивном пластике, предварительно обработанном 0.1% раствором желатина (Sigma, США). Клетки культивировали в среде DMEM GlutaMAX (Gibco, США), содержащей 10% HyClone FBS (Cytiva, США) и 1×пенициллин/стрептомицин (Gibco). Спустя 4–5 пассажей, по достижении конfluence, МЭФ инкубировали в течение 2.5 ч в среде с добавлением 10 мкг/мл митомицина-С (MMC, Sigma). По окончании инкубации клетки промывали PBS и криоконсервировали для последующего использования.

Культивирование ЭСК

ЭСК мыши культивировали при температуре 37°C во влажной среде в атмосфере 5% CO₂ на адгезивных планшетах. В качестве подложки использовали фидерный слой митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши (MMC-МЭФ) плотностью 36×10^3 клеток/см², высеваемых на лунки за сутки до внесения ЭСК. Клетки культивировали в стандартной ЭСК среде S/L, включающей KnockOut DMEM (Gibco), обогащенной 15% HyClone FBS (Cytiva), 1×NEAA (Gibco), 1×пенициллин/стрептомицин (Gibco), 0.1 mM β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich), 2 mM L-глутамин (Gibco) и 1:5000 hLIF собственного производства.

Для перевода ЭСК в наивное плюрипотентное состояние использовали среду 2i/L, включающую N2B27 (смесь DMEM/F12 (Gibco) и Neurobasal (1 : 1), обогащенную 1× N2, 1× B27 (без ретиноевой кислоты, Gibco), 50 мкМ β-меркаптоэтанол (Sigma-

Aldrich), 0.005% BSA (Sigma), 1× пенициллин/стрептомицин (Gibco) и 2 mM L-глутамин (Gibco)) с добавлением 3 мкМ CHIR99021 (Axon), 1 мкМ PD0325901 (Axon) и 1 : 5000 hLIF. Планшеты для культивирования обрабатывали 0.01% раствором поли-L-орнитина (Sigma).

Плазмиды

Плазмида Rosa26-GOF-2APuro-MUT была получена на основе плазмиды Rosa26-GOF-2APuro, описанной ранее [17]. Rosa26-GOF-2APuro-MUT содержит фрагмент 9.8 т.п.н. гена *Pou5f1* с его проксимальным и дистальным энхансерами, плечи гомологии к локусу *Rosa26* и ген устойчивости к селективному маркеру пурамицину. Также в PAM-сайт первого экзона гена *Pou5f1* в плазмиде Rosa26-GOF-2APuro была внесена точечная синонимичная мутация, предотвращающая нокаут экзогенного *Pou5f1*.

Плазмиду pRosa26-GR-Cdx2, содержащую последовательность *Cdx2*, «сшитую» с лигандсвязывающим доменом глюкокортикоидного рецептора (GR), лигировали с использованием ранее полученных конструкций [18]. Плазмида также содержит ген устойчивости к генетицину и плечи гомологии к локусу *Rosa26*.

Для внедрения конструкций в аллели локуса *Rosa26* использовали последовательность гидовой РНК (гРНК) 5'-ACTCCAGTCTTTCTAGAAGA-3' в паре с Cas9-никазой.

CRISPR/Cas9-опосредованный нокаут *Pou5f1* проводили с помощью гРНК 5'-ACTCGTATGCGGGCGGACAT-3', кодируемой вектором pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9-EGFP. гРНК-последовательности были подобраны с помощью онлайн-ресурса Benchling (www.benchling.com).

Получение мутантных линий ЭСК

Для создания линии ЭСК *Pou5f1*^{-/-}; *Rosa26*^{*Pou5f1*/Cdx2} на первом этапе получали клетки *Pou5f1*^{+/+}; *Rosa26*^{*Pou5f1*/+}, содержащие в локусе *Rosa26* последовательность *Pou5f1* с синонимичной заменой в области первого экзона (в качестве донорской последовательности использовали вектор Rosa26-GOF-2APuro-MUT). Далее для нокаута эндогенного *Pou5f1* ЭСК *Pou5f1*^{+/+}; *Rosa26*^{*Pou5f1*/+} трансфицировали гРНК-/Cas9-кодирующей плазмидой. Трансфекцию проводили с использованием FuGene HD (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Нокаут эндогенных аллелей *Pou5f1* и интактность экзогенной конструкции в локусе *Rosa26* подтверждали с помощью секвенирования по Сэнгеру ТА-клонированных аллелей (рис. 2), для чего ампликоны этих аллелей клонировали в вектор pAL2-T («Евроген»).

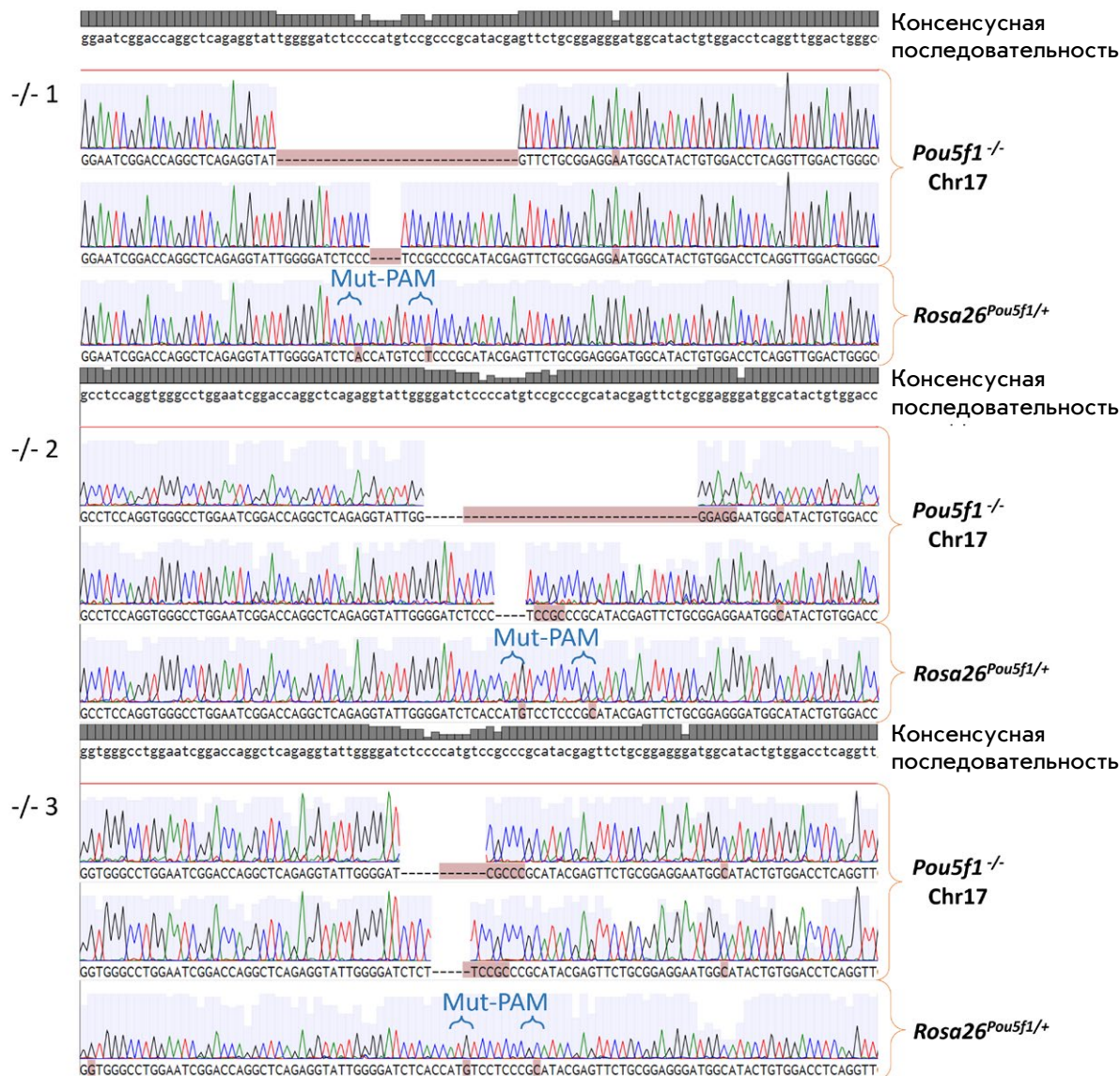


Рис. 2. Нуклеотидные последовательности эндогенных аллелей *Pou5f1* в линии *Pou5f1*^{-/-}; *Rosa26*^{*Pou5f1*/+}, три биологических повторности. Обозначения: -/- 1–3 – номера клонов ЭСК *Pou5f1*^{-/-}; *Rosa26*^{*Pou5f1*/+}

Для получения ЭСК *Pou5f1*^{-/-}; *Rosa26*^{*Pou5f1*/Cdx2} и *Pou5f1*^{Δ/Δ}; *Rosa26*^{*Pou5f1*/Cdx2} во второй аллель *Rosa26* вышеописанных линий ЭСК помещали последовательность GR-Cdx2. В качестве донорской последовательности использовали вектор *Rosa26*-GR-Cdx2. Отбор колоний проводили в течение 6 дней с использованием антибиотика генетицина (G418) в концентрации 500 мкг/мл.

Трофобластная дифференцировка

Линии ЭСК *Pou5f1*^{-/-}; *Rosa26*^{*Pou5f1*/Cdx2} и *Pou5f1*^{Δ/Δ}; *Rosa26*^{*Pou5f1*/Cdx2} культивировали в среде S/L с добавлением антибиотиков G418 (500 мкг/мл, Neofroxx)

и пурамицина (1 мкг/мл, Sigma-Aldrich). Клетки затем переводили в наивное состояние, культивируя их в 2i/L-условиях на протяжении 7 дней, после чего пересевали на лунки, покрытые слоем ММС-МЭФ и культивировали в TS-среде, которую готовили на основе среды RPMI 1640 (Gibco) с добавлением 20% HyClone FBS (Cytiva), 1 мМ пирувата натрия (Gibco), 1× пенициллин/стрептомицина (Gibco), 0.1 мМ β-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich), 2 мМ L-глутамина (Gibco), 1 мкг/мл гепарина (Hep) (Sigma-Aldrich) и 25 нг/мл фактора роста фибробластов 4 (Fgf4) (Peprotech). Среду предварительно кондиционировали на ММС-МЭФ на протяжении

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные для количественной ПЦР в реальном времени

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'→3'	T, °C	Размер ампликона, п.н.
qGAPDH-F	ACCCTTAAGAGGGATGCTGC	60	83
qGAPDH-R	CGGGACGAGGAAACACTCTC		
qOct4A-F	AGTGGAAAGCAACTCAGAGG	60	135
qOct4A-R	AACTGTTCTAGCTCCTTCTGC		
qCdx2-F	AGTCCCTAGGAAGCCAAGTGAA	60	96
qCdx2-R	AGTGAAACTCCTTCTCCAGCTC		
qCdx2GR-F	GCTGAAATCATCACCAATCAGATAC	60	134
qCdx2GR-R	CGCACGGAGCTAGGATACAT		
qCdx2endo-F	AGGCTGAGCCATGAGGAGTA	60	125
qCdx2endo-R	ctGAGGTCCATAATTCCACTCA		
qMash2-F	CGGGATCTGCACTCGAGGATT	65	86
qMash2-R	CCCCGTACCAGTCAAGGTGTG		
qTcfap2C-F	CGTCTCTCGTGGAAGGTGAAG	60	114
qTcfap2C-R	CCCCAAGATGTGGTCTCGTT		
qHand1-F	CCTACTTGATGGACGTGCTGG	60	129
qHand1-R	TTTCGGGCTGCTGAGGCAAC		
qElf5-F	CATTGCTCGCAAGGTTACT	60	133
qElf5-R	GAGGCTTGTTCTGGCTGTGA		
qH2-K1-F	TCCACTGTCTCCAACATGGC	60	113
qH2-K1-R	CCACCTGTGTTTCTCCTTCTCA		
qH2-Q6,8-F	CTGACCCTGATCGAGACCCG	60	112
qH2-Q6,8-R	TGTCCACGTAGCCGACGATAA		
qH2-Q7,9-F	GAGCTGTGGTGGCTTTTGTG	68	85
qH2-Q7,9-R	TGTCTTCATGCTGGAGCTGG		
qH2-Q10-F	ACATTGCTGATCTGCTGTGGC	60	120
qH2-Q10-R	GTCAGGTGTCTTCACACTGGAG		
qH2-Dmb1-F	ATGGCGCAAGTCTCATTCCT	68	95
qH2-Dmb1-R	TCTCCTTG GTTCCGGGTCTCT		
qH2-B1-F	ACCGGCTCCAACATGGTAAA	60	114
qH2-B1-R	AGGAAGGATGGCTATTTTCTGCT		
qH2-T23-F	ATAGATACCTACGGCTGGGAAATG	60	105
qH2-T23-R	AGCACCTCAGGGTGACTTCAT		
qTcf19-F	GATGATGAGGTCTCCCCAGG	60	107
qTcf19-R	TTTCCCTGTGGTCAATTCCTC		
qPsors1C2-F	CTGTGTGCAGGAGGCATTTTC	68	86
qPsors1C2-R	AGGGATCACCAGGGATTGGG		
Gm32362-F	GTCTGGAGAACCAAAGACAGCA	60	114
Gm32362-R	TTACAGCTTGGGATGCTCTTC		
Prrc2a-F	GAGATCCAGAAACCCGCTGTT	60	104
Prrc2a-R	TTCAGGCTTGGAAGGTTGGC		
Neu1-F	CCGGGATGTGACCTTCGAC	60	127
Neu1-R	CAGGGTCAGGTTCACTCGGA		
TNF-F	GTGCCTATGTCTCAGCCTCTT	60	117
TNF-R	AGGCCATTTGGGAACCTTCTCATC		

72 ч. Для культивирования клеток использовали смесь кондиционированной и свежей среды в соотношении 7 : 3. На следующий день после посева к клеткам добавляли дексаметазон (1 мкМ, Белмедпрепараты), а также G418 (500 мкг/мл, NeoFroxx). Спустя 4 дня клетки пересеивали и культивировали в стандартной или моделирующей воспалении TS-среде. Последняя дополнительно включала 300 ед/мл интерферона-гамма (IFN γ , ProSpec) или 1 мкг/мл липополисахарида *E. coli* (LPS, Sigma-Aldrich). Спустя сутки после индукции провоспалительного ответа в клетках анализировали экспрессию маркеров трофобласта.

Количественная ОТ-ПЦР

РНК выделяли при помощи набора RNA Solo («Евроген»), а для синтеза кДНК использовали 1 мкг тотальной РНК. Синтез кДНК проводили в присутствии ингибитора РНКаз RiboCare и ревертазы MMLV («Евроген»). ПЦР в реальном времени проводили с помощью системы LightCycler® 96 (Roche) с использованием 5 × qPCRmix-HS SYBR («Евроген»). Специфичность праймеров и оптимальные температуры отжига (T_o) предварительно проверяли с помощью ПЦР и электрофореза в 4% агарозном геле. Последовательности праймеров, а также подобранные T_o приведены в табл. 1. В качестве референсного гена использовали ген домашнего хозяйства *GAPDH*. Для каждой линии использовали не менее трех биологических и двух технических повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение линий контрольных ЭСК с нокаутом гена *Pou5f1*

Для исследования *цис*-регуляторной роли промотора гена *Pou5f1* в ЭСК и полученных из них дифференцированных клетках использовали созданную нами ранее линию ЭСК с Cre-опосредованной делецией фланкированных *loxP*-сайтами промотора и первого экзона гена *Pou5f1*. Эти клетки поддерживают плюрипотентное состояние благодаря экспрессии экзогенного, встроенного в локус *Rosa26* фрагмента гена *Pou5f1* – *Pou5f1 $\Delta\Delta$;Rosa26^{Pou5f1/+}* [17]. Делеция в созданной линии идентична делеции, полученной при исследовании роли транскрипционного фактора Oct4 в гладкомышечных и эндотелиальных клетках мыши, моделирующих атеросклероз [15, 16]. Для решения поставленной задачи мы дополнили полученную ранее линию новой, контрольной линией – *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/+}*, в которой нокаут эндогенного *Pou5f1* получен за счет инделмутаций в первом экзоне. Как и в случае с линией

Pou5f1 $\Delta\Delta$;Rosa26^{Pou5f1/+}, экспрессия Oct4 обеспечивалась за счет фрагмента 9.8 т.п.н. *Pou5f1*, помещенного в один из аллелей *Rosa26* (рис. 2). Таким образом, мы избавились от вариабельности в экспрессии Oct4 между двумя линиями ЭСК, которая бы неизбежно возникла при использовании линии *Pou5f1 $\Delta/+$* . Важно подчеркнуть, что в аллеле *Pou5f1* сохранен интактный промотор, что позволяет оценить его функции при сравнении с аллелем *Pou5f1 Δ* . Ранее мы обнаружили, что аллель *Rosa26^{Pou5f1}* может обеспечивать самоподдержание *Pou5f1 $\Delta\Delta$;Rosa26^{Pou5f1/+}* ЭСК, однако такие клетки не способны нормально дифференцироваться, что, как мы заключили, обусловлено отсутствием в 9.8 т.п.н. *Pou5f1*-фрагменте *цис*-регуляторных элементов, ответственных за корректную регуляцию гена в ходе дифференцировки [17]. Таким образом, направленная дифференцировка *Pou5f1 $\Delta\Delta$;Rosa26^{Pou5f1/+}* и *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/+}* ЭСК представляет отдельную задачу, которую нужно было решить в ходе настоящего исследования.

Оценка способности полученных ЭСК к дифференцировке в трофобластном направлении

В качестве направления дифференцировки мы выбрали трофобластную дифференцировку. Известно, что клетки трофобласта, окончательно сегрегирующие на стадии поздней бластоцисты в виде трофэктодермы, после имплантации способствуют формированию иммунотолерантности организма матери к плоду за счет активного синтеза неклассических МНС [19]. Также известно, что сегрегация трофобласта сопровождается выключением гена *Pou5f1* [20], что, как мы ожидали, может способствовать переключению активности его промоторной области с регуляции самого *Pou5f1* на регуляцию окружающих генов МНС-кластера [21]. Исходя из этого мы заключили, что трофобластная дифференцировка может послужить подходящей моделью для оценки динамики экспрессии генов в локусе *Pou5f1*-МНС.

В основу протокола дифференцировки легла форсированная экспрессия Cdx2, ключевого мастер-регулятора трофобласта [22, 23], также встраиваемого в локус *Rosa26*. Форсированная экспрессия была выбрана в качестве самой логичной альтернативы дифференцировки при помощи сред и ростовых факторов из-за ее простоты и наличия опубликованных протоколов. Для управляемой трофобластной дифференцировки использовали Cdx2 в составе химерного белка с лигандсвязывающим доменом глюкокортикоидного рецептора (GR), активация которого требовала добавления в среду дексаметазона (Dex). Финальная конфигурация линий ЭСК

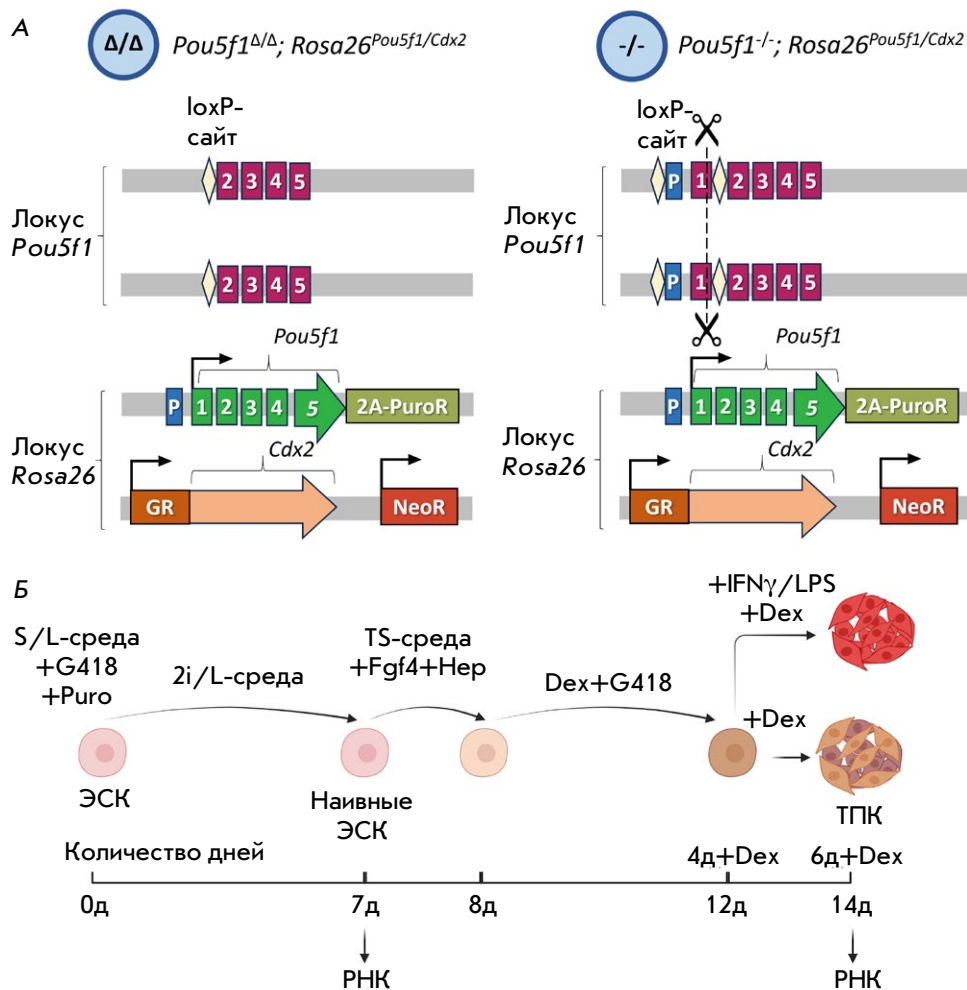


Рис. 3. Используемые линии клеток и протокол эксперимента. А – схематическое изображение сравниваемых линий эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Обозначения: « Δ/Δ » – линия ЭСК *Pou5f1* Δ/Δ ; *Rosa26*^{*Pou5f1/Cdx2*} с делецией эндогенного промотора *Pou5f1*; « $-/-$ » – линия ЭСК *Pou5f1* $-/-$; *Rosa26*^{*Pou5f1/Cdx2*} с интактным эндогенным промотором и инактивирующей indel-мутацией в первом экзоне гена; P – промотор, 1–5 – экзоны гена *Pou5f1*, 2A-PuroR – сайт P2A и ген устойчивости к пуромину PuroR, GR – лигандсвязывающий домен глюкокортикоидного рецептора, NeoR – ген устойчивости к G418/неомицину. Б – схема дифференцировки ЭСК в трофобластном направлении (см. «Экспериментальную часть» для текстового описания). Обозначения: Fgf4 – фактор роста фибробластов 4, Hep – гепарин, Dex – дексаметазон, IFN γ – интерферон-гамма, LPS – липополисахарид, ТПК – трофобластоподобные клетки. Рисунок создан с использованием BioRender

Pou5f1 Δ/Δ ; *Rosa26*^{*Pou5f1/Cdx2*} и *Pou5f1* $-/-$; *Rosa26*^{*Pou5f1/Cdx2*} представлена на рис. 3А.

Так как эффективность дифференцировки ЭСК в трофобластном направлении при форсированной экспрессии *Cdx2* зависит от стадии плюрипотентности, на которой находятся клетки [24], на первом этапе дифференцировки ЭСК *Pou5f1* Δ/Δ ; *Rosa26*^{*Pou5f1/Cdx2*} и *Pou5f1* $-/-$; *Rosa26*^{*Pou5f1/Cdx2*} переводили в наивное состояние посредством 7-дневного культивирования в среде 2i/L. Кроме того, данную экспериментальную точку использовали в качестве дополнительной для отслеживания динамики изменения экспрессии исследуемых генов. Второй, основной, точкой исследования был 6 день культивирования клеток в присутствии дексаметазона, что соответствовало 14 дню всего эксперимента (рис. 3Б).

По мере прохождения стадий дифференцировки, клетки куполообразных колоний, характерных для ЭСК в сывороточной среде S/L, и шарообразных колоний, характерных для «наивных» ЭСК, к 6 дню

культивирования в присутствии Dex формировали плоские колонии с хорошо различимыми границами клеток угловатой формы, типичными для описанных ранее [22, 23] колоний трофобластных стволовых клеток (рис. 4А).

При анализе профиля экспрессии маркеров на 6-й день дифференцировки в присутствии дексаметазона в обеих линиях выявили существенное снижение уровня мРНК *Oct4* (в сравнении с наивными ЭСК) и повышение уровня мРНК трофобластных маркеров. В качестве контроля уровня экспрессии мРНК трофобластных маркеров мы использовали плаценту мыши. Уровень общего *Cdx2* в обеих линиях ЭСК был значительно выше, чем в плаценте. При дифференциальном анализе уровня эндогенного *Cdx2* и мРНК, синтезированной за счет экзогенного GR-*Cdx2*, стало ясно, что подобное различие в уровне общего *Cdx2* обусловлено индуцированной сверхэкспрессией GR-*Cdx2*. При этом уровень эндогенного *Cdx2* также возрастал и был сопоставим с уровнем *Cdx2* в плаценте. Не обнару-

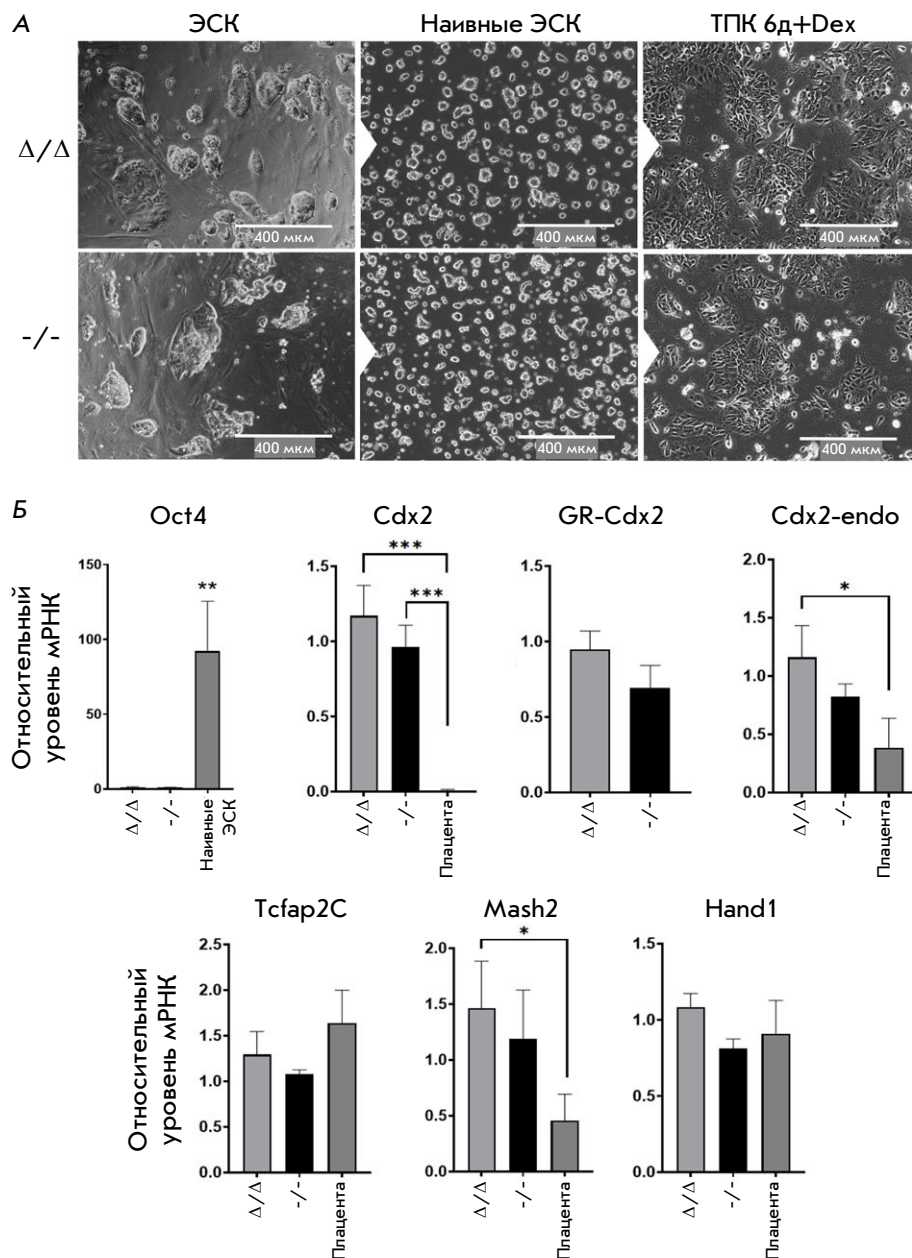


Рис. 4. Подтверждение способности линий ЭСК *Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* и *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* к дифференцировке в трофобластном направлении. А – морфологические характеристики клеток на разных этапах дифференцировки: сывороточные (S/L) условия культивирования (слева), наивные (2i/L) условия культивирования (в центре) и индуцированные обработкой Dex в течение 6 дней трофобластные клетки (справа). Б – анализ экспрессии трофобластных маркеров (Cdx2, Tcfap2C, Mash2, Hand1) в ходе дифференцировки в сравнении с плацентой. Обозначения как на рис. 3А. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ по ANOVA

жено статистически значимых различий в экспрессии Cdx2 между линиями *Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* и *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}*, что важно для правильной интерпретации результатов. Показана также экспрессия других трофобластных маркеров в полученных ТПК (Tcfap2C, Mash2, Hand1) (рис. 4Б).

Оценка влияния промоторной области *Pou5f1* на экспрессию генов локуса *Pou5f1*-МНС

В ходе эксперимента клетки были разбиты на группы и подвергнуты воздействию IFN γ или липопо-

лисахарида (LPS). IFN γ и LPS часто используются в различных *in vitro* и *in vivo* моделях воспаления, исходя из чего мы предполагали, что индукция провоспалительных сигналов будет способствовать повышенной экспрессии генов, связанных с иммунным ответом, в том числе генов МНС, что позволит оценить различия в экспрессии исследуемых генов между клеточными линиями с большим разрешением. Тем не менее различия в экспрессии ряда генов МНС (*H2-K1*, *H2-T23*, *H2-B1*, *H2-Dmb1*, *H2-Q6,8*, *H2-Q7,9*) были вызваны только условиями культивирования, но не отличались между

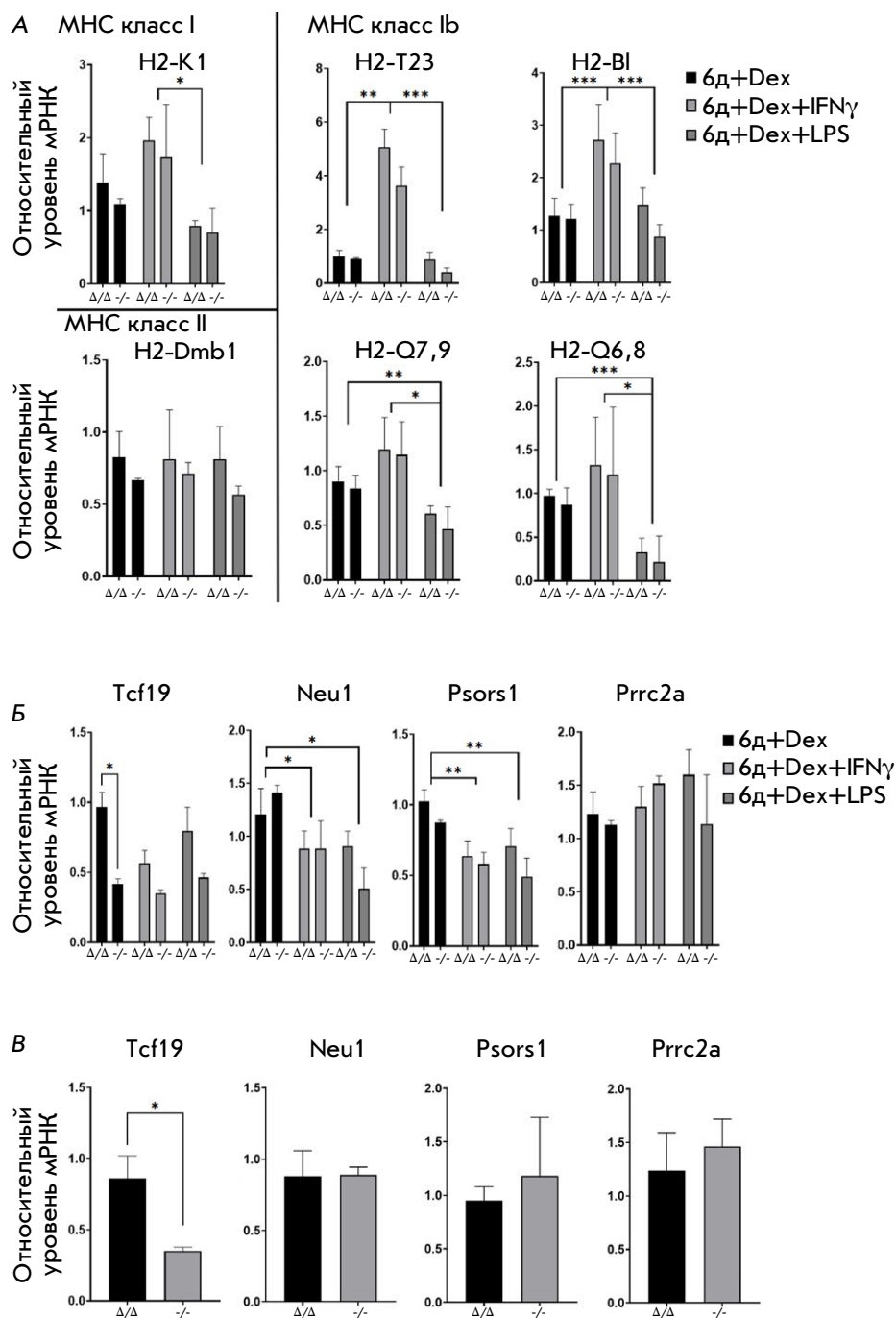


Рис. 5. Сравнение экспрессии генов локуса *Pou5f1*-MHC между линиями *Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa-26^{Pou5f1/Cdx2}* и *Pou5f1^{-/-};Rosa-26^{Pou5f1/Cdx2}* в стандартных и провоспалительных условиях культивирования. А, Б — сравнение относительного уровня мРНК между линиями ЭСК *Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* и *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* спустя 6 дней культивирования с дексаметазоном (Dex) в стандартных и провоспалительных (с добавлением IFN γ или LPS) условиях. Представлены результаты анализа экспрессии генов MHC классов I и II (А) и генов локуса *Pou5f1*-MHC с ранее показанной *цис*-регуляторной активностью в отношении *Pou5f1* (Б). В — сравнение экспрессии генов из (Б) в недифференцированных ЭСК *Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* и *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}*, культивируемых в 2i/L-условиях. Обозначения как на рис. 3А; * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ по ANOVA. С использованием теста Тьюки сравнивали линии Δ/Δ и $-/-$ при каждом условии культивирования, а также между условиями

Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa26^{Pou5f1/Cdx2} и *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* ЭСК (рис. 5А). Единственным из генов, чья экспрессия статистически значимо различалась между ЭСК двух генотипов, был *Tcf19* (рис. 5Б). Следует отметить, что в недифференцированных ЭСК *Pou5f1 Δ/Δ ;Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}*, культивируемых в наивных (2i/L) условиях, экспрессия *Tcf19* была уже повышена по сравнению с ЭСК *Pou5f1^{-/-};Rosa26^{Pou5f1/Cdx2}* (рис. 5В).

ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие активности гена *Pou5f1* вне общепринятой концепции плюрипотентности — вопрос, на который до сих пор нет однозначного ответа. С одной стороны, опубликованные работы свидетельствуют об отсутствии функциональной роли *Pou5f1* в дифференцированных клетках млекопитающих, обосновывая это отсутствием фенотипического ответа на нокаут этого гена и потенциальными ошибками в интерпре-

тации данных, полученных с использованием методов иммуноокрашивания и ОТ-ПЦР [25–27]. С другой стороны, достаточно убедительными выглядят и новые данные, полученные с использованием методов функциональной генетики, которые демонстрируют функцию *Pou5f1* в соматических клетках. К таким исследованиям относятся работы, в которых описан эффект нокаута *Pou5f1* в гладкомышечных и эндотелиальных клетках, а также работа Zalc и соавт., которые обнаружили реактивацию *Pou5f1* в краниальных клетках нервного гребня и обосновали ее роль в увеличении дифференцировочного потенциала этого типа клеток в ходе эмбриогенеза [15, 16, 28].

Наше предположение могло бы интегрировать описанные результаты с точки зрения *цис*-регуляторных свойств промотора *Pou5f1*, с одной стороны, подтверждая активность этого гена, а с другой – отвязывая ее от продукта этого гена, белка Oct4.

Выяснение точного механизма функционирования гена *Pou5f1* в контексте атеросклероза является актуальной задачей, решение которой представляет не только фундаментальный интерес, но и крайне важно для последующего использования в медицине. Так, если, например, эффекты, описанные на моделях атеросклероза, ассоциированы с транскрипционным фактором Oct4, то в качестве потенциального эффекторного белка в терапии этого заболевания следует рассматривать именно Oct4. Если же атеросклеротический фенотип связан с *цис*-регуляторной активностью промотора *Pou5f1*, то акцент в терапии должен быть смещен в сторону модуляции этой активности.

В отличие от подхода, представленного в настоящей работе, модели, созданные ранее для изучения гена *Pou5f1*, были разработаны прежде всего для исследования его функции в ПСК, а плюрипотентное состояние клеток поддерживали с помощью трансгенной кДНК *Pou5f1* под управлением промоторов с конститутивной экспрессией [3, 29]. Наш подход не только позволил получить изогенную пару линий с инактивируемой в процессе направленной дифференцировки экспрессией *Pou5f1*, но и дал возможность сравнивать их за счет идентичной локализации экзогенного *Pou5f1*, что было бы невозможно с использованием, например, лентивирусных векторов. Мы полагаем, что разработанная модель сможет помочь ответить на вопрос об активности гена *Pou5f1* в дифференцированных клетках. Эта работа стала первым шагом в этом направлении. И хотя мы не обнаружили масштабного влияния удаления промоторной области *Pou5f1* на экспрессию генов локуса МНС, один из исследуемых генов, *Tcf19*, оказался воспри-

имчивым к внесенным модификациям. Интересно, что этот ген является ближайшим соседом *Pou5f1*, что, возможно, облегчает взаимодействия между их регуляторными последовательностями. С другой стороны, учитывая, что наблюдаемые различия между линиями появляются на плюрипотентной стадии, наиболее вероятным можно считать механистический сценарий действия внесенной делеции. Так, в случае конкуренции со стороны транскрипционной машины расположенных друг напротив друга генов *Tcf19* и *Pou5f1*, блокируя транскрипцию одного из них – *Pou5f1* (за счет удаления его промотора), мы освобождаем пространство для экспрессии второго – *Tcf19*. И, хотя мы совершенно не ожидали такого точечного эффекта, он наиболее логичен с точки зрения основной концепции плюрипотентности. Являясь транскрипционно активным в плюрипотентных клетках, *Pou5f1*, изменяя свою активность (за счет, например, определенных мутаций), может влиять на экспрессию *Tcf19*, вызывая цепную реакцию нарушения в регуляции генов в дочерних клетках, в том числе не плюрипотентных, что уже в свою очередь может приводить к различным патологиям. Это неплохо объясняет результаты изучения полиморфизмов *Pou5f1*, ассоциированных с псориазом [12], особенно учитывая связь *Tcf19* с этим заболеванием [30, 31]. Интересно, что *Tcf19* также может участвовать в воспалительных реакциях, что связывает наши результаты с данными, полученными на моделях атеросклероза [32, 33]. Точкой расхождения в данном вопросе то, что в экспериментах, проведенных на мышинных моделях атеросклероза, нокаут *Pou5f1* был условным, т.е. индуцируемым в гладкомышечных или эндотелиальных клетках сосудов. Тем не менее, не исключено, что удаление даже метилированной области *Pou5f1* может приводить к усилению экспрессии *Tcf19*, что требует дополнительного изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе мы смогли создать уникальную генетическую модель для исследования значимости последовательности промотора гена *Pou5f1* в регуляции активности генов, не играющих ключевую роль в плюрипотентных клетках и, как следствие, поиска его неклассических функций в дифференцированных клетках. Нам удалось частично подтвердить гипотезу о *цис*-регуляторной активности промоторной области *Pou5f1* в отношении генов локуса *Pou5f1*-МНС, а точнее, в отношении его ближайшего соседа – гена *Tcf19*. Дальнейшие исследования будут направлены на уточнение регуляторного ландшафта локуса *Pou5f1*-МНС в дифференцированных клетках других типов. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021 г.) –

получение и культивирование линий клеток, а также гранта Российского научного фонда № 24-75-10131, <https://rscf.ru/project/24-75-10131/> – дифференцировка и количественная ОТ-ПЦР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
2. Niwa H., Miyazaki J., Smith A.G. // Nat. Genet. 2000. V. 24. № 4. P. 372–376. doi: 10.1038/74199.
3. Radziszewska A., Le Bin Chia G., Dos Santos R.L., Theunissen T.W., Castro L.F.C., Nichols J., Silva J.C.R. // Nat. Cell Biol. 2013. V. 15. № 6. P. 579–590. doi: 10.1038/ncb2742.
4. Streibinger D., Deluz C., Friman E.T., Govindan S., Alber A.B., Suter D.M. // Mol. Syst. Biol. 2019. V. 15. № 9. P. 9002. doi: 10.15252/msb.20199002.
5. Horton R., Wilming L., Rand V., Lovering R.C., Bruford E.A., Khodiyar V.K., Lush M.J., Povey S., Conover C.J., Wright M.W., et al. // Nat. Rev. Genet. 2004. V. 5. № 12. P. 889–899. doi: 10.1038/nrg1489.
6. Shiina T., Inoko H., Kulski J. // Tissue Antigens. 2004. V. 64. № 6. P. 631–649. doi: 10.1111/j.1399-0039.2004.00327.x.
7. Nichols J., Smith A. // Cell Stem Cell. 2009. V. 4. № 6. P. 487–492. doi: 10.1016/j.stem.2009.05.015.
8. Choi H.W., Joo J.Y., Hong Y.J., Kim J.S., Song H., Lee J.W., Wu G., Schöler H.R., Do J.T. // Stem Cell Repts. 2016. V. 7. № 5. P. 911–926. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.09.012.
9. Yeom Y.I., Fuhrmann G., Ovitt C.E., Brehm A., Ohbo K., Gross M., Hübner K., Schöler H.R. // Development. 1996. V. 122. № 3. P. 881–894. doi: 10.1242/dev.122.3.881.
10. Diao Y., Fang R., Li B., Meng Z., Yu J., Qiu Y., Lin K.C., Huang H., Liu T., Marina R.J., et al. // Nat. Methods. 2017. V. 14. № 6. P. 629–635. doi: 10.1038/nmeth.4264.
11. Canver M.C., Tripathi P., Bullen M.J., Olshansky M., Kumar Y., Wong L.H., Turner S.J., Lessard S., Pinello L., Orkin S.H., et al. // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. № 47. P. 15797–15809. doi: 10.1074/jbc.RA120.013772.
12. Chang Y.T., Hsu C.Y., Chou C.T., Lin M.W., Shiao Y.M., Tsai C.Y., Yu C.W., Shiue J.J., Lee Y.F., Huang C.H., et al. // J. Dermatol. Sci. 2007. V. 46. № 2. P. 153–156. doi: 10.1016/j.jdermsci.2007.01.003.
13. Liu X., Li W., Fu X., Xu Y. // Front. Immunol. 2017. V. 8. P. 645. doi: 10.3389/fimmu.2017.00645.
14. Drukker M., Katz G., Urbach A., Schuldiner M., Markel G., Itskovitz-Eldor J., Reubinoff B., Mandelboim O., Benvenisty N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 15. P. 9864–9869. doi: 10.1073/pnas.142298299.
15. Cherepanova O.A., Gomez D., Shankman L.S., Swiatlowska P., Williams J., Sarmiento O.F., Alencar G.F., Hess D.L., Bevard M.H., Greene E.S., et al. // Nat. Med. 2016. V. 22. № 6. P. 657–665. doi: 10.1038/nm.4109.
16. Shin J., Tkachenko S., Chaklader M., Pletz C., Singh K., Bulut G.B., Han Y.M., Mitchell K., Baylis R.A., Kuzmin A.A., et al. // Cardiovasc. Res. 2022. V. 118. № 11. P. 2458–2477. doi: 10.1093/cvr/cvac036.
17. Kuzmin A.A., Ermakova V.V., Potapenko E.V., Ostroverkhova M.G., Guriev N.A. Tomilin A.N. // J. Dev. Biol. 2020. V. 51. № 6. P. 410–415. doi: 10.1134/S106236042006003X.
18. Tolkunova E., Cavaleri F., Eckardt S., Reinbold R., Christenson L.K., Schöler H.R., Tomilin A. // Stem Cells. 2006. V. 24. № 1. P. 139–144. doi: 10.1634/stemcells.2005-0240.
19. Rodgers J.R., Cook R.G. // Nat. Rev. Immunol. 2005. V. 5. № 6. P. 459–471. doi: 10.1038/nri1635.
20. Wu G., Schöler H.R. // Cell Regen. 2014. V. 3. № 1. P. 1–10. doi: 10.1186/2045-9769-3-7.
21. Malfait J., Wan J., Spicuglia S. // BioEssays. 2023. V. 45. № 10. P. 2300012. doi: 10.1002/bies.202300012.
22. Tanaka S., Kunath T., Hadjantonakis A.K., Nagy A., Rosant J. // Science. 1998. V. 282. № 5396. P. 2072–2075. doi: 10.1126/science.282.5396.2072.
23. Kehler J., Tolkunova E., Koschorz B., Pesce M., Gentile L., Boiani M., Lomeli H., Nagy A., McLaughlin K.J., Schöler H.R., et al. // EMBO Rep. 2004. V. 5. № 11. P. 1078–1083. doi: 10.1038/sj.embor.7400279.
24. Blij S., Parenti A., Tabatabai-Yazdi N., Ralston A. // Stem Cells Dev. 2015. V. 24. № 11. P. 1352–1365. doi: 10.1089/scd.2014.0395.
25. Lengner C.J., Camargo F.D., Hochedlinger K., Welstead G.G., Zaidi S., Gokhale S., Schöler H.R., Tomilin A., Jaenisch R. // Cell Stem Cell. 2007. V. 1. № 4. P. 403–415. doi: 10.1016/j.stem.2007.07.020.
26. Liedtke S., Enczmann J., Wacławczyk S., Wernet P., Kögler G. // Cell Stem Cell. 2007. V. 1. № 4. P. 364–366. doi: 10.1016/j.stem.2007.09.003.
27. Warthemann R., Eildermann K., Debowski K., Behr R. // Mol. Hum. Reprod. 2012. V. 18. № 12. P. 605–612. doi: 10.1093/molehr/gas032.
28. Zalc A., Sinha R., Gulati G.S., Wesche D.J., Daszczuk P., Swigut T., Weissman I.L., Wysocka J. // Science. 2021. V. 371. № 6529. P. eabb4776. doi: 10.1126/science.abb4776.
29. Karwacki-Neisius V., Göke J., Osorno R., Halbritter F., Ng J.H., Weiße A.Y., Wong F.C., Gagliardi A., Mullin N.P., Festuccia N., et al. // Cell Stem Cell. 2013. V. 12. № 5. P. 531–545. doi: 10.1016/j.stem.2013.04.023.
30. Nedoszytko B., Szczerkowska-Dobosz A., Stawczyk-Macieja M., Owczarczyk-Saczonek A., Reich A., Bartosińska J., Batorycka-Baran A., Czajkowski R., Dobrucki I.T., Dobrucki L.W., et al. // Adv. Dermatol. Allergol. 2020. V. 37. № 3. P. 283–298. doi: 10.5114/ada.2020.96243.
31. Ling Y.H., Chen Y., Leung K.N., Chan K.M., Liu W.K. // PLoS One. 2023. V. 18. № 12. P. e0294661. doi: 10.1371/journal.pone.0294661.
32. Yang G.H., Fontaine D.A., Lodh S., Blumer J.T., Roopra A., Davis D.B. // Metabolites. 2021. V. 11. № 8. P. 513. doi: 10.3390/metabol11080513.
33. Ma X., Wang Q., Sun C., Agarwal I., Wu H., Chen J., Zhao C., Qi G., Teng Q., Yuan C., et al. // Cell Rep. 2023. V. 42. № 8. P. 112944. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112944.

УДК 577.21

Классификация и количественная оценка событий непродуктивного сплайсинга

Л. Г. Завилейский*, Е. А. Чернявская, М. А. Власенок, Д. Д. Первушин

Центр молекулярной и клеточной биологии, Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

*E-mail: l.zavileisky@skoltech.ru

Поступила в редакцию 26.11.2024

Принята к печати 31.03.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27572

РЕФЕРАТ В эукариотических клетках мРНК, содержащие преждевременные стоп-кодоны, разрушаются системой нонсенс-опосредованного распада (NMD). В результате взаимодействия между системами NMD и альтернативного сплайсинга генерируются NMD-чувствительные транскрипты (NMD targets, NMDT), которые играют важную роль в регуляции экспрессии генов по механизму непродуктивного сплайсинга. Для понимания этого механизма необходимо правильно идентифицировать события альтернативного сплайсинга, приводящие к появлению NMDT. В данной работе для нахождения событий альтернативного сплайсинга, их классификации и количественной оценки разработан вычислительный конвейер NMDj, который в отличие от существующих методов не опирается на сравнение NMDT с наиболее похожим на него кодирующим транскриптом, а использует набор характеристических интронов, отличающих NMDT от кодирующих транскриптов. Тестирование на смоделированных данных секвенирования РНК показало, что NMDj способен количественно определять события альтернативного сплайсинга, приводящие к проявлению NMDT, с большей точностью, чем другие существующие для этой цели методы. NMDj представляет собой универсальный метод, подходящий для классификации сколь угодно сложных событий альтернативного сплайсинга, приводящих к появлению NMDT. Вычислительный конвейер NMDj доступен через репозиторий <https://github.com/zavilev/NMDj/>.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА непродуктивный сплайсинг, нонсенс-опосредованный распад, NMD, сплайсинг.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ NMD – нонсенс-опосредованный распад (Nonsense Mediated Decay); NMDT – транскрипт-мишень NMD (NMD target); АС – альтернативный сплайсинг; ПСК – преждевременный стоп-кодон; НТО – нетранслируемая область; нт – нуклеотид.

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря альтернативному сплайсингу (АС) гены эукариот могут экспрессировать большое число изоформ транскриптов. По грубым оценкам, гены человека, кодирующие белки, на детектируемом уровне экспрессии производят до ~150000 различных транскриптов, в среднем по 7.4 изоформы на ген [1]. Однако только половина из них кодирует полноразмерные белки, а остальные могут содержать преждевременные стоп-кодоны (ПСК) [1, 2]. У эукариот такие транскрипты избирательно уничтожаются системой, называемой нонсенс-опосредованным распадом (NMD) [3].

NMD не только предотвращает трансляцию усеченных белков, возникающих в результате нонсенс-мутаций и ошибок сплайсинга, но также участвует в различных биологических процессах, включая регуляцию экспрессии генов [4]. Большинство РНК-связывающих белков контролируют уровень

собственной экспрессии посредством петли отрицательной обратной связи, в которой белковый продукт гена связывается с кодирующей его мРНК и индуцирует в ней АС, который приводит к появлению ПСК [5, 6]. Считается, что АС в большей степени воздействует на транскрипционный ландшафт эукариот путем генерации NMD-изоформ для ограничения уровней экспрессии генов, чем путем расширения разнообразия протеома [2].

Локальные, то есть сосредоточенные на небольшом участке пре-мРНК, изменения сплайсинга являются одним из основных источников транскриптов, служащих мишенями NMD (NMD targets, NMDT). Среди основных типов локальных событий АС можно выделить АС так называемых ядовитых и необходимых экзонов, которые приводят к появлению NMDT при включении и пропуске экзона соответственно, а также использование альтернативных 5'- и 3'-сайтов сплайсинга и удержание ин-

тронов [7]. Некоторые из них могут быть вовлечены в регуляцию одного и того же биологического процесса (например, удержания интронов) или регулироваться одним и тем же фактором сплайсинга [8, 9]. Однако многообразие всех событий АС не исчерпывается перечисленными основными типами [6]. Задача характеристики сложных событий АС, приводящих к появлению NMDT, возникает во многих исследованиях, связанных с изучением регуляции генной экспрессии [10–12].

На сегодняшний день решить эту задачу можно только с помощью программы NMD Classifier [13]. Используемый в этой программе подход основан на предположении о минимальной эволюции/регуляции, согласно которому NMDT возникают в результате эволюционных или регуляторных событий, которые наименьшим возможным образом изменяют рамку считывания кодирующего транскрипта. То есть, NMD Classifier для каждого NMDT находит наиболее похожий (с точки зрения общей нуклеотидной последовательности) кодирующий транскрипт и считает искомым событием АС различия между найденным наилучшим транскриптом-партнером и NMDT, вызывающие сдвиг рамки считывания. Однако вероятность того, что NMDT был получен из кодирующего транскрипта в результате АС, зависит не только от сходства их экзон-интронной архитектуры, но и от уровня экспрессии. Кодирующий транскрипт с самым высоким уровнем экспрессии с большей вероятностью будет источником NMDT [14]. Более того, NMDT может быть получен из разных транскриптов со сравнимыми уровнями экспрессии, что ставит под сомнение обоснованность подхода, состоящего в выборе единственного лучшего транскрипта-партнера.

Возвращаясь к этой задаче, мы разработали NMDj – инструмент для систематического поиска, классификации и количественной оценки событий АС, приводящих к появлению NMDT. NMDj учитывает все аннотированные транскрипты и сообщает обо всех альтернативных интронах, отличающих NMDT от кодирующих транскриптов. NMDj обеспечивает более подробную классификацию событий АС, приводящих к появлению NMDT, чем NMD Classifier. Сопряжение между NMD и АС является важнейшим посттранскрипционным механизмом регуляции экспрессии генов [15]. Поэтому разработка метода поиска, классификации и количественной оценки событий АС, приводящих к появлению NMDT, с учетом всего многообразия изоформ транскриптов, является актуальной задачей. На ее решение и направлен метод NMDj. Он получает на вход множество транскриптов в виде аннотационной базы данных или моделей транскриптов, построенных по данным секвенирова-

ния РНК, а на выходе характеризует события АС, приводящие к появлению NMDT, и производит их количественную оценку.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Геномы и их аннотация

Аннотации геномов человека (GRCh38, версия 108), мыши (mm10, версия 113), данио-рерио (danRer11, версия 113) и дрозофилы (dm6, версия 113) были загружены из Ensembl в формате GTF [16]. При поиске событий АС, приводящих к появлению NMDT, рассматривали только транскрипты генов, кодирующих белки, по крайней мере с одним аннотированным NMDT. Транскрипты без аннотированных старт- или стоп-кодонов не рассматривали. Гены без NMDT или кодирующих транскриптов также не рассматривали.

NMD Classifier

Исходный код NMD Classifier был загружен с сайта [13]. Для количественной оценки локальных изменений сплайсинга выходные данные NMD Classifier были преобразованы в список альтернативных интронов, соответствующих четырем основным типам событий АС: альтернативные экзоны, альтернативные 5'- и 3'-сайты сплайсинга и удержание интронов (NMD_in, NMD_ex, A5SS, A3SS, NMD_IR, nNMD_IR).

Вычислительный конвейер NMDj

Входными данными для NMDj является аннотация транскриптома в формате GFF/GTF [17]. Рассматриваются следующие четыре ее элемента («transcript», «exon», «start_codon» и «stop_codon») и три атрибута («gene_id», «transcript_id», «transcript_biotype»). В дополнение к основному файлу GFF/GTF NMDj также может принимать файл с аннотацией транскриптов, содержащий элементы «transcript» и «exon» и атрибут «transcript_id». В этом случае каждый транскрипт из дополнительного файла приписывается гену из основного файла на основе максимального количества общих интронов и перекрытия последовательности не менее 50%. Для транскриптов, которые были приписаны генам, выбирается самая длинная рамка считывания из числа тех, которые начинаются с аннотированных для гена старт-кодонов, и к аннотации добавляются соответствующие позиции старт- и стоп-кодонов. Как и в Ensembl [18], транскрипт аннотируется как NMDT, если в нем на расстоянии не менее 50 нт в направлении 3'-конца от стоп-кодона присутствует интрон.

Затем для каждого NMDT рассматривается геномный интервал от последнего сайта сплайсинга,

общего для NMDT и любого кодирующего транскрипта с той же фазой (или старт-кодона, в отсутствие такового), до 3'-конца экзона с ПСК или ближайшего конца транскрипта, если NMDT имеет общий стоп-кодон с кодирующим транскриптом. Характеристические интроны определяются как все интроны, пересекающиеся с найденным геномным интервалом, за исключением тех, которые являются общими для NMDT и любого кодирующего транскрипта. Событием AC, приводящим к появлению NMDT, считается набор найденных характеристических интронов. События AC из пары NMDT объединяются в кластер, если данные NMDT имеют хотя бы один общий характеристический интрон.

Для того, чтобы классифицировать события AC, приводящие к появлению NMDT, NMDj по умолчанию использует транскрипты MANE-Select в качестве эталона, поскольку они, как правило, являются наиболее высоко экспрессируемыми [19]. Однако пользователь может задать и другое множество транскриптов сравнения. NMDj строит ориентированный ациклический граф, используя сайты сплайсинга NMDT и транскрипта сравнения в качестве узлов, а интроны и экзоны в качестве ребер, и ищет в нем «пузыри» (bubbles), определенные вершинно-независимыми путями, которые содержат характеристические интроны [20, 21]. NMDj выводит найденные пары вершинно-независимых путей в виде $X_1...X_n : Y_1...Y_m$, где X_i и Y_j – это символы «D» (донор) или «A» (акцептор). При этом $X_i \neq X_j$ и $Y_i \neq Y_j$, когда $j = i \pm 1$. Если множество транскриптов сравнения не было задано, то NMDj итеративно сравнивает NMDT с каждым кодирующим транскриптом.

Последним, необязательным, шагом является количественная оценка AC с использованием чтений с разрывами из экспериментов по секвенированию РНК (подаются на вход в виде таблицы). NMDj вычисляет значения метрики сплайсинга Ψ , которая оценивает уровень экспрессии NMDT относительно экспрессии всех транскриптов гена. Она рассчитывается по формуле:

$$\Psi = \frac{\sum_{i=1}^A a_i k_i}{\sum_{i=1}^A a_i k_i + \sum_{j=1}^B b_j r_j},$$

где A и B – число характеристических интронов, поддерживающих NMDT и кодирующие транскрипты, a_i и b_j – число чтений с разрывами, соответствующих характеристическим интронам, а k_i и r_j – веса, которые учитывают кратности, с которыми характеристические интроны встречаются в NMDT и кодирующих транскриптах соответственно. Веса

k_i и r_j находятся независимо для NMDT и кодирующих транскриптов. Естественно потребовать, чтобы сумма весов характеристических интронов, входящих в каждый транскрипт, была равна единице. Это приводит нас к системе из n линейных уравнений с m неизвестными, где n – число транскриптов, а m – число характеристических интронов. По построению характеристических интронов такая система всегда совместна, однако она может иметь бесконечное число решений. В общем случае однозначный выбор k_i и r_j можно сделать, накладывая на эту систему ограничения регуляризации. Однако в NMDj мы используем следующий эвристический алгоритм, который позволяет определить значение Ψ в соответствии с данными ранее определениями для основных типов событий AC [6, 11].

Аннотированные в найденном интервале транскрипты представляются в виде графа, вершинами которого являются характеристические интроны, а ребрами – соединяющие их экзоны (или их группы). Затем в этом графе происходит поиск пар вершин, между которыми существуют только вершинно-независимые пути. Для каждого такого пути веса характеристических интронов в нем полагаются равными друг другу. Например, для ядовитого экзона таких путей будет два: один, соответствующий включению экзона (с двумя характеристическими интронами, каждый с весом 0.5), и другой, соответствующий пропуску экзона (с одним характеристическим интроном, вес которого равен 1). После того как коэффициентам вершин на путях между выбранной парой присвоены значения, эти вершины объединяются в одну и поиск продолжается в новом графе. На каждом шаге коэффициенты характеристических интронов, объединенных в вершину, домножаются на присвоенное ей значение, и процедура повторяется до тех пор, пока все вершины не будут объединены в одну. Данный алгоритм подходит для всех простых типов событий AC, а для сложных событий работает в предположении о вложенности вершинно-независимых путей.

Данные секвенирования РНК и их симуляция

Для того чтобы реалистично смоделировать данные секвенирования РНК, используя заведомо известные уровни экспрессии транскриптов, а значит и относительные уровни экспрессии NMDT, мы случайным образом выбрали по три образца из каждой из трех тканей (мышца, печень, мозжечок) в панели транскриптомных данных консорциума Genotype-Tissue Expression project (GTEx) [22]. Выбор тканей был обусловлен тем, что они наиболее значительно различаются по AC [23, 24]. Уровни экспрессии транскриптов в выбранных образцах были вычислены с помощью

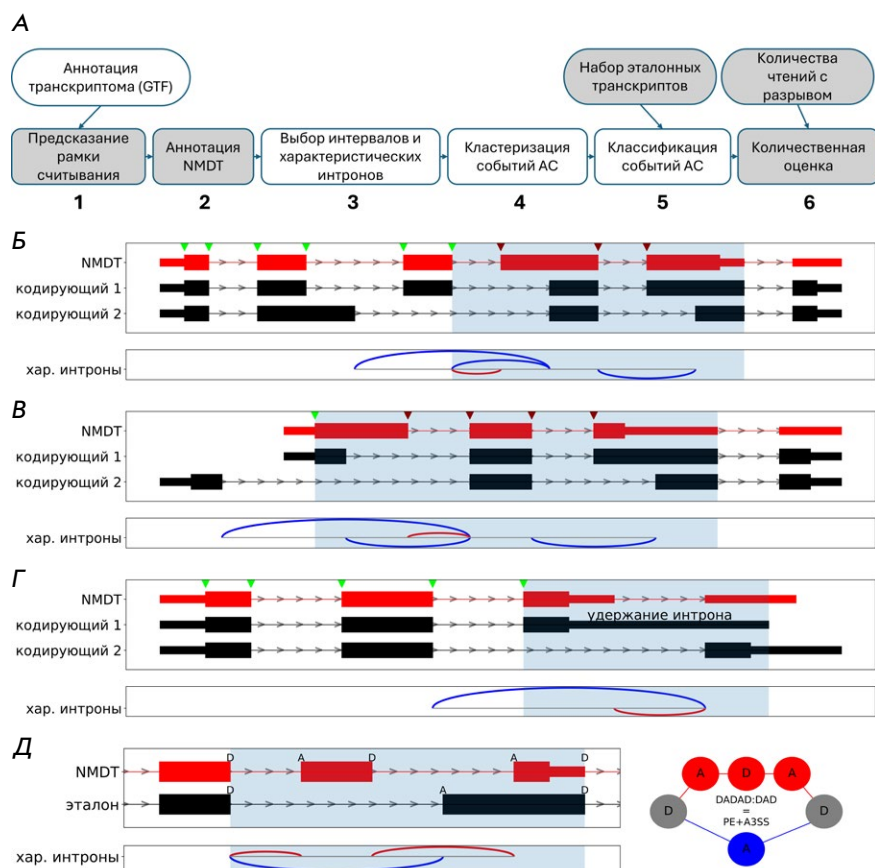


Рис. 1. Вычислительный конвейер NMDj. **А** – блок-схема конвейера. **Б–Г** – выбор границ интервала (обозначен голубой заливкой). 5'-Границей является либо последний сайт сплайсинга, общий для NMDT и любого кодирующего транскрипта с той же фазой (**Б**), либо стартовый кодон, если такого сайта сплайсинга нет (**В**). 3'-Граница представляет собой либо донорный сайт сплайсинга интрона, следующего за ПСК-содержащим экзоном (**Б, В**), либо конец самой короткой 3'-НТО после стоп-кодона NMDT (**Г**). **Д** – пример классификации на основе вершинно-независимых путей. NMDT и его эталонный кодирующий транскрипт (слева) соответствуют паре вершинно-независимых путей, состоящих из донорных и акцепторных сайтов сплайсинга (справа). NMDT и кодирующие транскрипты, а также соответствующие им характеристические интроны (дуги) обозначены красным и синим цветом соответственно. Сайты сплайсинга NMDT обозначены зелеными стрелками, если рамка NMDT соответствует кодирующей рамке, или красными в противном случае

программы rsem-calculate-expression с опцией estimate-rspd [25]. Для каждого гена рассчитывали доли экспрессии NMDT, наилучших транскриптов-партнеров, найденных NMD Classifier, и транскриптов MANE-Select от общей экспрессии гена. Выборку повторяли 5 раз, а результаты усредняли.

Симуляцию экспериментов по секвенированию РНК осуществляли с помощью программы rsem-simulate-reads с использованием уровней экспрессии транскриптов, полученных ранее. Для каждого образца было смоделировано 50 млн парноконцевых чтений. Симулированные чтения были картированы на геном человека GRCh38 с использованием программы STAR Aligner 2.7.3a [26]. Чтения с разрывами были подсчитаны программой IPISA с настройками по умолчанию [27]. Уровни экспрессии транскриптов в симулированных данных определяли количественно с помощью RSEM (как указано выше) [25], Salmon 1.10.3 с опциями --seqBias --gcBias --posBias [28] и StringTie 2.2.3 с опцией -e [29]. Чтобы преобразовать результаты количественного определения уровней экспрессии транскриптов в значения Ψ , уровни экспрессии NMDT (в TPM, transcripts per million) были разделены на сумму уровней экспрессии транскриптов, пересекающих найденные NMDj геномные интервалы.

Данные секвенирования РНК при инактивации NMD

Результаты экспериментов по инактивации компонентов NMD (двойной нокдаун SMG6 и SMG7) с последующим секвенированием РНК получены из Gene Expression Omnibus под номером доступа GSE86148 в формате FASTQ и выровнены на сборку генома человека GRCh38 (hg38) с использованием STAR Aligner v2.7.8a в парноконцевом режиме. Чтения с разрывами были подсчитаны программой IPISA с настройками по умолчанию [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Вычислительный конвейер NMDj

NMDj состоит из трех основных и трех вспомогательных этапов (рис. 1А). Получая на вход аннотацию транскриптов, программа выполняет поиск рамки считывания и предсказывает NMDT, если они не были аннотированы. Аннотация NMDT производится на основании так называемого правила 50 нт, которое постулирует, что транскрипт распознается системой NMD как мишень, если он содержит интрон на расстоянии не менее 50–55 нт в направлении 3'-конца от стоп-кодона [30]. Оно основано на предположении о том, что связанные вблизи экзон-эк-

Таблица 1. Список основных типов событий NMDj и их синонимов в классификации, предоставленной NMD Classifier

Тип	Событие	Описание	Синоним
DADA:DA	PE	Ядовитый кассетный экзон вызывает NMD при включении	NMD_in
D(AD)nA:DA	PE _n	Одновременное включение <i>n</i> последовательных кассетных экзонов вызывает NMD	multi_NMD_in
DA:DADA	EE	Необходимый кассетный экзон вызывает NMD при пропуске	NMD_ex
DA:D(AD)nA	EE _n	Одновременный пропуск <i>n</i> последовательных кассетных экзонов вызывает NMD	multi_NMD_ex
ADA:ADA	A5SS	Альтернативный 5'-сайт сплайсинга	A5SS
DAD:DAD	A3SS	Альтернативный 3'-сайт сплайсинга	A3SS
ADAD:ADAD	A5SS+A3SS	Альтернативные 5'- и 3'-сайты сплайсинга одного и того же интрона	A5SS, A3SS
AD:ADAD	IR	Удержание интрона вызывает NMD	nNMD_IR
ADAD:AD	ID	Вырезание интрона вызывает NMD	NMD_IR
DADA:DADA	MXE	Пара взаимоисключающих соседних экзонов	-
AD(AD)nA:ADA	A5SS+PE _n	Альтернативный 5'-сайт сплайсинга и <i>n</i> последовательных ядовитых экзонов	-
ADA:AD(AD)nA	A5SS+EE _n	Альтернативный 5'-сайт сплайсинга и <i>n</i> последовательных необходимых экзонов	-
D(AD)nAD:DAD	PE _n +A3SS	<i>n</i> последовательных ядовитых экзонов и альтернативный 3'-сайт сплайсинга	-
DAD:D(AD)nAD	EE _n +A3SS	<i>n</i> последовательных необходимых экзонов и альтернативный 3'-сайт сплайсинга	-
ADAD:AD(AD)nAD	A5SS+EE+A3SS	Альтернативный 5'-сайт сплайсинга, <i>n</i> последовательных необходимых экзонов и альтернативный 3'-сайт сплайсинга	-

зонных соединений белковые комплексы смещаются рибосомой во время первого раунда трансляции, а те, которые остаются связанными за пределами рамки считывания, служат сигналом о появлении ПСК [30]. В NMDj мы использовали порог в 50 нт, поскольку это значение принято для автоматической аннотации NMDT в Ensembl [16]. Однако количество предсказанных NMDT меняется незначительно при увеличении порога до 55 нт (рис. S1).

После того как для каждого гена предсказаны NMDT, программа находит события AC, приводящие к их появлению. Существуют различные формализации для описания событий AC, включая бинарную классификацию (например, ядовитые экзоны [31]), классификацию связных компонент в графе сплайсинга [32] и нахождение локальных вариантов сплайсинга [33]. В этой работе мы определяем событие AC как набор характеристических интронов, охватывающих определяемый далее геномный интервал. Для каждого NMDT 5'-граница интервала определяется как последний сайт сплайсинга, в котором фаза NMDT совпадает с фазой любого кодирующего транскрипта (рис. 1Б). Если такого сайта не существует, то 5'-границей считается старт-кодон NMDT, если он является общим хотя бы с одним кодирующим транскриптом (рис. 1В). 3'-Границей интервала считается 3'-конец экзона, содержаще-

го ПСК, или, если NMDT имеет общий стоп-кодон с кодирующим транскриптом (и в этом случае это не настоящий ПСК), то концом интервала считается ближайший конец транскрипта (рис. 1Г).

Затем NMDj выбирает характеристические интроны, которые отличают NMDT от кодирующих транскриптов. Все интроны, которые примыкают к интервалу или пересекают его, за исключением общих для NMDT, и хотя бы одного кодирующего транскрипта, считаются характеристическими. В результате каждый NMDT характеризуется набором интронов, которые присутствуют либо в нем, либо в кодирующих транскриптах (рис. 1Б,Г, красные и синие дуги). Поскольку несколько NMDT часто имеют одинаковые или очень похожие наборы характеристических интронов, найденные события AC объединяются в кластеры, чтобы уменьшить избыточность.

NMDj классифицирует события сплайсинга на основные типы, такие как ядовитые (poison exon, PE) и необходимые (essential exon, EE) экзоны, альтернативные сайты сплайсинга (A5SS, A3SS) и другие (табл. 1). Классификация событий AC основана на концепции вершинно-независимых путей в применении к графу сплайсинга [20, 34]. В ориентированном ациклическом графе, вершинами которого являются донорные (D) и акцепторные (A) сайты

Таблица 2. Приводящие к появлению NMDT события AC в транскриптах человека и модельных организмов

Организм	#Tr	#NMDT	NMDT, %	Доля событий AC, %					
				PE	EE	A5SS	A3SS	IR	Другие
Человек	79940	16741	21	18	11	6	8	2	55
Мышь	49951	5339	11	18	18	11	14	4	36
Данио-рерио	35040	854	2	11	10	11	12	23	32
Дрозофила	30688	1325	4	18	4	12	9	16	41

Примечание. #Tr – общее число транскриптов; #NMDT – число NMDT; NMDT – доля NMDT в %. Доли (в %) ядовитых (PE) и необходимых (EE) экзонов, доли альтернативных 5'-(A5SS) и 3'- сайтов сплайсинга (A3SS), доля удержанных интронов (IR) и доля остальных событий (Другие).

сплайсинга, а ребрами – экзоны и интроны, вершинно-независимые пути можно определить как пару путей, которые не имеют общих вершин, кроме первой и последней (рис. 1Д). Каждая такая пара представляется в символической форме, соответствующей последовательности вершин, т.е. ядовитый экзон соответствует DADA:DA, альтернативный 5'-сайт сплайсинга (A5SS) – ADA:ADA, а множественные ядовитые экзоны (PE_n) – D(AD)_nA:DA, где n – количество экзонов. На последнем этапе NMDj оценивает долю экспрессии NMDT в экспрессии гена в виде метрики Ψ, вычисленной на основании числа чтений с разрывами из экспериментов секвенирования РНК (см. «Экспериментальную часть»).

Применение NMDj к транскриптам человека и модельных организмов

Применение NMDj к аннотированным транскриптам человека, мыши, данио-рерио и дрозофилы показало, что доля NMDT, подчиняющихся правилу 50 нт, у человека и мыши существенно выше, чем у данио-рерио и дрозофилы, что несомненно является результатом различий в качестве и полноте аннотаций транскриптомов (табл. 2). Однако частоты событий AC, приводящих к появлению NMDT, значительно различаются между организмами. Если у человека и мыши появление NMDT происходит в большей степени за счет использования ядовитых и необходимых экзонов, чем за счет удержания интронов, то у дрозофилы и данио-рерио наблюдается обратная тенденция. По существующим оценкам доля удержания интронов среди основных типов AC одинаково низка как у млекопитающих, так и у других позвоночных и беспозвоночных [35]. Таким образом, наблюдаемое различие между частотами приводящих к появлению NMDT событий AC не может объясняться ни разной представленностью их типов, ни разной полнотой аннотации транскриптома, а скорее указывает на особенности функционирования системы NMD в разных таксономических группах.

Преимущества NMDj для нахождения событий AC, приводящих к NMD

Существующий подход к анализу событий AC, приводящих к появлению NMDT, реализованный в методе NMD Classifier, основан на нахождении наилучшего транскрипта-партнера. Его главной проблемой является то, что при выборе наилучшего партнера не учитываются другие транскрипты и уровни их экспрессии. Кодировующий транскрипт вряд ли может быть основным источником NMDT, если уровень его экспрессии низок. Чтобы проиллюстрировать важность этой проблемы, мы применили NMD Classifier к аннотации транскриптома Ensembl [16] и сравнили множество найденных транскриптов-партнеров с транскриптами из аннотации MANE-Select в качестве множества наиболее экспрессируемых транскриптов в каждом гене человека [19].

Транскрипты MANE-Select определены как наилучшие транскрипты-партнеры только для 25% NMDT, хотя они имели значительно более высокий уровень экспрессии, что подтверждается случайной выборкой экспериментов по секвенированию РНК из GTEx (рис. 2А). Более того, когда наилучший транскрипт-партнер не совпадал с MANE-Select, его вклад в общий уровень экспрессии генов был сопоставим с вкладом NMDT. Это указывает на то, что кодирующий транскрипт с наибольшей длиной общей с NMDT последовательности может не быть транскриптом, из которого NMDT получается в результате AC. Кроме того, транскрипты MANE-Select не всегда являются наиболее экспрессируемыми. Ткани могут различаться по наиболее экспрессируемым транскриптам (рис. 2Б) или экспрессировать несколько транскриптов на сопоставимых уровнях. Поэтому NMDj рассматривает все аннотированные транскрипты для того, чтобы избежать проблемы выбора одного наилучшего транскрипта-партнера, и кластеризует NMDT по характеристическим интронам, чтобы получить краткий и неприводимый набор событий AC.

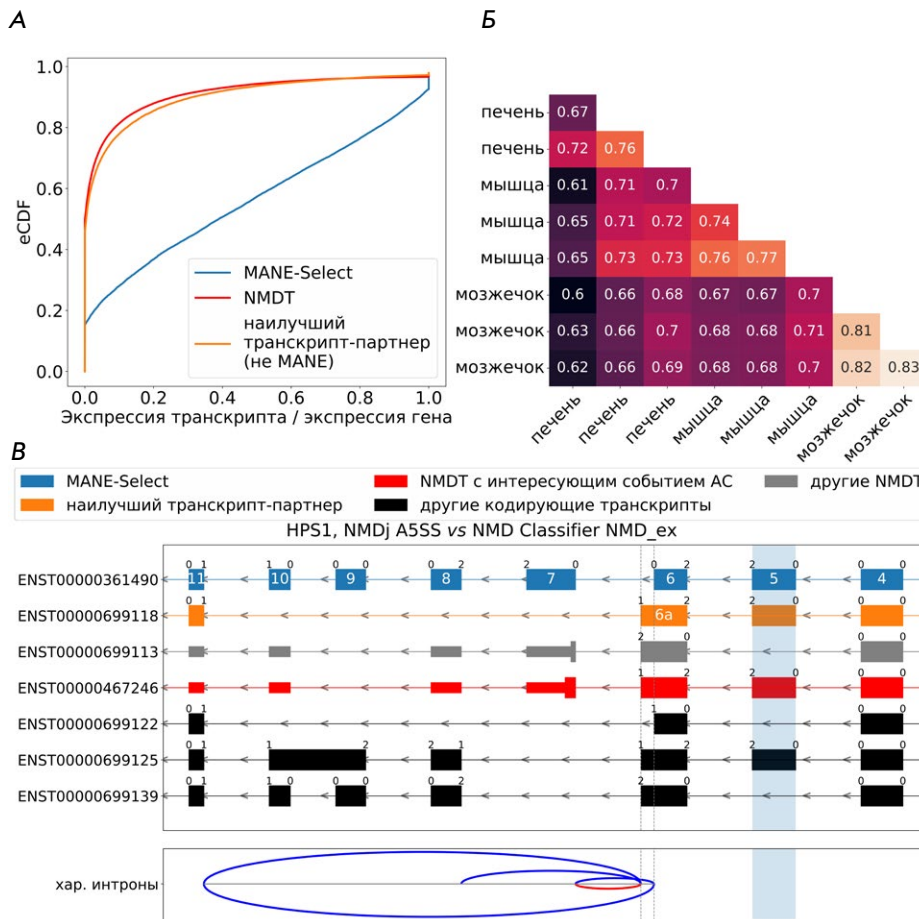


Рис. 2. NMDj и наилучшие транскрипты-партнеры NMD Classifier. **А** — относительные доли транскриптов (eCDF — кумулятивная функция распределения) изоформ MANE-Select, изоформ наилучшего транскрипта-партнера и изоформ NMDT, оцененные по выборке экспериментов секвенирования РНК из тканей человека. **Б** — доля генов, наиболее экспрессируемые транскрипты которых совпадают между парами образцов тканей. **В** — пример локального события AC, приводящего к появлению NMDT, в гене *HPS1*. Характеристические интроны для NMDT и кодирующих транскриптов показаны красными и синими дугами соответственно. Фаза рамки считывания указана над границами экзонов. Цвета транскриптов: MANE-Select (синий), NMDT (красный), наилучший транскрипт-партнер, найденный NMD Classifier (оранжевый), другие транскрипты (серый — NMDT, черный — кодирующие). Необходимый экзон, обнаруженный NMD Classifier, выделен вертикальной голубой заливкой, однако в действительности NMDT образуется из-за смещения сайта сплайсинга в MANE-Select-изоформе

NMDj особенно полезен в генах со сложной архитектурой сплайсинга. Ярким примером является ген *HPS1*, который содержит группу экзонов, длина которых не кратна трем (рис. 2B). Пропуск каждого отдельного экзона приводит к появлению NMDT, если он не компенсируется событием AC в направлении 3'-конца, которое восстанавливает рамку считывания. Одновременное включение экзонов 6а и 7 приводит к появлению NMDT. NMD Classifier выбирает транскрипт с экзонам 5 в качестве наилучшего транскрипта-партнера. Этот экзон пропускается в NMDT, что действительно вызывает сдвиг рамки считывания. Однако он также пропускается в кодирующем транскрипте, в котором его сдвиг рамки компенсируется использованием экзона 6 вместо экзона 6а и пропуском экзонов 7–10. NMDj правильно идентифицирует последний сайт сплайсинга, в котором рамка считывания NMDT совпадает с рамкой считывания кодирующего транскрипта, как 3'-границу экзона 6а, что позволяет обнаружить единственное истинное событие AC, приводящее к появлению NMD, а именно вырезание интрона между экзонами 6а и 7. Он также идентифицирует все альтернативные интроны, вырезание которых позволяет избежать сдвига

рамки. Интересно, что другой NMDT с включенным экзонам 5 имеет тот же характеристический интрон и поэтому кластеризуется с предыдущим.

NMDj дает более подробную классификацию событий AC

Мы сравнили результаты классификации событий AC, полученные с помощью NMDj и NMD Classifier, в применении к одной и той же аннотации транскриптома человека (рис. 3A). NMDj настроен на использование транскриптов MANE-Select в качестве эталона. Из 15914 NMDT программы NMD Classifier и NMDj смогли классифицировать события AC для 15446 и 15265 NMDT соответственно. Однако события AC были отнесены к одному и тому же типу (табл. 1) только в 60% случаев.

В то время как NMD Classifier подразделяет события AC на небольшое число наиболее распространенных типов, NMDj может описывать более сложные события сплайсинга, используя вершинно-независимые пути. Например, в гене *POR* NMDT отличается от кодирующих изоформ альтернативными 5'- и 3'-сайтами сплайсинга и кассетным экзонам (рис. 3B). Такие события обычно пропускают-

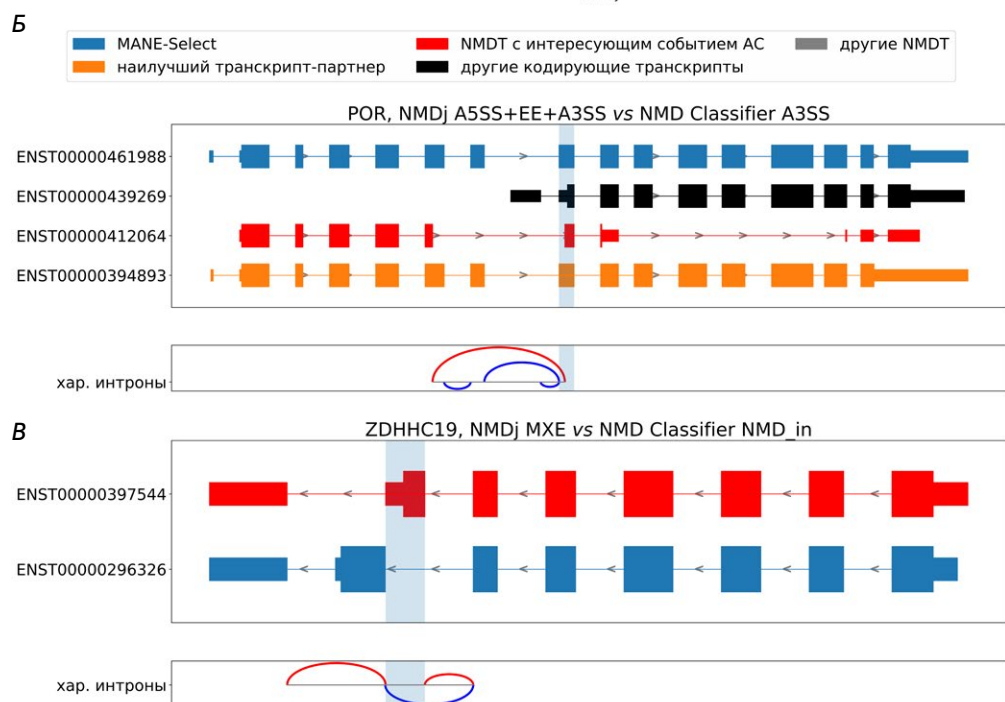
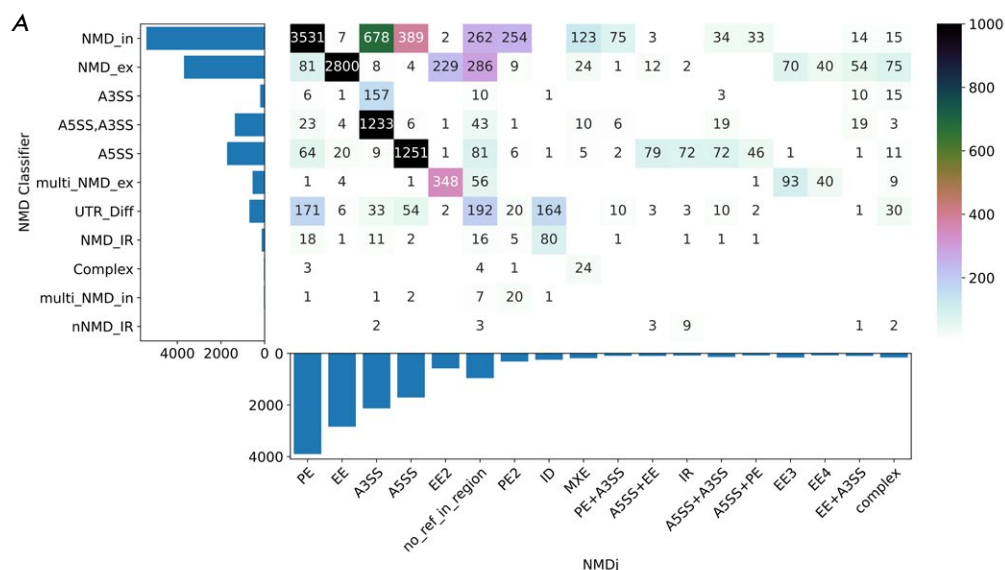


Рис. 3. Категоризация событий AC. **А** – сравнение классификаций NMDj и NMD Classifier. Каждая ячейка представляет количество NMDT, классифицированных на соответствующие типы с помощью NMDj (строки) и NMD Classifier (столбцы). **Б, В** – примеры редких событий AC, приводящих к образованию NMDT. Остальные обозначения как на рис. 2

ся многими стандартными методами исследования сплайсинга [31, 32]. Наличие типов AC, которые NMD Classifier не может правильно классифицировать, является причиной большой доли несоответствий между двумя классификациями. Например, ряд событий, определенных NMD Classifier как ядовитые экзоны (NMD_in), классифицируются NMDj как PE+A3SS и MXE (рис. 3A,B). Еще одно преимущество NMDj – способность классифицировать события AC в 3'-нетранслируемых областях (3'-НТО). Большинство событий, индуцирующих NMD в 3'-НТО, ожидаемо представлено удержанием интро-

нов. Более того, многие события 3'-НТО не пересекаются с изоформой MANE-Select (рис. 3A, S2).

Относительно небольшое количество других несоответствий можно объяснить тем фактом, что NMDj и NMD Classifier используют разные эталонные транскрипты для классификации событий AC. Лишь 61% событий AC были классифицированы одинаково, когда NMDj был настроен на использование наилучших транскриптов-партнеров в качестве эталона. Значительная часть различий обусловлена неправильной классификацией NMD Classifier. Например, большинство событий, отнесенных NMD

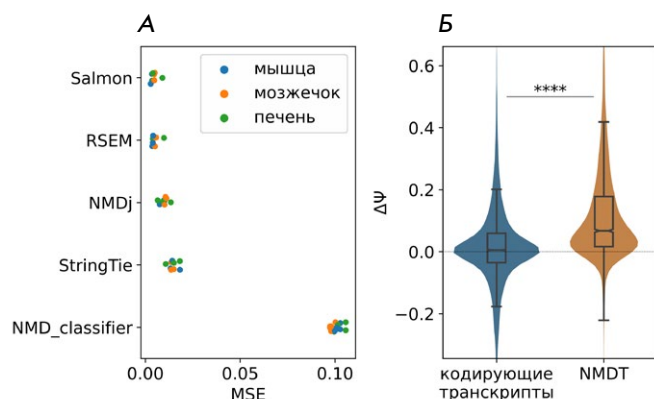


Рис. 4. Сравнение предсказаний NMDj и NMD Classifier. **А** – среднеквадратическая ошибка (MSE) значений Ψ , оцененных различными методами по симулированным данным секвенирования РНК относительно истинного значения. **Б** – статистически значимые изменения событий АС, приводящих к появлению NMDT и кодирующих транскриптов (кассетные экзоны, альтернативные сайты сплайсинга и удержание интронов) при инактивации NMD циклогексимином. **** обозначает статистически значимые различия на 0.01% уровне значимости (тест Манна–Уитни)

Classifier к типу «A3SS, A5SS», классифицируются NMDj как A3SS (рис. 3А). Между тем, размер класса «A5SS, A3SS» NMD Classifier намного больше, чем размер класса «A3SS». Это противоречит здравому смыслу, поскольку выбор между парой альтернативных 5'-сайтов сплайсинга, по-видимому, не зависит от выбора между парой альтернативных 3'-сайтов сплайсинга, расположенных в направлении 3'-конца и разделенных длинным интроном [36]. Визуальная проверка случайно выбранных примеров несоответствия классификации подтверждает правильность классификации NMDj (рис. S3).

Валидация NMDj на симулированных и реальных данных

Приводящие к появлению NMDT события АС можно использовать для количественной оценки относительных уровней экспрессии NMDT с использованием данных секвенирования РНК. Чтобы оценить точность NMDj в количественной оценке АС, мы симулировали данные секвенирования РНК, используя средние уровни экспрессии транскриптов в тканях человека. Оценочные значения Ψ , которые были рассчитаны на основе чтений с разрывами, соответствующих характеристическим интронам, сравнивали с фактическими значениями Ψ , определяемыми как доля уровня экспрессии NMDT в суммарном уровне экспрессии всех транскриптов гена. В качестве меры расстояния использовали среднеквадратичную ошибку

(MSE) по всем значениям Ψ для всех изоформ NMDT. Оказалось, что по точности NMDj сравним с современными методами количественной оценки на уровне транскриптов, в то время как значения MSE для NMD Classifier были значительно выше (рис. 4А). Поскольку способ вычисления метрики Ψ в NMDj и NMD Classifier был одинаковым, это еще раз говорит о том, что не только наилучший транскрипт-партнер, но и другие транскрипты вносят существенный вклад в значение Ψ .

Чтобы подтвердить, что предсказанные NMDj события АС действительно приводят к образованию NMDT, мы проанализировали изменения Ψ событий АС, приводящих и не приводящих к появлению NMDT, в экспериментах по инактивации системы NMD при помощи нокдауна двух ее ключевых факторов – SMG6 и SMG7 [14]. События АС, не приводящие к появлению NMDT, включали в себя кассетные экзоны, альтернативные сайты сплайсинга и удержанные интроны, найденные в кодирующих транскриптах, не являющихся NMDT. Как и ожидалось, при инактивации NMD значения Ψ событий АС, приводящих к появлению NMDT, увеличиваются более заметно, чем значения Ψ событий АС в кодирующих транскриптах (рис. 4Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Подход, реализованный в NMDj, не опирается на поиск одного наилучшего транскрипта-партнера, что позволяет ему идентифицировать и правильно описывать гораздо большее число событий АС, приводящих к появлению NMDT, по сравнению с NMD Classifier. Однако для некоторых NMDT (всего 1139 транскриптов) характеристические интроны не обнаружены, что в большинстве случаев обусловлено координацией между удаленными событиями АС и альтернативными старт- и стоп-кодонами. Например, одновременное включение и исключение несмежных экзонов 5 и 7 в гене *ERLEC1* сохраняет рамку считывания, а включение только одного экзона из пары приводит к появлению NMDT (рис. 5А). Этот пример показывает, что установить причинно-следственную связь между локальным событием АС и NMDT не всегда возможно, поскольку способность служить мишенью NMD является глобальной характеристикой транскрипта, которая зависит от координации между удаленными событиями АС, а локальные события АС по отдельности не определяют эти глобальные свойства. Как и любой другой подход, учитывающий только локальные события АС, NMDj принципиально не способен правильно охарактеризовать причину появления таких NMDT.

Известно, что локальные события АС регулируют экспрессию генов путем переключения АС

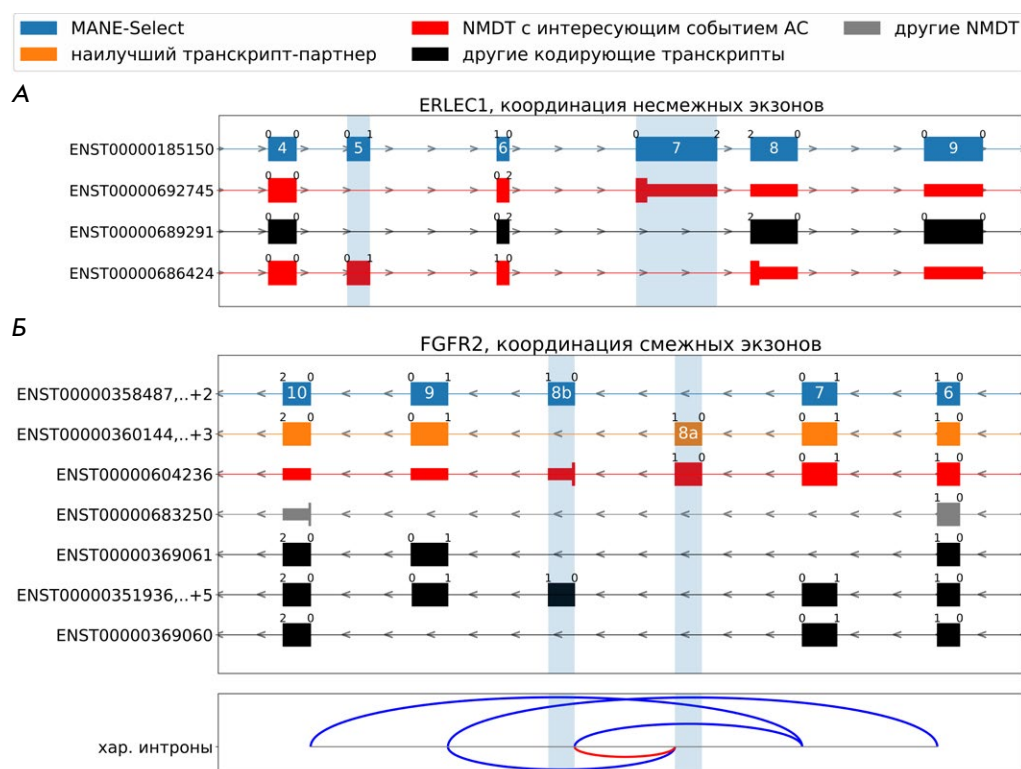


Рис. 5. Скоординированный сплайсинг несмежных кассетных экзонов в гене *ERLEC1* (А) и скоординированный сплайсинг экзонов в гене *FGFR2* (Б). Помимо взаимного исключения экзонов 8а и 8б, аннотированы изоформы с скоординированным пропуском экзонов 7–9 (NMDT), а также кодирующие изоформы с скоординированным пропуском экзонов 7–8а,б и 8а,б–9. При одновременном включении экзонов 8а и 8б возникает NMDT. Цветовые обозначения как на рис. 2

на производство NMDT [5, 6]. Такое переключение управляется РНК-связывающими белками, которые связываются с *цис*-элементами в пре-мРНК, и, как правило, регулируется локально [37]. С другой стороны, о функциональных последствиях и регуляторных механизмах координации событий AC на больших расстояниях известно довольно мало [38–41]. Координация между событиями AC может быть важна для получения изоформ белка с различными функциями. В некоторых случаях координация может поддерживаться системой NMD. Примером тому служит скоординированный взаимоисключающий сплайсинг экзонов 8а и 8б в гене *FGFR2*, который приводит к образованию функциональных белковых продуктов с различной лигандной специфичностью [41] (рис. 5Б). Включению экзона 8а способствуют эпителиально-специфичные белки ESRP1 и ESRP2, которые связываются с одной и той же регуляторной последовательностью внутри интрона [42]. При этом одновременное включение обоих экзонов приводит к образованию NMDT. Таким образом, в *FGFR2* переключение между изоформами регулируется на уровне локального AC, а координация взаимоисключения экзонов достигается за счет элиминации NMDT.

В целом, одновременный анализ всех изоформ сплайсинга вместо одного наилучшего транскрипта-партнера позволяет NMDj идентифицировать события AC, приводящие к появлению NMDT, с более высокой точностью. Однако в отношении клас-

сификации скоординированного действия удаленных событий AC NMDj имеет те же ограничения, что и другие методы. Анализ таких событий требует принципиально иных подходов. Однако представляется более вероятным, что это NMD вызывает неслучайную связь между событиями AC, а не регулируемая связь между событиями AC вызывает появление мишеней NMD. Поэтому описание скоординированных событий AC на больших расстояниях выходит за рамки данного исследования как по техническим, так и по концептуальным причинам.

Разработанный нами метод может быть полезен в исследованиях регуляции генной экспрессии по механизму непродуктивного сплайсинга [6]. Например, он может быть применен в таких задачах, как поиск специфически экспрессируемых NMDT и для оценки активности системы NMD в целом. Таким образом, NMDj закрывает существующий пробел в инструментарии для исследования сопряжения AC и NMD. ●

Представленные результаты включают данные, полученные из портала GTeX (номер dbGaP phs000424/GRU).

Данная работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (№ 22-14-00330).

Приложения доступны на сайте <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27572>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tung K.-F., Pan C.-Y., Chen C.-H., Lin W.-C. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 16245. doi: 10.1038/s41598-020-73081-5
2. Fair B., Najar C.F.B.A., Zhao J., Lozano S., Reilly A., Mossian G., Staley J.P., Wang J., Li Y.I. // *Nat. Genet.* 2024. V. 56. № 9. P. 1851–1861. doi: 10.1038/s41588-024-01872-x
3. Kurosaki T., Popp M.W., Maquat L.E. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019. V. 20. № 7. P. 406–420. doi: 10.1038/s41580-019-0126-2
4. Nasif S., Contu L., Mühlemann O. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2018. V. 75. P. 78–87. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.08.053
5. Müller-McNicoll M., Rossbach O., Hui J., Medenbach J. // *J. Mol. Cell Biol.* 2019. V. 11. № 10. P. 930–939. doi: 10.1093/jmcb/mjz043
6. Zavileyskiy L.G., Pervouchine D.D. // *Acta Naturae.* 2024. V. 16. № 1. P. 4–13. doi: 10.32607/actanaturae.27337
7. Yan Q., Weyn-Vanhenenryck S.M., Wu J., Sloan S.A., Zhang Y., Chen K., Wu J.Q., Barres B.A., Zhang C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 11. P. 3445–3450. doi: 10.1073/pnas.1502849112
8. Wong J.J.-L., Ritchie W., Ebner O.A., Selbach M., Wong J.W.H., Huang Y., Gao D., Pinello N., Gonzalez M., Baidya K., et al. // *Cell.* 2013. V. 154. № 3. P. 583–595. doi: 10.1016/j.cell.2013.06.052
9. Jangi M., Boutz P.L., Paul P., Sharp P.A. // *Genes Dev.* 2014. V. 28. № 6. P. 637–651. doi: 10.1101/gad.235770.113
10. Margasyuk S., Kuznetsova A., Zavileyskiy L., Vlasenok M., Skvortsov D., Pervouchine D.D. // *NAR Genom. Bioinform.* 2024. V. 6. № 4. P. lqae163. doi: 10.1093/nargab/lqae163
11. Mironov A., Petrova M., Margasyuk S., Vlasenok M., Mironov A.A., Skvortsov D., Pervouchine D.D. // *Nucleic Acids Res.* 2023. V. 51. № 7. P. 3055–3066. doi: 10.1093/nar/gkad161
12. Pervouchine D., Popov Y., Berry A., Borsari B., Frankish A., Guigó R. // *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. № 10. P. 5293–5306. doi: 10.1093/nar/gkz193
13. Hsu M.-K., Lin H.-Y., Chen F.-C. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 4. P. e0174798. doi: 10.1371/journal.pone.0174798
14. Karousis E.D., Gypas F., Zavolan M., Mühlemann O. // *Genome Biol.* 2021. V. 22. № 1. P. 223. doi: 10.1186/s13059-021-02439-3
15. Isken O., Maquat L.E. // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. № 9. P. 699–712. doi: 10.1038/nrg2402
16. Harrison P.W., Amode M.R., Austine-Orimoloye O., Azov A.G., Barba M., Barnes I., Becker A., Bennett R., Berry A., Bhai J., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2024. V. 52. № D1. P. D891–D899. doi: 10.1093/nar/gkad1049
17. Cunningham F., Allen J.E., Allen J., Alvarez-Jarreta J., Amode M.R., Armean I.M., Austine-Orimoloye O., Azov A.G., Barnes I., Bennett R., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2022. V. 50. № D1. P. D988–D995. doi: 10.1093/nar/gkab1049
18. Britto-Borges T., Gehring N.H., Boehm V., Dieterich C. // *RNA.* 2024. V. 30. № 10. P. 1277–1291. doi: 10.1261/rna.080066.124
19. Morales J., Pujar S., Loveland J.E., Astashyn A., Bennett R., Berry A., Cox E., Davidson C., Ermolaeva O., Farrell C.M., et al. // *Nature.* 2022. V. 604. № 7905. P. 310–315. doi: 10.1038/s41586-022-04558-8
20. Ivanov T.M., Pervouchine D.D. // *Genes.* 2018. V. 9. № 7. doi: 10.3390/genes9070356
21. Ma C., Zheng H., Kingsford C. // *Algorithms Mol. Biol.* 2021. V. 16. № 1. P. 5. doi: 10.1186/s13015-021-00184-7
22. Lonsdale J., Thomas J., Salvatore M., Phillips R., Lo E., Shad S., Hasz R., Walters G., Garcia F., Young N., et al. // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 6. P. 580–585. doi: 10.1038/ng.2653
23. Yeo G., Holste D., Kreiman G., Burge C.B. // *Genome Biol.* 2004. V. 5. № 10. P. R74.
24. Barbosa-Morais N.L., Irimia M., Pan Q., Xiong H.Y., Gueroussov S., Lee L.J., Slobodeniuc V., Kutter C., Watt S., Colak R., et al. // *Science.* 2012. V. 338. № 6114. P. 1587–1593. doi: 10.1126/science.1230612
25. Li B., Dewey C.N. // *BMC Bioinformatics.* 2011. V. 12. P. 323. doi: 10.1186/1471-2105-12-323
26. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. // *Bioinformatics.* 2013. V. 29. № 1. P. 15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635
27. Pervouchine D.D., Knowles D.G., Guigó R. // *Bioinformatics.* 2013. V. 29. № 2. P. 273–274. doi: 10.1093/bioinformatics/bts678
28. Patro R., Duggal G., Love M.I., Irizarry R.A., Kingsford C. // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. № 4. P. 417–419. doi: 10.1038/nmeth.4197
29. Pertea M., Pertea G.M., Antonescu C.M., Chang T.-C., Mendell J.T., Salzberg S.L. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. № 3. P. 290–295. doi: 10.1038/nbt.3122
30. Popp M.W., Maquat L.E. // *Cell.* 2016. V. 165. № 6. P. 1319–1322. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.053
31. Shen S., Park J.W., Lu Z., Lin L., Henry M.D., Wu Y.N., Zhou Q., Xing Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 51. P. E5593–5601. doi: 10.1073/pnas.1419161111
32. Li Y.I., Knowles D.A., Humphrey J., Barbeira A.N., Dickinson S.P., Im H.K., Pritchard J.K. // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. № 1. P. 151–158. doi: 10.1038/s41588-017-0004-9
33. Vaquero-Garcia J., Barrera A., Gazzara M.R., González-Vallinas J., Lahens N.F., Hogenesch J.B., Lynch K.W., Barash Y. // *eLife.* 2016. V. 5. P. e11752. doi: 10.7554/eLife.11752
34. Wang X., Dalkic E., Wu M., Chan C. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008. V. 19. № 5. P. 482–491. doi: 10.1016/j.copbio.2008.07.011
35. Kim E., Magen A., Ast G. // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. № 1. P. 125–131.
36. Conti L.D., Baralle M., Buratti E. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2013. V. 4. № 1. P. 49–60. doi: 10.1002/wrna.1140
37. Barash Y., Calarco J.A., Gao W., Pan Q., Wang X., Shai O., Blencowe B.J., Frey B.J. // *Nature.* 2010. V. 465. № 7294. P. 53–59. doi: 10.1038/nature09000
38. Joglekar A., Foord C., Jarroux J., Pollard S., Tilgner H.U. // *Transcription.* 2023. V. 14. № 3–5. P. 92–104. doi: 10.1080/21541264.2023.2213514
39. Fededa J.P., Petrillo E., Gelfand M.S., Neverov A.D., Kadener S., Nogués G., Pelisch F., Baralle F.E., Muro A.F., Kornblihtt A.R. // *Mol. Cell.* 2005. V. 19. № 3. P. 393–404.
40. Bushra S., Lin Y.-N., Joudaki A., Ito M., Ohkawara B., Ohno K., Masuda A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 8. P. 7420. doi: 10.3390/ijms24087420
41. Holzmann K., Grunt T., Heinzle C., Sampl S., Steinhoff H., Reichmann N., Kleiter M., Hauck M., Marian B. // *J. Nucleic Acids.* 2012. V. 2012. P. 950508. doi: 10.1155/2012/950508
42. Warzecha C.C., Sato T.K., Nabet B., Hogenesch J.B., Carstens R.P. // *Mol. Cell.* 2009. V. 33. № 5. P. 591–601. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.025

УДК 577.29

Гипометилирующий агент 5-азацитидин усиливает действие ингибиторов RAS и Sp1 в клетках нейробластомы

К. А. Иваненко^{1*}, А. В. Снежкина¹, М. А. Золотовская^{2,3}, П. В. Спирин^{1,4}, О. Г. Леонова¹, В. И. Попенко¹, А. В. Кудрявцева^{1,4}, А. А. Буздин^{2,3,5,6}, В. С. Прасолов^{1,4}, Т. Д. Лебедев^{1,4}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный, 141701 Россия

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, 119991 Россия

⁴Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

⁵Государственный научный центр Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

⁶PathoBiology Group, European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), Brussels, 1200, Belgium

*E-mail: karina.ivanenko@mail.ru

Поступила в редакцию 08.11.2024

Принята к печати 03.04.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27558

РЕФЕРАТ Нейробластома – злокачественная солидная опухоль, возникающая в результате трансформации клеток нервного гребня. Нейробластома встречается преимущественно у детей и характеризуется неблагоприятным течением. В связи с этим актуальна разработка новых подходов к терапии нейробластом, в том числе к комбинированной терапии. Увеличение уровня метилирования ДНК, обнаруженное в клетках нейробластомы, указывает на потенциальную возможность использования гипометилирующих агентов в комбинированной терапии этого заболевания. Для выявления эффективных комбинаций противоопухолевых препаратов нами проведен анализ изменений транскриптома клеток нейробластомы SH-SY5Y после обработки гипометилирующим агентом 5-азацитидином с последующей экспериментальной проверкой эффективности этих комбинаций. Обнаружены два препарата – митрамицин А и лонафарниб – совместное применение которых с 5-азацитидином синергически усиливает гибель клеток SH-SY5Y. Эти препараты ингибируют сигнальный путь, связанный с фактором транскрипции Sp1, и сигнальный путь RAS-MAPK, которые активируются под действием 5-азацитидина. Анализ сигнальных путей также выявил активацию сигнальных каскадов, связанных с дифференцировкой клеток нейробластомы и индукцией апоптоза, что было подтверждено методами мультиплексной и конфокальной микроскопии. Таким образом, анализ изменения сигнальных путей позволяет установить механизмы гибели клеток и их адаптации к гипометилирующим агентам, что может быть в дальнейшем использовано для разработки новых подходов к терапии нейробластомы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА детские злокачественные заболевания, комбинированная терапия, эпигенетические регуляторы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 5-Аза – 5-азацитидин; GD2 – дисialogанглиозид; ALK – киназа анапластической лимфомы; MDM2 – убиквитин-протеинлигаза E3; ДМСО – диметилсульфоксид; PKB – протеинкиназа B; NGF – фактор роста нервов; ILK – интегрин-связанная киназа; TRK – рецепторная тропомиозинкиназа; IGF1R – инсулиноподобный фактор роста 1; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; ERK – внеклеточная сигнал-регулируемая киназа; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; FGFR – рецептор фактора роста фибробластов, JAK – Янус-киназа; CHK – киназа контрольных точек клеточного цикла; mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих; RAF – серин/треониновая протеинкиназа; CDK – циклинзависимая киназа; PTK – рецепторная тирозинкиназа; RAS – малый G-белок.

ВВЕДЕНИЕ

Нейробластома – это внечерепная солидная опухоль, которая образуется в результате злокачественного перерождения клеток нервного гребня во время формирования симпатической нервной системы [1]. Пятилетняя выживаемость детей с нейробластомой высокого риска (50% случаев) составляет 60% [2]. К основным методам лечения нейробластом высокого риска относятся интенсивная химиотерапия, лучевая терапия, трансплантация аутологичных стволовых клеток и иммунотерапия [3]. Разрабатываются таргетные препараты, направленные на дисаialogанглиозид (GD2) [4], киназу анапластической лимфомы (ALK) [5–7], убиквитин-протеинлигазу E3 (MDM2) [8], компоненты сигнальных путей PI3K/Akt/mTOR, Fos/Jun и RAS-MAPK [9]. Ингибиторы ALK уже находятся на стадии клинических испытаний для лечения пациентов с рецидивами и резистентными формами нейробластомы [10]. Существующие подходы к лечению таких пациентов не всегда эффективны, поэтому разрабатываются методы комбинированной терапии нейробластом [11].

Изменения в метилировании ДНК часто наблюдаются в злокачественных клетках разной природы, в частности, гиперметилирование промоторов опухолевых генов-супрессоров или глобальное гипометилирование [12]. На данный момент для лечения миелодиспластических синдромов одобрены два ингибитора ДНК-метилтрансферазы – 5-азациитидин (5-Аза) и его аналог децитабин [13, 14]. 5-Аза – гипометилирующий агент, являющийся синтетическим аналогом цитидина. Встраивание 5-Аза в ДНК приводит к нарушению работы ДНК-метилтрансфераз, гипометилированию и повреждению ДНК. Препарат одобрен для лечения пациентов с острыми миелоидными лейкозами и миелодиспластическими синдромами [15].

Повышенный уровень метилирования геномной ДНК в клетках нейробластомы связывают с неблагоприятным прогнозом [16]. Показано, что 5-Аза вызывает дифференцировку клеток нейробластом, снижает скорость пролиферации и формирование колоний, а также усиливает цитотоксический эффект таких препаратов, как доксорубицин, цисплатин и этопозид [17]. Децитабин ранее тестировали в сочетании с доксорубицином, но на первой стадии клинических испытаний выявили высокую токсичность такой комбинации [18]. Ингибиторы эпигенетических регуляторов, например ингибиторы гистоновых деацетилаз, могут проявлять синергический эффект в сочетании с ингибиторами рецепторных тирозинкиназ за счет повышения их экспрессии [19]. 5-Аза также может оказывать су-

щественное влияние на экспрессию генов, активно участвующих в онкогенезе, путем деметилирования ДНК. Поэтому перспективным представляется поиск новых подходов к терапии, основанных именно на комбинированном использовании 5-Аза с другими противоопухолевыми препаратами.

В представленной работе проанализированы изменения экспрессии генов и активности сигнальных путей в клетках нейробластомы SH-SY5Y под действием 5-Аза для отбора наиболее эффективных комбинаций 5-Аза с противоопухолевыми препаратами различных типов. Дополнительно проверяли функциональное значение изменений активности сигнальных путей на уровне транскриптома, изучая внутриклеточные процессы с помощью флуоресцентной микроскопии и оценивая совместное действие 5-Аза с ингибиторами различных сигнальных путей. Эти данные можно рассматривать как предпосылку для разработки нового подхода к лечению тех нейробластом, клетки которых чувствительны к действию деметилирующих агентов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**Культуры клеток и ингибиторы**

Перевиваемые клетки злокачественных опухолей человека: нейробластомы SH-SY5Y, рака молочной железы SK-BR-3, рака почки 786-O, рака шейки матки SiHa и рака яичника SK-OV-3 культивировали в среде RPMI-1640 (Capricorn Scientific, Германия), клетки колоректального рака HCT-116, аденокарциномы легкого H1299, глиобластомы LN-18, рабдомиосаркомы TE-671 культивировали в среде DMEM (Capricorn Scientific). Все клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США), 1 mM пирувата натрия (Gibco), 2 mM L-глутамин (Gibco), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Capricorn Scientific). Для пересева клеток использовали фосфатный буфер и трипсин (ThermoFisher Scientific). Клетки SH-SY5Y, H1299, LN-18 и TE-671 подарены Институтом экспериментальной вирусологии Генриха Петте (Гамбург, Германия), клетки SK-BR-3 получены из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия), остальные клеточные культуры взяты из коллекции Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (Москва, Россия). Клетки тестировали на отсутствие контаминации микоплазмой каждые две недели с помощью окрашивания красителем ДНК Hoechst-33342 (Sigma-Aldrich, США).

Все использованные в работе ингибиторы растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), стоковые растворы хранили при -80°C (табл. S1).

Выделение РНК

РНК для анализа транскриптома выделяли из 1 млн клеток SH-SY5Y, обработанных 5 мкМ 5-Аза в течение 24 ч. РНК выделяли хлороформ-феноловым методом реагентом TRIzol (Ambion) с последующей обработкой ДНКазой (Zymo Research, США) и очисткой РНК с помощью колонок RNA Clean & Concentrator-25 (Zymo Research) согласно протоколам производителей.

Количество выделенной РНК определяли с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific). Общую целостность РНК оценивали с помощью биоанализатора Agilent 2100 (Agilent Technology, США). Целостность РНК (RIN) каждого образца составила ≥ 8 .

РНК-секвенирование и анализ транскриптома

Для получения каждой библиотеки использовали в общей сложности 1 мкг РНК. Библиотеки для секвенирования РНК создавали с использованием набора для подготовки библиотеки мРНК TruSeq (Illumina, США) в соответствии с рекомендациями производителя. К каждому образцу прикрепляли различные адаптеры с одним индексом из наборов TruSeq RNA Single Index (Illumina) для облегчения мультиплексного секвенирования. Фрагменты ДНК длиной 250–300 п.н. отбирали с помощью магнитных шариков MagPure A4 XP (Magen Biotechnology, Китай). Затем библиотеки кДНК обогащали методом ПЦР и очищали. Качество библиотек оценивали с помощью биоанализатора Agilent 2100. Конечные библиотеки собрали в эквимольных соотношениях и секвенировали на системе NextSeq 2000 (Illumina) в режиме single-end с длиной прочтения 101 п.н. Результаты секвенирования были обработаны с помощью программы STAR aligner версии 2.7.4a [20] в режиме «GeneCounts» с аннотацией Ensembl human transcriptome (версия сборки GRCh38 и аннотация транскрипта GRCh38.89). Исходные значения экспрессии RNAseq (формат ReadsPerGene) нормировали по стандарту DESeq2 [21]. Мы рассчитали уровни активации путей (PALs) в общей сложности для 3024 путей, используя общедоступную коллекцию молекулярных путей, извлеченных из OncoboxPD [22].

Анализ активности сигнальных путей и анализ CMAP

Для поиска схожих или противоположных воздействий использовали алгоритм CMAP [23]. Алгоритм CMAP позволяет сравнить изменения экспрессии генов под определенным воздействием и под действием каждого из сотен тысяч измеренных воздействий, содержащихся в базе данных.

Алгоритм показывает, влияние каких воздействий на экспрессию генов оказалось наиболее сходным или противоположным анализируемому воздействию. Сравнивали уровни экспрессии 100 генов, экспрессия которых наиболее сильно повысилась, и 100 генов, экспрессия которых наиболее заметно снизилась, под исследуемым воздействием. В качестве контроля использовали клетки SH-SY5Y, обработанные ДМСО.

Оценка выживаемости клеток

Жизнеспособность клеток оценивали с использованием наборов Cell Proliferation Assay XTT (11465015001, Roche, Sigma-Aldrich, США) и AbiCell Resazurin Cytotoxicity Assay Kit резазурин (CEL-04-30ML, Abisense, Россия).

Клетки SH-SY5Y (2500 клеток на лунку 96-луночного планшета) инкубировали с препаратами в течение 6 дней, затем удаляли питательную среду и добавляли к клеткам резазурин или ХТТ. После 4 ч инкубации при 37°C и 5% CO₂ измеряли сигнал от клеток на спектрофотометре Multiscan FC как разницу поглощения на длинах волн 570 и 620 нм для резазурина и 450 и 605 нм для ХТТ. Изменение жизнеспособности клеток, вызванное комбинацией препаратов, рассчитывали как разницу общего эффекта препаратов и суммы их эффектов по отдельности. Использовали методику расчета выживаемости клеток и показателя AUC (area under the curve), аналогичную опубликованной ранее [24]. Для расчета AUC вычисляли площадь под графиком в координатах выживаемости клеток (в процентах) и концентрации препарата, используя для расчета площади разбиение графика на трапеции. На основании рассчитанных для всех клеточных линий значений определяли среднее значение показателя AUC для всех линий для последующей нормировки. Значение AUC нормировали таким образом, что показатель AUC, равный единице, соответствует среднему значению AUC для всех линий.

Подсчет клеток автоматическим микроскопом

Для подсчета клеток автоматическим флуоресцентным микроскопом мы применяли протокол подсчета клеток с экспрессией репортерной системы ERK-KTR H2B-mRuby, который использовали в лаборатории ранее [25]. Каждый эксперимент повторяли три раза; для подсчета клеток в каждой лунке выбирали четыре случайные поля для съемки. Измеряли четыре временные точки: 0, 24, 72 и 144 ч. Изображения клеток получали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI8 (Leica, Германия), подсчет количества клеток производили в программах Cellpose и CellProfiler.

Измерение механизмов гибели клеток

Клетки SH-SY5Y высевали на 96-луночные планшеты (2500 клеток на лунку). Окрашивание проводили через 72 ч после добавления 5-Аза. Для окрашивания митохондрий, тубулина, лизосом, ионов железа Fe^{II} , каспаз 3/7, ядер и ДНК использовали красители TMRE (Lumiprobe, Россия), Tubulin Tracker™ Deep Red (Invitrogen, США), LumiTracker® LysoGreen (Lumiprobe), HMRhoNox-M (Lumiprobe), NucView® 488 (Biotium, США), Hoechst-33342 и 7-аминоактиномицин Д (7-AAD) (BioinnLabs, Россия) соответственно. Окрашивание проводили при 37°C и 5% CO_2 , съемку – на флуоресцентном микроскопе Leica DMI8. Используемые концентрации, времена окрашивания, параметры съемки указаны в приложении (табл. S2).

Делали по четыре фотографии клеток, инкубированных с препаратом в каждой концентрации, опыт проводили в двух повторах. Индивидуальные клетки на фотографиях определяли с помощью программ Cellpose и CellProfiler. Протоколы сегментации клеток и расчета интенсивностей флуоресценции опубликованы ранее [24]. Активности митохондрий, лизосом, ионов Fe^{II} измеряли, используя интегральную интенсивность флуоресценции для каждой клетки. Для анализа активности каспаз 3/7 и выявления мертвых клеток по окрашиванию 7-AAD определяли процент окрашенных клеток в CellProfiler.

Конфокальная микроскопия

Клетки фиксировали 4% раствором формальдегида (Sigma-Aldrich, США) в 0.1 М фосфатном буфере (PBS) в течение 15 мин, затем блокировали с использованием раствора, состоящего из 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) («ПанЭко», Россия), 22.52 мг/мл глицина (Sigma-Aldrich), 1% Tween (Sigma-Aldrich) в PBS. Для изучения распределения рецепторных белков TRK в цитоплазме клеток использовали конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa 647 антитела (ab194322, Abscam, Великобритания). Клетки инкубировали с антителами в течение ночи, разведение антител – 1 : 100 в 1% растворе BSA в PBS. Покровные стекла помещали на предметные стекла, на которых размещали 8 мкл Slowfade gold medium (Invitrogen, США) с 1 мкг/мл DAPI (Sigma-Aldrich) клетками вниз, покровные стекла заклеивали лаком для ногтей. Для детекции ядер использовали краситель DAPI. Данные получали методом конфокальной микроскопии на лазерно-сканирующем микроскопе Leica TCS SP5 (Leica), который оснащен объективом HCX PLAPO CS 63×1.4, используя масляную иммерсию. Полученные конфокальные

8-битные изображения обрабатывали в программном обеспечении LAS AF 4.0.

Обработка данных

Статистические тесты и визуализацию данных проводили в программных обеспечениях GraphPad Prism 8.0, Python, LAS AF. Средние значения, значения стандартного отклонения (SD) для оценки жизнеспособности клеток посчитали в R и GraphPad Prism 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения селективности 5-Аза в отношении клеток нейробластомы мы измерили действие 5-Аза в концентрациях 0.25–20 мкМ на клетки опухолей человека различной природы: нейробластомы SH-SY5Y, рака молочной железы SK-BR-3, рака почки 786-O, рака шейки матки SiHa, рака яичника SK-OV-3, колоректального рака HCT-116, аденокарциномы легких H1299, глиобластомы LN-18, рабдомиосаркомы TE-671 (рис. 1А). Наиболее чувствительными к действию 5-Аза оказались клетки нейробластомы SH-SY5Y (рис. 1Б).

Клетки нейробластомы SH-SY5Y были получены путем клонирования клеточной линии нейробластомы SK-N-SH [26]. Клетки SH-SY5Y являются наиболее часто используемыми в научных исследованиях: на сайте <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> представлены 13789 публикаций, в которых применяли клеточную линию SH-SY5Y, а на долю сле-

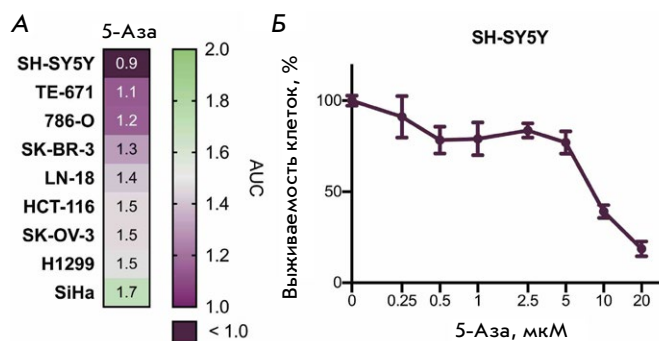


Рис. 1. Оценка токсичности 5-азацитидина (5-Аза) для клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. А – чувствительность злокачественных клеток разной природы к 5-Аза в течение 72 ч. Клетки обрабатывали препаратом в концентрации 0.25–20 мкМ, представлены значения показателя AUC (area under the curve). Б – выживаемость клеток нейробластомы SH-SY5Y после обработки 5-Аза в течение 72 ч. На графике приведены среднее значение из трех повторов и среднеквадратическое отклонение (SD). Контроль – клетки, инкубированные с диметилсульфоксидом (ДМСО)

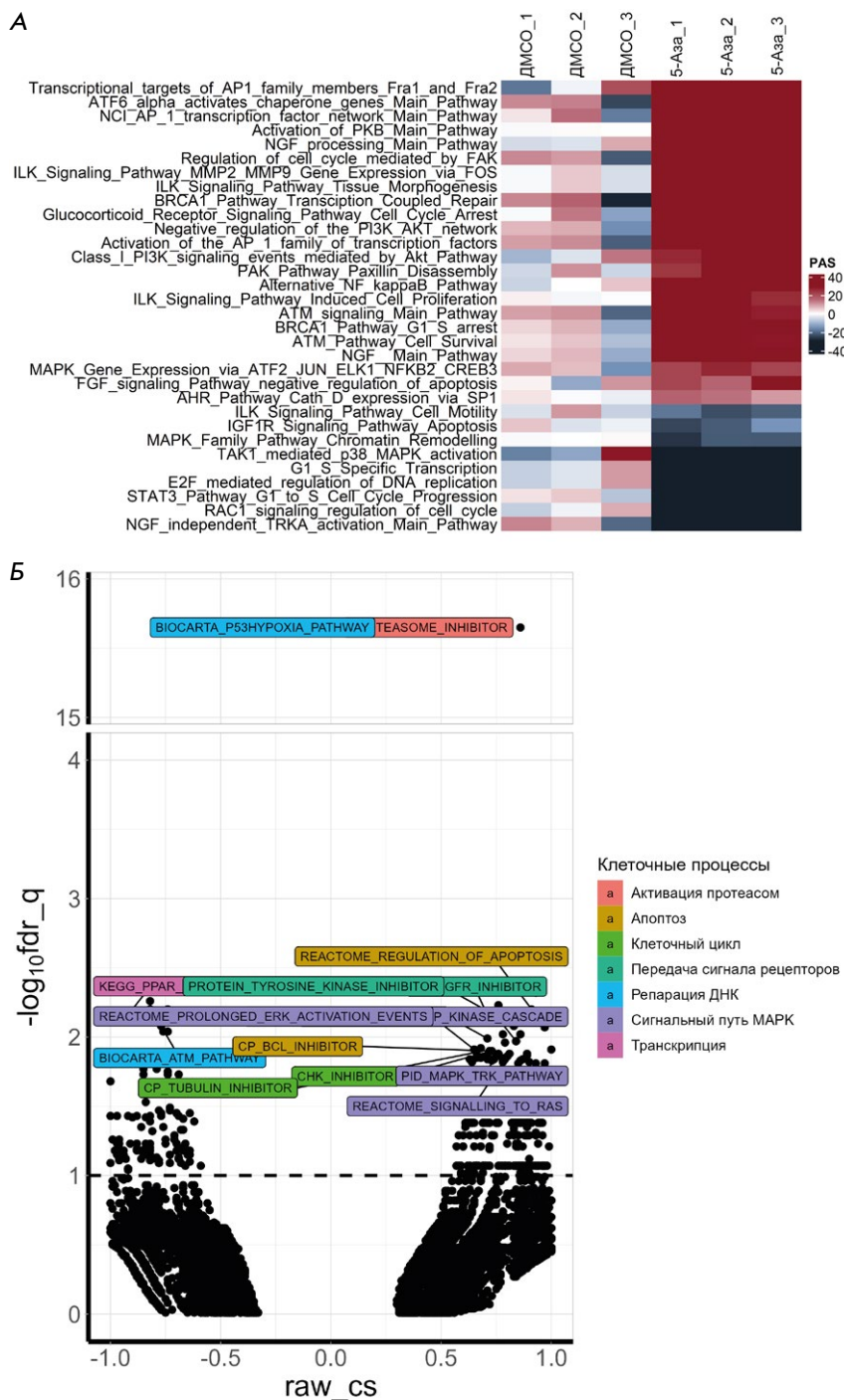


Рис. 2. Изменение сигнальных путей в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y после обработки 5-азациитидином (5-Аза). **А** – сила активации сигнальных путей в клетках SH-SY5Y после обработки 5 мкМ 5-Аза в течение 24 ч по результатам анализа Онкобокс [22]. Приведены результаты для каждого повторения отдельно. Сила активации сигнальных путей (PAS): красным обозначено позитивное изменение, черным – негативное. Показаны сигнальные пути, которые могут вносить вклад в прогрессию злокачественных опухолей и имеют статистически значимые изменения. **Б** – клеточные процессы, изменяющиеся в клетках SH-SY5Y, обработанных 5 мкМ 5-Аза в течение 24 ч, согласно анализу CMAP. Точками обозначены клеточные процессы из анализа CMAP. Цветом обозначены классы клеточных процессов, которые имеют статистически значимые совпадения или различия с набором генов, экспрессия которых изменяется под воздействием 5-азациитидина, согласно анализу CMAP. Результаты показаны как обратный десятичный логарифм q-значений после коррекции на множественные значения ($-\log_{10} \text{fdr}_q$) и connectivity scores (raw_cs) – степени совпадения дифференциально активированных генов на анализируемое изменение их экспрессии в ответ на воздействие 5-азациитидином. Положительные значения raw_cs указывают на наличие одинаковых изменений в экспрессии генов под воздействием 5-Аза и указанных пертурбаций. Отрицательные значения соответствуют противоположному изменению в экспрессии генов под воздействием 5-Аза и указанных пертурбаций

дующей по количеству упоминаний линии (NMB) приходится 5338 публикаций. Клетки SH-SY5Y содержат мутацию в гене *ALK* (F1174L) [27], они подходят для изучения дифференцировки клеток [28]. Клетки SH-SY5Y оказались самыми чувствительными к 5-Аза, поэтому дальнейшие исследования проводили на культуре этих клеток.

Чтобы определить, на какие процессы в клетках нейробластомы воздействует 5-Аза, нами проведен

анализ транскриптома клеток под воздействием 5 мкМ 5-Аза в течение 24 ч и сравнение с транскриптомом клеток SH-SY5Y, обработанных ДМСО в течение 24 ч. Результаты анализа транскриптома представлены в виде активности сигнальных путей и экспрессии генов (рис. 2А).

Наибольшие положительные изменения активности сигналинга наблюдали в сигнальных путях, связанных с транскрипционными факторами AP1,

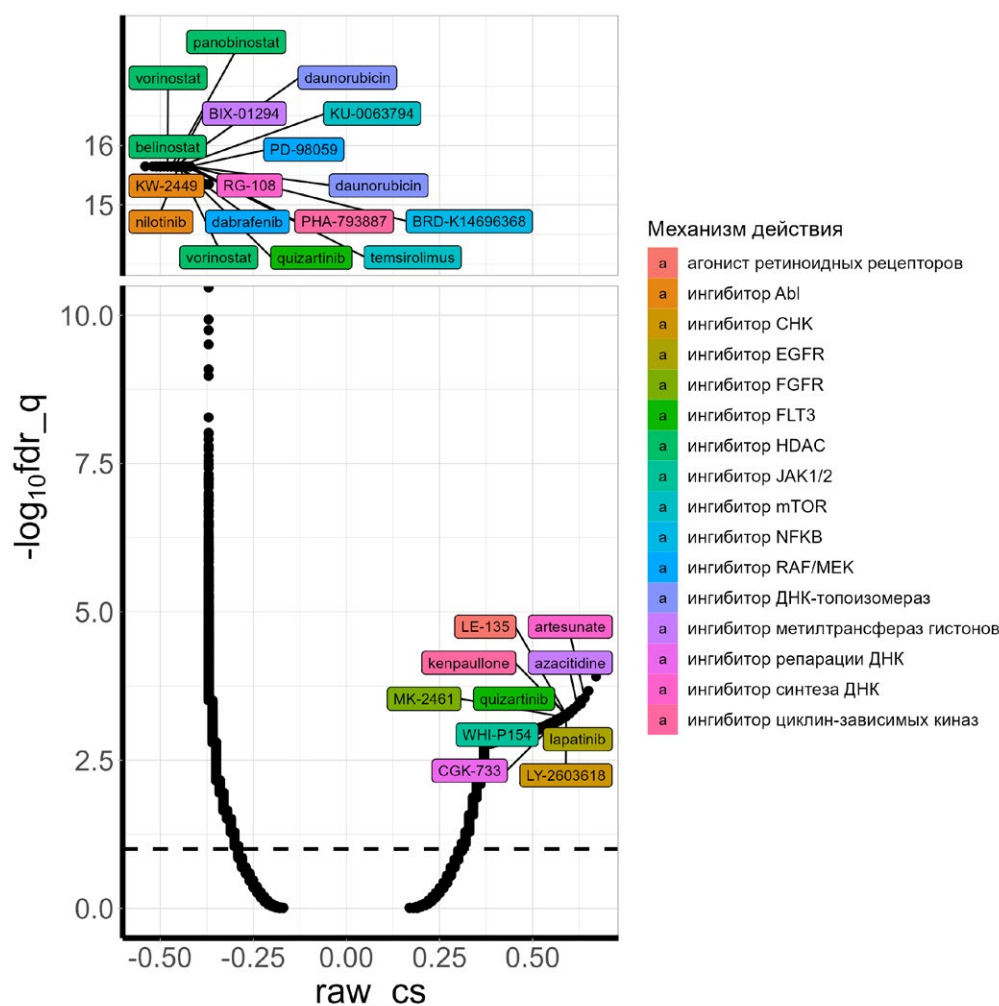


Рис. 3. Определение препаратов со сходным с 5-азацитидином (5-Аза) воздействием на экспрессию генов клеток SH-SY5Y нейробластомы человека с помощью CMAP. Клетки обрабатывали 5 мкМ 5-Аза и инкубировали их с препаратом в течение 24 ч. Точками обозначены воздействия ингибиторов, малых шпилечных РНК или сверхэкспрессии определенных генов. Цветом обозначены разные классы ингибиторов. Показаны препараты со статистически значимым максимальным эффектом. Результаты показаны как обратный десятичный логарифм q-значений после коррекции на множественные значения ($-\log_{10} \text{fdr}_q$) и connectivity scores (raw_cs) – степени похожести дифференциально активированных генов на анализируемое воздействие. Положительные значения raw_cs указывают на схожие воздействия с действием 5-Аза, а отрицательные – на противоположные

ATF6, Sp1, с активацией протеинкиназы В (PKB), процессингом фактора роста нервов (NGF), арестом клеточного цикла за счет рецептора глюкокортикоидов, сигнальными каскадами, связанными с интегринзависимой киназой (ILK) и сигнальным путем PI3K/Akt/mTOR (рис. 2А). Наибольшие отрицательные изменения выявлены в сигнальных путях, связанных с NGF-независимой активацией рецепторной тропомиозинкиназы А (TRKA), клеточным циклом, репликацией ДНК с участием транскрипционного фактора E2F, сигнальными путями митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), апоптозом за счет рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R).

Чтобы определить, какие противоопухолевые препараты и клеточные процессы могут оказывать схожее или противоположное воздействие на транскриптом клеток, мы провели анализ алгоритмом CMAP [23] (табл. S3, S4, рис. 2, 3). Нами выявлены значимые изменения клеточных процессов в клетках SH-SY5Y, обработанных 5-Аза (рис. 2Б).

Схожие изменения касались процессов, связанных с регуляцией апоптоза и клеточного цикла, активностью протеасом, рецепторным сигналингом и MAPK-путем, в частности, связанных с внеклеточной сигнал-регулируемой киназой (ERK) и TRK. Противоположные изменения касались процессов, связанных с ответом на повреждения ДНК и транскрипцией.

Ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора фактора роста фибробластов (FGFR), Янус-киназы (JAK), киназы контрольных точек клеточного цикла (CHK) и ингибитор репарации ДНК действовали на экспрессию генов так же, как и 5-Аза (рис. 3). В числе соединений, вызывающих сходные эффекты, выявлен 5-Аза, что указывает на достоверность наблюдаемых нами изменений транскриптома. Противоположные эффекты вызвали ингибиторы гистондеацетилаз, ингибиторы mTOR, топоизомеразы, серин/треониновой протеинкиназы (RAF), тирозинкиназы Abl, транскрипционного фактора NF-kB. Ингибиторы циклин-

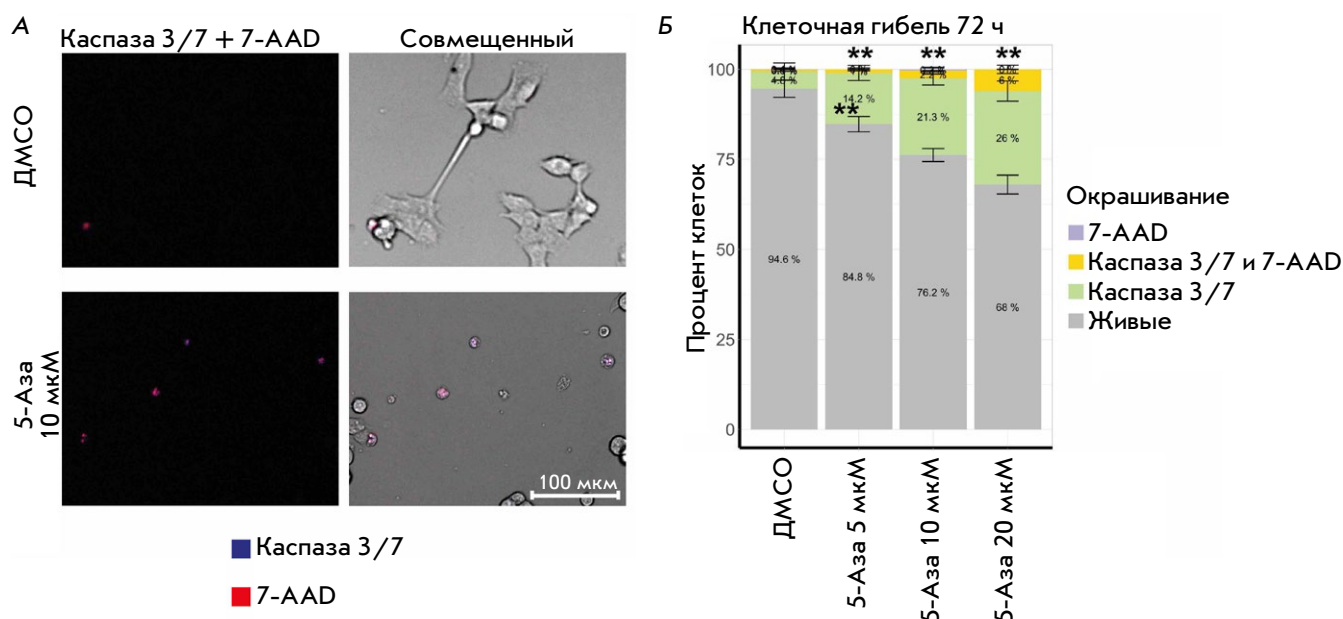


Рис. 4. Вклад апоптоза в гибель клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, обработанных 5-азацитидином (5-Аза) в течение 72 ч. А – окрашивание клеток SH-SY5Y красителем каспаз 3/7 и 7-аминоактиномицином Д (7-AAD) после обработки 10 мкМ 5-Аза. Б – доля апоптотических клеток (зеленый и желтый) в популяции клеток SH-SY5Y после обработки 5–20 мкМ 5-Аза. Фотографии клеток получены на автоматическом флуоресцентном микроскопе. Контроль – клетки, обработанные диметилсульфоксидом (ДМСО). Анализ проводили на основе интенсивности флуоресценции красителей в 350–2500 клетках, среднеквадратичное отклонение (SD) оценивали для среднего значения интенсивности восьми фотографий каждой концентрации 5-Аза. Статистическую значимость определяли с помощью теста Манна–Уитни по сравнению с ДМСО (** $p \leq 0.01$)

зависимых киназ (CDK), рецепторной тирозинкиназы (РТК) FLT3 и ингибиторы синтеза ДНК влияли на экспрессию генов по-разному.

Нами обнаружено увеличение активности семи клеточных путей, связанных с апоптозом (табл. S3). Поскольку существуют разные механизмы клеточной гибели, мы решили определить, как влияет обработка 5-Аза в течение 72 ч на активность каспаз 3/7, митохондрий, лизосом, содержание Fe^{II} в клетках и количество мертвых клеток SH-SY5Y. С помощью флуоресцентных красителей выявлено увеличение количества клеток в апоптозе до 26% (рис. 4А,Б), что подтверждает повышение активности сигнальных каскадов, связанных с апоптозом. Обнаружено увеличение активности лизосом в клетках SH-SY5Y после обработки 5-Аза (рис. 5А,Б). Также выявлено снижение активности митохондрий и повышение количества Fe^{II} , но эти изменения были незначительными и, вероятно, связаны с гибелью клеток (рис. 5В,Г).

Показано *in vitro*, что NGF способен замедлять рост нейрогенных опухолевых клеточных линий и вызывать их дифференцировку [29]. Поскольку 5-Аза влияет на активность сигнальных путей, связанных с NGF и его рецептором TRKA, мы оценили

распределение рецепторов TRK в цитоплазме клеток SH-SY5Y, обработанных 5-Аза в концентрации 10 мкМ в течение 72 ч (рис. 6).

Обнаруженное усиление окрашивания клеток антителами к белкам TRK в цитоплазме клеток SH-SY5Y может объяснять повышение активности сигнальных путей, связанных с NGF и белками TRK, на уровне экспрессии генов.

На основе полученных результатов (табл. S3, S4, рис. 2, 3) были выбраны 18 препаратов для дальнейшего тестирования в комбинациях с 5-Аза. В частности, отобран ряд ингибиторов РТК, гистон-деацетилаз, MAPK-пути, клеточного цикла, а также ингибиторы протеасом, глюкокортикоидных рецепторов, синтеза ДНК, восстановления поврежденной ДНК, индуктор апоптоза и активатор сигнального пути, связанного с p38 (табл. 1).

Мы одновременно обрабатывали клетки 5-Аза в концентрации 2.5 мкМ и вторым ингибитором в подобранной ранее действующей концентрации, которая снижает количество клеток на 20–50% за 72 ч. Далее мы инкубировали клетки в течение 144 ч и для оценки эффективности комбинаций препаратов измеряли жизнеспособность клеток резазурином (рис. 7А).

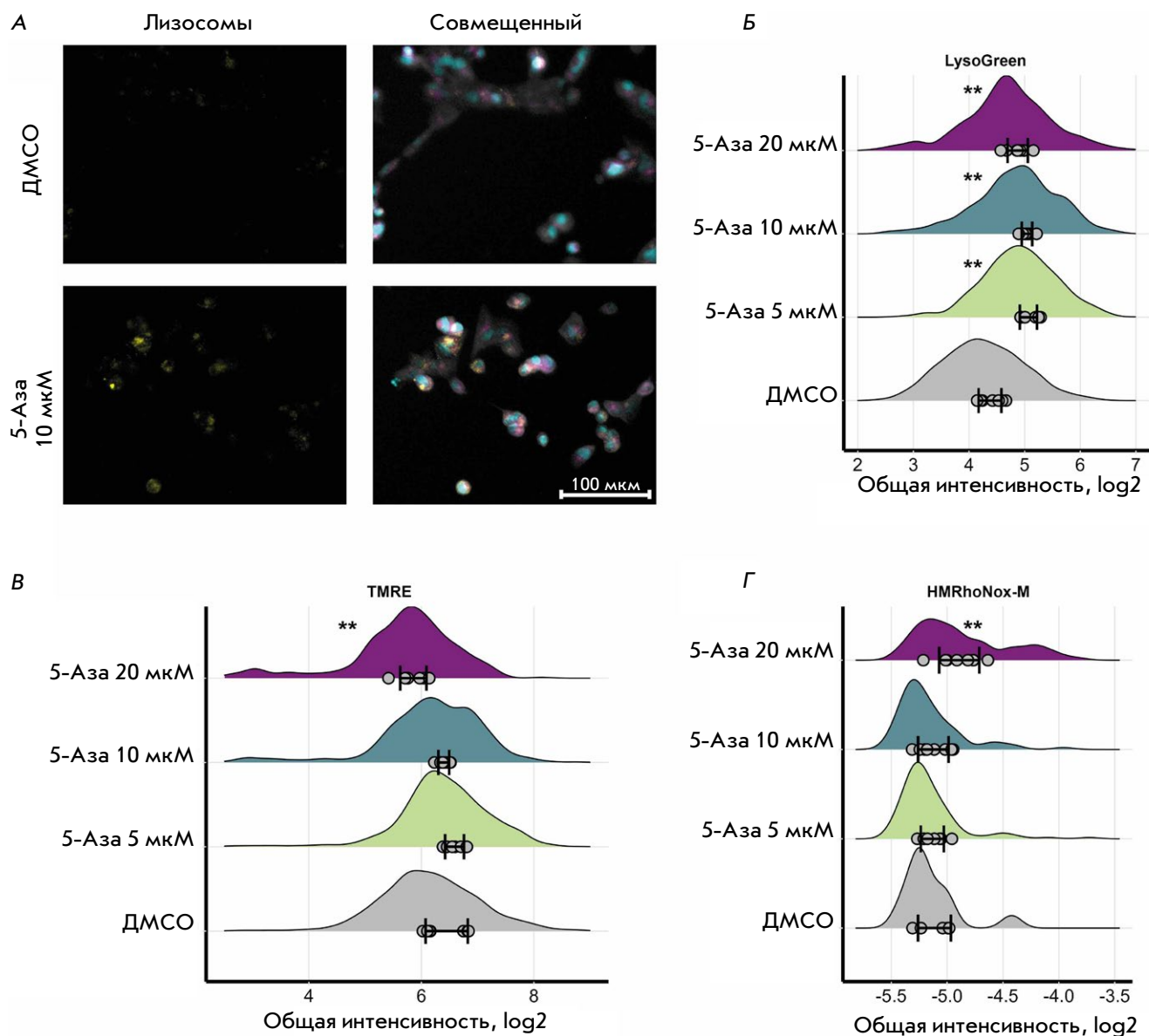


Рис. 5. Изменение активности лизосом в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y после обработки 5-азациитидином (5-Аза) в течение 72 ч. **А** – окрашивание клеток SH-SY5Y красителем лизосом после обработки 10 мкМ 5-Аза. Фотографии клеток получили на флуоресцентном микроскопе. Желтым отмечены лизосомы, синим – ядра, фиолетовым – митохондрии, серым – тубулин. **Б** – изменение активности лизосом в клетках SH-SY5Y после обработки 5–20 мкМ 5-Аза. **В** – изменение активности митохондрий в клетках SH-SY5Y после обработки 5–20 мкМ 5-Аза. **Г** – изменение количества железа Fe^{II} в клетках SH-SY5Y после обработки 5–20 мкМ 5-Аза. Контроль – клетки, обработанные диметилсульфоксидом (ДМСО). Показаны распределения интегральной интенсивности красителей в 350–2500 клетках, точками отмечены средние значения для каждой из восьми фотографий, а также указано среднееквадратичное отклонение (SD). Статистическую значимость определяли с помощью теста Манна–Уитни по сравнению с ДМСО (** $p \leq 0.01$)

Обнаружены две наиболее эффективные комбинации – 5-Аза с акситинибом, с мультикиназным ингибитором и митрамицином А, ингибитором синтеза ДНК. Однако поскольку такой метод оценки пролиферации клеток показывает изменение метаболической активности клеток [24], мы решили

проверить жизнеспособность клеток после обработки комбинациями ингибиторов с 5-Аза с помощью подсчета числа клеток на автоматическом флуоресцентном микроскопе (рис. 7Б,В, S1). Выявили отличия от результатов эксперимента с резазурином: наиболее эффективными оказались сочетания 5-Аза

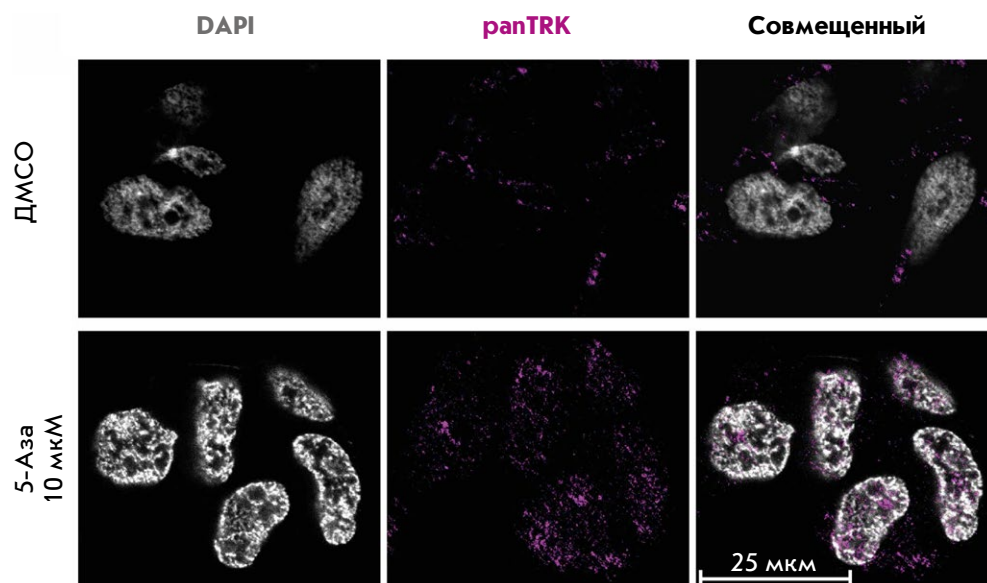


Рис. 6. Распределение белков TRK в цитоплазме клеток нейробластомы человека SH-SY5Y после обработки 10 мкМ 5-азацитидина (5-Аза) в течение 72 ч. Контроль – клетки, обработанные диметилсульфоксидом (ДМСО). Фотографии клеток получили на конфокальном микроскопе с использованием антител к белкам TRK (Alexa647, пурпурный) и окрашивания ядер фиксированных клеток с использованием DAPI (серый)

Таблица 1. Препараты, выбранные для оценки эффективности их совместного действия с 5-азацитидином на клетки SH-SY5Y

Препарат	Класс ингибитора
Акситиниб, энтректиниб, гефитиниб, сорафениб	Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ
Белиностат, энтиностат, вориностат	Ингибиторы гистондеацетилаз
Бортезомиб	Ингибитор протеасом
Дексаметазон	Ингибитор глюкокортикоидных рецепторов, агент дифференцировки
Лонафарниб, PD184352	Ингибиторы MAPK
Митрамицин А	Ингибитор синтеза ДНК, ингибитор транскрипционной активности Sp1
Метформин	Активатор JNK/p38 MAPK-пути
В12536, пальбоциклиб, воласертиб	Ингибиторы клеточного цикла
Стауроспорин	Индуктор апоптоза, ингибитор PKC
Талазопариб	Ингибитор восстановления поврежденной ДНК

с митрамицином А и лонафарнибом, ингибитором малого G-белка (RAS) (рис. 7B). Комбинирование митрамицина А или лонафарниба с 5-Аза в концентрациях, которые сами по себе не оказывают значительного влияния на пролиферацию клеток, привело к существенному ингибированию роста клеток SH-SY5Y и практически полностью остановило их пролиферацию.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе проанализировано изменение транскриптома клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, обработанных 5-Аза, с целью выявления препаратов, которые можно будет использовать в комбинациях с 5-Аза. Определено также, посредством каких механизмов 5-Аза может активировать гибель клеток SH-SY5Y.

Обнаружено, что 5-Аза влияет на сигнальные пути, связанные с NGF: усиливается окрашивание клеток антителами к белкам TRK, изменяется морфология клеток. Ранее показано, что 5-Аза вызывает дифференцировку клеток нейробластом [30]. Возможно, что действие препарата обусловлено, в том числе, активацией процесса дифференцировки клеток. По некоторым данным, в клетках нейробластом, которые подверглись дифференцировке, в отсутствие NGF запускается апоптотическая гибель [31]. Индукция дифференцировки с помощью ретиноевой кислоты [32, 33] активно применяется в терапии нейробластомы низкой группы риска и в качестве поддерживающей терапии при более агрессивных формах заболевания [34]. Показано, что сочетание 5-Аза с ретиноевой кислотой усиливает дифференцировку клеток нейробластомы [35]. 5-Аза вызывает увеличение активности каспаз 3/7, что, возможно, связано с процессами дифференцировки клеток и увеличением экспрессии рецепторов TRK в отсутствие NGF.

Нами обнаружено увеличение активности лизосом в клетках SH-SY5Y. 5-Аза вызывает индукцию аутофагии в клетках острого миелоидного лейкоза [36]. Предполагается, что 5-Аза может запускать разные процессы гибели клеток нейробластом, од-

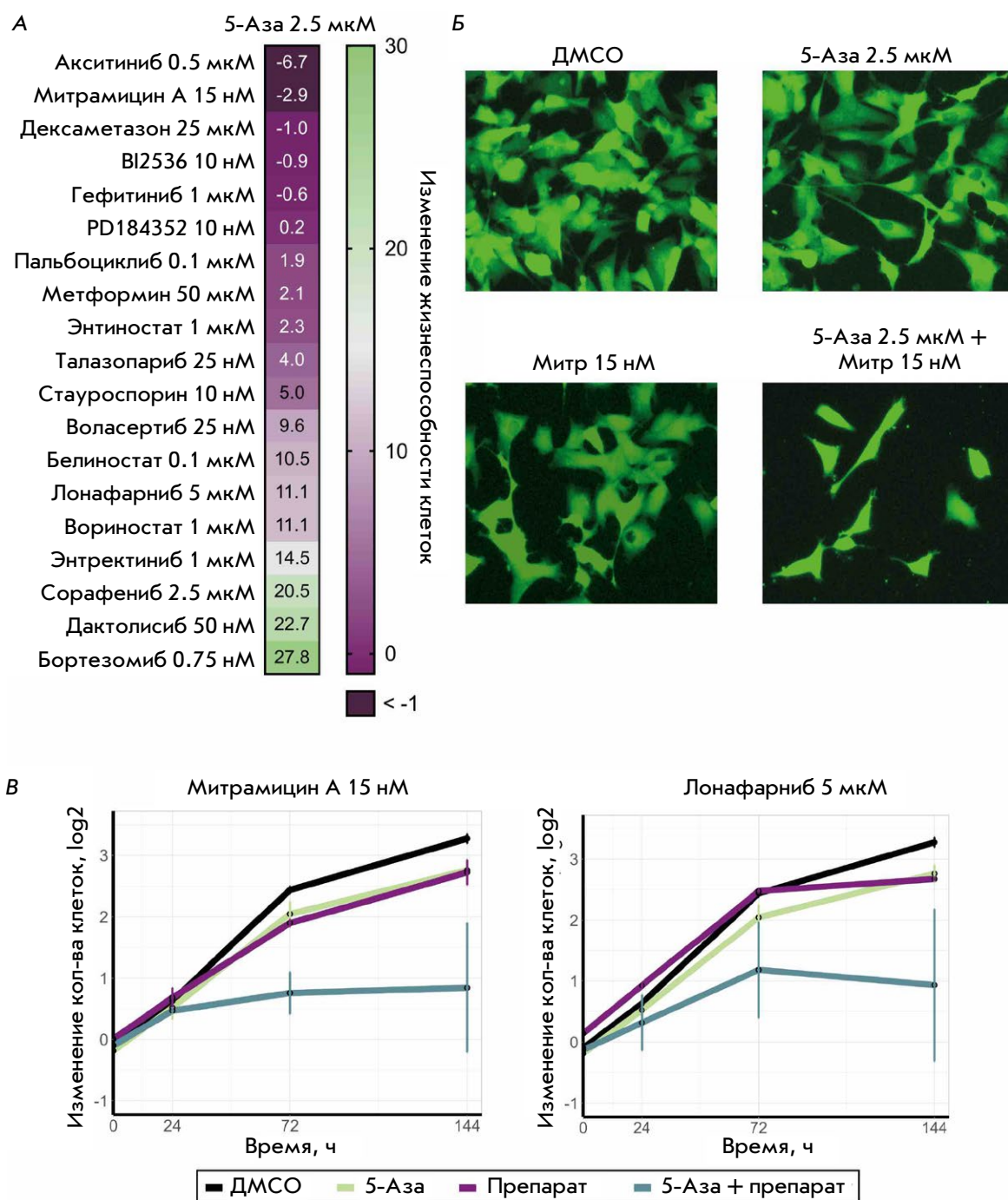


Рис. 7. Эффективность комбинаций 5-азацитидина (5-Аза) с противоопухолевыми препаратами для клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. Клетки одновременно обрабатывали 2.5 мкМ 5-Аза и противоопухолевым препаратом (препараты и их концентрации приведены на рисунке), затем инкубировали в течение 144 ч. Контрольный сигнал – клетки, инкубированные с диметилсульфоксидом (ДМСО). А – тепловая карта, отражающая синергический эффект действия комбинации 5-Аза и ингибиторов разных классов на клетки SH-SY5Y. Б – фотографии клеток SH-SY5Y, содержащих репортерную систему ERK-KTR H2B-Ruby, после совместной обработки 2.5 мкМ 5-Аза и 15 нМ митрамицина А (Митр) в течение 144 ч. Представлены фотографии, сделанные с помощью автоматического флуоресцентного микроскопа. В – графики изменения количества клеток SH-SY5Y после одновременного добавления 2.5 мкМ 5-Аза и 15 нМ митрамицина А или 5 мкМ лонафарниба. На графиках показали среднее значение из трех повторов и среднеквадратичное отклонение (SD)

нако для подтверждения этого предположения необходимы дальнейшие исследования. При анализе изменений транскриптома клеток SH-SY5Y нами обнаружено изменение путей, связанных с митохондриями и клеточной гибелью, однако существенного изменения активностей митохондрий мы не наблюдали.

Митрамицин А – антибиотик, активный в отношении клеток рака легкого, пищевода [37], колоректального рака [38] и лейкозных клеток [39], однако этот препарат оказался высокотоксичным [40]. Лонафарниб тестировали в комбинациях с ингибиторами ALK на мутантных по ALK клетках нейробластомы *in vitro* и *in vivo* [41]. Показано, что митрамицин А и лонафарниб вызывают снижение уровня метилирования ДНК [42, 43]. Возможно, что усиление действия 5-Аза в клетках SH-SY5Y этими препаратами обусловлено воздействием на ДНК-метилтрансферазу 1 (DNMT1). Кроме того, клетки нейробластомы характеризуются высокой зависимостью от активации определенных рецепторов ростовых факторов [44, 45]. 5-Аза активирует ряд сигнальных каскадов, связанных с активностью РТК, а лонафарниб может блокировать передачу сигнала от РТК за счет ингибирования RAS [41].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что анализ изменения транскриптома клеток под действием 5-Аза позволил выявить препараты, оказывающие синергический эффект на гибель клеток нейробластомы, в частности, синергичность комбинации 5-Аза с митрамицином А и лонафарнибом в отношении клеток нейробластомы SH-SY5Y. Дальнейшее исследование эффективности сочетаний препаратов может быть направлено на более детальное изучение механизма совместного действия этих препаратов и тестирования на других моделях нейробластомы. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда грант № 22-14-00353. РНК-секвенирование выполнено на оборудовании ЦКП «Геном» ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php). Микроскопия генетически модифицированных клеток выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1660).

Приложения доступны на сайте <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27558>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Matthay K.K., Maris J.M., Schleiermacher G., Nakagawara A., Mackall C.L., Diller L., Weiss W.A. // *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2016. V. 2. № 1. P. 16078. doi: 10.1038/nrdp.2016.78.
- Irwin M.S., Naranjo A., Zhang F.F., Cohn S.L., London W.B., Gastier-Foster J.M., Ramirez N.C., Pfau R., Reshmi S., Wagner E., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2021. V. 39. № 29. P. 3229–3241. doi: 10.1200/JCO.21.00278.
- Krystal J., Foster J.H. // *Children.* 2023. V. 10. № 8. P. 1302. doi: 10.3390/children10081302.
- Straathof K., Flutter B., Wallace R., Jain N., Loka T., Depani S., Wright G., Thomas S., Cheung G.W.-K., Gileadi T., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2020. V. 12. № 571. P. eabd6169. doi: 10.1126/scitranslmed.abd6169.
- Foster J.H., Voss S.D., Hall D.C., Minard C.G., Balis F.M., Wilner K., Berg S.L., Fox E., Adamson P.C., Blaney S.M., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2021. V. 27. № 13. P. 3543–3548. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-4224.
- Fischer M., Moreno L., Ziegler D.S., Marshall L.V., Zwaan C.M., Irwin M.S., Casanova M., Sabado C., Wulff B., Stegert M., et al. // *Lancet Oncol.* 2021. V. 22. № 12. P. 1764–1776. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00536-2.
- Liu T., Merguerian M.D., Rowe S.P., Pratilas C.A., Chen A.R., Ladle B.H. // *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* 2021. V. 7. № 4. P. 1–16. doi: 10.1101/MCS.A006064.
- Chen L., Pastorino F., Berry P., Bonner J., Kirk C., Wood K.M., Thomas H.D., Zhao Y., Daga A., Veal G.J., et al. // *Int. J. Cancer.* 2019. V. 144. № 12. P. 3146–3159. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.32058>.
- Georger B., Morland B., Jiménez I., Frappaz D., Pearson A.D.J., Vassal G., Maeda P., Kincaide J., Mueller U., Schlieff S., et al. // *Eur. J. Cancer.* 2021. V. 153. P. 142–152. doi: 10.1016/j.ejca.2021.05.023.
- Zage P.E. // *Children.* 2018. V. 5. № 11. P. 148. doi: 10.3390/children5110148.
- Pieniążek B., Cencelewicz K., Bzdziuch P., Młynarczyk Ł., Lejman M., Zawitkowska J., Derwich K. // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25. № 14. P. 7730. doi: 10.3390/ijms25147730.
- Das P.M., Singal R. // *J. Clin. Oncol.* 2024. V. 22. № 22. P. 4632–4642. doi: 10.1200/JCO.2004.07.151.
- Kaminskas E., Farrell A., Abraham S., Baird A., Hsieh L.-S., Lee S.-L., Leighton J.K., Patel H., Rahman A., Sridhara R., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. № 10. P. 3604–3608. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2135.
- Steensma D.P. // *Leuk. Res.* 2009. V. 33. P. S12–S17. doi: [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(09\)70228-0](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(09)70228-0).
- Hollenbach P.W., Nguyen A.N., Brady H., Williams M., Ning Y., Richard N., Krushel L., Aukerman S.L., Heise C., MacBeth K.J. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 2. P. e9001.
- Gómez S., Castellano G., Mayol G., Suñol M., Queiros A., Bibikova M., Nazor K.L., Loring J.F., Lemos I., Rodríguez E., et al. // *Epigenomics.* 2015. V. 7. № 7. P. 1137–1153. doi: 10.2217/epi.15.49.
- Jubierre L., Jiménez C., Rovira E., Soriano A., Sábado C., Gros L., Lloret A., Hladun R., Roma J., de Toledo J.S., et al. // *Exp. Mol. Med.* 2018. V. 50. № 4. P. 1–12. doi: 10.1038/s12276-018-0077-2.
- George R.E., Lahti J.M., Adamson P.C., Zhu K., Finkelstein D., Ingle A.M., Reid J.M., Krailo M., Neuberg D., Blaney S.M., et al. // *Pediatr. Blood Cancer.* 2010. V. 55. № 4. P. 629–638. doi: <https://doi.org/10.1002/pbc.22607>.
- Vagapova E., Kozlov M., Lebedev T., Ivanenko K., Le-

- onova O., Popenko V., Spirin P., Kochetkov S., Prassolov V. // *Biomedicines*. 2021. V. 9. № 12. P. 1846. doi: 10.3390/biomedicines9121846.
20. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. // *Bioinformatics*. 2013. V. 29. № 1. P. 15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
21. Love M.I., Huber W., Anders S. // *Genome Biol.* 2014. V. 15. P. 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
22. Zolotovskaia M.A., Tkachev V.S., Guryanova A.A., Simonov A.M., Raevskiy M.M., Efimov V.V., Wang Y., Sekacheva M.I., Garazha A.V., Borisov N.M., et al. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2022. V. 20. P. 2280–2291. doi: 10.1016/j.csbj.2022.05.006.
23. Subramanian A., Narayan R., Corsello S.M., Peck D.D., Natoli T.E., Lu X., Gould J., Davis J.F., Tubelli A.A., Asiedu J.K., et al. // *Cell*. 2017. V. 171. № 6. P. 1437–1452.e17. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.049.
24. Mikheeva A., Bogomolov M., Gasca V., Sementsov M., Spirin P., Prassolov V., Lebedev T. // *Cell Death Discov.* 2024. V. 10. P. 181. doi: 10.1038/s41420-024-01950-3.
25. Lebedev T.D., Khabusheva E.R., Mareeva S.R., Ivanenko K.A., Morozov A.V., Spirin P.V., Rubtsov P.M., Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V., Sorokin M.I., et al. // *J. Biol. Chem.* 2022. V. 298. № 8. P. 102226. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102226.
26. Biedler J.L., Roffler-Tarlov S., Schachner M., Freedman L.S. // *Cancer Res.* 1978. V. 38. № 11. Part 1. P. 3751–3757.
27. George R.E., Sanda T., Hanna M., Fröhling S., Luther W. 2nd, Zhang J., Ahn Y., Zhou W., London W.B., McGrady P., et al. // *Nature*. 2008. V. 455. № 7215. P. 975–978. doi: 10.1038/nature07397.
28. Kovalevich J., Langford D. // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 1078. P. 9–21. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5_2.
29. Aloe L., Rocco M.L., Balzamino B.O., Micera A. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2016. V. 35. № 1. P. 1–7. doi: 10.1186/s13046-016-0395-y.
30. Bartolucci S., Rossi M., Longo A., Rossi M., Estenoz M., Momparler R.L., Santoro B., Augusti-Tocco G. // *Cell Differ. Dev.* 1989. V. 27. № 1. P. 47–55. doi: https://doi.org/10.1016/0922-3371(89)90043-9.
31. Nakagawara A., Arima-Nakagawara M., Scavarda N.J., Azar C.G., Cantor A.B., Brodeur G.M. // *N. Engl. J. Med.* 1993. V. 328. № 12. P. 847–854. doi: 10.1056/NEJM199303253281205.
32. Bayeva N., Coll E., Piskareva O. // *J. Pers. Med.* 2021. V. 11. № 3. P. 211. doi: 10.3390/jpm11030211.
33. Лебедев Т.Д., Вагапова Э.Р., Прасолов В.С. // *Acta Naturae*. 2021. T. 13. № 4. С. 69–77. doi: 10.32607/actanaturae.11461.
34. Makimoto A., Fujisaki H., Matsumoto K., Takahashi Y., Cho Y., Morikawa Y., Yuza Y., Tajiri T., Iehara T. // *Cancers (Basel)*. 2024. V. 16. № 3. P. 544. doi: 10.3390/cancers16030544.
35. Almeida V.R., Vieira I.A., Buendia M., Brunetto A.T., Gregianin L.J., Brunetto A.L., Klamt F., de Farias C.B., Abujamra A.L., Lopez P.L. da C., et al. // *Mol. Neurobiol.* 2017. V. 54. № 10. P. 7610–7619. doi: 10.1007/s12035-016-0250-3.
36. Noronha N., Durette C., Cahuzac M., E Silva B., Courtois J., Humeau J., Sauvat A., Hardy M.-P., Vincent K., Laverdure J.-P., et al. // *Leukemia*. 2024. V. 38. № 5. P. 1019–1031. doi: 10.1038/s41375-024-02250-6.
37. Zhang M., Mathur A., Zhang Y., Xi S., Atay S., Hong J.A., Datrice N., Upham T., Kemp C.D., Ripley R.T., et al. // *Cancer Res.* 2012. V. 72. № 16. P. 4178–4192. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3983.
38. Quarni W., Dutta R., Green R., Katiri S., Patel B., Mohapatra S.S., Mohapatra S. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 15202. doi: 10.1038/s41598-019-50917-3.
39. Вагапова Э.Р., Лебедев Т.Д., Тихонова А.Д., Гойхман Б.В., Иваненко К.А., Спиринов П.В., Прасолов В.С. // *Молекуляр. биология*. 2020. T. 54. № 3. С. 522–528. doi: 10.31857/S0026898420030192.
40. Baum M. // *Br. J. Cancer*. 1968. V. 22. № 2. P. 176–183. doi: 10.1038/bjc.1968.25.
41. Pucci P., Lee L.C., Han M., Matthews J.D., Jahangiri L., Schleder M., Mannes E., Sorby-Adams A., Kaggie J., Trigg R.M., et al. // *Nat. Commun.* 2024. V. 15. P. 3422. doi: 10.1038/s41467-024-47771-x.
42. Lin R., Hsu C.-H., Wang Y.-C. // *Anticancer. Drugs*. 2007. V. 18. № 10. P. 1157–1164. doi: 10.1097/CAD.0b013e3282a215e9.
43. Chen T., Cai C., Wang L., Li S., Chen L. // *Front. Pharmacol.* 2020. V. 11. P. 589780.
44. Lebedev T., Buzdin A., Khabusheva E., Spirin P., Suntsova M., Sorokin M., Popenko V., Rubtsov P., Prassolov V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 14. P. 7724. doi: 10.3390/ijms23147724.
45. Lebedev T., Vagapova E., Spirin P., Rubtsov P., Astashkova O., Mikheeva A., Sorokin M., Vladimirova U., Suntsova M., Kononov D., et al. // *Oncogene*. 2021. V. 40. № 44. P. 6258–6272. doi: 10.1038/s41388-021-02018-7.

УДК 577.21

Интеграция HiMoRNA и RNA-Chrom: подтверждение функциональной роли длинных некодирующих РНК в эпигенетической регуляции генов человека с помощью данных РНК-хроматинового интерактома

И. С. Ильницкий^{1,2,3†}, Г. К. Рябых^{1,2†}, Д. А. Маракулина^{3,4}, А. А. Миронов^{1,2},
Ю. А. Медведева^{3,4}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119234 Россия

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, 119991 Россия

³Институт биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, ФИЦ биотехнологий РАН, Москва, 117312 Россия

⁴Школа биомедицинской физики, Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия

*E-mail: nfsus96@gmail.com

†Авторы внесли одинаковый вклад в работу.

Поступила в редакцию 21.10.2024

Принята к печати 31.03.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27543

РЕФЕРАТ Известно, что длинные некодирующие РНК, или lncRNA (long non-coding RNA), могут привлекать белки-модификаторы хроматина к определенным геномным локусам, участвуя таким образом в эпигенетической регуляции экспрессии генов. Ранее были созданы две базы данных HiMoRNA и RNA-Chrom. Первая содержит области эпигенетических модификаций (пики), скоррелированные с экспрессией длинных некодирующих РНК, вторая – полногеномные взаимодействия десятков тысяч РНК с хроматином. В данной работе мы интегрировали эти два ресурса, что позволило сгенерировать интерпретируемые и поддерживаемые экспериментальными данными гипотезы о механизмах эпигенетической регуляции экспрессии генов длинными некодирующими РНК. С этой целью мы адаптировали веб-интерфейс HiMoRNA и RNA-Chrom таким образом, чтобы для каждой триады «lncRNA–эпигенетическая модификация–ассоциированный с модификацией ген» из HiMoRNA можно было получить контакты соответствующей lncRNA с конкретным геномным локусом или со всем геномом в RNA-Chrom. В частности, нами показано, что для lncRNA MALAT1, HOXC-AS2, NEAT1, NR2F1-AS1, PVT1, MEG3 большинство пиков HiMoRNA находятся на расстоянии до 25 т.п.н. от контактов данных lncRNA из RNA-Chrom. Подробно исследованы и подтверждены контакты lncRNA MIR31HG и PVT1 с пиками HiMoRNA для меток H3K27ac и H3K27me3 в локусах генов *GLI2* и *LATS2* соответственно, которые, как показано, регулируются данными РНК. Таким образом, интеграция баз HiMoRNA и RNA-Chrom позволяет прояснить роль конкретных lncRNA в регуляции гистоновых модификаций на уровне как отдельных локусов, так и полного генома. Мы считаем, что данная интеграция является удобным и ценным инструментом, который может значительно облегчить функциональную аннотацию lncRNA человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА длинная некодирующая РНК, модификация гистонов, взаимодействие РНК с хроматином.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ нкРНК – некодирующая РНК; lncRNA – длинная некодирующая РНК (long non-coding RNA).

ВВЕДЕНИЕ

Клетки человека транскрибируют многочисленные длинные некодирующие РНК (lncRNA), число которых сравнимо с числом белок-кодирующих генов [1, 2]. lncRNA с трудом поддаются функциональной аннотации из-за низкого уровня их экспрессии, тканевой специфичности и низкой консервативности последовательности [3–5]. Тем не менее ряд характеристик lncRNA часто сохраняется, включая синтению с соседними генами, вторичную структуру и сходство коротких фрагментов последовательностей [6]. Кроме того, транскрипция lncRNA регулируется не менее сложно, чем белок-кодирующих РНК, обеспечивая их участие в разнообразных молекулярных механизмах [7]. Подавление lncRNA приводит к значительному изменению транскрипционного профиля клетки [8]. Эти наблюдения позволяют предположить, что многие lncRNA являются функциональными. Большинство lncRNA взаимодействуют с хроматином и вовлечены в эпигенетическую регуляцию геномных локусов, в структурную организацию хромосом [9–12]. Все это делает актуальной идентификацию функциональных геномных мишеней lncRNA, взаимодействующих с хроматином.

Ранее мы разработали базу данных HiMoRNA [13], которая содержит более 5 млн эпигенетических «пиков» – геномных регионов, в которых наблюдается одна из 10 модификаций гистоновых белков, причем уровень модификации значимо коррелирует с экспрессией одной из длинных некодирующих РНК не менее чем в 20 клеточных линиях и тканях. Пики гистоновых меток, представленных HiMoRNA, там, где это возможно, ассоциированы с генами, образуя триады «lncRNA–пик эпигенетической модификации–ассоциированный ген». Предполагается, что lncRNA в триаде потенциально может регулировать соответствующий ген посредством влияния на установление (1) или удаление (2) модификации гистона в районе ассоциированного с геном пика. В случае (1) пики будут положительно коррелировать с lncRNA («+» пики), а в случае (2) – отрицательно («–» пики). Таким образом, результаты, представленные в базе данных HiMoRNA, позволяют выдвигать предположения о роли lncRNA в установке или удалении эпигенетических модификаций в конкретных геномных локусах и, следовательно, в их влиянии на экспрессию генов. Однако для выдвижения разумных гипотез такого рода и их дальнейшей экспериментальной проверки, список из 5 млн пиков необходимо отфильтровать, выбрав наиболее надежные из них. Экспериментальные методы обнаружения взаимодействий РНК с хроматином позволяют получить ценные данные для этой цели.

Существует ряд экспериментальных методов, которые позволяют определить области хроматина, с которыми контактирует некодирующая РНК. Мы можем разделить их на две группы: «один-против-всех» [11, 14–18] и «все-против-всех» [19–24]. Первая группа методов определяет контакты конкретной РНК с хроматином, а вторая направлена на выявление всех возможных контактов РНК–ДНК в клетке [25]. К сожалению, все эти экспериментальные методы генерируют много ложноположительных результатов, а методы «все-против-всех» плохо детектируют контакты слабо экспрессирующихся РНК и перегружены контактами зарождающихся транскриптов. Несмотря на это, полногеномные данные взаимодействия некодирующих РНК (нкРНК) с хроматином очень важны для понимания механизма их действия. В связи с этим недавно была создана база данных RNA-Chrom [26], которая содержит экспериментальные данные контактов тысяч РНК с хроматином и предоставляет два типа анализа этих данных («от РНК» и «от ДНК»), которые можно использовать в исследовательских целях.

Чтобы улучшить и значительно облегчить функциональную аннотацию lncRNA, мы интегрировали базы данных HiMoRNA и RNA-Chrom. Для этого веб-интерфейс HiMoRNA и RNA-Chrom был модифицирован таким образом, чтобы обеспечить прямой доступ к контактам 4124 из 4145 lncRNA из HiMoRNA с хроматином в RNA-Chrom. Наш подход позволяет генерировать гипотезы относительно механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов человека длинными некодирующими РНК, подкрепленные экспериментальными данными о взаимодействиях соответствующих РНК с хроматином. Мы считаем, что эта интеграция является удобным и ценным ресурсом, который поможет определять надежные триады «lncRNA–эпигенетическая модификация–ассоциированный с модификацией ген» для их экспериментальной проверки. База данных HiMoRNA доступна пользователям по адресу <https://himorna.fbras.ru> (по состоянию на 20.10.2024).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Интеграция баз данных HiMoRNA и RNA-Chrom

Базы данных используют разные источники аннотации генов. Поэтому, во-первых, необходимо было установить соответствие между генами из разных версий GENCODE-аннотаций, так как для длинных некодирующих РНК HiMoRNA использует «gencode basic annotation v31», а RNA-Chrom – «gencode basic annotation v35». Мы использовали три показателя сходства: (1) одинаковые имена генов (совпадение

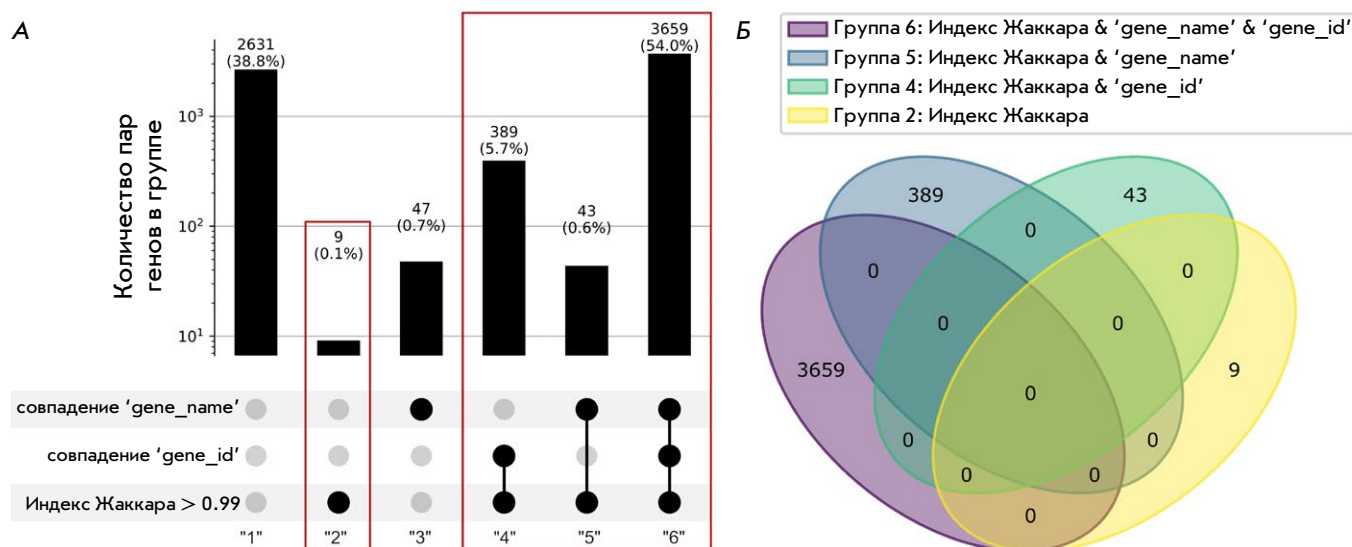


Рис. 1. Пересечение 4145 генов из HiMoRNA с 60619 генами из RNA-Chrom. А – разделение пар генов на шесть групп в зависимости от показателей сходства, которым они удовлетворяют. Красными прямоугольниками выделены те группы, в которых достигнуто однозначное соответствие между генами. Б – диаграмма Венна между группами генов 2, 4, 5 и 6 (суммарное количество пар генов в четырех группах равно 4100)

'gene_name', рис. 1А); (2) одинаковые идентификаторы генов (совпадение 'gene_id', рис. 1А); и (3) индекс Жаккара (отношение длины перекрытия генов к длине их объединения) больше 0.99 (Индекс Жаккара > 0.99, рис. 1А). К сожалению, имена/идентификаторы и координаты генов в разных источниках аннотаций не всегда совпадают. Чтобы решить эту проблему, мы пересекли 4145 генов lncRNA из HiMoRNA с 60619 генами из RNA-Chrom по геномным координатам с использованием bedtools (команда intersect), в результате чего получилось 6778 пар генов (из-за того, что гены из HiMoRNA несколько раз пересекались с генами из RNA-Chrom, пар получилось больше 4145). Два гена из HiMoRNA не пересекались ни с одним из генов из RNA-Chrom (ENSG00000267034.1, ENSG00000280076.1). Далее для каждой пары генов был рассчитан индекс Жаккара. Используя описанные выше три показателя сходства, мы разбили 6778 пар генов на шесть групп (рис. 1А). Взяв в качестве главной метрики сходства «Индекс Жаккара > 0.99», мы выделили четыре группы (рис. 1А, группы 2, 4, 5 и 6), между которыми гены не пересекались (рис. 1Б). Таким образом мы определили 4100 однозначных соответствий между генами. Из оставшихся 43 генов из HiMoRNA нам удалось сопоставить 24 гена с генами из RNA-Chrom по метрике совпадение 'gene_name'. Всего мы получили 4124 гена lncRNA, общих как для HiMoRNA, так и для RNA-Chrom. Таблица соответствия генов lncRNA («lncRNA corre-

spondence table») доступна для скачивания на веб-ресурсе HiMoRNA (дополнительная табл. 1).

Во-вторых, к веб-интерфейсу RNA-Chrom была добавлена новая опция – обработка параметров (локус, название РНК, внутренний для RNA-Chrom идентификатор РНК, организм) из специального вида URL-ссылки (например, https://rnachrom2.bioinf.fbb.msu.ru/basic_graphical_summary_dna_filter?locus=chrX:23456-24253566&name=XIST&rnaID=227896&organism=Homo+sapiens) и предоставление информации о контактах запрашиваемой в URL-ссылке lncRNA с хроматином в разных типах экспериментов на новой странице в браузере.

В-третьих, на стороне HiMoRNA были сделаны следующие улучшения:

Для правильной генерации URL-ссылки была добавлена таблица соответствия генов lncRNA между RNA-Chrom и HiMoRNA.

1) На веб-страницу «Страница результатов поиска» была добавлена кнопка «Перейти в RNA-Chrom БД» («Go to RNA-Chrom DB») с выпадающим списком (рис. 2), который позволяет сгенерировать три типа URL-ссылки для перехода на страницу RNA-Chrom:

- а) с контактами данной lncRNA в определенном геномном локусе, расширенном на 1 / 5 / 10 / 25 / 50 / 100 т.п.н.;
- б) со всеми контактами данной lncRNA;
- в) со всеми РНК, которые имеют контакты в определенном геномном локусе.

Односторонний точный тест Фишера

В большинстве триад обнаруживаются пики гистоновых модификаций как с отрицательной, так и с положительной корреляцией экспрессии lncRNA и уровня сигнала пика (далее «-» и «+» пики соответственно). Обнаружение «+» пика соответствует предположению, что lncRNA участвует в установке модификации гистона, тогда как обнаружение «-» пика соответствует предположению, что lncRNA участвует в удалении модификации гистона.

Чтобы оценить, насколько хорошо предсказания согласуются с опубликованными на данный момент результатами экспериментальных исследований, были отобраны lncRNA и соответствующие им расширенные на +/- 25 т.п.н. «-» и «+» – гистоновые пики (положительно и отрицательно скоррелированные), у которых доля соответствующих пиков, поддерживаемых контактами хотя бы по одной из гистоновых меток, больше 0.4. Далее мы посчитали правосторонний и левосторонний тест Фишера («right-tailed Fisher's exact test» и «left-tailed Fisher's exact test») отдельно для каждой lncRNA и гистоновой метки (например, таблица сопряженности для пары «PVT1–H3K27ac» – *дополнительная табл. 2*).

Данные Red-ChIP

При рассмотрении lncRNA PVT1 в качестве примера интеграции HiMoRNA и RNA-Chrom мы дополнительно валидировали ее контакты с хроматином с помощью внешних данных Red-ChIP [27], которые доступны в Gene Expression Omnibus под номером GSE174474, образцы GSM5315228 и GSM5315229 (клеточная линия hES). Метод Red-ChIP фиксирует контакты РНК с хроматином, опосредованные белком EZH2, компонентом комплекса PRC2, который устанавливает, в том числе гистоновую модификацию H3K27me3. Первичную обработку этих данных проводили в соответствии с протоколом, использованным в базе данных RNA-Chrom. Далее мы определили участки генома, обогащенные контактами lncRNA PVT1 с хроматином, с помощью программы BaRDIC (--qval_type all; --qval_threshold 1) [28]. Таким образом, мы обнаружили 3242 потенциально функциональные геномные области, в которых связывание PVT1 опосредовано белком EZH2.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интеграция баз данных

Поскольку HiMoRNA содержит миллионы эпигенетических пиков, целесообразно отобрать для последующего анализа наиболее надежные из них. Чтобы

облегчить эту задачу, мы провели интеграцию пиков HiMoRNA с данными РНК-хроматинового интерактома из RNA-Chrom. Для этого установили взаимно однозначное соответствие между генами двух баз данных и модифицировали веб-интерфейсы (смотри «Экспериментальную часть», подраздел «Интеграция баз данных HiMoRNA и RNA-Chrom»). При таком подходе HiMoRNA может генерировать специальный URL-запрос к 4124 из 4145 lncRNA из RNA-Chrom, что, в частности, позволяет ответить на вопрос о том, с какими другими локусами хроматина контактирует исследуемая РНК. Этот подход позволяет значительно расширить представление о функции конкретной РНК.

Общая схема интеграции представлена на *рис. 2*. Чтобы воспользоваться интеграцией, для начала необходимо найти целевую lncRNA в базе данных HiMoRNA. Находясь на главной странице HiMoRNA, пользователь может скачать саму базу данных, добавленные в рамках интеграции «Таблицу генов» («Gene table») и «Таблицу соответствия длинных некодирующих РНК» («lncRNA correspondence table»), для поиска в них интересующих генов/lncRNA по геномным координатам. Мы предоставили эту опцию, поскольку идентификатор Ensembl или названия lncRNA и ассоциированные с гистоновыми модификациями гены, которые пользователь хочет использовать, могут не совпадать с приведенными в HiMoRNA. На странице поиска пользователю необходимо настроить фильтры под свою задачу, указывая интересующие lncRNA, модификации гистонов, геномные координаты и гены, ассоциированные с выбранной модификацией гистонов.

Попав на страницу с результатами поиска, пользователь может более подробно изучить найденные по запросу предсказания, в частности, перейдя в базу данных RNA-Chrom. Для этого следует выбрать интересующую триаду «lncRNA–пик эпигенетической модификации–ассоциированный с пиком ген» в интерактивной таблице результатов, а затем нажать на кнопку «Перейти в RNA-Chrom БД» («Go to RNA-Chrom DB»). В выпадающем списке необходимо нажать соответствующую кнопку для перехода на страницу: 1) с контактами данной lncRNA в области конкретного пика (надо выбрать, на сколько расширить координаты пика при поиске контактов); 2) со всеми контактами данной lncRNA; 3) со всеми lncRNA, которые имеют контакты в данном локусе. Далее пользователь будет перенаправлен на веб-страницу базы данных RNA-Chrom с графической сводкой lncRNA-хроматинового интерактома, которая позволяет уточнить, опосредована ли функциональная связь «lncRNA–эпигенетическая модификация» из HiMoRNA физическим

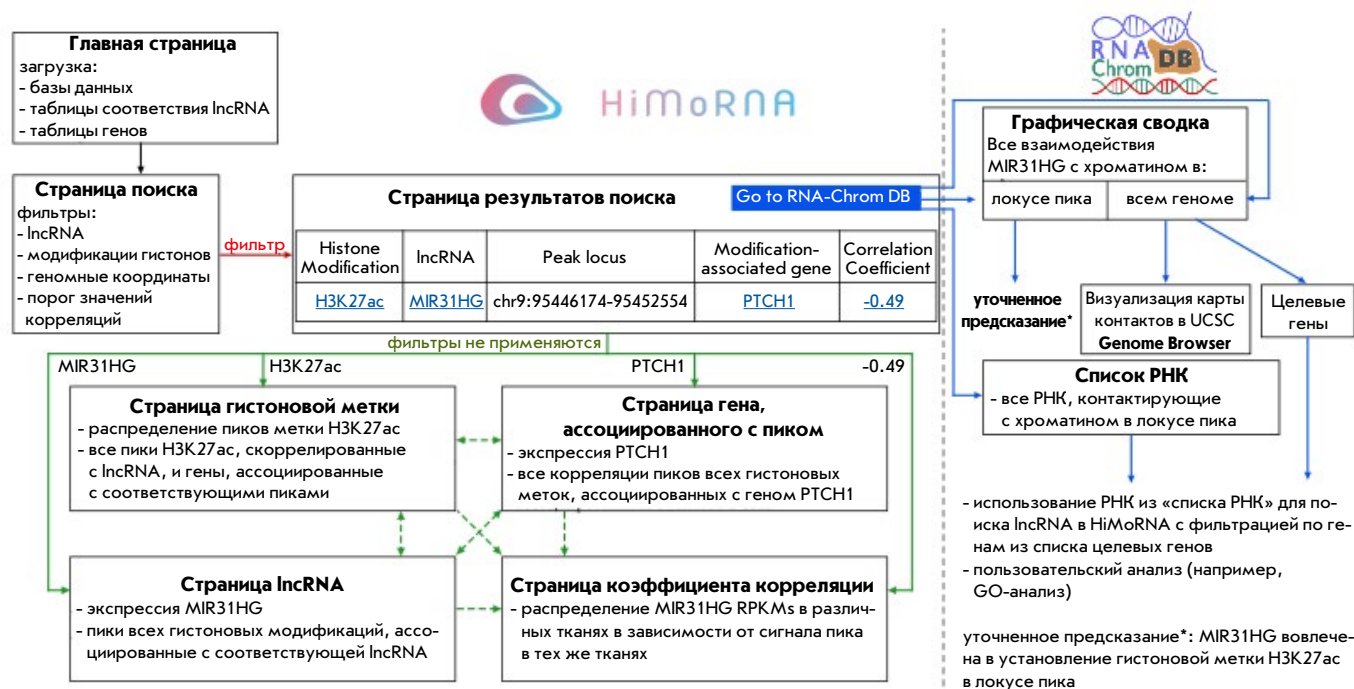


Рис. 2. Сценарий использования баз данных HiMoRNA и RNA-Chrom после интеграции. Прямоугольники представляют веб-страницы, стрелки – переходы между ними

нахождением lncRNA у соответствующего геномного локуса, а также какие еще lncRNA потенциально могут участвовать в регуляции данного локуса. Для визуального анализа контакты всех интересующих экспериментов можно загрузить в UCSC Genome Browser (нажать на «VIEW IN GENOME BROWSER»). Выбрав один эксперимент по РНК-хроматиновому интерактому, пользователь может получить список генов, которые располагаются на интересующем участке генома, со статистикой контактируемости lncRNA с ними (нажать на «ALL TARGET GENES»). Этот список генов пользователь может скачать и далее работать с ним, например, выполнив GO-анализ. Примеры использования интеграции баз данных HiMoRNA и RNA-Chrom приведены и подробно рассмотрены в разделе «Варианты использования».

Согласованность результатов HiMoRNA и RNA-Chrom

Для оценки полноты интеграции проанализировали частоту подтверждения скоррелированных с экспрессией lncRNA гистоновых пиков HiMoRNA данными о контактах соответствующей lncRNA с хроматином. Из 4145 lncRNA, присутствующих в HiMoRNA, 4011 (96.8%) имеют хотя бы один контакт в базе данных RNA-Chrom, 29 РНК не согласуются между базами данных и еще 105 (2.5%) не име-

ют контактов в RNA-Chrom. Среди интересующих нас 4011 lncRNA только 35.5% имеют хотя бы один пик, который поддерживается контактами соответствующей lncRNA. Однако, принимая во внимание, что по построению экспериментальных протоколов реальное взаимодействие lncRNA с хроматином может происходить на удалении от экспериментально фиксируемого контакта, мы предлагаем расширять координаты контакта для более точной оценки соответствия предсказанных пиков HiMoRNA и информации из RNA-Chrom. При расширении контактов на +/- 1, +/- 5, +/- 10, +/- 25 и +/- 50 т.п.н. процент РНК, у которых пики из HiMoRNA подтверждаются хотя бы одним контактом, увеличивается до 38.5, 42.7, 45.7, 50.1 и 53% соответственно. В частности, для lncRNA MALAT1, HOXC-AS2, NEAT1, NR2F1-AS1, PVT1, MEG3 и ряда других доля расширенных на +/- 25 т.п.н. пиков из HiMoRNA, подтвержденных в RNA-Chrom, приближается к 1 (рис. 3). Однако чаще встречаются lncRNA, у которых доля расширенных на +/- 25 т.п.н. и подтвержденных контактами пиков сильно меньше 1 (JPX, AP005263.1, MIR31HG) или приближается к 0 (MAPKAPK5-AS1). Это, по-видимому, связано с тем, что базы данных HiMoRNA и RNA-Chrom содержат неполную информацию о lncRNA из-за строгой фильтрации предсказаний и несовершенства экспериментальных данных взаимодей-

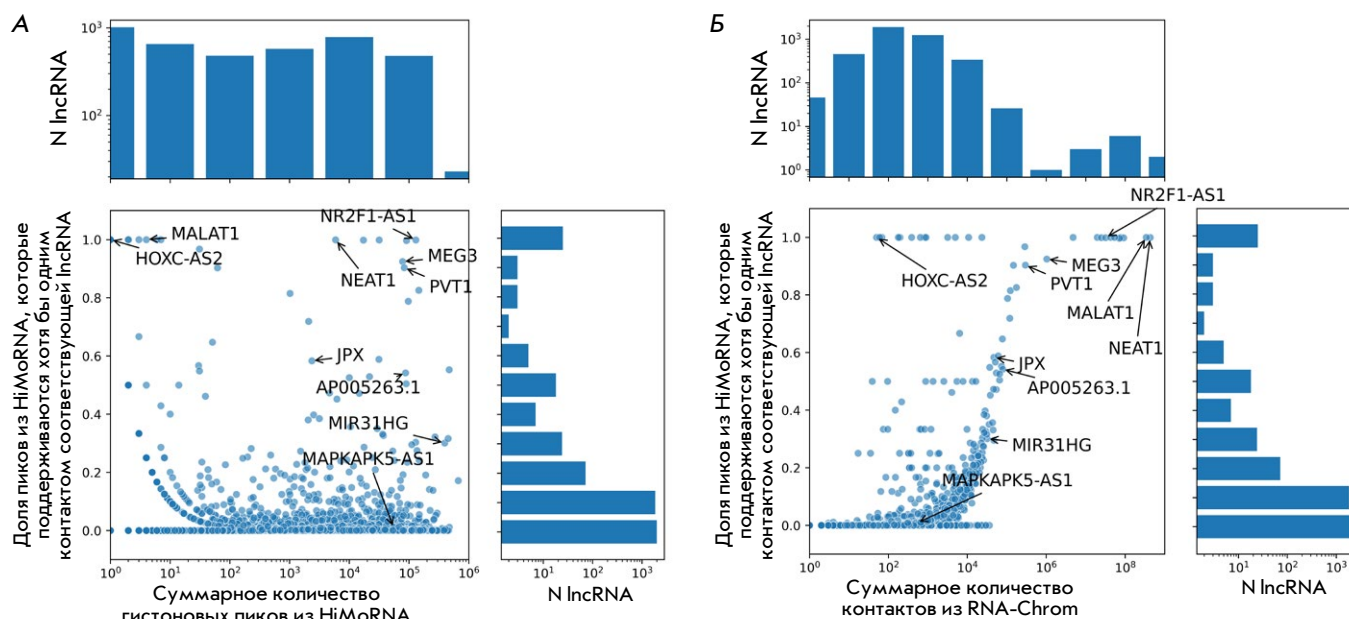


Рис. 3. Доли пиков HiMoRNA, которые подтверждаются хотя бы одним контактом соответствующей lncRNA из RNA-Chrom, относительно суммарного количества пиков HiMoRNA для соответствующей lncRNA (А) и суммарного количества контактов для соответствующей lncRNA из RNA-Chrom (Б). Геномные координаты контактов расширены на ± 25 т.п.н.

ствий РНК–хроматин соответственно. Например, в RNA-Chrom половина рассматриваемых в данной статье lncRNA имеют меньше 200 контактов (рис. 3Б), так как для большинства lncRNA имеются лишь данные «все-против-всех», полученные экспериментальными методами, которые недостаточно полно определяют контакты низко экспрессирующихся РНК.

В базе данных HiMoRNA встречаются триады с отрицательной или положительной корреляцией экспрессии lncRNA и сигнала эпигенетического пика («-» и «+» пики соответственно). Для того, чтобы оценить, насколько хорошо предсказания на основе интегрированных баз данных согласуются с опубликованными на данный момент экспериментальными исследованиями, мы отобрали 30 lncRNA и соответствующие им гистоновые пики, для которых статистически значимо (односторонний точный тест Фишера, p -value < 0.001) преобладают «+» или «-» пики хотя бы одной из гистоновых меток, подтвержденные контактами из RNA-Chrom с расширением на ± 25 т.п.н. (смотри «Экспериментальную часть», подраздел «Односторонний точный тест Фишера», рис. 4). Отфильтровав результаты по p -value < 0.001, мы получили следующие пары «lncRNA-гистоновая метка»:

21 lncRNA, у которых «+» пики соответствующих гистоновых меток лучше поддерживаются контак-

тами из RNA-Chrom нежели «-» пики (правосторонний точный тест Фишера, p -value < 0.001).

11 lncRNA, у которых «-» пики соответствующих гистоновых меток лучше поддерживаются контактами из RNA-Chrom, нежели «+» пики (левосторонний точный тест Фишера, p -value < 0.001).

Ранее было показано потенциальное участие значительной части выявленных lncRNA в эпигенетической регуляции посредством гистоновых модификаций. Разберем случаи, когда «+» пики статистически значимо лучше поддерживаются контактами из RNA-Chrom, нежели «-» пики. Например, MIR4435-2HG участвует в установлении активаторной метки H3K27ac в энхансерном регионе локуса RPTOR [29]. Наши данные показывают, что у MIR4435-2HG, помимо H3K27ac, вероятно, существуют и другие мишени эпигенетической регуляции посредством установления таких меток, как H3K27me3, H3K36me3, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K79me2 (рис. 4А). Аналогично на основании данных для MIR31HG [30], SNHG1, PVT1 [31–33] и lncRNA lnc-Nr2f1 мыши (предположительно имеющей функциональную консервативность с lncRNA NR2F1-AS1 человека) [34] мы определили согласующиеся с этими данными гистоновые модификации: NR2F1-AS1 – H3K27ac, MIR31HG – H3K4me3, SNHG1 – H3K27me3, PVT1 – H3K27me3. Помимо этого, мы выявили функциональную связь

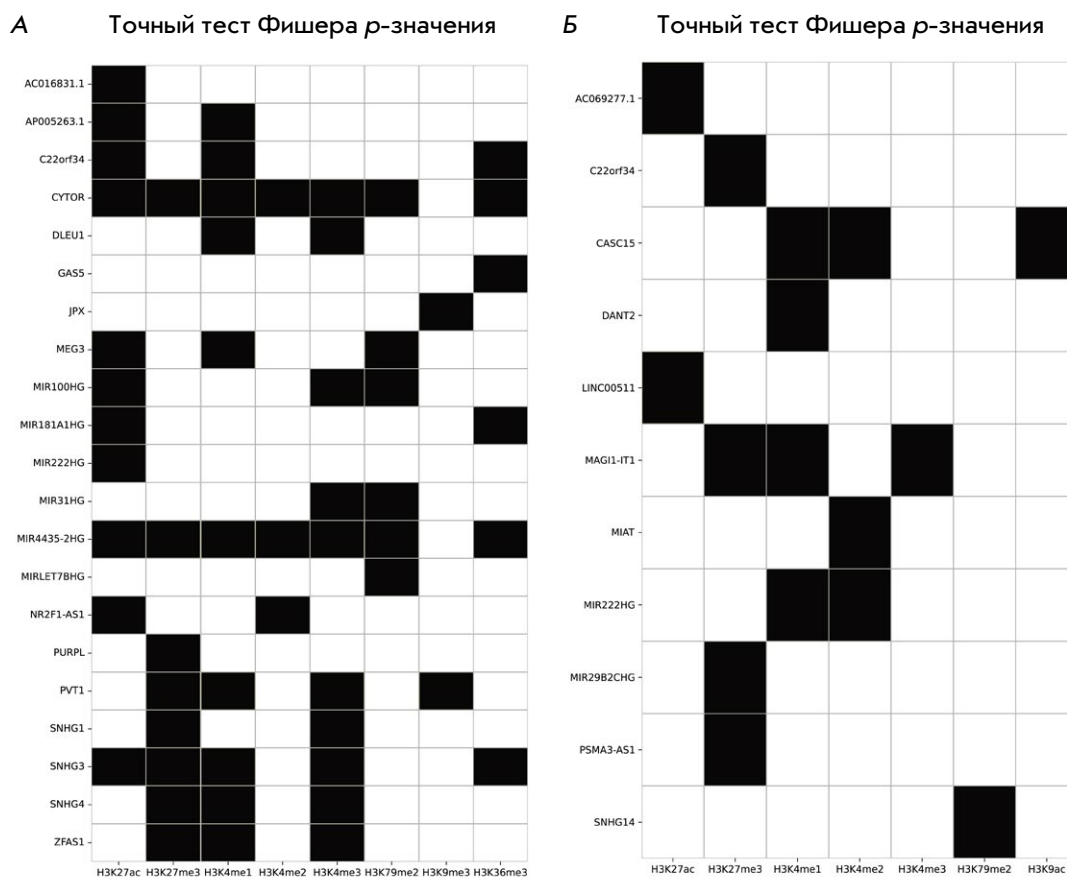


Рис. 4. Тепловая карта с результатами точного теста Фишера («Fisher exact test») для пар «lncRNA – расширенные на ± 25 т.п.н. пики гистоновой метки». Черный цвет означает, что доля «-» / «+» гистоновых пиков, поддерживаемых контактами соответствующей lncRNA, больше 0.4 и p -value точного теста Фишера меньше 10^{-3} , иначе – белый цвет. А – правосторонний тест Фишера («right-tailed»): «+» пики соответствующих гистоновых меток лучше поддерживаются контактами из RNA-Chrom, нежели «-» пики. Б – левосторонний тест Фишера («left-tailed»): «-» пики соответствующих гистоновых меток лучше поддерживаются контактами из RNA-Chrom, нежели «+» пики

этих lncRNA с другими эпигенетическими метками: NR2F1-AS1 – H3K4me2, MIR31HG – H3K79me2, SNHG1 – H3K4me3, PVT1 – H3K4me1, H3K4me3, H3K9me3 (рис. 4А).

У ряда lncRNA (ZFAS1, SNHG4, SNHG1, SNHG3, PVT1, MIR4435-HG, CYTOR) выявлено большое количество подтвержденных контактами «+» пиков H3K27me3 и H3K4me3, которые статистически значимо больше поддерживаются контактами из RNA-Chrom, нежели «-» пики (рис. 4А), отвечающие за противоположные состояния хроматина. По аналогии с существующими lncRNA, устанавливающими обе этих гистоновых метки в зависимости от ассоциации с различными эффекторными белками (как, например, нРНК SRA [35], ANRIL [36]), можно предположить, что для них тоже характерны более сложные механизмы регуляции активности хроматина.

Случай, когда «-» пики статистически значимо больше поддерживаются контактами из RNA-Chrom, нежели «+» пики, вероятно, можно объяснить тем, что соответствующие lncRNA регулируют удаление гистоновых меток посредством привлечения деметилаз и деацетилаз к соответствующим геномным локусам (рис. 4Б). Мы не можем оценить качество нашего предсказания для этих lncRNA, поскольку экспериментальные статьи, показывающие такого рода регуляцию этих lncRNA, не найдены. Мы предполагаем, что полученные в данном разделе пары «lncRNA-гистоновая метка» (рис. 4), являются потенциальными объектами дальнейших исследований.

Варианты использования

Основная цель интеграции HiMoRNA и RNA-Chrom – уточнить функциональную связь внутри

IncRNA/IncRNA ID (required) ● Gene/Gene ID (optional) ●

Add one by one via "Enter" Load file Clear Add one by one via "Enter" Load file ●

MIR31HG X

Genomic Coordinates (optional) ●

Histone modifications (required) ●

☒ H3K27ac ☐ H3K27me3 ☐ H3K36me3
☒ H3K4me1 ☐ H3K4me2 ☐ H3K4me3
☐ H3K9ac ☐ H3K9me3 ☐ H3K79me2
☐ H4K20me1 ☐ Select all modifications

chr2 120725622 120992653 Load file ● Clear

Correlation threshold (optional) ●

Search

Search result. Total entries: 2 Download tab delimited Go to RNA-Chrom DB

Histone Modification	IncRNA	Peak Id	Peak Coordinate	Correlation	HM-associated Gene
☒ H3K27ac	MIR31HG	peak_473655	chr2:120729163-120730534	0.6182991	
☐ H3K4me1	MIR31HG	peak_461207	chr2:120728875-120730667	0.5093381	

Search result. Total entries: 2 Download tab delimited Go to RNA-Chrom DB

Histone Modification	IncRNA	Peak Id	Peak Coordinate	Correlation	HM-associated Gene
☒ H3K27ac	MIR31HG	peak_473655	chr2:120729163-120730534	0.6182991	
☐ H3K4me1	MIR31HG	peak_461207	chr2:120728875-120730667	0.5093381	

All MIR31HG (MIR31HG) RNA contacts
MIR31HG (MIR31HG) RNA contacts with the locus (peak_473655)

± 1000
± 5000
± 10000
± 25000
± 50000
± 100000

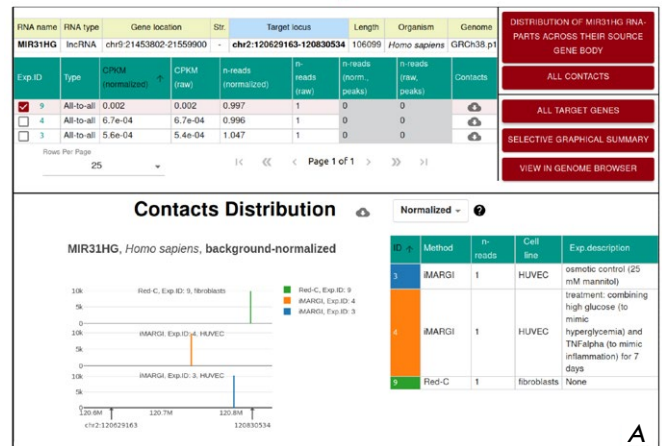


Рис. 5. Вариант использования интеграции баз данных HiMoRNA и RNA-Chrom на примере lncRNA MIR31HG. А – создание запроса в HiMoRNA на MIR31HG, гистоновые модификации H3K4me1 и H3K27ac, гены *GLI2* и *FABP4*. Б – таблица с результатами поиска. В – переход в RNA-Chrom

триад «lncRNA–пик эпигенетической модификации–ассоциированный с пиком ген» с помощью данных о локализации соответствующей lncRNA в геномной области вблизи пиков конкретной модификации гистонов. Далее мы приведем примеры пользовательского исследования нескольких lncRNA, механизм действия которых известен.

lncRNA MIR31HG

Длинная некодирующая РНК MIR31HG является известным регулятором гистоновых меток H3K1me1,



Search by "Target gene" Download tab delimited Go to RNA-Chrom DB

RNA name	RNA type	Gene location	Str	Target locus	Length	Organism	Genome
MIR31HG	lncRNA	chr2:120729163-120730534	-	chr2:120729163-120730534	106099	Homo sapiens	GRCh38.p1

Method Method n-reads Cell line Exp description

1	MARGL	1	HUVEC	osmotic control (25 mM mannitol)
4	MARGL	1	HUVEC	treatment combining high glucose (to mimic hyperglycemia) and TNF-alpha (to mimic inflammation) for 7 days
9	Red-C	1	Fibroblasts	None

Up 10kb **Up 5kb** **Gene body** **Down 5kb** **Down 10kb**

Log2(Density) **Log2(Density)** **Log2(Density)** **Log2(Density)** **Log2(Density)**

Рис. 6. Вариант использования интеграции баз данных HiMoRNA и RNA-Chrom на примере lncRNA MIR31HG. А – страница RNA-Chrom с контактами MIR31HG с хроматином в области расширенного пика HiMoRNA. Б – таблица со всеми генами из области расширенного пика, с которыми взаимодействует или нет MIR31HG (эксперимент Exp.ID: 9)

H3K4me3 и H3K27ac. Ранее сообщалось о снижении уровней H3K4me1 и H3K27ac в энхансерной области гена *GLI2* и H3K4me3 и H3K27ac в промоторной области гена *FABP4* после нокдауна MIR31HG [30, 37]. Это наблюдение можно проверить, используя нашу интеграцию HiMoRNA и RNA-Chrom. Для этого мы создали запрос в HiMoRNA: lncRNA MIR31HG, метки гистонов H3K4me1 и H3K27ac, координаты двух выбранных генов указаны с увеличенной на 10 т.п.н. промоторной областью в поле геномных координат (рис. 5А). В результате веб-ресурс HiMoRNA сгенерировал таблицу с пиками H3K27ac и H3K4me1, которые коррелируют с экспрессией MIR31HG в различных тканях (рис. 5Б). Затем мы выбрали триаду с пиком H3K27ac и перешли на страницу RNA-Chrom с эксперименталь-

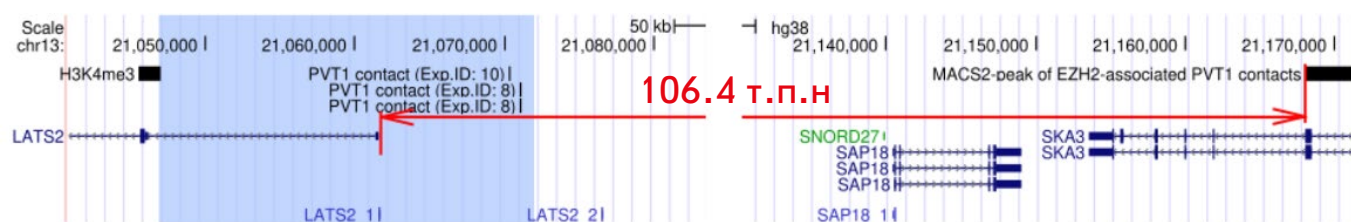


Рис. 7. Представление в UCSC Genome Browser в области гена *LATS2* и его промоторной окрестности пика H3K4me3, скоррелированного с экспрессией lncRNA PVT1, контакты lncRNA PVT1 из двух экспериментов (RNA-Chrom Exp.ID: 8, 10) и пик EZH2-опосредованных контактов PVT1. Синяя область отражает расширение координат пика H3K4me3 на 25 т.п.н., в пределах которых были отобраны контакты из RNA-Chrom

но обнаруженными контактами MIR31HG с хроматином в области выбранного пика (при нажатии на «Go to RNA-Chrom DB», *рис. 5B*). Выбрав РНК-хроматиновый эксперимент в верхней таблице и нажав на «All target genes» (*рис. 6A*), получили таблицу, в которой, в частности, отражено взаимодействие MIR31HG с геном *GLI2* (*рис. 6B*). Пошаговый анализ представлен в *дополнительной табл. 3*.

Чтобы выяснить, может ли интеграция HiMoRNA и RNA-Chrom дать новую биологическую информацию о функциональной роли lncRNA, мы предположили, что MIR31HG может регулировать не только *GLI2*, но и другие гены, принадлежащие регуляторному пути «Sonic hedgehog» (KEGG:04340). С этой целью идентифицировали соответствующие гены с помощью базы данных KEGG Pathway [38], после чего был сформирован новый запрос в HiMoRNA: lncRNA MIR31HG, гистоновые метки H3K4me1 и H3K27ac, названия 56 генов из пути «Hedgehog signaling pathway» (*дополнительная табл. 4*). В результате мы получили таблицу из 162 триад, которые можно проверить с помощью ресурса RNA-Chrom. Например, в локусе пика H3K27ac_963553 (chr9:95446174-95452554) MIR31HG контактирует с геном *PTCH1*, кодирующим рецептор «Sonic hedgehog». Чтобы оценить, насколько существенно список генов, ассоциированных со скоррелированными с экспрессией MIR31HG пиками H3K27ac и H3K4me1, обогащен генами из регуляторного пути «Hedgehog signaling pathway», был проведен анализ KEGG обогащений при помощи веб-ресурса «g:Profiler» [39]. В качестве запроса подавались отобранные для MIR31HG и H3K27ac/H3K4me1 гены, а в качестве бэкграунда использовались все остальные ассоциированные с пиками HiMoRNA гены. По результатам нашего анализа, гены, принадлежащие пути «Hedgehog signaling pathway», обогащены пиками H3K27ac ($p\text{-value} = 2.090 \times 10^{-2}$), но не H3K4me1. Это наблюдение позволяет предположить участие MIR31HG в регуляции пути «Hedgehog signaling pathway» через

установление гистоновой модификации H3K27ac в соответствующих геномных локусах.

lncRNA PVT1

lncRNA PVT1 ингибирует экспрессию гена *LATS2* в клетках немелкоклеточного рака легкого путем рекрутирования EZH2 (субъединица комплекса PRC2) на соответствующий промотор [40]. Мы выполнили поиск триад в HiMoRNA: lncRNA PVT1, все гистоновые модификации, ген *LATS2*. В результате получили пики только для активирующей метки H3K4me3, которые отрицательно коррелировали с экспрессией PVT1, что косвенно согласуется с опубликованными данными [39], поскольку PVT1 привлекает EZH2 и участвует в установлении репрессивной метки H3K27me3. В RNA-Chrom мы наблюдали контакты вокруг одного из пиков H3K4me3 (peak_169403, chr13:21045571-21046978) в двух экспериментах (клеточные линии K562 и MDA-MB-231). Визуализация контактов PVT1 в Genome Browser [41] подтверждает наличие этого пика в промоторной области гена *LATS2* (*рис. 7*, пошаговый анализ представлен в *дополнительной табл. 5*). Дополнительное подтверждение регуляции *LATS2* с помощью lncRNA PVT1 было получено на основе данных Red-ChIP (смотри раздел «Экспериментальная часть», подраздел «Данные Red-ChIP»): обнаружен пик EZH2-опосредованных контактов PVT1 (chr13:21168000-21224000, $q\text{-value} = 0.09$) в 106.4 т.п.н. от 5'-конца гена *LATS2* (*рис. 7*).

Отсутствие в HiMoRNA триад «lncRNA PVT1–пик H3K27me3–ген *LATS2*» с положительной корреляцией, по-видимому, связано с чрезмерно строгой фильтрацией пиков метки H3K27me3 при создании базы данных. Приведенные выше примеры из раздела «Варианты использования» подтверждают, что интеграцию можно успешно применять для генерации гипотез о роли lncRNA в эпигенетической регуляции конкретных генов для дальнейшей экспериментальной проверки.

ОБСУЖДЕНИЕ

Перспективы использования и ограничения подхода

База данных HiMoRNA представляет собой коллекцию геномных локусов, в которых сигнал модификации гистонов значимо коррелирует с экспрессией lncRNA во многих типах клеток и тканей. В настоящее время она содержит более 5 млн корреляций для 10 типов модификаций гистонов и 4145 lncRNA. Предполагается, что некоторые из этих корреляций могут быть ложноположительными или соответствовать случаям непрямого регуляции, а следовательно, требуется дополнительная верификация с помощью внешних данных. RNA-Chrom – это база данных, содержащая полногеномные данные о взаимодействиях РНК с хроматином. К сожалению, эти данные почти не содержат контакты низкоэкспрессирующихся нкРНК и перегружены контактами новосинтезированных транскриптов. Помимо этого, сами по себе они не позволяют генерировать гипотезы, объясняющие функциональную роль взаимодействия. Имея это в виду, разумно интегрировать данные, содержащиеся в HiMoRNA и RNA-Chrom, чтобы охарактеризовать влияние lncRNA на эпигенетические модификации и экспрессию генов.

Как упоминалось выше, в базе данных HiMoRNA не найдены пики H3K27ac и H3K4me1 в локусе гена *FABP4*. Это наблюдение противоречит экспериментальным данным и базе данных RNA-Chrom. Есть и другие отрицательные примеры как в HiMoRNA, так и в RNA-Chrom для известных lncRNA, выполняющих функции в эпигенетической регуляции и поддержании структуры хроматина. Например, в HiMoRNA не наблюдались пики H3K27me3, коррелирующие с *MEG3*, хотя сообщалось, что *MEG3* является регулятором комплекса PRC2 и участвует в поддержании H3K27me3, особенно в промоторных областях генов *SMAD2*, *TGFB2* и *TGFBR1* [11]. Отсутствие таких пиков можно объяснить тем, что большинство lncRNA экспрессируются клеточно-специфичным образом, а указанный механизм был обнаружен в типе клеток, который не представлен в HiMoRNA. Даже когда данные ChIP-seq доступны, стандартная процедура поиска пиков может оказаться слишком строгой и привести к потере биологически значимых взаимодействий.

Кроме того, мы сталкивались с ситуациями, когда предсказание базы данных HiMoRNA подтверждалось опубликованными данными, но мы не обнаруживали контактов РНК с хроматином в соответствующем геномном локусе в RNA-Chrom. Например, для lncRNA *MAPKAPK5-AS1* большинство скоррелированных пиков из HiMoRNA не поддерживают-

ся контактами соответствующей РНК с хроматином из RNA-Chrom. Это, по-видимому, связано с низкой экспрессией данной РНК, что приводит к малому количеству наблюдаемых контактов этой РНК с хроматином в экспериментах «все-против-всех». Мы полагаем, что подобные случаи также могут быть связаны с несовпадением типов клеток в двух базах данных. К сожалению, эта ситуация является следствием малого количества доступных данных такого типа.

Поскольку экспериментальные данные недостаточно полные, обе базы данных не содержат исчерпывающую информацию. Поэтому некоторые известные биологические примеры могли быть пропущены при интеграции. Тем не менее мы полагаем, что интеграция баз данных уменьшает различные систематические ошибки благодаря мультиомиксной природе объединенных данных, тем самым позволяя генерировать интерпретируемые гипотезы о механизмах эпигенетической регуляции экспрессии генов длинными некодирующими РНК.

БУДУЩЕЕ РАЗВИТИЕ

В дополнение к реализованной интеграции полезным будет привлечение дополнительных полногеномных данных и аннотаций. Они могут включать информацию о трехмерной структуре хроматина, экспрессии и коэкспрессии генов, включая экспрессию lncRNA, целевых генов триады и генов, участвующих в установлении/удалении гистоновых меток, а также о локализации ДНК-связывающих и модифицирующих хроматин белков. В связи с тем, что экспериментальные данные такого рода пока довольно редки, стоит рассмотреть возможность использования биоинформатических предсказаний. Одним из возможных направлений может быть включение результатов предсказания типа взаимодействия lncRNA и хроматина (подробнее о сравнении программ, определяющих механизм взаимодействия lncRNA и других молекул, см., например, [42]). Предсказания типа взаимодействия lncRNA с целевыми молекулами доказали свою эффективность в комплексе с мультиомиксными экспериментальными данными для генерации гипотез о роли конкретной lncRNA [43–45]. Еще одним важным направлением может стать включение информации об изменении экспрессии генов в ответ на искусственное изменение концентрации конкретной lncRNA в клетке [8] и экспериментально подтвержденной информации об участии конкретной lncRNA в регуляции конкретной гистоновой модификации [46]. Это создаст дополнительную стадию валидации результатов интеграции HiMoRNA и RNA-Chrom. Помимо этого, полезным с практи-

ческой точки зрения может оказаться дополнение интеграции оценкой статистической значимости колокализации пиков HiMoRNA и контактов RNA-Chrom для конкретной lncRNA с помощью специальных программных средств: Genometricorr [47], StereoGene [48], RegioneR [49].

Область функциональной аннотации lncRNA – быстро развивающаяся область исследований. Мы будем поддерживать интеграцию HiMoRNA и RNA-Chrom, поскольку каждая база данных будет расширять список доступных организмов и пополняться новыми данными. По мере появления новых экспериментально подтвержденных данных мы планируем построить несколько прогностических моделей «lncRNA–эпигенетические модификации гистонов–ассоциированный с модификацией ген». Мы уверены, что дальнейшее совместное развитие веб-ресурсов HiMoRNA и RNA-Chrom будут способствовать более глубокому пониманию функциональной роли lncRNA в эпигенетической регуляции генов. ●

Благодарности

Авторы выражают благодарность А. Никольской за предоставление обработанных данных Red-ChIP, а также анонимным рецензентам за ценные предложения.

Эта работа поддержана грантом РНФ № 23-14-00371 (рук. Ю.А. Медведева).

Вклад авторов

Улучшение веб-интерфейса и базы данных HiMoRNA, разработка программного обеспечения, И.И.; адаптация веб-ресурса RNA-Chrom для интеграции с HiMoRNA, соответствие названий генов, администрирование проекта, Г.Р.; варианты использования, Г.Р. и Д.М.; общий надзор, А.М. и Ю.М.; подготовка рукописи, И.И., Г.Р., Д.М., А.М. и Ю.М. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Приложения доступны на сайте <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27543>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Carninci P., Sandelin A., Lenhard B., Katayama S., Shimokawa K., Ponjavic J., Semple C.A.M., Salmena L., Nishida M., Hayashizaki Y., et al. // Science. 2005. V. 309. № 5740. P. 1559–1563. doi: 10.1126/science.1112014
- Hon C.-C., Ramilowski J.A., Harshbarger J., Bertin N., Rackham O.J.L., Garmire L.X., Forrest A.R.R., Carninci P., Kawaji H., Hayashizaki Y., et al. // Nature. 2017. V. 543. № 7644. P. 199–204. doi: 10.1038/nature21374
- Cabili M.N., Trapnell C., Goff L., Koziol M., Tazon-Vega B., Regev A., Rinn J.L. // Genes Dev. 2011. V. 25. № 18. P. 1915–1927. doi: 10.1101/gad.17446611
- Andersson R., Gebhard C., Miguel-Escalada I., Hoof I., Bornholdt J., Boyd M., Chen Y., Zhao X., Schmidl C., Suzuki T., et al. // Nat. Commun. 2014. V. 5. № 1. P. 5336. doi: 10.1038/ncomms6336
- Ulitsky I., Shkumatava A., Jan C.H., Sive H., Bartel D.P. // Cell. 2011. V. 147. № 7. P. 1537–1550. doi: 10.1016/j.cell.2011.11.055
- Quinn J.J., Ilik I.A., Qu K., Georgiev P., Chu C., Akhtar A., Chang H.Y. // Genes Dev. 2016. V. 30. № 2. P. 191–207. doi: 10.1101/gad.272187.115
- Alam T., Medvedeva Y.A., Jia H., Brown J.B., Lipovich L., Baillie J.K. // PLoS One. 2014. V. 9. № 10. P. e109443. doi: 10.1371/journal.pone.0109443
- Ramilowski J.A., Yip C.W., Agrawal S., Chang J.-C., Ciani Y., Kulakovskiy I.V., Mendez M., Ooi J.L.C., Ouyang J.F., Nguyen A., et al. // Genome Res. 2020. V. 30. № 7. P. 1060–1072. doi: 10.1101/gr.254516.119
- Khalil A.M., Guttman M., Huarte M., Garber M., Raj A., Rivea Morales D., Thomas K., Presser A., Bernstein B.E., van Oudenaarden A., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 28. P. 11667–11672. doi: 10.1073/pnas.0904715106
- Grote P., Herrmann B.G. // RNA Biol. 2013. V. 10. № 10. P. 1579–1585. doi: 10.4161/rna.26165
- Mondal T., Subhash S., Vaid R., Enroth S., Uday S., Reinius B., Mitra S., Mohammed A., James A.R., Hoberg E., et al. // Nat. Commun. 2015. V. 6. № 1. P. 7743. doi: 10.1038/ncomms8743
- Goff L.A., Rinn J.L. // Genome Res. 2015. V. 25. № 10. P. 1456–1465. doi: 10.1101/gr.191122.115
- Mazurov E., Szykh A., Medvedeva Y.A. // Non-Coding RNA. 2022. V. 8. № 1. P. 18. doi: 10.3390/ncrna8010018
- Engreitz J.M., Pandya-Jones A., McDonel P., Shishkin A., Sirokman K., Surka C., Kadri S., Xing J., Goren A., Lander E.S., et al. // Science. 2013. V. 341. № 6147. P. 1237973. doi: 10.1126/science.1237973
- Simon M.D., Wang C.I., Kharchenko P.V., West J.A., Chapman B.A., Alekseyenko A.A., Borowsky M.L., Kuroda M.I., Kingston R.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. № 51. P. 20497–20502. doi: 10.1073/pnas.1113536108
- Chu C., Qu K., Zhong F.L., Artandi S.E., Chang H.Y. // Mol. Cell. 2011. V. 44. № 4. P. 667–678. doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.027
- Quinn J.J., Qu K., Chang H.Y. // Nat. Biotechnol. 2014. V. 32. № 9. P. 933–940. doi: 10.1038/nbt.2943
- Chu H.-P., Cifuentes-Rojas C., Kesner B., Aeby E., Lee H.-G., Wei C., Oh H.J., Boukhali M., Haas W., Lee J.T., et al. // Cell. 2017. V. 170. № 1. P. 86–101. doi: 10.1016/j.cell.2017.06.017
- Sridhar B., Rivas-Astroza M., Nguyen T.C., Chen W., Yan Z., Cao X., Hebert L., Zhong S. // Curr. Biol. 2017. V. 27. № 4. P. 602–609. doi: 10.1016/j.cub.2017.01.011
- Li X., Zhou B., Chen L., Gou L.-T., Li H., Fu X.-D. // Nat. Biotechnol. 2017. V. 35. № 10. P. 940–950. doi: 10.1038/nbt.3968
- Bell J.C., Jukam D., Teran N.A., Risca V.I., Smith O.K., Johnson W.L., Skotheim J.M., Greenleaf W.J., Straight A.F. // eLife. 2018. V. 7. P. e27024. doi: 10.7554/eLife.27024
- Yan Z., Huang N., Wu W., Chen W., Jiang Y., Zhang J., Zhang X., Zhang Y., Zhang Q., Zhang L., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. № 8. P. 3328–3337. doi: 10.1073/pnas.1819788116
- Bonetti A., Agostini F., Suzuki A.M., Hashimoto K., Pascarella G., Gimenez J., Roos L., Nash A.J., Ghazanfar S., Carninci P., et al. // Nat. Commun. 2020. V. 11. № 1. P. 1018.

- doi: 10.1038/s41467-020-14337-6
24. Gavrilov A.A., Zharikova A.A., Galitsyna A.A., Luzhin A.V., Rubanova N.M., Golov A.K., Petrova N.V., Kantidze O.L., Ulianov S.V., Misteli T., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2020. V. 48. № 12. P. 6699–6714. doi: 10.1093/nar/gkaa456
25. Ryabykh G.K., Zharikova A.A., Galitsyna A.A., Ulianov S.V., Razin S.V., Gavrilov A.A. // *Mol. Biol.* 2022. V. 56. № 2. P. 210–228. doi: 10.1134/S002689332202017X
26. Ryabykh G.K., Dikstein N., Zharikova A.A., Galitsyna A.A., Ulianov S.V., Razin S.V., Gavrilov A.A. // *Database J. Biol. Databases Curation.* 2023. V. 2023. P. baad025. doi: 10.1093/database/baad025
27. Gavrilov A.A., Golov A.K., Luzhin A.V., Zharikova A.A., Galitsyna A.A., Rubanova N.M., Kantidze O.L., Ulianov S.V., Razin S.V., Misteli T., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2022. V. 119. № 1. P. e2116222119. doi: 10.1073/pnas.2116222119
28. Mylarshchikov D.E., Baumgart S.J., Mazurov E., Saveliev A., Medvedeva Y.A. // *NAR Genomics Bioinforma.* 2024. V. 6. № 2. P. lqae054. doi: 10.1093/nargab/lqae054
29. Hartana C.A., Rassadkina Y., Gao C., Yashiro-Ohtani Y., Mercier F., Deng S., Li X., Lin T. R.H., Das S., Lian C., et al. // *J. Clin. Invest.* 2021. V. 131. № 9. P. e146136. doi: 10.1172/JCI146136
30. Chen W., Zhang J., Xu H., Dai X., Zhang X., Wang W., Wu Y., Li Y., Wang X., Zhang Y., et al. // *Oncogene.* 2024. V. 43. № 18. P. 1328–1340. doi: 10.1038/s41388-024-02986-2
31. Li B., Jiang Q., Liu X., Yang X., Li Z., Li J., Zhang Y., Wu Y., Li X., Zhang Y., et al. // *Cell Death Dis.* 2020. V. 11. № 10. P. 823. doi: 10.1038/s41419-020-03031-6
32. Li Z., Guo X., Wu S. // *Stem Cell Res. Ther.* 2020. V. 11. № 1. P. 435. doi: 10.1186/s13287-020-01953-8
33. Nylund P., Gimenez G., Laine I., Massinen S., Gordon S., Kuusela M., Kontturi S., Rusanen A., Vetterranta K., Lohi O., et al. // *Haematologica.* 2024. V. 109. № 2. P. 567–577. doi: 10.3324/haematol.2022.282375
34. Ang C.E., Trevino A.E., Chang S., Soeung M., Ma L., Chidambaram S., Young C., Wernig M., Sudhof T.C., Chang H.Y., et al. // *eLife.* 2019. V. 8. P. e41770. doi: 10.7554/eLife.41770
35. Wongtrakongate P., Riddick G., Hashem O., Harris R., Jones S., Ramjaun A., Bunjobpol W., Felsenfeld G., Turner B.M., Schwabe J.W.R., et al. // *PLoS Genet.* 2015. V. 11. № 10. P. e1005615. doi: 10.1371/journal.pgen.1005615
36. Alfeghaly C., Bozec D., Forterre M., Muller Q., Bernard D., Munch M., Schulte M.L., Nollet M., Paul N., Regnault B., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2021. V. 49. № 9. P. 4954–4970. doi: 10.1093/nar/gkab267
37. Huang Y., Zheng Y., Jia L., Li W. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 8080. doi: 10.1038/s41598-017-08131-6
38. Kanehisa M., Furumichi M., Tanabe M., Sato Y., Morishima K. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № D1. P. D457–D462. doi: 10.1093/nar/gkv1070
39. Kolberg L., Raudvere U., Kuzmin I., Vilo J., Peterson H. // *Nucl. Acids Res.* 2023. V. 51. № W1. P. W207–W212. doi: 10.1093/nar/gkad347
40. Wan L., Zhang L., Fan K., Cheng Z.X., Sun Q.C., Wang J.J. // *Mol. Cancer Ther.* 2016. V. 15. № 5. P. 1082–1094. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0509
41. Kent W.J., Sugnet C.W., Furey T.S., Roskin K.M., Pringle T.H., Zahler A.M., Haussler D. // *Genome Res.* 2002. V. 12. № 6. P. 996–1006. doi: 10.1101/gr.229102
42. Antonov I.V., Mazurov E., Borodovsky M., Medvedeva Y.A. // *Brief. Bioinform.* 2019. V. 20. № 2. P. 551–564. doi: 10.1093/bib/bbx132
43. Antonov I., Medvedeva Y.A. // *Genes.* 2020. V. 11. № 12. P. E1483. doi: 10.3390/genes11121483
44. Matveishina E., Antonov I., Medvedeva Y.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 3. P. 830. doi: 10.3390/ijms21030830
45. Ogunleye A.J., Romanova E., Medvedeva Y.A. // *F1000Research.* 2021. V. 10. P. 204. doi: 10.12688/f1000research.51844.1
46. Marakulina D., Vorontsova Y., Mazurov E., Anisenko A., Korchagina A., Medvedeva Y.A., Kolmykov S., Fishman V., Kulakovskiy I.V., Meshcheryakov R., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2023. V. 51. № D1. P. D564–D570. doi: 10.1093/nar/gkac809
47. Favorov A., Mularoni L., Cope L.M., Medvedeva Y.A., Mironov A.A., Makeev V.J., Wheelan S.J. // *PLoS Comput. Biol.* 2012. V. 8. № 5. P. e1002529. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002529
48. Stavrovskaya E.D., Tepluk N., Mironov A.A., Panchenko A.R., Favorov A.V., Makeev V.J. // *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2017. V. 33. № 20. P. 3158–3165. doi: 10.1093/bioinformatics/btx379
49. Gel B., Díez-Villanueva A., Serra E., Buschbeck M., Peinado M.A., Malinverni R. // *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2016. V. 32. № 2. P. 289–291. doi: 10.1093/bioinformatics/btv562

УДК 577

Индукцированная конверсия мономерного α -синуклеина в реальном времени: новый подход к диагностике нейродегенеративных заболеваний из группы синуклеинопатий со слабо выраженной активностью в тесте RT-QuIC

Д. А. Орлова^{1*}, А. А. Кудряева¹, Н. А. Колотьева², Е. О. Иванова², Е. Ю. Федотова²,
П. П. Трегуб^{2,3}, А. Б. Салмина², С. Н. Иллариошкин², А. А. Белогулов^{1,4}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии», Москва, 125367 Россия

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, 119048 Россия

⁴Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский университет медицины Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 127473 Россия

*E-mail: dorlova01@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.10.2024

Принята к печати 07.02.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27530

РЕФЕРАТ Нейродегенеративные заболевания, составляющие группу синуклеинопатий (болезнь Паркинсона, деменция с тельцами Леви и мультисистемная атрофия), характеризуются формированием агрегатов aberrантного синаптического белка α -синуклеина в нейронах или глиальных клетках. Эти заболевания манифестируют клинически лишь спустя годы после появления первых следовых количеств патологических белковых агрегатов в мозге, что затрудняет их своевременную и корректную диагностику. В последние годы ведется разработка и апробация нового подхода, который основан на конверсии белков, индуцированной встряхиванием, в реальном времени – RT-QuIC (Real-Time Quaking-Induced Conversion): предполагается, что данная технология сможет предоставить врачам мощный инструмент для ранней и точной диагностики синуклеинопатий, открывая тем самым новые горизонты в изучении нейродегенеративных заболеваний. Этот подход позволяет обнаруживать неправильно свернутые агрегаты α -синуклеина в физиологических жидкостях человека путем добавления избытка рекомбинантного α -синуклеина, который в результате запускаемой экспоненциальной реакции принимает конформацию присутствующих aberrантных молекул. Получение чистого α -синуклеина критически важно для успешного применения технологии RT-QuIC, так как качество рекомбинантного белка сильно влияет на чувствительность и специфичность метода, что, в свою очередь, определяет его диагностическую ценность. С применением трехстадийной хроматографической очистки из периплазмы бактериальных клеток получен препарат рекомбинантного мономерного α -синуклеина с чистотой более 97%. Более высокая степень очистки препарата α -синуклеина увеличивает время ана-

лиза, но вместе с тем уменьшает фоновый сигнал и позволяет проводить более длительные инкубации для уверенной детекции таких синуклеинопатий, как мультисистемная атрофия мозжечкового типа со слабо выраженной активностью в тесте RT-QuIC. Представленные данные дают основания утверждать, что разработанные компоненты системы RT-QuIC позволяют расширить диагностический потенциал данного метода в отношении нейродегенеративных заболеваний из группы синуклеинопатий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА α -синуклеин, синуклеинопатии, мультисистемная атрофия, деменция с тельцами Леви, индуцированная конверсия в реальном времени (Real-Time Quaking-Induced Conversion), диагностика.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БП – болезнь Паркинсона; ДТЛ – деменция с тельцами Леви; ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид; МРТ – магнитно-резонансная томография; МСА – мультисистемная атрофия; МСА-М – мультисистемная атрофия мозжечкового типа; МСА-П – мультисистемная атрофия паркинсонического типа; ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле; СРЧ – синдром ригидного человека; ЦСЖ – цереброспинальная жидкость; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота; FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography (быстрая жидкостная хроматография белков); GF – Gel-filtration chromatography (гель-фильтрационная хроматография); HIC – Hydrophobic Interaction Chromatography (хроматография гидрофобного взаимодействия); IEX – Ion Exchange Chromatography (ионообменная хроматография); RT-QuIC – Real-Time Quaking-Induced Conversion (конверсия, вызванная дрожанием в реальном времени); SAA – Seed Amplification Assay (анализ амплификации семян); ThT – Thioflavin T (тиофлавин Т).

ВВЕДЕНИЕ

Синуклеинопатии представляют собой группу нейродегенеративных заболеваний, включающую болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Леви (ДТЛ) и мультисистемную атрофию (МСА). Ключевую роль в патогенезе этих заболеваний играет агрегация неправильно свернутого белка α -синуклеина в нейронах и/или глиальных клетках: установлено, что α -синуклеин с aberrантной конформацией обладает способностью транссинаптически распространяться по центральной нервной системе подобно прионам [1–4].

α -Синуклеин – это пресинаптический белок массой 14 кДа, кодируемый геном SNCA, локализованным на длинном плече 4-й хромосомы в локусе 4q21–22. Экспрессия α -синуклеина преимущественно наблюдается в черной субстанции среднего мозга, неокортексе и гиппокампе [5]. Физиологические уровни α -синуклеина необходимы для нормальной работы митохондрий, высвобождения нейротрансмиттеров и поддержания морфологической целостности клеток. Сверхэкспрессия α -синуклеина и изменения его агрегационных свойств приводят к митохондриальной дисфункции, нейровоспалению и нарушению синаптического высвобождения дофамина и других нейротрансмиттеров, что приводит к гибели нейронов [6, 7]. Отличительной особенностью семейства синуклеинов является их склонность к образованию агрегатов. В нативной форме α -синуклеин представляет собой неструктурированный, мономерный растворимый белок. При патологических состояниях он образует β -складчатые олигомеры (протофибриллы), которые впослед-

ствии трансформируются в амилоидные фибриллы и откладываются в нейронах в форме телец и нейритов Леви, а также других включений [8–10]. Предполагается, что механизм роста агрегатов α -синуклеина в каждом случае основан на затравочной полимеризации. При болезни Паркинсона и ДТЛ наблюдается транссинаптическое распространение aberrантных молекул от нейрона к нейрону, в то время как при МСА происходит их накопление и передача в клетках глиальной природы [11].

До настоящего времени не существует какой-либо общепринятой референсной технологии детекции агрегатов α -синуклеина в нервной системе, а известные методы иммуногистохимического определения α -синуклеина в биопсийном материале периферических тканей (кожи, слюнных желез и т.д.) сложны и весьма затратны [12], что затрудняет их массовое применение в клинической практике. Между тем, внедрение новых высокочувствительных методов определения патологических форм α -синуклеина и других церебральных белков имеет ключевое значение для совершенствования диагностики (в том числе на продромальной стадии болезни) и своевременной терапии нейродегенеративных заболеваний. Так, большое внимание привлекает метод амплификации белков на основе нуклеации (seed amplification assay, SAA), изначально разработанный для прионных болезней и позволяющий объективизировать цепную реакцию мисфолдинга белков при наличии в реакционной среде патологических белковых конформеров из биообразцов пациента. Применение прионной

гипотезы к α -синуклеину при болезни Паркинсона, МСА и ДТЛ позволило начать исследовать возможности метода SAA в обнаружении патологических конформеров α -синуклеина в различных тканях и жидкостях организма, таких как кожа, обонятельная слизистая оболочка, цереброспинальная жидкость, кровь [12, 13].

Современной разновидностью SAA является технология конверсии, индуцированной встряхиванием, в реальном времени (*Real-Time Quaking-Induced Conversion, RT-QuIC*) [14, 15]. В данной технологии в качестве субстрата используется рекомбинантный белок, в то время как биологический материал пациента служит «затравкой» для выявления мисфолдинга белков. RT-QuIC основан на способности патологической формы α -синуклеина индуцировать конформационные изменения нормального мономерного α -синуклеина, приводящие к образованию белковых агрегатов с неправильной укладкой. Принцип метода заключается в создании искусственных условий для «затравочной» амплификации α -синуклеина путем чередования циклов инкубации и интенсивного встряхивания, что способствует дополнительной фрагментации образовавшихся агрегатов и увеличению образования протофибрилл. Для детекции процесса агрегации α -синуклеина используется флуоресцентный краситель тиюфлавин Т (ThT), который встраивается в агрегаты во время полимеризации, что приводит к увеличению флуоресценции с течением времени [14, 16]. Следует отметить, что чистота используемого субстрата – мономерного растворимого α -синуклеина – критически важна для обеспечения достоверности и воспроизводимости результатов, а также предотвращения ложноположительных реакций [17, 18].

Цель данной работы состояла в совершенствовании диагностической системы нейродегенеративных заболеваний из разряда синуклеинопатий, основанной на методе RT-QuIC, и в этой связи разработка метода очистки рекомбинантного мономерного α -синуклеина дикого типа особой чистоты для его дальнейшего применения в качестве субстрата в методе RT-QuIC.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспрессия рекомбинантного α -синуклеина в клетках *Escherichia coli*

Плаزمид рЕТ33b+, содержащая последовательность гена α -синуклеина человека, была трансформирована в клетки *E. coli* One Shot BL21 (DE3) Star (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки культивировали в 500 мл бактериальной среды LB, содержащей канамицин в концентрации 50 мкг/мл и глюкозу

в концентрации 0.1%, при постоянном перемешивании со скоростью 200 об/мин. Культуру выращивали до достижения значения оптической плотности 0.6 при длине волны 600 нм ($OD_{600} = 0.6$). Экспрессию целевого белка индуцировали, добавляя ИПТГ (изопропил- β -D-l-тиогалактопиранозид) до конечной концентрации 1 mM, с последующей инкубацией клеток в течение 4 ч при температуре 37°C и интенсивном перемешивании. По завершении периода экспрессии клетки осаждали центрифугированием при 4000 *g* в течение 15 мин.

Периплазматический лизис

После центрифугирования клеточный осадок, полученный из 300 мл культуральной среды, ресуспендировали в 60 мл буфера для осмотического шока (30 mM Трис, 40% сахарозы и 2 mM EDTA pH 7.2) и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем суспензию центрифугировали при 18000 *g* в течение 20 мин, после чего супернатант отделяли, а осадок ресуспендировали в 50 мл ледяной воды (dH_2O) с добавлением 20 мкл насыщенного раствора $MgCl_2$. Полученную суспензию выдерживали на льду в течение 3 мин перед последующим центрифугированием при 18000 *g* в течение 20 мин. Супернатант подвергали диализу в течение ночи против буферного раствора, содержащего 10 mM Трис и 1 mM EDTA (pH 7.2), при температуре 4°C.

Ионообменная хроматография

Ионообменную хроматографию (IEX) проводили с применением колонки C 10/10 Column (Cytiva, США), заполненной сорбентом Q Sepharose Fast Flow (Cytiva, США), с использованием системы быстрой жидкостной хроматографии белков (FPLC) BioLab 30 (Jiangsu Hanbon Science and Technology Co., Ltd, Китай). Перед нанесением образца белка колонку уравнивали буфером IEX A (10 mM Трис pH 7.2). Перед проведением хроматографии все буферные растворы и образцы белка были подвергнуты дегазации и фильтрации через мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Элюцию проводили линейным градиентом, соответствующим 7 объемам колонки, с использованием буферов IEX A (10 mM Трис pH 7.2) и IEX B (10 mM Трис и 0.15 M $(NH_4)_2SO_4$ pH 7.2), после чего проводили финальную промывку колонки 100% буфером IEX B. Оптическую плотность элюата контролировали при длине волны 280 нм. Для определения времени десорбции α -синуклеина с хроматографической колонки полученные фракции собирали и анализировали методом электрофореза в 13% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (ПААГ)

с последующим окрашиванием Кумасси бриллиантовым синим. Фракции, содержащие белковые полосы, соответствующие молекулярной массе мономерного α -синуклеина, объединяли и диализовали в течение ночи против 20 мМ буферного раствора Трис, pH 7.0, и 0.15 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Хроматография гидрофобного взаимодействия

Хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC) была выполнена с использованием колонки C 10/10 Column (Cytiva), заполненной сорбентом Phenyl Sepharose High Performance (Cytiva). Перед нанесением образца белка колонка была уравновешена буфером HIC A (50 мМ бис-Трис и 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7.0). Концентрацию соли в образцах доводили до 1 М, постепенно добавляя $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при перемешивании смеси при комнатной температуре; pH образца доводили до 7.0. Далее образец наносили на хроматографическую колонку и элюировали линейным градиентом, соответствующим 7 объемам колонки, с использованием буферов HIC A (50 мМ бис-Трис и 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 7.0) и HIC B (50 мМ бис-Трис pH 7.0), после чего проводили финальную промывку колонки 100% буфером HIC B. Фракции, содержащие α -синуклеин, объединяли и подвергали диализу против 20 мМ буферного раствора Трис (pH 7.2) в течение ночи при температуре 4°C. Полученный раствор белка концентрировали в центробежных концентраторах с лимитом пропускания 5000 Да до концентрации 1.0–1.5 мг/мл и замораживали при -80°C до проведения дальнейших экспериментов.

Гель-фильтрационная хроматография

Гель-фильтрационную хроматографию (GF) выполняли с использованием колонки Superose 12 10/30 FPLC Column (GE Pharmacia, США). Перед нанесением белка колонку уравновешивали буфером (20 мМ Трис pH 7.2). На колонку наносили 500 мкл предварительно сконцентрированного образца со скоростью 1 мл/мин. Хроматографические фракции анализировали в 13% ПААГ в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием Кумасси бриллиантовым синим. Изображение геля анализировали с помощью Image Lab Touch Software для денситометрического определения чистоты белка. Полученный рекомбинантный белок α -синуклеина аликвотировали до желаемого объема и хранили при температуре -80°C до проведения реакции RT-QuIC.

Взятие и пробоподготовка образцов

Для проведения пилотных исследований с применением технологии RT-QuIC были отобраны образцы

цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) ($n = 3$) у пациентов в возрасте 58–69 лет с МСА (мозжечковый тип), ДТЛ и (в качестве контрольного образца) синдромом ригидного человека. Диагнозы были поставлены на основе данных анамнеза, клинического обследования, а также результатов специальных лабораторно-инструментальных тестов, включая высокопольную МРТ (3 Тл) в соответствующих исследовательских режимах. Все пациенты дали письменное согласие на обследование. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр неврологии» (протокол № 71/24). Люмбальную пункцию проводили утром, натощак. ЦСЖ отбирали стерильным способом в полипропиленовую пробирку, центрифугировали, аликвотировали по 500 мкл, подвергали быстрой заморозке, хранили при температуре -80°C.

RT-QuIC

Реакции RT-QuIC проводили в черных 96-луночных планшетах с непрозрачным дном. В каждую лунку были добавлены 37 ± 3 мг стеклянных шариков (600–800 мкм), реакционный буфер (100 мМ фосфатный буфер pH 8.2, 10 мкМ ThT), содержащий синтезированный рекомбинантный α -синуклеин в конечной концентрации 0.1 мг/мл, и образцы неразбавленной ЦСЖ. Планшет запечатывали клейкой пленкой и помещали в мультимодальный планшетный ридер ClarioStar (BMG Labtech). Образцы инкубировали при температуре 37°C в течение 125 ч с прерывистыми циклами встряхивания. Кинетику образования фибрилл визуализировали по накоплению флуоресценции ThT в режиме реального времени каждые 60 мин, при длине волны 450/480 нм. Измерения останавливали, когда сигналы флуоресценции ThT выходили на плато. Каждый образец анализировали в трех повторах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первым этапом хроматографической очистки рекомбинантного α -синуклеина была ионообменная хроматография. Для оценки чистоты и эффективности разделения белковых фракций, полученных в ходе хроматографии, применяли электрофоретический анализ в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с последующим окрашиванием геля красителем Кумасси бриллиантовым синим. Анализ фракций позволил установить профиль элюции α -синуклеина с хроматографической колонки. Главная фракция, содержащая α -синуклеин, выделена цветом на хроматограмме (рис. 1А). Результаты электрофоретического анализа (рис. 1А, вставка) свидетельствуют о том, что элюция белка начиналась при достижении 60%

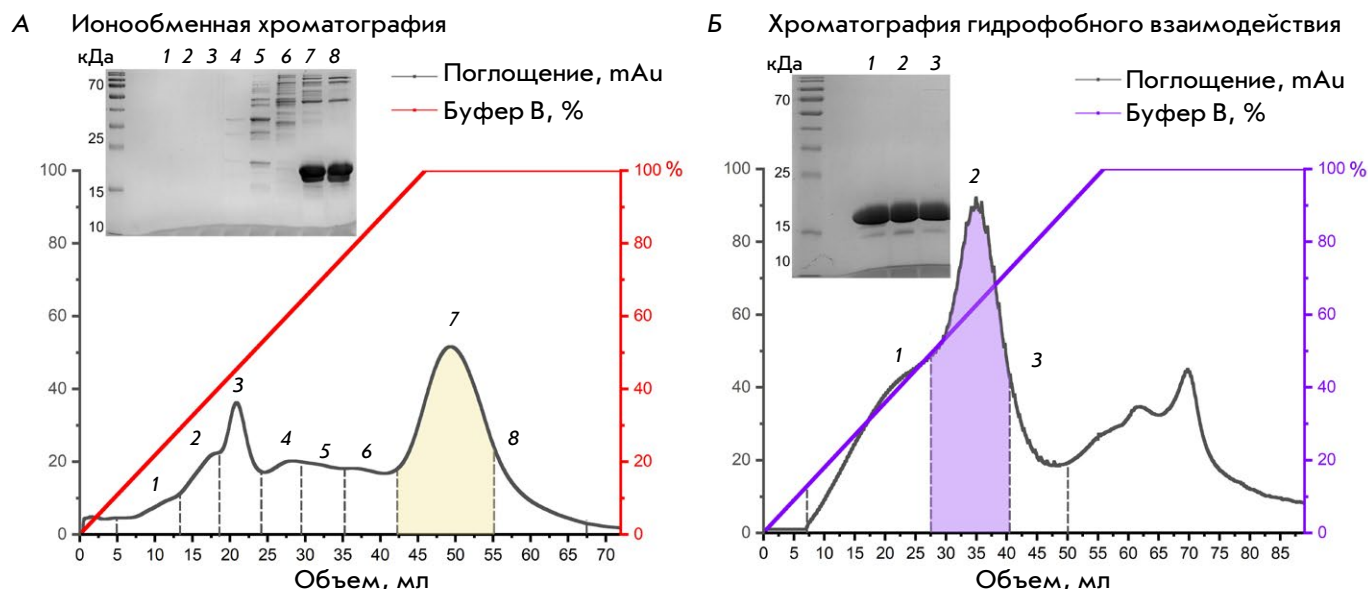


Рис. 1. А – ионообменная хроматография образцов после периплазматического лизиса. Пик, выделенный цветом, соответствует фракции, содержащей наибольшее количество α -синуклеина. На вставке сверху слева показаны результаты электрофореза белковых фракций после ионообменной хроматографии. Б – гидрофобная хроматография образцов после ионообменной хроматографии (mAu – единица оптической плотности). Пик, выделенный цветом, соответствует фракции, содержащей основное количество α -синуклеина. На вставке сверху слева показаны результаты электрофореза белковых фракций после хроматографии гидрофобного взаимодействия. Масса целевого белка соответствует 19 кДа (кажущаяся масса). Номера пиков на хроматографических профилях соответствуют номерам проб на ПААГ

концентрации буферного раствора ИЕХ В в элюенте с поправкой на объем колонки. Дальнейшее повышение концентрации буфера ИЕХ В до 80% приводило к полной элюции α -синуклеина. Фракции 7–8, содержащие α -синуклеин, объединяли и использовали на дальнейших этапах очистки белка.

Препарат α -синуклеина, выделенного из периплазмы, содержит белковые примеси, поэтому для получения гомогенного продукта требуется дополнительная стадия очистки. С этой целью добавляли этап гидрофобной хроматографии. Анализ хроматографического профиля элюции α -синуклеина показал, что десорбция целевого белка с гидрофобного сорбента начиналась при достижении доли буферного раствора ИЕХ В в составе подвижной фазы 15% и продолжалась до 65%. Фракция, содержащая наибольшее количество α -синуклеина, выделена цветом на хроматограмме (рис. 1Б). Эффективность очистки белкового препарата методом гидрофобной хроматографии оценивали при помощи электрофоретического анализа (рис. 1Б, вставка). Результаты ПААГ подтвердили удаление основных примесных белков после стадии гидрофобной хроматографии.

Для отделения от возможных ковалентных и нековалентных димеров была проведена заключительная очистка α -синуклеина с применением гель-фильтрационной хроматографии. Хроматографический профиль элюции α -синуклеина (рис. 2) свидетельствует, что время удержания белка на колонке составляло 12.5 мин. Это соответствует его ожидаемой массе в виде мономера. Дополнительные пики не содержали полипептидной составляющей и соответствовали колебаниям электропроводности, вызванным компонентами буферного раствора α -синуклеина. Электрофоретический анализ фракции 1–3 выявил дополнительные верхние полосы, тогда как четвертая фракция показала наивысшую степень чистоты по сравнению с остальными и была использована для проведения RT-QuIC.

Эксперименты по определению содержания aberrantного α -синуклеина в ЦСЖ пациентов проведены с использованием модифицированного протокола RT-QuIC [16]. В процессе анализа агрегаты патологического α -синуклеина подвергались частично денатурирующему воздействию в результате пе-

Препаративная гель-фильтрационная хроматография

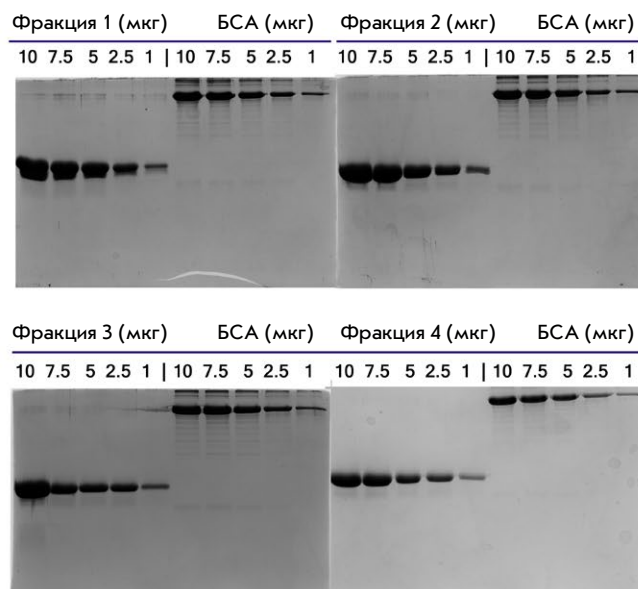
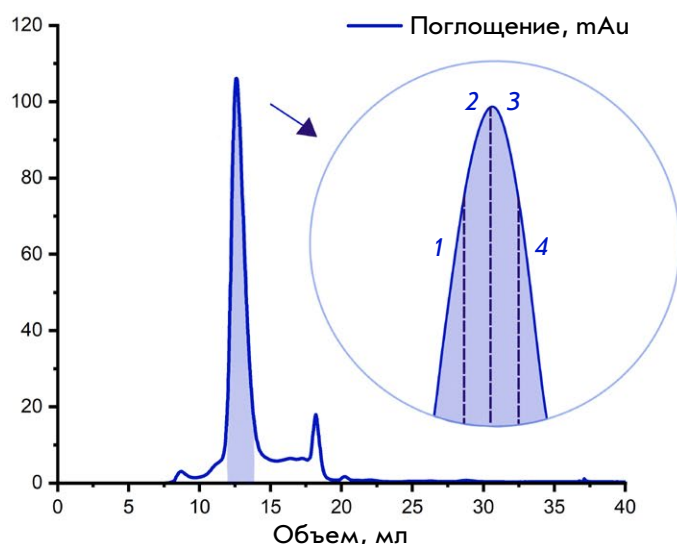


Рис. 2. Гель-фильтрационная хроматография белкового препарата α -синуклеина (mAu – единица оптической плотности). Пик, выделенный цветом, соответствует фракции, содержащей целевой белок. Справа показан денатурирующий электрофорез белковых фракций, где слева нанесена соответствующая фракция α -синуклеина в различной концентрации (10, 7.5, 5, 2.5 и 1 мкг), а справа в качестве калибратора нанесен бычий сывороточный альбумин (БСА) в тех же концентрациях. Номера фракций на хроматограмме соответствуют номерам проб на ПЛАГ

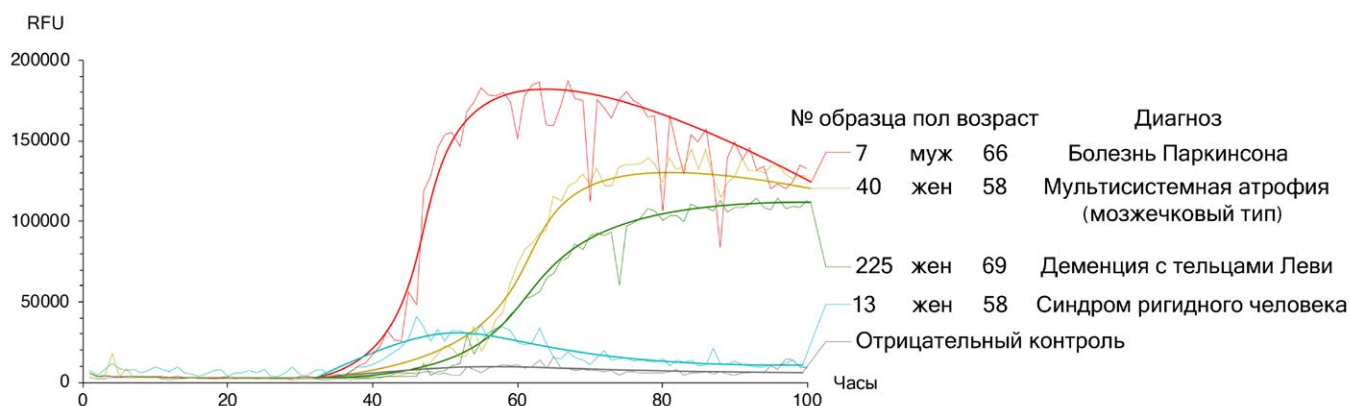


Рис. 3. Кривые амплификации патологического α -синуклеина у пациентов (RFU – относительные единицы флуоресценции). Анализ образцов от пациентов с синдромом ригидного человека (голубой), деменцией с тельцами Леви (зеленый), мультисистемной атрофией мозжечкового типа (желтый) и болезнью Паркинсона (красный)

риодического встряхивания. В условиях избытка в реакционной смеси рекомбинантного белка-мономера происходит амплификация и увеличение содержания неправильно свернутого агрегированного белка, связывающего ThT и, как следствие, рост уровня флуоресценции. Результаты приведены на рис. 3.

Образец 13 (синдром ригидного человека, СРЧ) не показал существенного увеличения флуорес-

ценции, в то время как в образцах 40 (мультисистемная атрофия, МСА) и 225 (деменция с тельцами Леви, ДТЛ) наблюдалось явное увеличение флуоресцентного сигнала в интервале 40–60 ч, достигающее значений 145000 и 120000 RFU соответственно. Образец номер 7 (болезнь Паркинсона) показал самый высокий сигнал флуоресценции 170000 RFU и самую большую скорость выхода на плато в интервале 32–45 ч. Таким образом, анализ кри-

вых RT-QuIC выявил повышение уровня флуоресценции до 120–150 тыс. RFU примерно через 75 ч наблюдения в образцах ЦСЖ от пациентов с МСА и ДТЛ и 170 тыс. RFU для БП через 55 ч наблюдения соответственно. В образце ЦСЖ от пациента с СРЧ не зафиксировано увеличение флуоресценции, что свидетельствует об отсутствии aberrантного белка α -синуклеина в биоматериале. В качестве отрицательного контроля использовали аналог цереброспинальной жидкости (NaCl 100 мМ, KCl 2 мМ, CaCl₂ 1 мМ, мочевины 5 мМ, БСА 300 мкг/мл, глюкоза 2.5 мМ, NaHCO₃, pH 7.3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные результаты свидетельствуют о том, что полученный рекомбинантный мономерный α -синуклеин является оптимальным субстратом для применения в технологии RT-QuIC. Ранее показали, что разнообразие методов очистки и составов буферов для экстракции может значительно влиять на конформацию, стабильность и агрегационное поведение α -синуклеина, что, в свою очередь, существенно осложняет интерпретацию результатов анализа [17, 18]. Кроме того, актуальной является стандартизация методов производства и очистки рекомбинантного α -синуклеина для его использования в диагностических целях. Последовательное сочетание методов ионообменной и гидрофобной хроматографии позволило нам получить высокоочищенный препарат целевого белка (более 97%), соответствующего рекомбинантному мономерному α -синуклеину, который может с успехом использоваться в дальнейших функциональных тестах. Подобная высокая чистота и однородность препаратов α -синуклеина являются ключевым фактором поддержания воспроизводимости результатов лабораторной диагностики синуклеинопатий. В будущем это позволит обеспечить большую надежность данных RT-QuIC и будет способствовать трансляции результатов, полученных в лабораторных условиях, в клинику.

Диагностика синуклеинопатий представляет собой сложную задачу, требующую высокой точности. В рамках нашего пилотного исследования с использованием метода RT-QuIC проанализированы образцы от пациентов с ДТЛ, а также с МСА мозжечкового типа (МСА-М), находящихся на стадии средней степени тяжести с нарушением когнитивного статуса. В качестве отрицательного контроля использовали образцы, полученные от пациентов с синдромом ригидного человека. Следует отметить, что МСА может быть диагностирована с 100% вероятностью только посмертно из-за пересечения клинической картины с проявлениями других синуклеинопатий.

Это редкое и быстро прогрессирующее нейродегенеративное заболевание делится на два основных подтипа: паркинсонический (МСА-П) и мозжечковый (МСА-М). Клинические проявления МСА-П включают симптомы, характерные для классического паркинсонизма, в то время как МСА-М характеризуется мозжечковой атаксией. Аналогично, диагностика ДТЛ осложняется смешением симптомов. ДТЛ часто ошибочно воспринимается за болезнь Альцгеймера из-за схожести клинических проявлений, при этом единственным надежным диагностическим маркером является наличие aberrантной формы α -синуклеина у пациента.

Результаты нашего исследования свидетельствуют, что начало значимой агрегации синуклеина начинается через 50 ч после смешивания образцов ЦСЖ и компонентов реакционной смеси. В то же время в аналогичных исследованиях подъем кривых агрегации начинался приблизительно после 12 ч инкубации [19]. Скорость агрегации α -синуклеина может зависеть от множества факторов и очевидно, что наиболее критический из них – это степень очистки. Олигомеры, от которых не удалось избавиться в процессе выделения рекомбинантного белка, могут индуцировать агрегацию наравне с вносимыми в реакционную смесь природными патологическими вариантами. С одной стороны, более высокая степень очистки нашего препарата α -синуклеина увеличивает время анализа, с другой стороны, уменьшает фоновый сигнал и позволяет проводить более длительную инкубацию для уверенной детекции таких синуклеинопатий, как МСА со слабо выраженной активностью в тесте RT-QuIC [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Раннее обнаружение aberrантных белков, которые участвуют в реализации механизмов нейротоксичности/нейровоспаления и циркулируют в системном кровотоке и ЦСЖ, признается сегодня одной из наиболее «горячих» точек нейронауки [20]. Серия пилотных исследований по определению уровня патологических агрегатов методом RT-QuIC в ЦСЖ пациентов с синуклеинопатиями с использованием особо чистого рекомбинантного α -синуклеина продемонстрировала большой потенциал этой методики в контексте развития лабораторной нейродиагностики. Дальнейшее развитие исследований будет посвящено разработке стандартизированного метода детекции патологических форм α -синуклеина, который должен быть информативным, высокочувствительным, специфичным, воспроизводимым и при этом простым в использовании для его последующего внедрения в клиническую практику. ●

Данная работа выполнена при поддержке гранта Минобрнауки России на проведение крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технологического развития, соглашение № 075-15-2024-638.

Авторы выражают благодарность за предоставление плазмиды, кодирующей α -синуклеин, В.И. Муронцу (НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, отдел биохимии животной клетки).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gai W.P., Pountney D.L., Power J.H.T., Li Q.X., Culvenor J.G., McLean C.A., Jensen P.H., Blumbergs P.C. // *Exp. Neurol.* 2003. V. 181. № 1. P. 68–78. doi: 10.1016/s0014-4886(03)00004-9.
2. Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M.-Y., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. // *Nature.* 1997. V. 388. № 6645. P. 839–840. doi: 10.1038/42166.
3. Tong J., Wong H., Guttman M., Ang L.C., Forno L.S., Shimadzu M., Rajput A.H., Muenter M.D., Kish S.J., Hornykiewicz O., et al. // *Brain.* 2010. V. 133. № 1. P. 172–188. doi: 10.1093/brain/awp282.
4. Ma J., Gao J., Wang J., Xie A. // *Front. Neurosci.* 2019. V. 13. P. 552. doi: 10.3389/fnins.2019.00552.
5. Goedert M. // *Science.* 2015. V. 349. № 6248. P. 1255555. doi: 10.1126/science.1255555.
6. Call T., Ottolini D., Negro A., Brini M. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 22. P. 1791417929. doi: 10.1074/jbc.M111.302794.
7. Longhena F., Faustini G., Missale C., Pizzi M., Spano P., Bellucci A. // *Neural Plast.* 2017. V. 2017. P. 5012129. doi: 10.1155/2017/5012129.
8. Eliezer D., Kutluay E., Bussell R., Browne G. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 307. № 4. P. 10611073. doi: 10.1006/jmbi.2001.4538.
9. Winner B., Jappelli R., Maji S.K., Desplats P.A., Boyer L., Aigner S., Hetzer C., Loher T., Vilar M., Campioni S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 10. P. 4194–4199. doi: 10.1073/pnas.1100976108.
10. Housmans J.A.J., Wu G., Schymkowitz J., Rousseau F. // *FEBS J.* 2023. V. 290. № 3. P. 554–583. doi: 10.1111/febs.16312.
11. Karpowicz R.J., Trojanowski J.Q., Lee V.M.-Y. // *Lab. Invest.* 2019. V. 99. № 7. P. 971981. doi: 10.1038/s41374-019-0195-z.
12. Rhoads D.D., Wrona A., Foutz A., Blevins J., Glisic K., Person M., Maddox R.A., Belay E.D., Schonberger L.B., Tatsuoka C., et al. // *Neurology.* 2020. V. 95. № 8. P. e1017–e1026. doi: 10.1212/WNL.0000000000010086.
13. Srivastava A., Alam P., Caughey B. // *Biomolecules.* 2022. V. 12. № 4. P. 576. doi: 10.3390/biom12040576.
14. Candelise N., Schmitz M., Thune K., Cramm M., Rabano A., Zafar S., Stoops E., Vanderstichele H., Villar-Pique A., Llorens F., et al. // *Transl. Neurodegener.* 2020. V. 9. № 1. P. 5. doi: 10.1186/s40035-019-0181-9.
15. Vascellari S., Orru C.D., Caughey B. // *Front. Aging Neurosci.* 2022. V. 14. P. 853050. doi: 10.3389/fnagi.2022.853050.
16. Okuzumi A., Hatano T., Fukuhara T., Ueno S., Nukina N., Imai Y., Hattori N. // *Methods Mol. Biol.* 2021. V. 2322. P. 3–16. doi: 10.1007/978-1-0716-1495-2_1.
17. Stephens A.D., Matak-Vinkovic D., Fernandez-Villegas A., Kaminski Schierle G.S. // *Biochemistry.* 2020. V. 59. № 48. P. 4563–4572. doi: 10.1021/acs.biochem.0c00725. doi: 10.3390/biom12020324.
18. Al-Azzani M., Konig A., Outeiro T.F. // *Biomolecules.* 2022. V. 12. № 2. P. 324. doi: 10.3390/biom12020324.
19. Rossi M., Candelise N., Baiardi S., Capellari S., Giannini G., Orru C.D., Antelmi E., Mammana A., Hughson A.G., Calandra-Buonaura G., et al. // *Acta Neuropathol. (Berl.).* 2020. V. 140. № 1. P. 49–62. doi: 10.1007/s00401-020-02170-6.
20. Morris H.R., Lees A.J. // *JAMA Neurol.* 2024. V. 81. № 9. P. 905–906. doi: 10.1001/jamaneurol.2024.2381.

УДК 577.29

Две ключевые замены в хромофорном окружении белка mKate2 для получения улучшенного FusionRed-подобного красного флуоресцентного белка

Д. А. Ручкин¹, А. С. Гавриков¹, Д. В. Колесов¹, А. Ю. Гороховатский¹, Т. В. Чепурных¹,
А. С. Мишин¹, Е. Г. Максимов², Н. В. Плетнева¹, В. З. Плетнев¹, А. М. Павлова^{1,3},
В. А. Никитин^{1,2}, А. М. Богданов^{1,4*}

¹Государственный научный центр Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119992 Россия

³Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, 117997 Россия

⁴Измирский институт технологий, кафедра фотоники, Измир, 35430 Турция

*E-mail: noobissat@ya.ru

Поступила в редакцию 20.10.2024

Принята к печати 19.02.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27545

РЕФЕРАТ Красные флуоресцентные белки (RFP) часто используются в качестве предпочтительных флуоресцентных меток в микроскопии живых тканей и визуализации целого организма. При выборе конкретного варианта RFP приоритетными могут быть такие характеристики, как молекулярная яркость флуоресценции, скорость созревания хромофора, мономерность, длины волн возбуждения/эмиссии флуоресценции и низкая токсичность, которые в конкретном белке редко сочетаются оптимальным образом. Если же к метке предъявляются дополнительные требования, такие как продолжительное время жизни флуоресценции и/или мигание (blinking), то доступный набор вариантов может существенно сузиться. Поскольку все разнообразие традиционных моногенных RFP относится лишь к нескольким филогенетическим линиям (основные из которых – производные DsRed, eqFP578 и eqFP611), их практически значимые свойства ожидаемо распределены между близкими гомологами. В таких случаях систематический мутационный анализ, ориентированный на вариант-специфичные аминокислотные остатки, может пролить свет на происхождение различий между родственными RFP и быть полезным для объединения их преимуществ в новых вариантах RFP. Так, белок FusionRed, эффективный для флуоресцентного мечения благодаря высокой степени мономерности и низкой цитотоксичности, имеет значительно сниженные яркость и время жизни флуоресценции по сравнению с предковым mKate2. Нами охарактеризован новый быстро созревающий мономерный RFP, полученный на основе mKate2 и FusionRed, превосходящий оба родительских белка по молекулярной яркости, обладающий увеличенным временем жизни флуоресценции и спонтанным миганием, перспективным для наноскопии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА RFP, FusionRed, mKate2, флуоресцентный белок, время жизни флуоресценции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ФБ – флуоресцентные белки; RFP – Red fluorescent protein, красные флуоресцентные белки; FLIM – Fluorescence lifetime imaging microscopy, микроскопия времени жизни флуоресценции; BALM – Bleaching/Blinking Assisted Localization Microscopy, локализационная микроскопия с использованием фотообесцвечивания и мигания; OSER – Organised smooth endoplasmic reticulum, организованный гладкий эндоплазматический ретикулум; NE – nuclear envelope, ядерная оболочка; PEI – полиэтиленмин; SMLM – single molecule localization microscopy, микроскопия одиночных молекул.

ВВЕДЕНИЕ

Современные методы биологической визуализации используют огромное разнообразие флуоресцентных меток, среди которых предпочтение часто отдается генетически кодируемым флуорофорам, таким как флуоресцентные белки (ФБ). ФБ обеспечивают высокоспецифичное внутриклеточное мечение и позволяют реализовать продвинутые модальности флуоресцентной визуализации, микроскопию сверхвысокого разрешения и времени жизни флуоресценции (FLIM) на уровне живых клеток [1, 2]. В свою очередь, красные флуоресцентные белки (RFP), полифилетическая группа [3–6] ФБ из кораллов (Anthozoa), флуоресцирующие в красной области спектра, широко применяются для визуализации мишеней в целом организме и/или в глубине биологической ткани. Красные и дальнекрасные ФБ зачастую оказываются оптимальным вариантом выбора в таких исследованиях благодаря снижению поглощению биологическими тканями света на длинах волн ~600–1200 нм (в так называемом «диагностическом окне») [7–9].

FusionRed – один из существующих вариантов RFP [10], часто используется как метка для визуализации живых клеток (включая визуализацию тонких внутриклеточных структур). Способность FusionRed поддерживать высоко мономерное состояние даже при высоких локальных концентрациях (характерных для некоторых локализаций в клетках млекопитающих [11, 12]) называется «супермономерностью» и сочетается в этом белке с низкой токсичностью и низкой чувствительностью к pH среды. Благодаря такому набору свойств, FusionRed подходит в качестве флуоресцентного ядра для генетически кодируемых индикаторов, а мечение им других белков не влияет на их функциональную активность и пространственную структуру [13–16]. В то же время у FusionRed есть ряд выраженных недостатков, снижающих его практическую ценность как многоцелевого маркера и создающих предпосылки для дальнейшей оптимизации этого RFP. Так, изящные исследования лаборатории Хименеса позволили с помощью направленной белковой эволюции [17] и полурационального дизайна [18] получить более яркие варианты FusionRed (в частности, FusionRed-MQV [19] показал примерно четырехкратный прирост молекулярной яркости относительно родительского белка, хотя и ценой 20 нм гипсохромного сдвига максимума эмиссии). Кроме того, результаты рентгеноструктурного анализа показали, что примерно половина молекул FusionRed несет хромофор в незрелой форме [20]. Эта особенность значительно снижает эффективную яркость FusionRed как флуоресцентной метки (относительно

ожидаемой на основании измеренной молекулярной яркости флуоресцентного белка) и становится еще одним направлением структурно-обоснованного дизайна новых вариантов RFP.

Важно отметить, что FusionRed ($\lambda_{em} = 608$ нм) – дочерний вариант наиболее яркого на данный момент мономерного дальнекрасного ФБ mKate2 ($\lambda_{em} = 633$ нм) [21], от которого он отличается 17 аминокислотными заменами, введенными полурационально при помощи нескольких раундов сайт-направленного и случайного мутагенеза [10]. При этом структурные основы спектральных различий (в коэффициентах экстинкции, квантовых выходах и временах жизни флуоресценции, положениях максимумов поглощения/испускания) между белками FusionRed и mKate2 не установлены. Основываясь на анализе пространственной структуры FusionRed [20], мы сделали предположение о ключевой роли трех остатков в окружении хромофора, Arg-67, Cys-158 и His-197 (Lys-67, Ala-158 и Arg-197 для mKate2 соответственно) как детерминант описанных спектральных различий. В настоящем исследовании мы систематически изучили влияние указанных положений на свойства обоих белков методом сайт-направленного мутагенеза. Среди представителей полученной библиотеки обнаружен вариант, обладающий повышенной яркостью и высоким спектральным сходством с FusionRed – mKate2-K67R/R197H. Этот RFP наследует достоинства обоих родственных белков: моноэкспоненциальное затухание флуоресценции, как у mKate2, и способность эффективно функционировать в составе белков слияния, как у FusionRed. Очищенный mKate2-K67R/R197H продемонстрировал способность к выраженному спонтанному миганию флуоресценции (blinking), открывающую перспективу использования этого белка в микроскопии сверхвысокого разрешения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Сайт-направленный мутагенез

Сайт-направленные аминокислотные замены в mKate2 и FusionRed вносили с использованием модифицированной процедуры IVA-клонирования [22]. Гены исходных RFP клонировали в векторную основу pQE-30 (Qiagen, США) по сайтам эндонуклеаз рестрикции BamHI и HindIII и использовали в качестве матриц для ПЦР. Прямые праймеры содержали 5'-концевую область длиной 15–20 нуклеотидов, гомологичную матричной ДНК, необходимую для бактериальной рекомбинации. За ней следовал триплет с целевой заменой и 3'-концевая область с расчетной температурой отжига

60°C. Обратные праймеры включали аналогичную последовательность для рекомбинации длиной 15–20 нуклеотидов на 5'-конце и 3'-концевую последовательность, вместе составляющие олигонуклеотид с расчетной температурой отжига 60°C. Если расчетные температуры отжига оказывались выше, то 5'-концевой фрагмент отжигался частично. 3'- и 5'-Концевые нуклеотиды обоих праймеров подбирали так, чтобы избежать комплементарного спаривания и минимизировать гомо- и гетеродимеризацию. 3'-Концы праймеров образовывали сильную комплементарную пару с матричной последовательностью. Олигонуклеотиды не образовывали тупых концов при гомо- и гетеродимеризации. В ПЦР использовали полимеразу Phusion (ThermoFisher, США), протокол, рекомендованный производителем, 35 циклов элонгации. Концентрация матричной ДНК составляла 50 нг на реакцию. Последовательности использованных праймеров:

а) FusionRed-R67K:

Прямой – 5'-agcttcacgtacggcagcaaaccttcacgaagcaccctccgg-3'

Обратный – 5'-gctgccgtacatgaagctggtag-3'

б) FusionRed-C158A: описан в предыдущем исследовании [20]

Прямой – 5'-cgggcgccctggaaggcgcagcagacatggccctgaagctcg-3'

Обратный – 5'-tgccgcttcaggccgctcagcggggtacatcgctcg-3'

с) FusionRed-H197R:

Прямой – 5'-ggcgtctacaacgtggacagaagactggaaagaatcaaggagggc-3'

Обратный – 5'-gtccacgtttagacgccgggcatcttgaggttcgtagcg-3'

д) mKate2-K67R:

Прямой – 5'-agcttcacgtacggcagcagaaccttcacgaaccacacccaggg-3'

Обратный – 5'-tgctgccgtacatgaagctggtag-3'

е) mKate2-A158C:

Мутантный вариант получен ранее [21]

Прямой – 5'-ggcctggaaggcagatgcgacatggccctgaagctcg-3'

Обратный – 5'-tctgccttcaggccgctcagcggggtacag-3'

ф) mKate2-R197H:

Прямой – 5'-ggcgtctactatgtggaccacagactggaaagaatcaaggagggc-3'

Обратный – 5'-gtccacatagtagacgccgggcatcttgaggttcttagcg-3'.

Преципитированные продукты ПЦР обрабатывали эндонуклеазой рестрикции DpnI для удаления матриц. При трансформации 100 мкл компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue (Evrogen, Россия) брали 700 нг продукта ПЦР.

Выделение и очистка белка

Варианты ФБ экспрессировали в штамме *E. coli* XL1-Blue в течение 72 ч при 37°C. После центрифугирования бактериальную биомассу ресуспендировали в PBS (GIBCO, ThermoFisher Scientific, США, pH 7.4) и обрабатывали ультразвуком на Sonics Dismembrator (Fisher Scientific, США). Очистку белков проводили на металл-аффинной смоле TALON (Clontech, США), предварительно промытой PBS в соответствии с протоколом производителя. Для элюции использовали 0.3 М раствор имидазола (pH 8.0). Элюаты белков обессоливали и концентрировали методом ультрафильтрации на колонках Amicon Ultra 0.5 10K (Merck Millipore, США). Обессоленный раствор белка (обычно с концентрацией ~5 мг/мл) анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) или спектроскопически, либо кратковременно хранили при 4°C до использования.

Абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия

Спектры поглощения и флуоресценции получали с помощью спектрофотометра Cary100 UV/VIS и спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, США) соответственно. Во всех случаях использовали раствор белка в PBS (pH 7.4). Квантовые выходы флуоресценции и молярные коэффициенты экстинкции определяли как описано ранее [20].

Исследование мономерности

Гель-фильтрация. Колонку Superdex® 200 Increase 10/300 GL (Cytiva, Швеция), уравновешенную 20 мМ натрий-фосфатным буфером (pH 7.4) с концентрацией NaCl 150 мМ, использовали в составе хроматографической системы Agilent 1260 Bio-Inert LC, оснащенной встроенным детектором поглощения и флуоресценции на базе светодиодов (diode array detector) Agilent 1260 и детектором флуоресценции Agilent 1260 при 24°C и со скоростью потока 0.75 мл/мин. Для калибровки использовали цитохром с (12.4 кДа), карбоангидразу (29 кДа), бычий сывороточный альбумин (66 кДа), алкогольдегидрогеназу (150 кДа), β -амилазу (200 кДа) и ферритин (450 кДа). Подробности калибровки представлены на рис. S6 и в табл. S1. Оборудованием управляли с помощью программного обеспечения Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition C.01.07 SR3.

OSER-тест. OSER-тест проводили в двух вариантах. Первый, на клетках HeLa, был аналогичен описанному в [12]. Клетки трансфицировали FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega, США) в со-

ответствии с рекомендациями производителя. Микрофотографии получали с помощью флуоресцентной широкопольной микроскопии на модифицированном инвертированном микроскопе Leica 6000LX, оснащенном флуоресцентным фильтркубом для mCherry (см. раздел «Широкопольная флуоресцентная микроскопия»). Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Fiji ImageJ (версия 2.9.0/1.54b). «Завитки» (whorl-like structures [23]) обнаруживали в соответствии с рекомендациями Constantini и соавт. [23]. Из-за отсутствия этих структур более чем в 80% трансфицированных клеток HeLa и связанной с этим сложности обнаружения достаточного для статистического анализа количества клеток с такими структурами, расчет соотношений интенсивности флуоресценции структур организованного гладкого эндоплазматического ретикулума (organised smooth endoplasmic reticulum, OSER) и ядерных оболочек (nuclear envelope, NE) не проводился.

Второй вариант теста OSER был аналогичен варианту, описанному в [23]. Клетки U2OS трансфицировали с помощью полиэтиленимина (PEI, Sigma-Aldrich, США) и наблюдали спустя 18 ч после трансфекции; изображения анализировали с использованием программного обеспечения Fiji ImageJ для получения средних значений сигналов NE и OSER. Линейные целевые области (ROI) выбирали инструментом обводки «straight»; для ROI OSER использовали инструмент «freehand». Для NE выбирали не менее трех ROI в различных локализациях для каждой клетки. Расчеты проводили в GraphPad Prism10.

Инженерия конструкций для экспрессии в клетках млекопитающих. Плазмиды для экспрессии в клетках млекопитающих кодировали слитые белки Diogenes с виментином (Vimentin-Diogenes), лайфактом (lifeact-Diogenes), энсконсином (ensconsin-Diogenes) и цитокератином (Diogenes-cytokeratin), а также с сигнальной последовательностью мембранного якоря белка эндоплазматического ретикулума CytERM (используемого для OSER). Конструкции получали с помощью методики Golden Gate в соответствии со стандартной процедурой MoClo [24–26]. Для обеспечения экспрессии в клетках млекопитающих каждая транскрипционная единица находилась под контролем цитомегаловирусного (CMV) промотора, содержала последовательность, кодирующую белок слияния, и терминатор SV40. Для Golden Gate использовали T4-лигазный буфер (SibEnzyme, Россия). Каждая реакция включала 10 U T4-лигазы и 20 U эндонуклеаз рестрикции BsaI либо BpiI (ThermoFisher) и 100–200 нг ДНК

каждого фрагмента. Условия реакции включали 30 циклов инкубации при 37°C и 16°C (90 с при 37°C, 180 с при 16°C).

Широкопольная флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентную микроскопию проводили на инвертированном микроскопе Leica 6000LX с масляным иммерсионным объективом Leica HCX PL APO 100X/1.40–0.70NA, камерой Zyla sCMOS (Andor, Великобритания) и источником света CoolLED pE-300, оснащенным кубическим фильтром для mCherry (Leica, Германия) (фильтр возбуждения: 560/40 нм, фильтр эмиссии: 630/75 нм). Мощность освещения варьировали от 1 до 5 Вт/см², время экспозиции составляло от 50 до 150 мс.

Измерение pH-стабильности

При подготовке образцов использовали ряд готовых буферных растворов с pH 3–10.55; растворы содержали (мМ): 130 KCl, 30 NaCl, 0.5 MgCl₂, 0.2 EGTA и 30 HCl–NaH₂C₆H₅O₇ (pH 3.0–4.5) или 15 KH₂PO₄–Na₂HPO₄ (pH 5.0–7.5) или 20 Na₂B₄O₇–HCl/NaOH (pH 8.0–11.0) [27]. Концентрация очищенного и обессоленного RFP в каждом образце составляла 5 мкг/мл. Спектры эмиссии измеряли на флуоресцентном спектрометре Cary Eclipse дважды в трех временных точках (немедленно, 3 и 5 мин спустя, всего 6 измерений на образец) в спектральном диапазоне от 560 до 700 нм при $\lambda_{\text{ex}} = 540$ нм и ширине щелей возбуждения/эмиссии 5 нм, при одинаковом напряжении на фотоумножителе и скорости сканирования. Значения интенсивности флуоресценции в максимумах эмиссии усредняли по 6 измерениям. Усредненные данные при всех значениях pH для каждого RFP нормировали на максимальное значение и отображали на графике со стандартными отклонениями. Для сигмоидных участков графиков строили кривые аппроксимаций в GraphPad Prism10 (логистическая кривая 4PL, 95% доверительный интервал, $n = 6$). pKa определяли по значению pH, при котором показатель нормированной флуоресценции на аппроксимирующей кривой достигал половины от максимального.

Измерение времени жизни флуоресценции

Наносекундный и пикосекундный источники возбуждения. Коррелированный по времени подсчет одиночных фотонов (TCSPC) проводили на флуоресцентном спектрометре miniTau (Edinburgh Instruments, Великобритания) в окне 20 нс, разделенном на 2048 временных каналов. Флуоресценцию возбуждали с помощью: (i) пикосекундного лазера EPL-450 (Edinburgh Instruments, Великобритания)

с центральной длиной волны эмиссии 445.6 нм и шириной импульса (FWHM) примерно 90 пс при частоте повторения 20 МГц; (ii) наносекундного импульсного светодиода EPLED-590 (Edinburgh Instruments, Великобритания) с центральной длиной волны эмиссии 590 нм, шириной импульса (FWHM) примерно 1.3 нс при частоте повторения 20 МГц.

Фотоны регистрировали в спектральном диапазоне 575–625 нм. Обработку данных, визуализацию и определение χ^2 (тест Пирсона) проводили с использованием программного обеспечения Fluoracle 2.5.1 (Edinburgh Instruments, Великобритания).

Фемтосекундный источник возбуждения.

Кинетика затухания флуоресценции RFP была записана с использованием детектора единичных фотонов (SPC) с ультранизким уровнем темнового счета (HPM-100-07C, Becker & Hickl, Германия) в спектральном окне 620/10, настроенном с помощью монохроматора ML-44 (Solar, Беларусь). Флуоресценцию возбуждали при 590 нм (частота повторения 80 МГц, ширина импульса 150 фс, оптическая мощность 5 мВт) с использованием второй гармоники (ASG-O, Avesta Project LTD., Россия) фемтосекундного оптического параметрического осциллятора (TOPOL-1050-C, Avesta Project LTD.), накачиваемого фемтосекундным лазером Yb (ТЕМА-150, Avesta Project LTD.). Сигнал эмиссии собирался перпендикулярно лучу возбуждения. Температуру образца поддерживали на уровне 25°C в течение эксперимента с помощью держателя кюветы (Qpod 2e) с магнитной мешалкой (Quantum Northwest, США). Данные собирали при помощи программного обеспечения SPCM Data Acquisition Software v. 9.89 (Becker & Hickl, Германия). Для экспоненциальной аппроксимации затухания флуоресценции с учетом неполного угасания RFP на высокой частоте повторения использовали ПО SPCImage (Becker & Hickl, Германия). Проводили постобработку и визуализировали данные в Origin Pro 2018 (OriginLab Corporation, США).

Измерения фотостабильности

Очищенные белки, низкая интенсивность возбуждения. Измерения проводили для RFP, иммобилизованных на металл-аффинной смоле TALON, с использованием лазерного сканирующего конфокального инвертированного микроскопа Leica DMIRE2 TCS SP2 (Leica Microsystems, Германия), оснащенного масляным иммерсионным объективом HCX PL APO lbd.BL 63× 1.4NA и HeNe-лазером мощностью 1.2 мВт. Флуоресценцию возбуждали лазером с линией испускания 543 нм и детектировали

в спектральном диапазоне 560–670 нм. Выбранное поле зрения (при увеличении 16×) непрерывно сканировали в режиме time-lapse (between the frames), количество изображений в серии 500–1500. Красный сигнал детектировали при мощности лазера 10–20% и напряжении фотоумножителя (ФЭУ, PMT) 700–800 В. Для фотообесцвечивания флуорофоров применяли максимальную мощность лазера (что обеспечивало плотность мощности около 2 Вт/см²). Измерения флуоресценции корректировали на фоновый сигнал, усредняли ($n = 5$) и нормировали по максимальному значению. Общую мощность возбуждающего света на выходе из объектива микроскопа измеряли с использованием измерителя мощности LaserCheck (Coherent, США). Плотность мощности излучения (Вт/см²) определяли как частное общей мощности и площади сканируемой области.

Измерения фотостабильности in cellulo, высокая интенсивность возбуждения.

RFP транзитивно экспрессировали в клетках линии HeLa без сигнала специфической внутриклеточной локализации. Кинетику фотообесцвечивания измеряли на микроскопе Nanoimager S (ONI, Великобритания), оснащенный масляным иммерсионным объективом Olympus UPlanSApo 100× NA 1.40, лазером с длиной волны 561 нм, дихроическим делителем луча 560 нм и камерой Scope8 sCMOS. Плотность мощности при облучении составляла 800 Вт/см². Сигнал записывали непрерывно с минимальными задержками между кадрами. Данные анализировали с использованием Fiji ImageJ версии 1.53f51 [28].

Микроскопия локализации одиночных молекул

Непосредственно перед визуализацией культуральную среду заменяли на минимальную среду (MEM, Sigma-Aldrich, США), содержащую 20 мМ HEPES. Для локализационной микроскопии с использованием фотообесцвечивания/мигания (BALM) использовали микроскоп Nanoimager S (ONI, Великобритания), оснащенный масляным иммерсионным объективом Olympus UPlanSApo ×100 NA 1.40, лазером 561 нм, дихроическим делителем луча 560 нм и камерой Scope8 sCMOS. Визуализацию выполняли при следующих условиях: лазер 561 нм с мощностью 2 кВт/см², временем регистрации кадра 16.7 мс и скоростью захвата 60 кадров в секунду. Съемку с использованием вспышек лазера 405 нм проводили при следующих условиях: лазер 561 нм с мощностью 2 кВт/см² с 0.4-секундными вспышками лазера 405 нм с плотностью мощности ~215 Вт/см² каждые 22 с, временем регистрации кадра 16.7 мс и скоростью захвата 60 кадров/с.

Различие между отношением сигнал/шум локализаций mKate2-K67R/R197H, TagRFP-T и mKate2 проверяли с использованием теста Колмогорова–Смирнова. Мигания одиночных молекул и реконструкцию сверхразрешенных изображений осуществляли с использованием программного обеспечения NimOS 490 версии 1.18.3.15066 (ONI, Великобритания). Для реконструкции изображения использовали стандартные параметры. Данные анализировали с использованием Fiji ImageJ версии 1.53f51 [29] и пользовательских скриптов на Python 3.9.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Положения 67, 158 и 197 ранее были идентифицированы как ключевые, регулирующие поведение хромофора FusionRed [20]. Чтобы конкретизировать вклад отдельных аминокислотных замен в окружении хромофоров FusionRed и mKate2, определяющих различия между физико-химическими свойствами этих белков, мы провели систематический мутационный анализ. Мутантные варианты в полученном наборе отличались от родительских белков по одному, двум либо трем указанным аминокислотным положениям (*рис. S1*).

Характеристика мутантных вариантов FusionRed и mKate2

Варианты, несущие одиночные аминокислотные замены. Показаны различия в эффектах замены в положении 67 (Arg→Lys) в исходных белках. Так, вариант mKate2-K67R практически не поглощал и не излучал в видимом диапазоне спектра. Эта аминокислотная замена, вероятно, существенно повлияла на сворачивание белка и/или созревание его хромофора. Напротив, обнаружено несколько спектральных форм FusionRed-R67K, которые, вероятно, соответствуют различным структурам хромофора (*табл. 1, рис. S2*). Пики поглощения FusionRed-R67K совпадали с пиками возбуждения флуоресценции: 389, 514 и 580 нм. Красная флуоресцентная форма ($\lambda_{\text{abs/ex}} = 580$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 610$ нм) была близка к таковой в исходном FusionRed, в то время как обе коротковолновые спектральные популяции, предположительно, соответствовали интермедиатам «созревания» хромофора.

Мы предполагаем, что синяя спектральная форма ($\lambda_{\text{abs/ex}} = 389$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 450$ нм) соответствует нейтральному GFP-подобному хромофору – хорошо описанному промежуточному продукту созревания DsRed-подобного хромофора [30, 31]. Желтая флуоресцентная форма ($\lambda_{\text{abs/ex}} = 514$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 522$ нм) FusionRed-R67K, спектрально схожая с классиче-

скими желтыми флуоресцентными белками (EYFP, TagYFP) с GFP-подобным хромофором, формирующим π -стекинг-взаимодействие с остатком тирозина-203 [32], менее типична для RFP. Возможно, замена R67K привела к частичному «замораживанию» созревания хромофора FusionRed на предпоследнем этапе окисления, где GFP-подобный интермедиат хромофора в анионной форме (обычно поглощающий на 470–500 нм) мог сформировать стекинг-взаимодействие с имидазольным кольцом гистидина-197, претерпев батохромный спектральный сдвиг.

Влияние замены в позиции 158 (Cys→Ala) на спектральные свойства FusionRed и mKate2 было описано ранее [20]. Хотя эта замена не привела к образованию новых спектральных форм или сильному ингибированию созревания хромофора (или заметным изменениям молекулярной яркости), мы включаем данные о соответствующих мутантах (FusionRed-C158A и mKate2-A158C) в *табл. 1* для единообразия.

Замены в положении 197 (His→Arg) вызывали изменения физико-химических свойств белков, противоположные вызванным заменой R67K/K67R. Подобно mKate2-K67R, FusionRed-H197R практически не поглощал в видимом спектральном диапазоне и почти не флуоресцировал в силу нарушенного созревания хромофора. Максимумы поглощения mKate2-R197H располагались на длинах волн 385, 510 и 582 нм. Последние две соответствовали также максимумам возбуждения флуоресценции с $\lambda_{\text{em}} = 520$ и 612 нм соответственно (*табл. 1, рис. S3*). Идентичность и происхождение этих спектральных форм предположительно совпадают с таковыми для FusionRed-R67K. Выраженный гипсохромный сдвиг максимумов поглощения/эмиссии красной формы mKate2-R197H по сравнению с исходным белком mKate2 (582/612 нм против 588/633 нм) подтверждает ключевую роль His-197 в детерминировании спектрального своеобразия FusionRed.

Варианты, содержащие комбинации из двух аминокислотных замен. Введение двух аминокислотных замен в оба белка в целом снижало эффективность созревания хромофора. Три из шести полученных вариантов с двумя заменами имели либо чрезвычайно слабые, либо не детектируемые полосы поглощения и эмиссии флуоресценции в видимом диапазоне (см. *табл. 1*). У сравнительно яркого варианта FusionRed-R67K/H197R замены в позициях 67 и 197 компенсировали эффекты друг друга. В этом белке замена R67K, по видимому, способствует «разблокированию» созревания хромофора, которое ингибируется заменой H197R. У FusionRed-R67K/H197R обнаружены три

Таблица 1. Спектральные свойства и особенности созревания хромофора, наблюдаемые в наборе одиночных, двойных и тройных реципрокных мутантных вариантов FusionRed и mKate2

Белок	Максимум поглощения, нм	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$, нм	EC ^a (M ⁻¹ cm ⁻¹)	FQY ^b	Молекулярная яркость (EC×QY/1000)	Комментарий
FusionRed- R67K/C158A/H197R	376; 488; 583	376/409; 488/508; 583/616	н/о	<0.05	н/о	Плохое созревание*
FusionRed- C158A/H197R	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	Плохое созревание*
FusionRed- R67K/H197R	380; 488; 584	380/449; 488/511; 584/616	н/о	0.62	н/о	
FusionRed- R67K/C158A	386; 513; 580	н/о	н/о	н/о	н/о	Плохое созревание*
FusionRed-H197R	н/о	570/607	н/о	<0.01	н/о	Плохое созревание*
FusionRed-C158A	571	571/598	91 000	0.24	21.84	[20]
FusionRed-R67K	389; 514; 580	389/450; 514/522; 580/610	н/о	0.3	н/о	
FusionRed	580	580/608	94 500	0.19	17.9	[10]
mKate2	586	588/633	62 500	0.4	25	[21, 33]
mKate2-K67R	405; 588	н/о	н/о	н/о	н/о	Плохое созревание*
mKate2-A158C	380; 590	590/624	47 300	0.47	22.2	[20]
mKate2-R197H	385; 510; 582	510/520; 582/612	н/о	0.26	н/о	
mKate2-K67R/A158C	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	Плохое созревание*
mKate2-K67R/R197H	579	579/603	90 000	0.44	39.6	
mKate2-A158C/R197H	380; 513; 583	380/435; 583/611	н/о	0.39	н/о	
mKate2-K67R/A158C/R197H	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	Плохое созревание*

Примечание. н/о – не определен.

*Коэффициент молярной экстинкции; не определялся для вариантов с несколькими спектральными формами.

^bКвантовый выход флуоресценции; измерялся только для красной спектральной формы.

*Пометка применялась в случаях, если через 48 ч после трансформации наблюдалась слабая или не детектируемая флуоресценция биомассы бактерий и/или низкое относительное поглощение в спектральном диапазоне, связанном с поглощением хромофора (например, A280/A580 > 10).

флуоресцентные формы (табл. 1, рис. S4): нейтральная синяя GFP-подобная ($\lambda_{abs/ex} = 380$ нм, $\lambda_{em} = 449$ нм), анионная зеленая GFP-подобная ($\lambda_{abs/ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 511$ нм) и красная DsRed-подобная ($\lambda_{abs/ex} = 584$ нм, $\lambda_{em} = 616$ нм). Красная флуоресцентная форма FusionRed-R67K/H197R показала выраженный батохромный сдвиг как спектра поглощения, так и спектра эмиссии флуоресценции (на 4 и 8 нм соответственно) по сравнению с исходным FusionRed, что дополнительно указывает на роль заместителя в позиции 197 в детерминировании спектрального своеобразия красных флуоресцентных белков.

Вариант mKate2-A158C/R197H показал сложное спектральное поведение (табл. 1, рис. S5), схожее с наблюдаемым у белков FusionRed R67K и mKate2 R197H. Замена R197H в mKate2-A158C/R197H, веро-

ятно, привела к гипсохромному сдвигу спектра флуоресценции красной формы и вовлечению незрелой «зеленой» формы хромофора в стеклинг-взаимодействие, приводящее к образованию «желтой» нефлуоресцентной спектральной формы с максимумом поглощения при 513 нм. Среди всех полученных реципрокных вариантов только mKate2-K67R/R197H показал высокую скорость созревания хромофора и молекулярную яркость. Квантовый выход флуоресценции 0.44 и коэффициент экстинкции 90 000 делают его в 1.6 раза ярче, чем mKate2, и в 2.2 раза ярче, чем FusionRed. В отличие от исходного белка этот вариант не имел дополнительных коротковолновых пиков поглощения на ~390 и ~450 нм, которые мы приписываем незрелым формам хромофора. У смещенной в синюю область основной полосы поглощения mKate2-K67R/R197H присутствовало

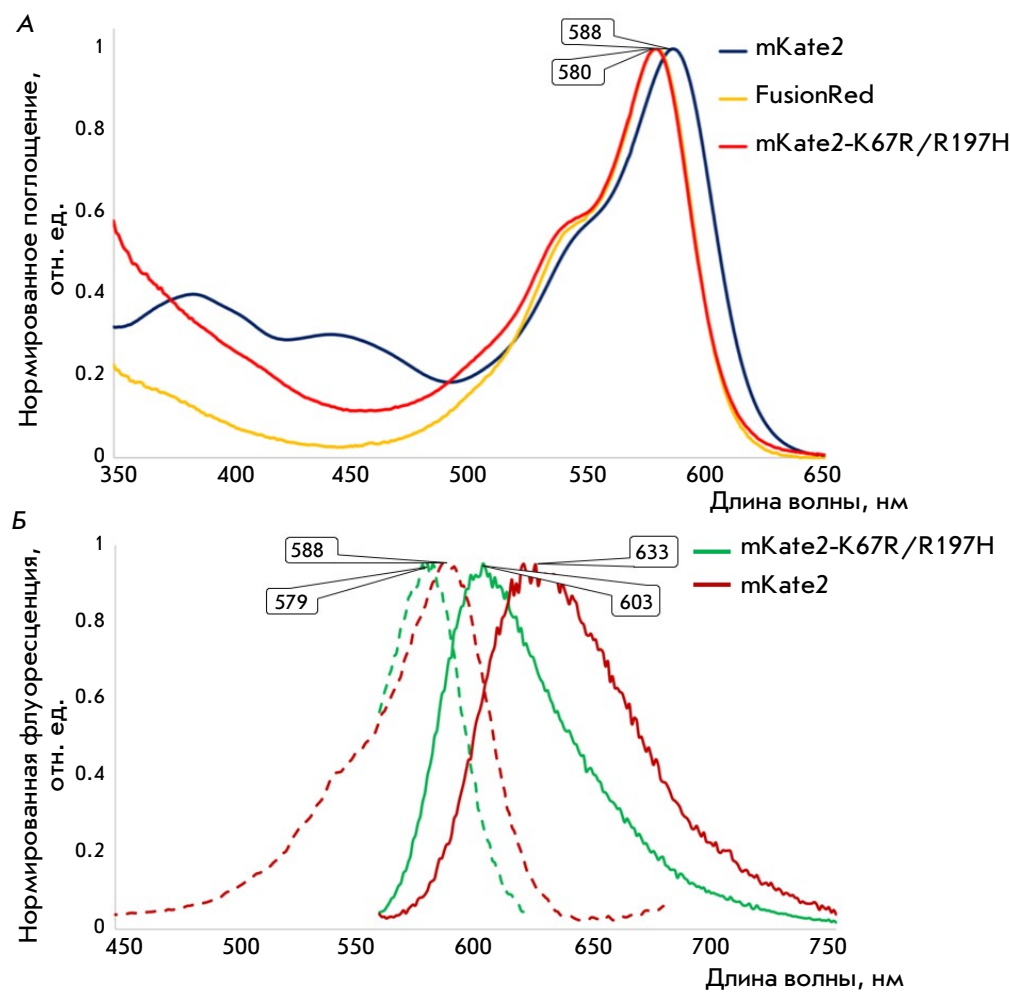


Рис. 1. Сравнение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) mKate2-K67R/R197H, mKate2 и FusionRed (только поглощение). Длины волн максимумов основных полос показаны в пузырьках. На панели Б пунктирные линии соответствуют возбуждению флуоресценции, а сплошные линии – эмиссии флуоресценции

Таблица 2. Спектральные характеристики mKate2, FusionRed и mKate2-K67R/R197H (Diogenes)

Белок	λ_{ex} , нм	λ_{em} , нм	ЕС (М ⁻¹ · см ⁻¹)	FQY	Молекулярная яркость (ЕС · FQY/1000)	Время жизни флуоресценции, нс [#]
mKate2	588	633	62500	0.4	25	2.4 ¹ /2.05 ¹
FusionRed	580	608	94500	0.19	17.955	1.6 ²
mKate2-K67R/R197H	579	603	90000	0.44	39.6	2.2 ¹

[#]Взвешенное по интенсивностям среднее время жизни флуоресценции. Показаны два времени жизни mKate2, полученные при разных режимах съемки (см. раздел «Измерение времени жизни флуоресценции»).

¹Моноэкспоненциальное затухание с $\chi^2 \leq 1.3$.

²Бизэкспоненциальное затухание с $\chi^2 \leq 1.3$.

ярко выраженное плечо при ~540 нм, характерное для FusionRed (табл. 1 и 2, рис. 1).

Варианты, содержащие комбинации из трех аминокислотных замен. Введение полного набора замен в положениях 67/158/197 значительно повлияло на созревание белков. Полосы поглощения и эмиссии флуоресценции в видимом диапазоне обоих вариантов, содержащих замены по трем положениям (mKate2-K67R/A158C/R197H и FusionRed-C158A/H197R/R67K),

не детектировались либо были чрезвычайно слабыми (см. табл. 1), что указывает на «замораживание» созревания хромофора на ранних стадиях. Эти варианты оказались малоинформативными для определения молекулярных детерминант спектрального своеобразия FusionRed/mKate2.

Наш фенотипический анализ указывает на вероятное смещение хромофора внутри β -бочонка в результате внесения замены в положение 67, так как спектроскопические признаки

π -стекингового взаимодействия хромофора с гистидином-197 (если обнаруживались) отличались у мутантов по этому положению от родительских белков. Замены в обоих этих положениях (67 и 197) во всех случаях, кроме mKate2-K67R/R197H, либо значительно влияли на созревание хромофора, либо приводили к возникновению коротковолновых спектральных форм, соответствующих промежуточным стадиям созревания хромофора. Замены в положении 197 вызывали спектральные сдвиги: батохромный сдвиг поглощения/эмиссии у производных FusionRed и гипсохромный сдвиг у производных mKate2. Мы предполагаем, что причиной этого может быть π -стекинговое взаимодействие между хромофором и гистидином-197, которое включается/выключается за счет внесенных мутаций. Кроме того, эти мутации оказывают заметное влияние на процесс созревания хромофора.

Физико-химические свойства mKate2-K67R/R197H и его применение в микроскопии

Далее мы детально охарактеризовали физико-химические свойства мутанта mKate2-K67R/R197H, который назвали Diogenes, с акцентом на его применение в клеточной флуоресцентной микроскопии.

Олигомерное состояние и флуоресцентное мечение. Так как олигомеризация значительно влияет на инвазивность и эффективность мечення внутриклеточных мишеней, мы в первую очередь проанализировали олигомерный статус Diogenes. При гель-фильтрации (рис. S6, рис. S7) очищенный белок элюировался в виде одного пика с молекулярной массой около 38 кДа (при концентрации по крайней мере до 5 мг/мл). Поскольку эта молекулярная масса не соответствовала ни мономеру (~25 кДа), ни димеру (~50 кДа), результат гель-фильтрации нельзя было однозначно интерпретировать. Предполагается, что в водном растворе концентрированный Diogenes либо строго мономерен, либо формирует исключительно димерную форму – с аномальной хроматографической подвижностью в обоих случаях. Возможно, Diogenes формирует равновесную смесь мономерных и димерных форм.

mKate2 изначально был описан как мономер [21], но в дальнейшем была показана некоторая его склонность к олигомеризации в водных растворах при высокой концентрации [10] и *in cellulose* [12]. Так как Diogenes получен из mKate2, предположили, что он обладает подобной склонностью. Важно было также сравнить Diogenes с его спектральным аналогом FusionRed, который в ходе разработки подвергся значительной оптимизации внешней по-

верхности β -бочонка, направленной на устранение остатков, потенциально важных для димеризации [10]. Действительно, очищенный FusionRed ведет себя как строгий мономер [10] и показывает более высокий ранг мономерности, чем mKate2, при исследовании в живых клетках ($91.5 \pm 3.0\%$ против $81.1 \pm 6.1\%$ в анализе OSER [12]). Однако причинно-следственная связь между улучшенными показателями FusionRed *in cellulose* и введенными мутациями остается неясной, поскольку рациональный дизайн этих замен опирался на пространственную структуру mKate [34], а не mKate2. Более того, сворачивание белка и молекулярные взаимодействия в кристаллах могут не полностью соответствовать наблюдаемому в водной фазе [35, 36]. В любом случае неоднозначная хроматографическая картина Diogenes побудила нас оценить его олигомерное состояние также *in cellulose*.

С этой целью мы применили анализ структур организованного гладкого эндоплазматического ретикулума (OSER) [23], который стал фактическим стандартом оценки мономерности флуоресцентных белков при экспрессии в клетках млекопитающих [12, 37]. Мы провели OSER-анализ двумя способами. В клетках линии HeLa применяли широко используемую упрощенную фенотипическую оценку частотности клеточных OSER-фенотипов. В клетках линии U2OS в соответствии с оригинальной методикой, предложенной Costantini и соавт., определяли соотношение флуоресцентных сигналов OSER:NE в каждой клетке. В клетках HeLa выявлено ~87% клеток без завитков (рис. 2A), что указывает на относительно высокую мономерность. Полученное значение упрощенной оценки Diogenes находится между значениями для FusionRed и mKate2, опубликованными ранее [12]. Следует отметить, что помимо очевидных OSER- и не-OSER-фенотипов мы наблюдали фракцию клеток, обладающую фенотипическими признаками, которые, вероятно, не следует относить к типичному фенотипу гладкого ЭР (мелкие точки, гранулы, локальные области с повышенной яркостью). Мы обозначили эту группу, составляющую ~23% от всей популяции клеток, как «смешанный фенотип» (рис. 2B). Обнаруженные нетипичные структуры могут указывать на агрегацию белка или его неспецифические взаимодействия с внутриклеточной средой, что, возможно, ограничивает его применимость для решения некоторых специфических задач. Среднее отношение OSER:NE Diogenes, выявленное при анализе OSER в U2OS, составило 2.175 с медианой 1.986 и стандартным отклонением 0.9299 (рис. 2B). Несмотря на относительно большое стандартное отклонение как среднее OSER : NE, так и медиана позволяют

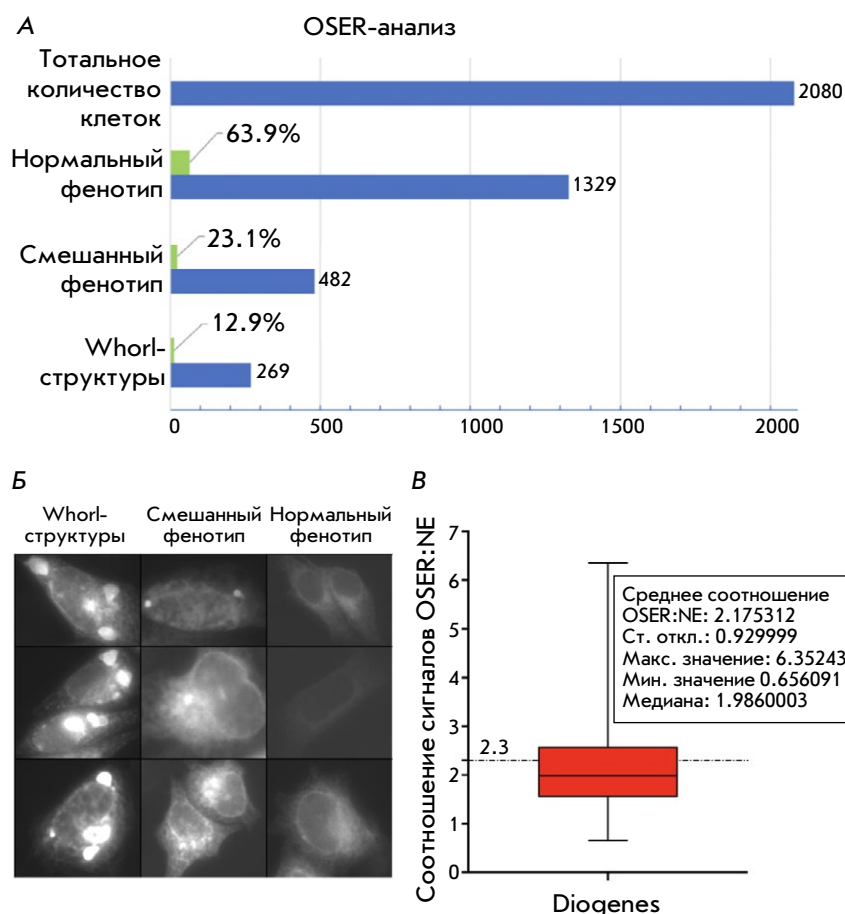


Рис. 2. Результаты OSER-анализа Diogenes. **А** – гистограмма, показывающая общее количество клеток (HeLa) и распределение трех фенотипов между ними. Столбец «Whorl-структуры» характеризует клетки, в которых гомоолигомеризация метки привела к образованию типичных структур организованного гладкого эндоплазматического ретикулула (OSER) («завитков», whorls), как они были описаны [12, 23]. Строка «Смешанный фенотип» представляет случаи, где наблюдаются артефакты, отличные от типичных «завитков» (мелкие точки, гранулы, области с локально повышенной яркостью). Строка «Нормальный фенотип» иллюстрирует клетки с равномерно окрашенной трубчатой сетью ЭР. **Б** – иллюстрация фенотипов, наблюдаемых в живых клетках HeLa при OSER-анализе. **В** – количественный анализ соотношения интенсивности OSER : NE в живых клетках U2OS. Красный прямоугольник обозначает 25–75 процентиль; усы обозначают минимальное и максимальное значение выборки. Горизонтальная линия внутри прямоугольника обозначает медиану; штрихпунктирная линия на уровне 2.3 обозначает пороговое значение OSER : NE для мономера [23]. Описательная статистика данных показана на вставке

нам считать Diogenes мономерным белком при установленном ранее пороговом значении OSER : NE $\leq 2.3 \pm 0.6$ [23]. Наконец, мы подготовили несколько экспрессионных конструкций для визуальной оценки эффективности Diogenes в качестве флуоресцентного ядра в слитых белках в клетках млекопитающих. В качестве мишеней были выбраны белки цитоскелета, качество визуализации которых, согласно нашему опыту, существенно зависит от степени олигомеризации метки (рис. 3). Субъективно мы оцениваем качество мечения как очень высокое.

pH-стабильность Diogenes. Сравнение интенсивностей флуоресценции Diogenes и родственных ему mKate2 и FusionRed в диапазоне pH 3–11 (рис. S8, S9) продемонстрировало высокую pH-стабильность Diogenes, аналогичную стабильности mKate2, одного из наиболее pH-стабильных RFP. В частности, Diogenes поддерживает уровень флуоресценции $\geq 80\%$ от максимального в наиболее физиологически и биохимически значимом диапазоне (pH 6.5–9.5). В кислом диапазоне (pH 3–6) Diogenes показал худшую относительную яркость, чем FusionRed, но немного превзошел mKate2. Значения pKa у Diogenes, FusionRed и mKate2 составили 6.1, 5.76 и 6.16 со-

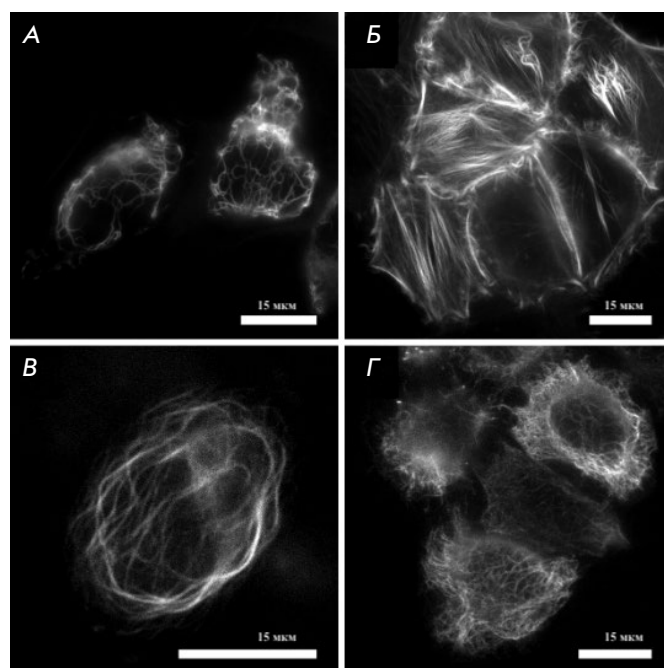


Рис. 3. Флуоресцентные изображения внутриклеточных структур, меченных Diogenes в живых HeLa Kyoto. Виментин (А), лайфакт (Б), энксонсин (В), цитокератин (Г)

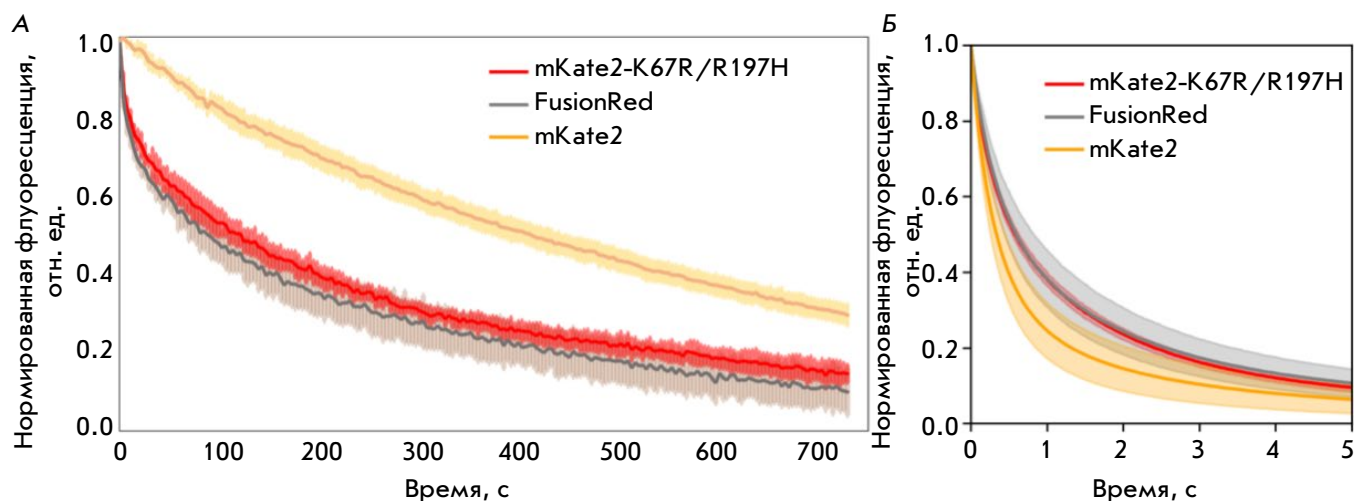


Рис. 4. Кинетика фотообесцвечивания RFP mKate2-K67R/R197H (Diogenes), mKate2 и FusionRed в водном растворе очищенного белка при плотности мощности возбуждения ~ 2 Вт/см² (А) и живых клетках HeLa при ~ 1 кВт/см² (Б). Сплошные линии указывают среднюю интенсивность флуоресценции во время фотообесцвечивания. Прозрачные области показывают стандартное отклонение (пять покрытых белком частиц металл-аффинной смолы либо 20 клеток для каждого флуоресцентного белка)

ответственно (рис. S9). В отличие от обоих родственных белков, у Diogenes интенсивность флуоресценции резко снижалась в щелочном диапазоне (pH 10–11), не имеющем, однако, большого биологического значения.

Время жизни флуоресценции. Мы измерили кинетику затухания флуоресценции очищенного mKate2-K67R/R197H в водном растворе, используя метод коррелированного по времени счета отдельных фотонов (TCSPC) в трех различных аппаратных конфигурациях (рис. S10–S12). Во всех случаях затухание флуоресценции Diogenes было моноэкспоненциальным со значением времени жизни ~ 2.2 нс. Аналогично, во всех аппаратных конфигурациях наблюдалось биэкспоненциальное затухание флуоресценции FusionRed со средним (взвешенным по интенсивности) временем жизни ~ 1.6 нс. Время жизни флуоресценции mKate2, однако, зависело от оборудования. Так, при возбуждении пикосекундным лазером 450 нм (FWHM ~ 100 пс, 20 МГц) и наносекундным импульсным светодиодом 590 нм (FWHM ~ 1.5 нс, 20 МГц) его время жизни составило 2.4 нс (см. рис. S10 и рис. S12), тогда как при возбуждении фемтосекундным лазером 590 нм (FWHM ~ 150 фс, 80 МГц) – 2.05 нс (рис. S11). Причины этого явления остаются неясными. Оно может быть следствием процессов, происходящих в mKate2 и родственных белках в возбужденном состоянии [30, 38]. Принимая во внимание длины волн возбуждения/эмиссии флуоресценции Diogenes, mRuby

[39] или mRuby2 [40] можно рассматривать как его близких конкурентов с точки зрения яркости/времени жизни флуоресценции.

Фотостабильность Diogenes. При выборе метки для традиционной флуоресцентной визуализации и микроскопии с высоким пространственным и временным разрешением [41] важно учитывать ее высокую фотостабильность. Однако известно, что динамика фотообесцвечивания метки может нелинейно зависеть от мощности источника возбуждения [12, 41]. Поэтому мы измерили фотостабильность Diogenes в двух различных модельных системах (см. рис. 4). Очищенный Diogenes в водной среде (иммобилизованный на микрочастицах) оказался несколько стабильнее FusionRed при плотности мощности, типичной для широкопольного флуоресцентного микроскопа (~ 2 Вт/см²) (время полуобесцвечивания $t_{1/2}$ составило 215 с у Diogenes против 165 с у FusionRed). При этом Diogenes оказался значительно менее фотостабильным, чем mKate2 ($t_{1/2} \sim 590$ с, рис. 4А). Однако при высокоинтенсивном (~ 1 кВт/см²) возбуждении, типичном для микроскопии одиночных молекул (single molecule localization microscopy, SMLM) в живых клетках HeLa, новый RFP показал примерно в 2 раза более высокую фотостабильность, чем mKate2 (рис. 4Б), и мало отличался от FusionRed, обладающего значительно меньшей молекулярной яркостью, что позволяло ожидать большую фотостабильность.

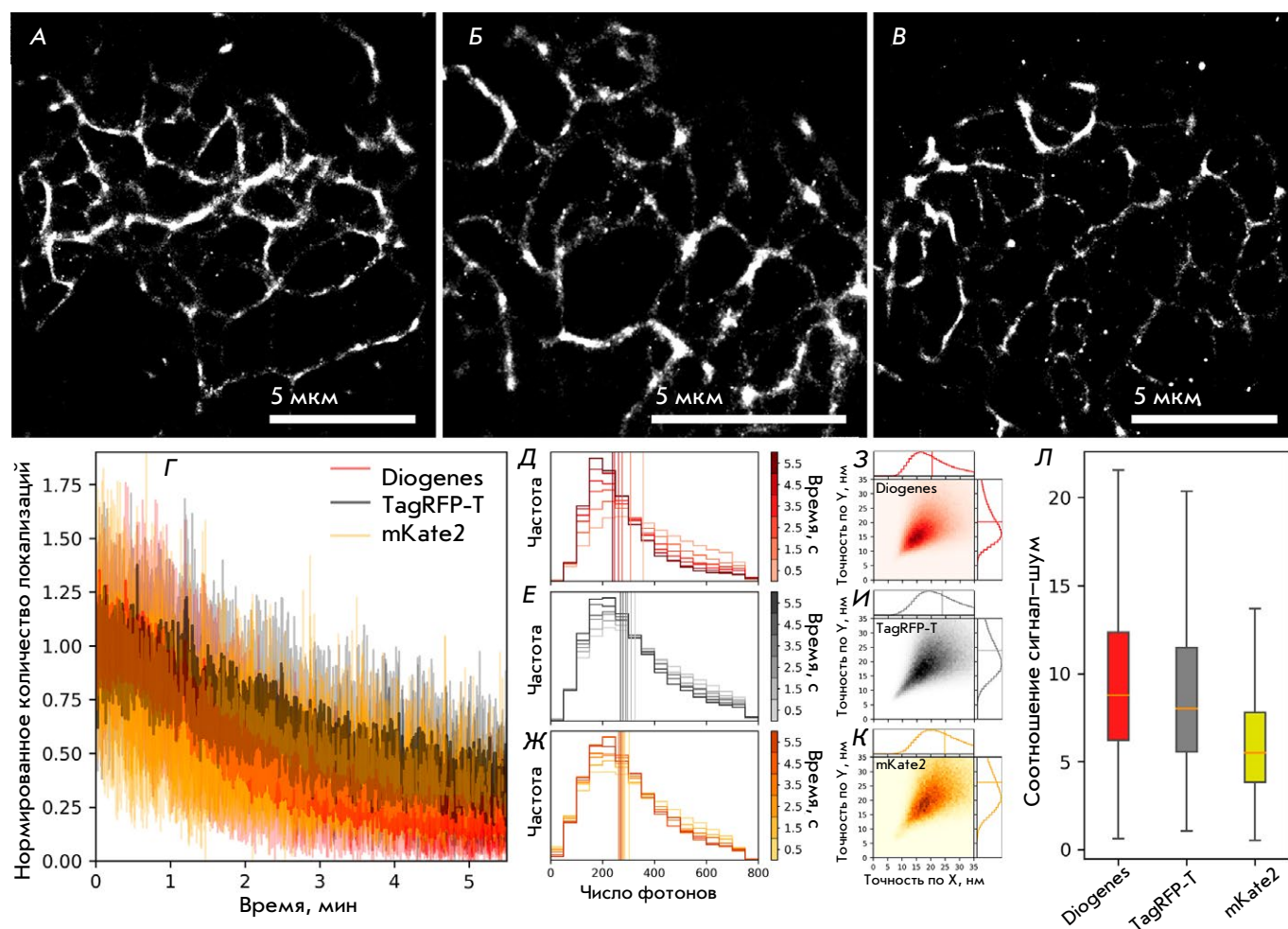


Рис. 5. Сравнение результатов микроскопии сверхвысокого разрешения при визуализации живых клеток HeLa, экспрессирующих Diogenes, TagRFP-T и mKate2, слитые с виментином (лазер 2 кВт/см² 561 нм, время кадра 16.7 мс, 20 000 кадров). Сверхразрешенные изображения HeLa, временно экспрессирующих виментин-Diogenes, виментин-TagRFP-T и виментин-mKate2 соответственно (А, Б, В). Стабильность плотности локализации Diogenes, TagRFP-T и mKate2 соответственно (Г). Гистограмма изменений числа обнаруженных фотонов на событие с одиночной молекулой Diogenes, TagRFP-T и mKate2 соответственно; вертикальные линии представляют собой медианные значения (Д, Е, Ж). 2D-гистограммы точности локализации на событие с одиночной молекулой Diogenes, TagRFP-T и mKate2 соответственно (З, И, К); медианные значения показаны как вертикальные линии на 1D-гистограммах. Отношение сигнал/шум обнаруженных локализаций (Л); усы показывают стандартное отклонение, оранжевые горизонтальные линии указывают медианные значения

Поведение mKate2-K67R/R197H в режиме детекции одиночных молекул

Увеличенная фотостабильность Diogenes при высокой мощности возбуждения, аналогичной применяемой в SMLM, побудила нас исследовать Diogenes на уровне одиночных молекул. Предварительные измерения, выполненные с использованием настроек флуоресцентного микроскопа сверхвысокого разрешения, подобных dSTORM, на каплях очищенного белка, выявили выраженное стохастическое мигание (blinking) Diogenes (данные не показаны). Важно, что красные и дальнекрасные FP, включая mScarlet, mKate2, TagRFP, FusionRed и FusionRed-

MQ, хотя и демонстрируют мигание [28, 42, 43], в основном уступают зеленым флуоресцентным белкам [42] в режиме визуализации одиночных молекул. Поэтому в методах SMLM, в которых спонтанное мигание используется для уточнения локализации меченых молекул, эта способность имеет важное значение для оценки новых вариантов RFP.

Мы изучили спонтанное мигание Diogenes *in cellulo* и его применимость для визуализации внутриклеточных структур с улучшенным разрешением с помощью микроскопии одиночных молекул (SMLM). Для сравнения мы использовали родительский белок mKate2 и обладающий самым

выраженным миганием среди исследованных RFP TagRFP-T [42]. Сравнение поведения одиночных молекул Diogenes, TagRFP-T и mKate2, слитых с виментином, проводили в модельной системе, где они временно экспрессировались в живых клетках HeLa (рис. 5).

При плотности мощности лазерного излучения 2 кВт/см² при 561 нм и времени кадра 16.7 мс все белки мигали на уровне одиночных молекул, позволяя получить изображения волокон виментина сверхвысокого разрешения в живых клетках HeLa (рис. 5А–В). Согласно результатам сравнительного анализа, стабильность плотности локализаций была сходной у всех трех белков (рис. 5Г). Кроме того, разница в медианном значении яркости одиночной молекулы сравниваемых белков не была значимой (рис. 5Д–Ж). Точность локализаций Diogenes оказалась выше, чем у mKate2 и TagRFP-T (20.5 нм против 24 нм и 25 нм соответственно, рис. 5З–К), в то время как медианное значение отношения сигнал/шум у Diogenes было примерно в 1.5 раза выше, чем у mKate2, хотя статистически значимые различия в общих наборах значений сигнал/шум отсутствовали (рис. 5Л). Таким образом, эффективность Diogenes в SMLM живых клеток находится на одном уровне или превышает эффективность TagRFP-T, показанную ранее для этого метода микроскопии [42]. Однако он уступает по стабильности плотности локализаций, молекулярной яркости и точности локализаций зеленым флуоресцентным белкам, способным к спонтанному миганию (например, mNeonGreen [44] и mBaoJin [45]). Интересно, что дополнительное облучение лазером с длиной волны 405 нм во время визуализации повлияло на плотность локализаций всех трех белков (рис. 5М). Короткие импульсы фиолетового лазера (плотность мощности около 200 Вт/см²) значительно увеличили количество зарегистрированных локализаций для всех трех белков. Хотя этих экспериментальных данных недостаточно для однозначного вывода о природе этого явления, можно предположить, что коротковолновое излучение дополнительно влияет на созревание хромофора и/или переключает хромофор из долгоживущего темного во флуоресцентное состояние (например, путем *цис-транс*-изомеризации хромофора).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этом исследовании мы систематически проанализировали библиотеку реципрокных мутантов дальнекрасного флуоресцентного белка mKate2 и дочернего FusionRed для определения влияния трех остатков в окружении хромофора (Arg/Lys-67, Cys/Ala-158, His/Arg-197) на фотофизические иден-

тичности этих широко используемых генетически кодируемых меток.

Один из представителей полученной библиотеки, mKate2-K67R/R197H, который мы назвали Diogenes, показал хорошее сочетание физико-химических и спектральных свойств и, по нашему мнению, представляет собой перспективную метку как для традиционных методов флуоресцентной микроскопии, так и для более новых модальностей с высоким временным (FLIM) и пространственным (SMLM) разрешением. Он наследует преимущества обоих родительских RFP, в частности, моноэкспоненциальное затухание флуоресценции, как mKate2, хорошую эффективность в белках слияния, как FusionRed, и высокую молекулярную яркость, превосходящую яркость обоих упомянутых RFP. По мономерности Diogenes превосходит родительский mKate2 и, возможно, приближается к уровню FusionRed. Стоит отметить относительно высокую фотостабильность Diogenes (особенно при нормировке на молекулярную яркость белка) в условиях интенсивного облучения, а также его способность к фотоактивации, индуцированной облучением (405 нм) и потенциально применимой для модуляции его поведения на уровне одиночных молекул в условиях многофотонной микроскопии живых клеток. Наши результаты косвенно указывают на присутствие в популяции молекул Diogenes некоторого количества молекул в переходных темновых состояниях (рис. S10). Вместе с данными абсорбционной спектроскопии (рис. 1А) это может свидетельствовать о более высоком качестве созревания хромофора и его стерической адаптации внутри молекулы белка по сравнению с родственными RFP.

Отметим, что по сравнению со своим спектральным аналогом (FusionRed) Diogenes несет минимальное количество мутаций относительно родительского mKate2. Более того, комбинация замен (K67R/R197H), обнаруженная при анализе реципрокной библиотеки, ранее была независимо перенесена из яркого, но склонного к олигомеризации белка TagRFP, в практически нефлуоресцентный мономер mKate2.5 для получения FusionRed [10]. Как и FusionRed [18, 46], Diogenes может стать отправной точкой дальнейших полурациональных улучшений красных флуоресцентных белков, в частности, использующих современные высокопроизводительные подходы. ●

Работа поддержана грантом Российского
научного фонда (РНФ) № 23-24-00011.

Приложения доступны на сайте
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.27545>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cardarelli F. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 11. P. 4164.
- Rodriguez E.A., Campbell R.E., Lin J.Y., Lin M.Z., Miyawaki A., Palmer A.E., Shu X., Zhang J., Tsien R.Y. // *Trends Biochem. Sci.* 2017. V. 42. № 2. P. 111–129.
- Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zaraisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. № 10. P. 969–973.
- Wiedenmann J., Schenk A., Röcker C., Girod A., Spindler K.-D., Nienhaus G.U. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 18. P. 11646–11651.
- Schnitzler C.E., Keenan R.J., McCord R., Matysik A., Christianson L.M., Haddock S.H.D. // *Mar. Biotechnol. N. Y. N.* 2008. V. 10. № 3. P. 328–342.
- Merzlyak E.M., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M.E., Shcheglov A.S., Fradkov A.F., Gaintzeva A., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A., Gadella T.W.J., et al. // *Nat. Methods.* 2007. V. 4. № 7. P. 555–557.
- Weissleder R. // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. № 4. P. 316–317.
- Frangioni J.V. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003. V. 7. № 5. P. 626–634.
- Smith A.M., Mancini M.C., Nie S. // *Nat. Nanotechnol.* 2009. V. 4. № 11. P. 710–711.
- Shemiakina I.I., Ermakova G.V., Cranfill P.J., Baird M.A., Evans R.A., Souslova E.A., Staroverov D.B., Gorokhovatsky A.Y., Putintseva E.V., Gorodnicheva T.V., et al. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 1204.
- Costantini L.M., Balaban M., Markwardt M.L., Rizzo M.A., Guo F., Verkhusha V.V., Snapp E.L. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 7670.
- Cranfill P.J., Sell B.R., Baird M.A., Allen J.R., Lavagnino Z., de Gruiter H.M., Kremers G.-J., Davidson M.W., Ustione A., Piston D.W. // *Nat. Methods.* 2016. V. 13. № 7. P. 557–562.
- Kost L.A., Nikitin E.S., Ivanova V.O., Sung U., Putintseva E.V., Chudakov D.M., Balaban P.M., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 9. P. e0184225.
- Shen Y., Dana H., Abdelfattah A.S., Patel R., Shea J., Molina R.S., Rawal B., Rancic V., Chang Y.-F., Wu L., et al. // *BMC Biol.* 2018. V. 16. № 1. P. 9.
- Kost L.A., Ivanova V.O., Balaban P.M., Lukyanov K.A., Nikitin E.S., Bogdanov A.M. // *Sensors.* 2019. V. 19. № 13. P. 2982.
- Yoon S., Pan Y., Shung K., Wang Y. // *Sensors.* 2020. V. 20. № 17. P. 4998.
- Manna P., Hung S.-T., Mukherjee S., Friis P., Simpson D.M., Lo M.N., Palmer A.E., Jimenez R. // *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro.* 2018. V. 10. № 9. P. 516–526.
- Mukherjee S., Hung S.-T., Douglas N., Manna P., Thomas C., Ekrem A., Palmer A.E., Jimenez R. // *Biochemistry.* 2020. V. 59. № 39. P. 3669–3682.
- Lambert T.J. // *Nat. Methods.* 2019. V. 16. № 4. P. 277–278.
- Muslinkina L., Pletnev V.Z., Pletneva N.V., Ruchkin D.A., Kolesov D.V., Bogdanov A.M., Kost L.A., Rakitina T.V., Agapova Y.K., Shemyakina I.I., et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 155. P. 551–559.
- Shcherbo D., Murphy C.S., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Chepurnykh T.V., Shcheglov A.S., Verkhusha V.V., Pletnev V.Z., Hazelwood K.L., Roche P.M., et al. // *Biochem. J.* 2009. V. 418. № 3. P. 567–574.
- García-Nafria J., Watson J.F., Greger I.H. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 27459.
- Costantini L.M., Fossati M., Francolini M., Snapp E.L. // *Traffic Cph. Den.* 2012. V. 13. № 5. P. 643–649.
- Engler C., Gruetzner R., Kandzia R., Marillonnet S. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 5. P. e5553.
- Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 11. P. e3647.
- Engler C., Marillonnet S. // *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 2011. V. 729. P. 167–181.
- Ermakova Y.G., Pak V.V., Bogdanova Y.A., Kotlobay A.A., Yampolsky I.V., Shokhina A.G., Panova A.S., Marygin R.A., Staroverov D.B., Bilan D.S., et al. // *Chem. Commun.* 2018. V. 54. № 23. P. 2898–2901.
- Manna P., Jimenez R. // *J. Phys. Chem. B.* 2015. V. 119. № 15. P. 4944–4954.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., et al. // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. № 7. P. 676–682.
- Protasova E.A., Mishin A.S., Lukyanov K.A., Maksimov E.G., Bogdanov A.M. // *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 2021. V. 20. № 6. P. 791–803.
- Subach F.V., Verkhusha V.V. // *Chem. Rev.* 2012. V. 112. № 7. P. 4308–4327.
- Wachter R.M., Elsliger M.A., Kallio K., Hanson G.T., Remington S.J. // *Struct. Lond. Engl.* 1998. V. 6. № 10. P. 1267–1277.
- Bindels D.S., Haarbosch L., van Weeren L., Postma M., Wiese K.E., Mastop M., Aumonier S., Gotthard G., Royant A., Hink M.A., et al. // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. № 1. P. 53–56.
- Pletnev S., Shcherbo D., Chudakov D.M., Pletneva N., Merzlyak E.M., Wlodawer A., Dauter Z., Pletnev V. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 43. P. 28980–28987.
- Janin J., Rodier F. // *Proteins.* 1995. V. 23. № 4. P. 580–587.
- Luo J., Liu Z., Guo Y., Li M. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 14214.
- Kim B.B., Wu H., Hao Y.A., Pan M., Chavarha M., Zhao Y., Westberg M., St-Pierre F., Wu J.C., Lin M.Z. // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 3678.
- Kremers G.-J., Hazelwood K.L., Murphy C.S., Davidson M.W., Piston D.W. // *Nat. Methods.* 2009. V. 6. № 5. P. 355–358.
- Kredel S., Oswald F., Nienhaus K., Deuschle K., Röcker C., Wolff M., Heiker R., Nienhaus G.U., Wiedenmann J. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 2. P. e4391.
- Lam A.J., St-Pierre F., Gong Y., Marshall J.D., Cranfill P.J., Baird M.A., McKeown M.R., Wiedenmann J., Davidson M.W., Schnitzer M.J., et al. // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. № 10. P. 1005–1012.
- Mamontova A.V., Grigoryev A.P., Tsarkova A.S., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. // *Rus. J. Bioorganic Chem.* 2017. V. 43. № 6. P. 625–633.
- Klementieva N.V., Pavlikov A.I., Moiseev A.A., Bozhanova N.G., Mishina N.M., Lukyanov S.A., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A., Mishin A.S. // *Chem. Commun. Camb. Engl.* 2017. V. 53. № 5. P. 949–951.
- Mukherjee S., Thomas C., Wilson R., Simmerman E., Hung S.-T., Jimenez R. // *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP.* 2022. V. 24. № 23. P. 14310–14323.
- Gavrikov A.S., Baranov M.S., Mishin A.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. V. 522. № 4. P. 852–854.
- Zhang H., Lesnov G.D., Subach O.M., Zhang W., Kuzmicheva T.P., Vlaskina A.V., Samygina V.R., Chen L., Ye X., Nikolaeva A.Y., et al. // *Nat. Methods.* 2024. V. 21. № 4. P. 657–665.
- Mukherjee S., Douglas N., Jimenez R. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2024. V. 15. № 6. P. 1644–1651.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий. Журнал выпускается на русском и английском языках. Журнал *Acta Naturae* входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России, включен в базы данных PubMed, Web of Science, Scopus, РИНЦ.

Редакция журнала *Acta Naturae* просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редакцией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков с пробелами (примерно 30 страниц формата А4, напечатанных через 1.5 интервала, шрифт Times New Roman, 12 размер) и 16 рисунков.

Объем экспериментальной статьи не должен превышать 30 000 знаков с пробелами (примерно 15 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10.

Новые, приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в разделе «Краткие сообщения». Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (5–6 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать трех.

Рукопись и все необходимые файлы следует загрузить на сайт www.actanaturae.ru:

- 1) текст в формате Word 2003 for Windows;
- 2) рисунки в формате TIFF;
- 3) текст статьи с рисунками в едином pdf-файле;
- 4) перевод на английский язык названия статьи, фамилий и инициалов авторов, названий организаций, реферата, ключевых слов, сокращений, подписей к рисункам, русскоязычных ссылок;
- 5) сопроводительное письмо, в котором надо указать, что представленный материал ранее нигде не был опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях;
- 6) лицензионный договор (форму договора можно скачать с сайта www.actanaturae.ru).

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт – курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт – полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).
- Указывается электронный адрес автора, ответственного за переписку с редакцией, включая работу с корректу-

рой. Автор, ответственный за переписку, выделяется значком *.

- Приводится полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.
- Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы, описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк (примерно 1500 знаков).
- Ключевые слова (3–6). В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.
- Список сокращений.
- Введение.
- Раздел «Экспериментальная часть».
- Раздел «Результаты».
- Раздел «Обсуждение» (или «Результаты и обсуждение»).
- Раздел «Выводы» (или «Заключение»). В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.
- Раздел «Список литературы».

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.
- Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Интервал между строками 1.5.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сноска, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сноска (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах: $T_{пл}$ – температура плавления, $T_{ф.п.}$ – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.
- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).

- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μM ; нм, но не nm).
- Знак «—» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только « $\times$ ». Знак « $\times$ » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « $\cdot$ » обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК-РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлгией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой редакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам

в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлгией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с ответами на все замечания рецензента.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде pdf-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлгией.

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте цифрами в квадратных скобках (нумерация в порядке цитирования). Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Библиографические описания цитируемых источников в списке литературы следует оформлять в соответствии с требованиями Международного комитета редакторов медицинских журналов (International Committee of Medical Journal Editors – ICMJE) и AMA Manual of Style: A Guide for Authors and Editors (11th Edition).

Подробные правила оформления ссылок представлены тут: <https://actanaturae.ru/2075-8251/pages/view/references>

Пользователям специализированного ПО для формирования библиографии редакция рекомендует следующие ресурсы:

- EndNote — скачать файл стиля Acta Naturae.ens, просмотреть референтный стиль JAMA: Journal of the American Medical Association (AMA 11th edition);
- Zotero — просмотреть референтный стиль American Medical Association 11th edition (brackets);
- Mendeley — просмотреть референтный стиль American Medical Association.

Примеры оформления ссылок:

1. Hisakata R, Nishida S, Johnston A. An adaptable metric shapes perceptual space. *Curr Biol*. 2016;26(14):1911-1915. doi: 10.1016/j.cub.2016.05.047
2. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. CSHL Press; 2001.
3. Hogue CWV. Structure databases. In: Baxevanis AD, Ouellette BFF, eds. *Bioinformatics*. 2nd ed. Life Sciences Series. Wiley-Interscience; 2001:83-109.

Для связи с редакцией следует использовать следующий электронный адрес: actanaturae@gmail.com, телефон: (495) 727-38-60.

ПРИЛОЖЕНИЯ К СТАТЬЕ Л. Г. ЗАВИЛЕЙСКОГО И СОАВТ. «КЛАССИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СОБЫТИЙ НЕПРОДУКТИВНОГО СПЛАЙСИНГА»

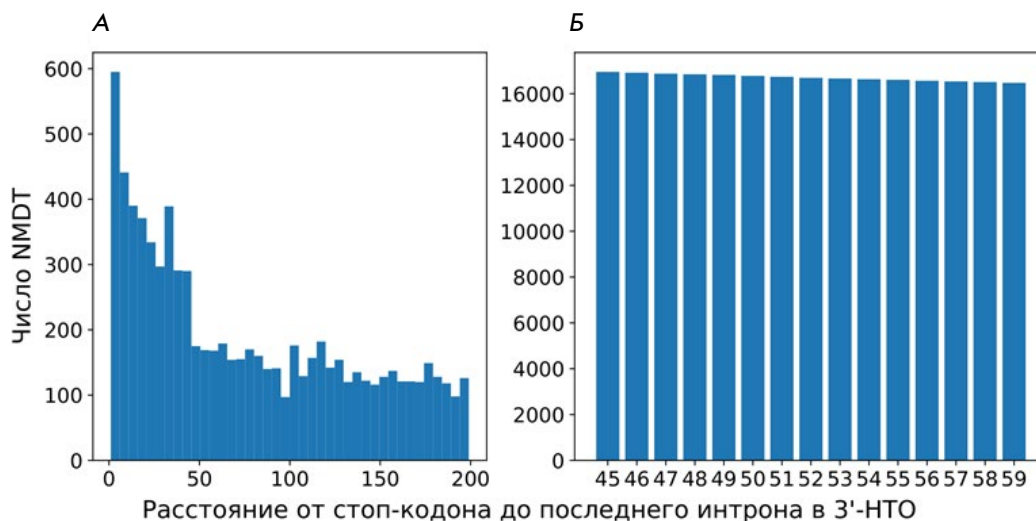


Рис. S1. Гистограмма расстояний между стоп-кодоном и последним интроном в 3'-НТО аннотированных транскриптов человека (А). Число предсказанных NMDT в зависимости от выбранного порога на расстояние от стоп-кодона до интрона (Б)

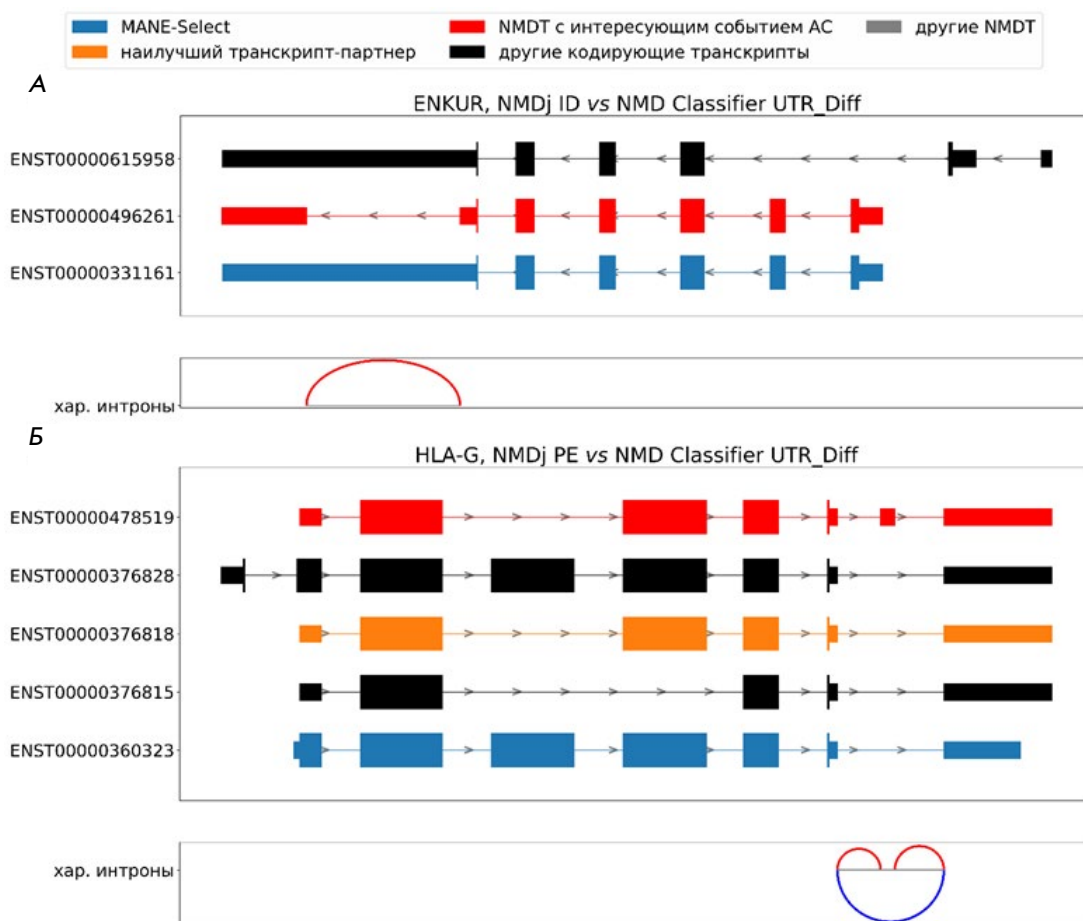


Рис. S2. Примеры подробной классификации событий AC, классифицированных NMD Classifier как UTR_Diff: удержание интрона (А) и ядовитый экзон (Б). Транскрипты MANE-Select показаны синим цветом, классифицируемые NMDT – красным, другие транскрипты, кодирующие белки, – черным

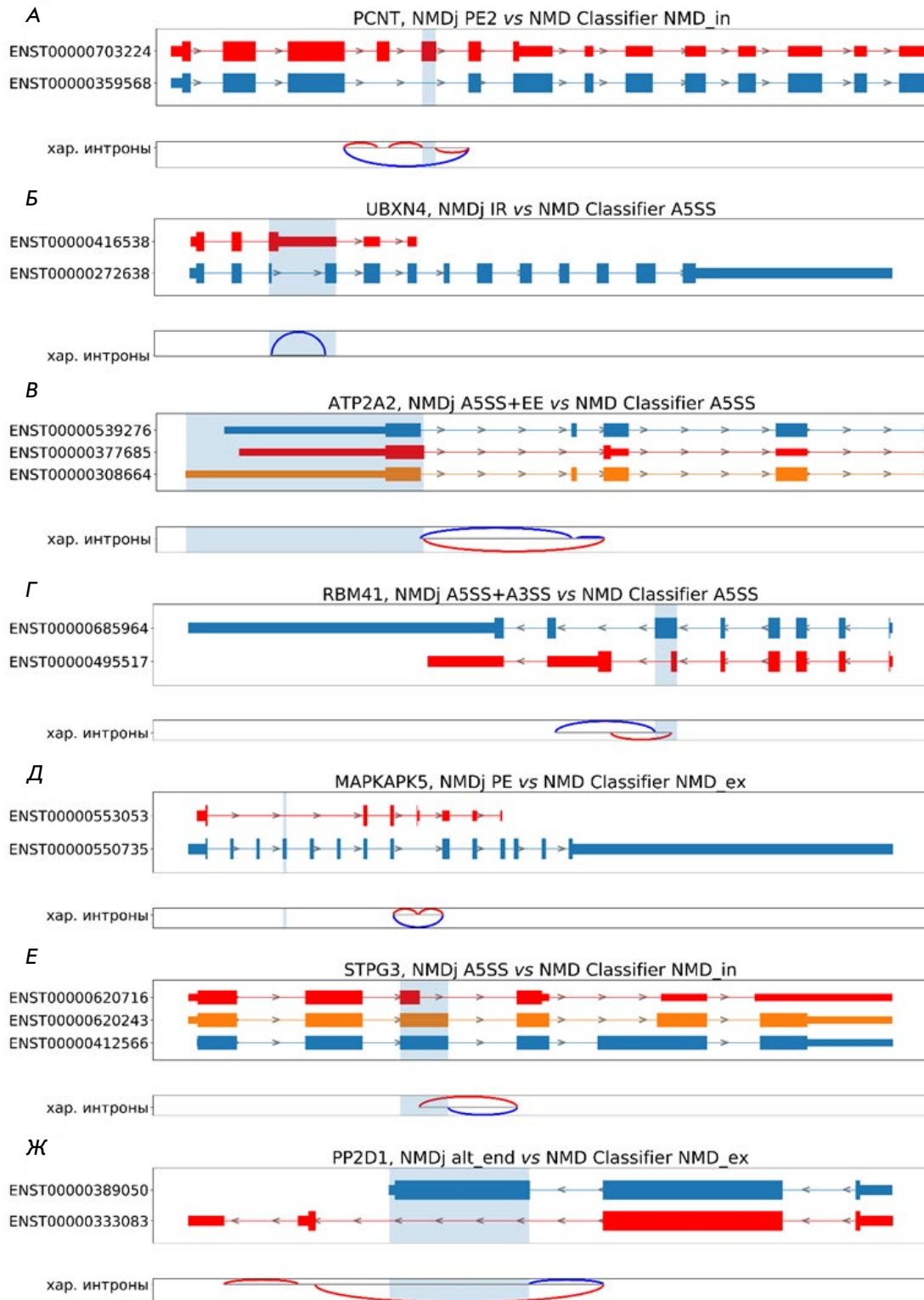


Рис. S3. Примеры неверной классификации NMD Classifier. Транскрипты MANE-Select показаны синим цветом, классифицируемые NMDT – красным. Наилучшие транскрипты-партнеры показаны оранжевым цветом в том случае, если они не совпадают с транскриптами MANE-Select

ПРИЛОЖЕНИЯ К СТАТЬЕ И. С. ИЛЬНИЦКОГО И СОАВТ. «ИНТЕГРАЦИЯ HiMoRNA И RNA-Chrom: ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ДАННЫХ РНК-ХРОМАТИНОВОГО ИНТЕРАКТОМА»

Дополнительная таблица 1. Таблица соответствия генов lncRNA между HiMoRNA и RNA-Chrom

https://himorna.fbras.ru/data/lncRNA_CorrespondenceTable.csv

Дополнительная таблица 2. Таблица сопряженности для расчета правостороннего и левостороннего теста Фишера, например, для пары lncRNA PVT1 – пики гистоновой метки H3K27ac»

	Общее количество «-» пиков H3K27ac	Общее количество «+» пиков H3K27ac
Суммарное количество «+» и «-» пиков, поддерживаемых контактами PVT1	Количество поддерживаемых контактами PVT1 «-» пиков H3K27ac	Количество поддерживаемых контактами PVT1 «+» пиков H3K27ac
Суммарное количество «+» и «-» пиков, неподдерживаемых контактами PVT1	Количество неподдерживаемых контактами PVT1 «-» пиков H3K27ac	Количество неподдерживаемых контактами PVT1 «+» пиков H3K27ac

Дополнительная таблица 3. Пошаговый анализ lncRNA MIR31HG при помощи интегрированных баз данных HiMoRNA и RNA-Chrom

Веб-ресурс	Шаг	Текущая страница	Действия	Результат
HiMoRNA	1	Главная страница	- нажать на кнопку «Search page» или на кнопку «Search»	Страница поиска
	2	Страница поиска	- добавить «MIR31HG» в соответствующее поле - выбрать интересующие гистоновые модификации (H3K4me1, H3K27ac) - добавить геномные координаты расширенного в промоторной области <i>GLI2</i> (chr2:120725622-120992653) - нажать на кнопку «Search»	Страница результатов поиска
	Опционально	Страница результатов поиска	- нажать на гиперссылку гистоновой модификации	Страница гистоновой метки
			- нажать на гиперссылку lncRNA	Страница lncRNA
			- нажать на гиперссылку гена	Страница гена, ассоциированного с пиком гистоновой модификации
			- нажать на гиперссылку коэффициента корреляции	Страница коэффициента корреляции
			- нажать на кнопку «Download»	Скачать таблицу с результатом поиска
	3	Страница результатов поиска	- выбрать интересующий пик при помощи переключателя слева от таблицы - нажать на кнопку «Go to RNA-Chrom DB», затем на «MIR31HG RNA contacts with the locus (peak_473655)» и выбрать необходимое расширение координат пика (например, 25000)	Графическое резюме контактов lncRNA MIR31HG с хроматином в области расширенного пика
RNA-Chrom	4	Страница с графическим резюме	- выбрать интересующий эксперимент при помощи флажка (Exp.ID: 9) - нажать на кнопку «ALL TARGET GENES»	Таблица со всеми генами из области расширенного пика, с которыми взаимодействует или нет MIR31HG

Веб-ресурс	Шаг	Текущая страница	Действия	Результат
HiMoRNA	5	Страница поиска	- добавить «MIR31HG» в соответствующее поле - выбрать интересующие гистоновые модификации (H3K4me1, H3K27ac) - добавить названия 56 генов из категории «Hedgehog signaling pathway» в поле «Gene/Gene ID (optional)» – нажать на кнопку «Search»	Страница результатов поиска
	6	Страница результатов поиска	- выбрать пик H3K27ac_963553 (chr9:95446174-95452554) - нажать на кнопку «Go to RNA-Chrom DB», затем на «MIR31HG RNA contacts with the locus (peak_963553)» и выбрать необходимое расширение координат пика (например, 25000)	Графическое резюме контактов lncRNA MIR31HG с хроматином в области расширенного пика
RNA-Chrom	7	Страница с графическим резюме	- выбрать интересующий эксперимент при помощи флажка (Exp.ID: 5) - нажать на кнопку «ALL TARGET GENES»	Таблица со всеми генами из области расширенного пика, с которыми взаимодействует или нет MIR31HG, среди которых находим PTCH1

Дополнительная таблица 4. Гены из пути «Hedgehog signaling pathway», полученные из базы данных KEGG Pathway

Исходный алиас	Преобразованный алиас	Имя	Описание	Пространство имён
KEGG:04340	ENSG00000010282	HNATL	hedgehog acyltransferase like [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:13242]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000036257	CUL3	cullin 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2553]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000054392	HNAT	hedgehog acyltransferase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:18270]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000055130	CUL1	cullin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2551]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000064309	CDON	cell adhesion associated, oncogene regulated [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17104]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000072062	PRKACA	protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9380]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000072803	FBXW11	F-box and WD repeat domain containing 11 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:13607]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000072840	EVC	EvC ciliary complex subunit 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3497]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000074047	GLI2	GLI family zinc finger 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4318]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000081479	LRP2	LDL receptor related protein 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6694]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000082701	GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4617]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000100077	GRK3	G protein-coupled receptor kinase 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:290]	KEGG

Исходный алиас	Преобразованный алиас	Имя	Описание	Пространство имён
KEGG:04340	ENSG00000102858	MGRN1	mahogunin ring finger 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:20254]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000105429	MEGF8	multiple EGF like domains 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3233]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000106012	IQCE	IQ motif containing E [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29171]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000106571	GLI3	GLI family zinc finger 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4319]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000107882	SUFU	SUFU negative regulator of hedgehog signaling [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16466]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000108854	SMURF2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16809]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000110092	CCND1	cyclin D1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1582]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000111087	GLI1	GLI family zinc finger 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4317]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000113712	CSNK1A1	casein kinase 1 alpha 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2451]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000117425	PTCH2	patched 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9586]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000118971	CCND2	cyclin D2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1583]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000121067	SPOP	speckle type BTB/POZ protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11254]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000128602	SMO	smoothened, frizzled class receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11119]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000131437	KIF3A	kinesin family member 3A [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:6319]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000133275	CSNK1G2	casein kinase 1 gamma 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2455]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000137486	ARRB1	arrestin beta 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:711]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000139549	DHH	desert hedgehog signaling molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2865]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000141480	ARRB2	arrestin beta 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:712]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000141551	CSNK1D	casein kinase 1 delta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2452]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000142875	PRKACB	protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9381]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000143147	GPR161	G protein-coupled receptor 161 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:23694]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000144228	SPOPL	speckle type BTB/POZ protein like [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:27934]	KEGG

Исходный алиас	Преобразованный алиас	Имя	Описание	Пространство имён
KEGG:04340	ENSG00000144857	BOC	BOC cell adhesion associated, oncogene regulated [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17173]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000151292	CSNK1G3	casein kinase 1 gamma 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2456]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000154309	DISP1	dispatched RND transporter family member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19711]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000163501	IHH	Indian hedgehog signaling molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:5956]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000164161	HHIP	hedgehog interacting protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:14866]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000164690	SHH	sonic hedgehog signaling molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:10848]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000165059	PRKACG	protein kinase cAMP-activated catalytic subunit gamma [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9382]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000166167	BTRC	beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1144]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000166813	KIF7	kinesin family member 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30497]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000169118	CSNK1G1	casein kinase 1 gamma 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2454]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000171791	BCL2	BCL2 apoptosis regulator [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:990]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000173020	GRK2	G protein-coupled receptor kinase 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:289]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000173040	EVC2	EvC ciliary complex subunit 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19747]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000175356	SCUBE2	signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:30425]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000180138	CSNK1A1L	casein kinase 1 alpha 1 like [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:20289]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000180447	GAS1	growth arrest specific 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:4165]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000185716	MOSMO	modulator of smoothened [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:27087]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000185920	PTCH1	patched 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:9585]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000198742	SMURF1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:16807]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000203965	EFCAB7	EF-hand calcium binding domain 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29379]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000213923	CSNK1E	casein kinase 1 epsilon [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:2453]	KEGG
KEGG:04340	ENSG00000283900	TPTEP2-CSNK1E	TPTEP2-CSNK1E readthrough [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:53829]	KEGG

Дополнительная таблица 5. Пошаговый анализ lncRNA PVT1 при помощи интегрированных баз данных HiMoRNA и RNA-Chrom

Веб-ресурс	Шаг	Текущая страница	Действия	Результат
HiMoRNA	1	Главная страница	- нажать на кнопку «Search page» или на кнопку «Search»	Страница поиска
	2	Страница поиска	- добавить «PVT1» в соответствующее поле - выбрать все гистоновые модификации - добавить «LATS2» в поле «Gene/Gene ID» - нажать на кнопку «Search»	Страница результатов поиска
	3	Страница результатов поиска	- выбрать интересующий пик при помощи переключателя слева от таблицы (например, peak_169403) - нажать на кнопку «Go to RNA-Chrom DB», затем на «PVT1 RNA contacts with the locus (peak_169403)» и выбрать необходимое расширение координат пика (например, 25000)	Графическое резюме контактов lncRNA PVT1 с хроматином в области расширенного пика
RNA-Chrom	4	Страница с графическим резюме	- выбрать интересующие эксперименты при помощи флажка (Exp.IDs: 8, 10) - нажать на кнопку «VIEW IN GENOME BROWSER»	UCSC Genome Browser

ПРИЛОЖЕНИЯ К СТАТЬЕ Д. А. РУЧКИНА И СОАВТ. «ДВЕ КЛЮЧЕВЫЕ ЗАМЕНЫ В ХРОМОФОРНОМ ОКРУЖЕНИИ БЕЛКА mKate2 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ УЛУЧШЕННОГО FusionRed-ПОДОБНОГО КРАСНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА»

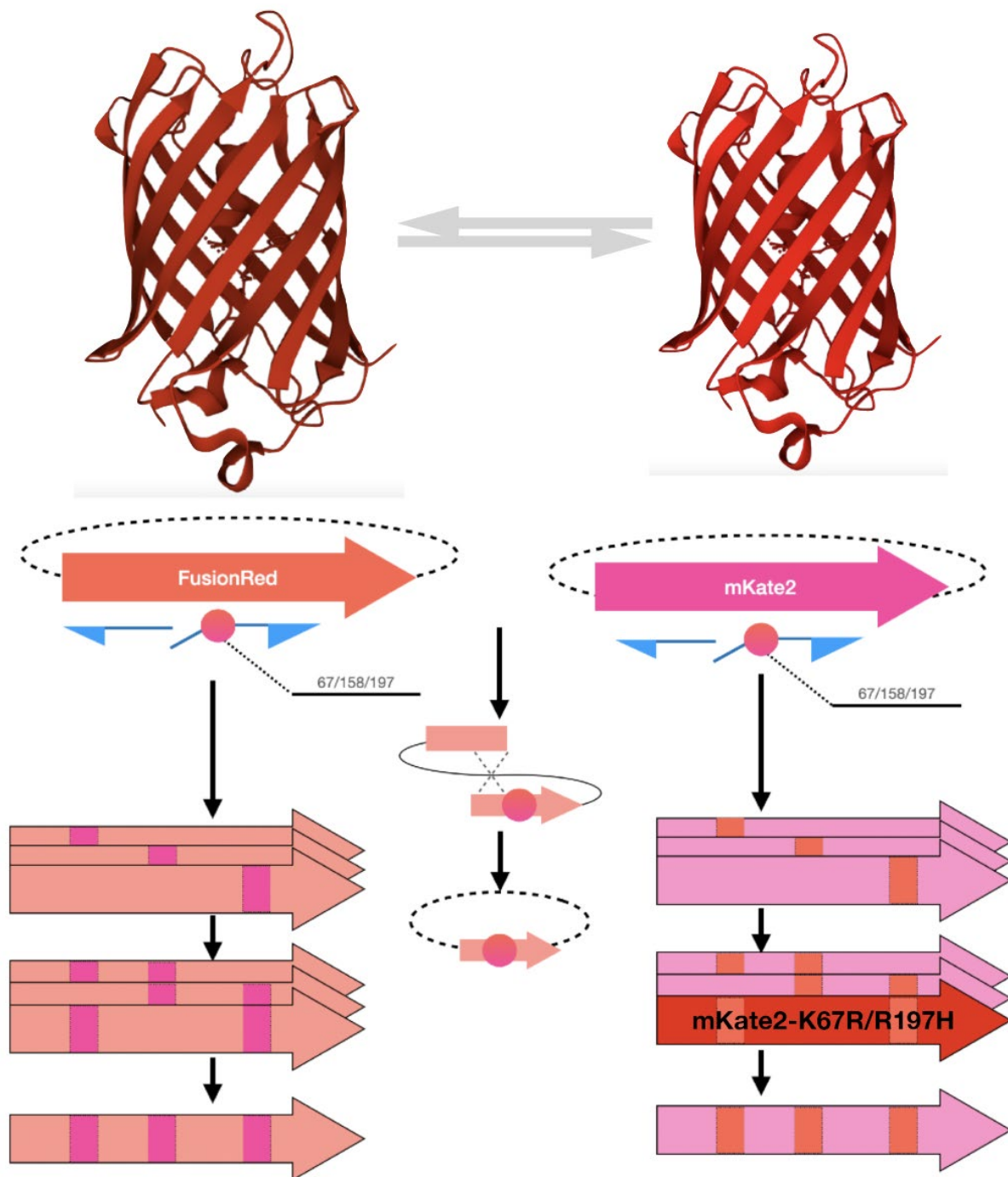
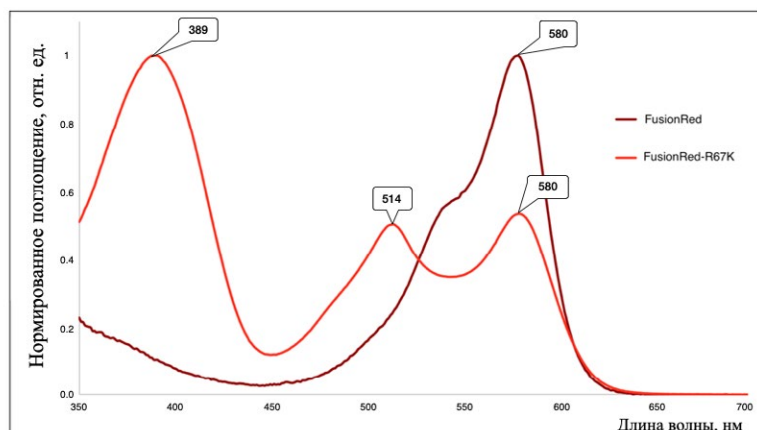


Рис. S1. Схема получения набора мутантов FusionRed и mKate2, содержащих замены по положениям 67/158/197. Верхняя панель иллюстрирует «обмен» аминокислотными остатками в указанных положениях. В центре схемы графически показан принцип сайт-направленного мутагенеза на основе клонирования методом IVA (синие стрелки — олигонуклеотиды, розовые круги — кодоны, содержащие замены, пунктирные эллипсы изображают векторную основу, пунктирный крест показывает рекомбинацию продукта полновекторной ПЦР). Прямые широкие стрелки слева и справа обозначают полученные варианты, положения замен показаны в виде вертикальных полос «противоположного» цвета

A



B

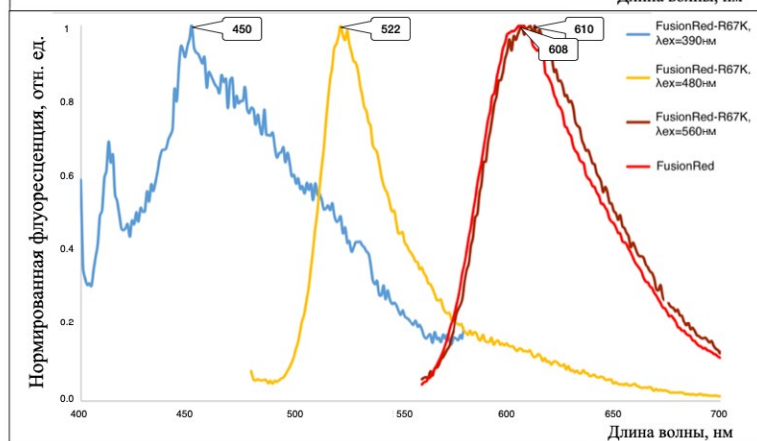
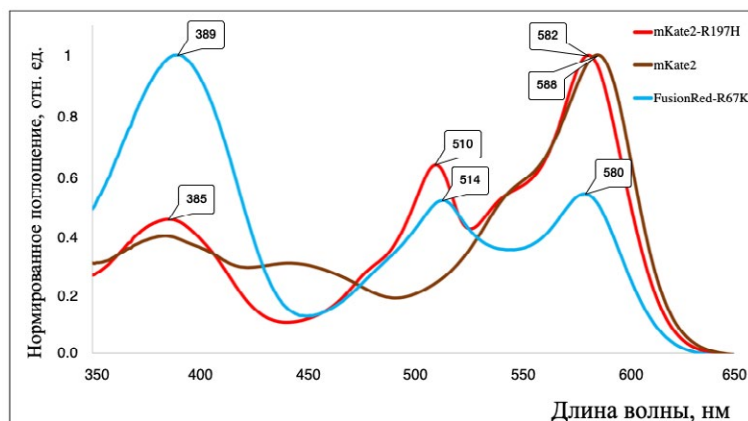


Рис. S2. Сравнение спектров поглощения (А) и эмиссии флуоресценции (Б) FusionRed-R67K и FusionRed. Длины волн максимумов основных полос показаны в пузырьках. Используемые длины волн возбуждения показаны в легенде на панели Б

A



B

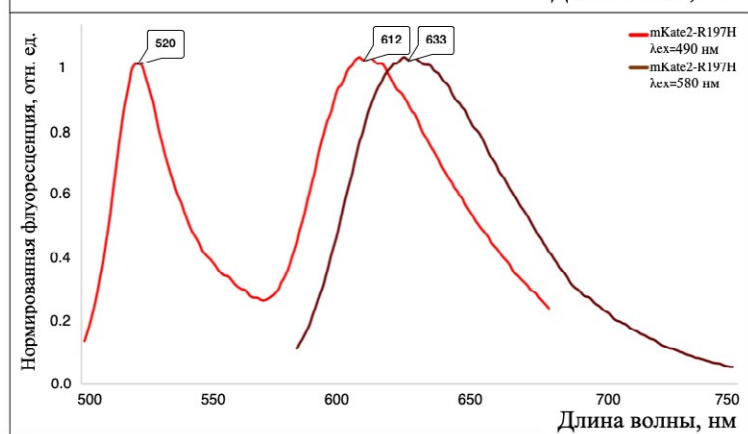
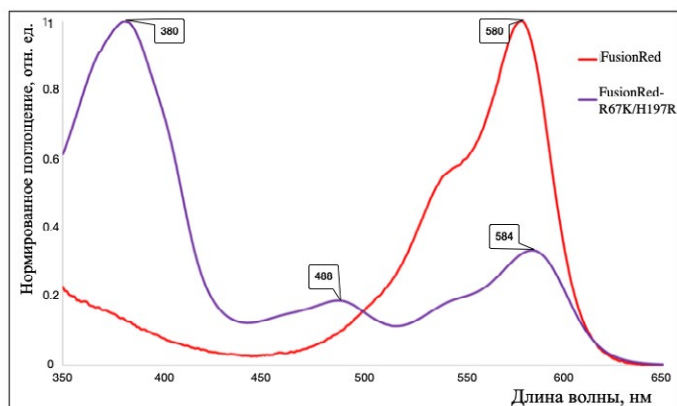


Рис. S3. Сравнение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) mKate2-R197H и mKate2. Длины волн максимумов основных полос показаны в пузырьках. Спектр поглощения FusionRed-R67K добавлен для сравнения (сплошная синяя линия, А). Используемые длины волн возбуждения показаны в легенде на панели Б

А



Б

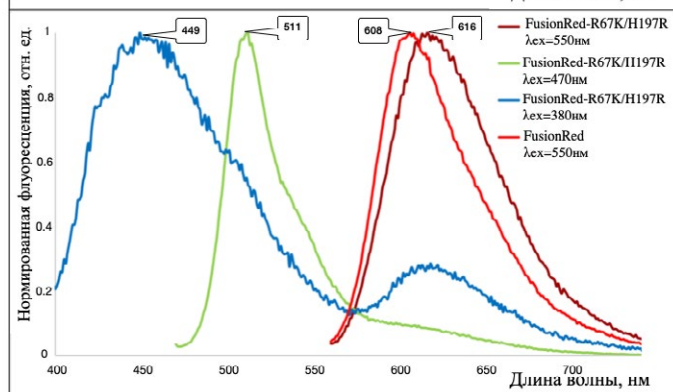
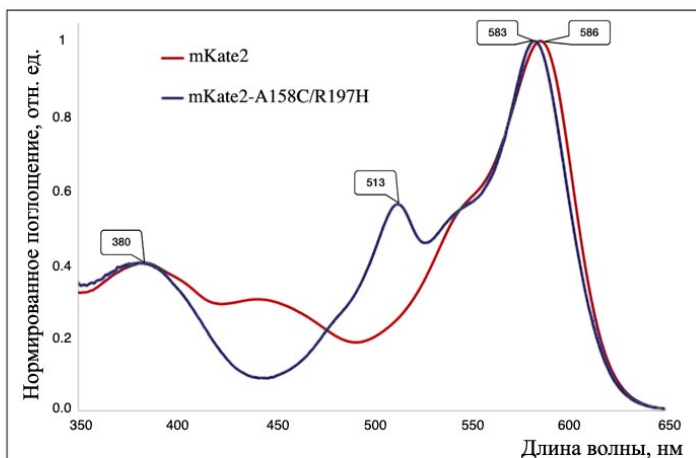


Рис. S4. Сравнение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) FusionRed-R67K/H197R и FusionRed. Длины волн максимумов основных полос показаны в пузырьках. Используемые длины волн возбуждения показаны в легенде на панели Б

А



Б

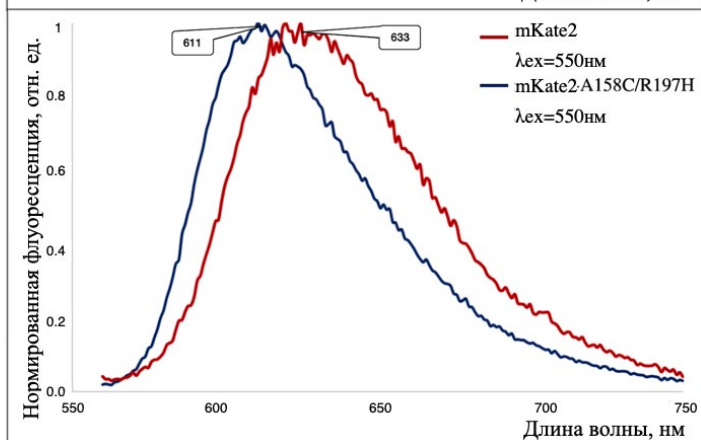


Рис. S5. Сравнение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) mKate2-A158C/R197H и mKate2. Длины волн максимумов основных полос показаны в пузырьках. Используемые длины волн возбуждения показаны в легенде на панели Б

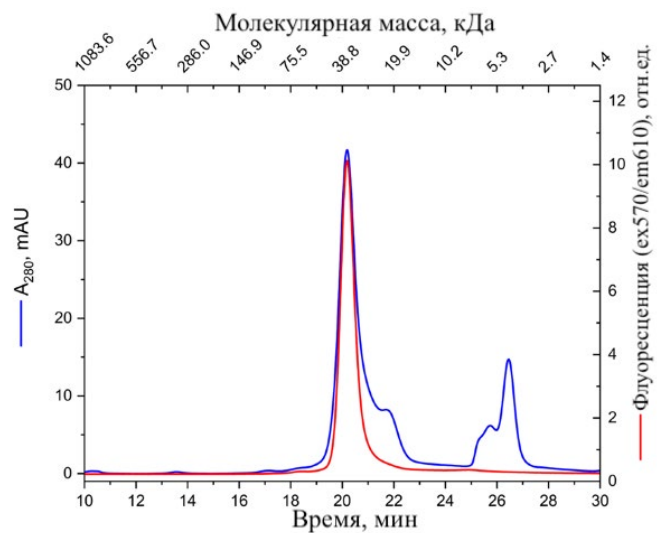


Рис. S6. Хроматограмма очищенного образца mKate2-K67R/R197H (Diogenes). Элюцию проводили под контролем встроенных детекторов поглощения и флуоресценции. Синим показано поглощение на 280 нм, красным – флуоресценция. Длины волн возбуждения и детекции флуоресценции указаны в легенде (правый верхний угол)

Таблица S1. Белковые стандарты, использованные для калибровки установки гель-фильтрации

Белок	Молекулярная масса, кДа	Время элюции, мин
Цитохром с из лошадиного сердца	12.4	23.354
Карбоангидраза из бычьих эритроцитов	29	21.265
Бычий сывороточный альбумин (БСА)	66	17.767
Алкогольдегидрогеназа дрожжей	150	15.995
β-Амилаза батата	200	15.253
Ферритин лошадиной селезенки	450	12.723

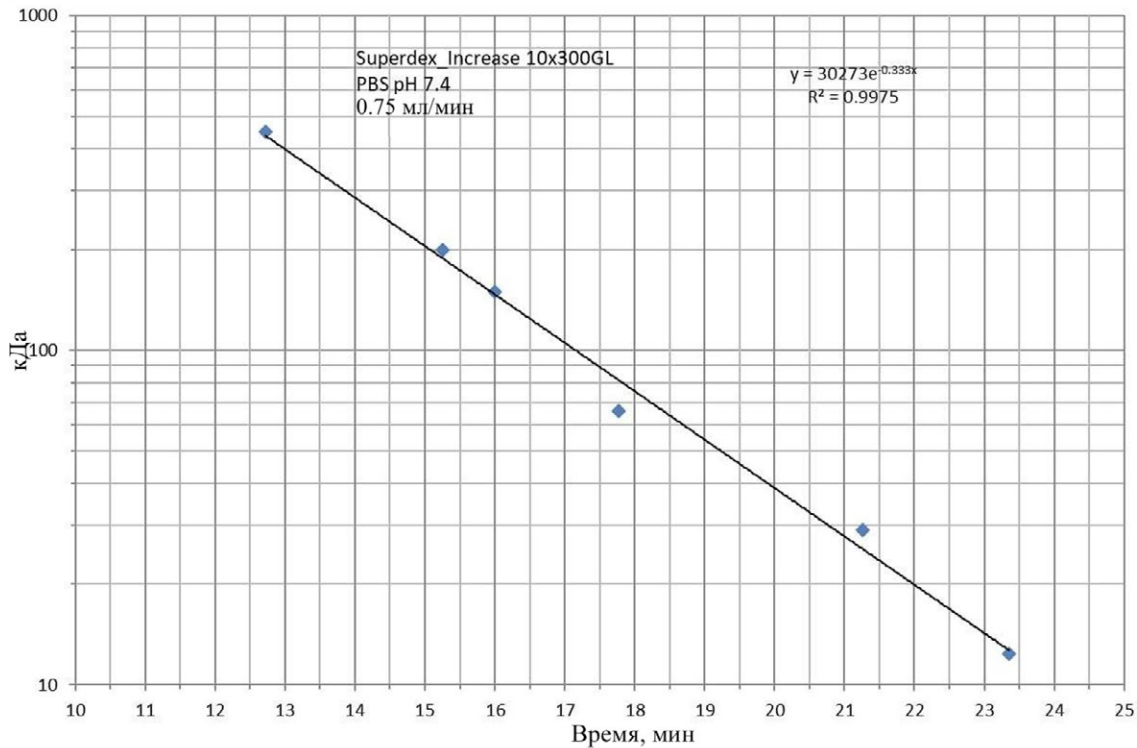


Рис. S7. Калибровочная прямая для определения молекулярных масс при хроматографическом анализе (см. раздел «Экспериментальная часть», основной текст). Синие квадраты показывают белковые стандарты, использованные для калибровки. Тип колонки и параметры уравнивания/элюции, а также результаты линейной аппроксимации показаны на графике

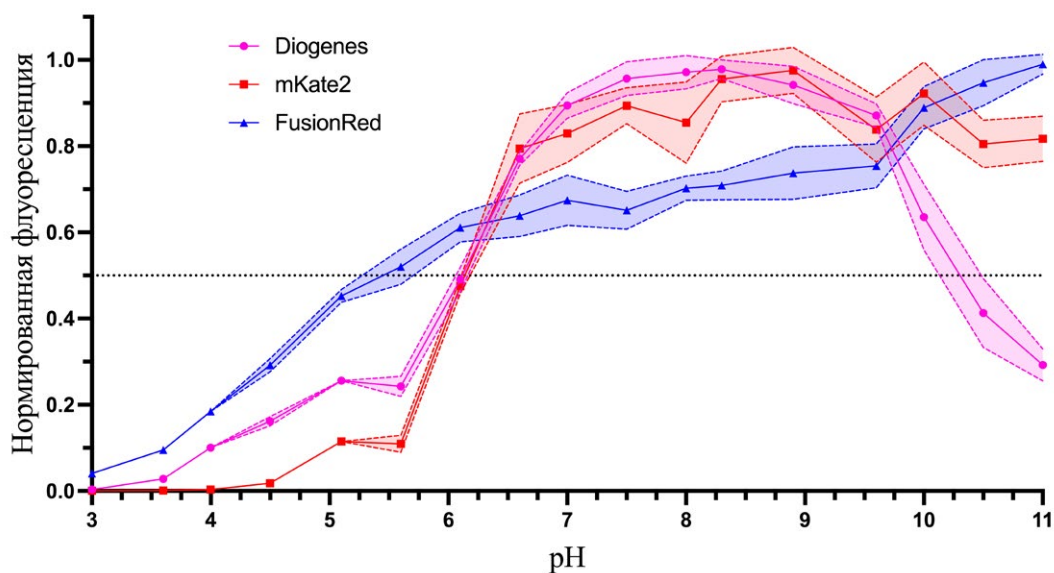


Рис. S8. Зависимость интенсивности флуоресценции очищенных mKate2-K67R/R197H (Diogenes), mKate2 и FusionRed от pH (pH-стабильность). Каждая точка показывает сигнал, нормированный на максимальное в наборе значение

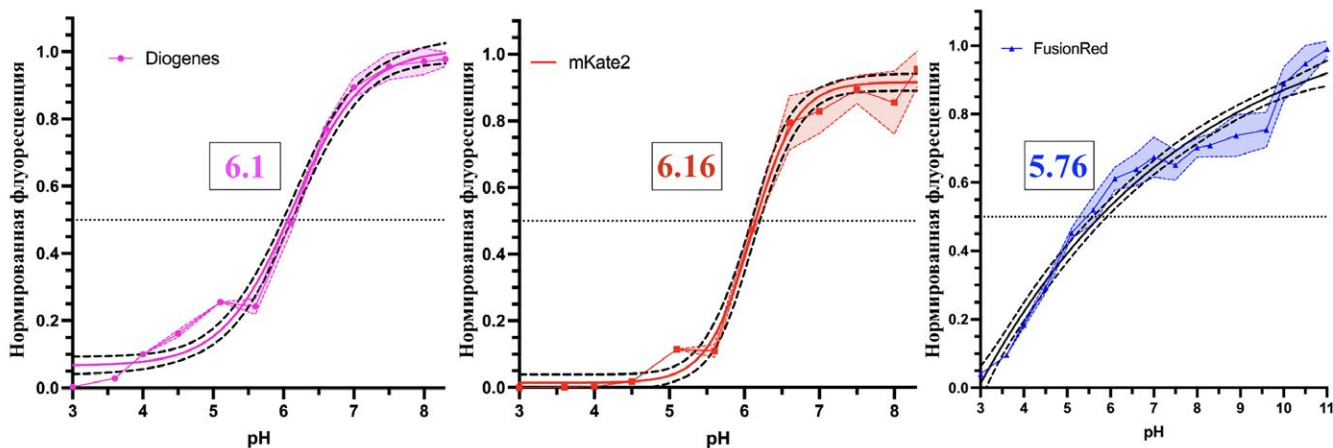


Рис. S9. Сигмоидные кривые аппроксимации pH-стабильности Diogenes, mKate2 и FusionRed. Цветные графики представляют экспериментальные данные со стандартными отклонениями в виде полупрозрачных областей ($n = 6$). Сплошная черная кривая – кривая аппроксимации с 95% доверительным интервалом, показанным черными пунктирными линиями. Аппроксимация выполнена в пакете GraphPad Prism10 в режиме четырехпараметрической логистической кривой (4PL). Горизонтальная линия обозначает половину от максимума флуоресценции

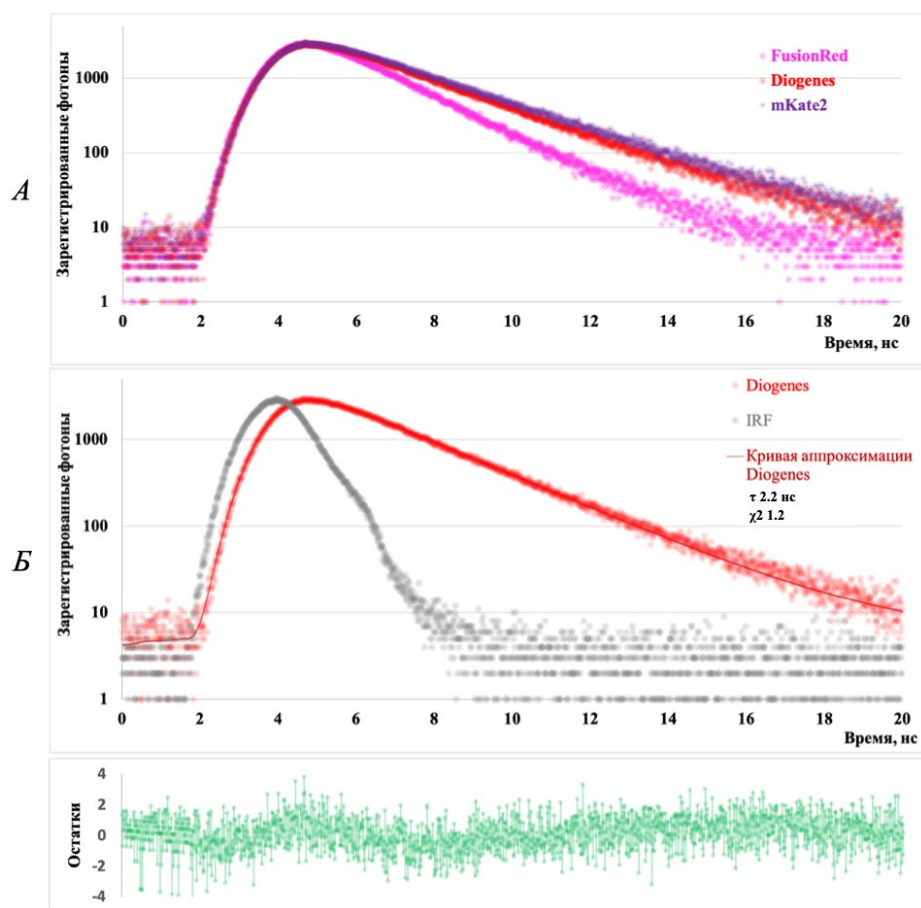


Рис. S10. Сравнение кривых затухания флуоресценции FusionRed, mKate2 и Diogenes при однофотонном возбуждении наносекундным импульсным светодиодом с частотой повторения 20 МГц, 590 нм (А). Моноэкспоненциальная аппроксимация кривой затухания Diogenes (Б). Для построения кривой использовали деконволюцию с IRF. Измеренная аппаратная функция (IRF) показана серым

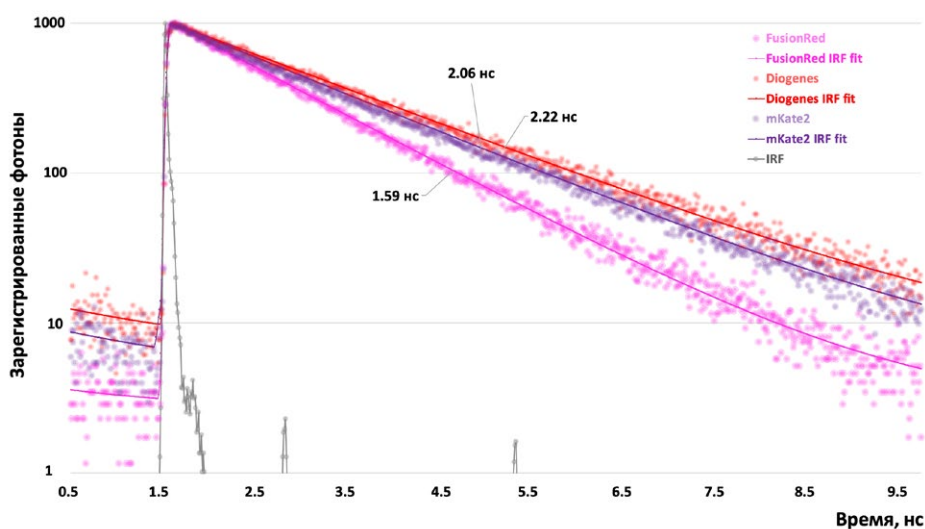
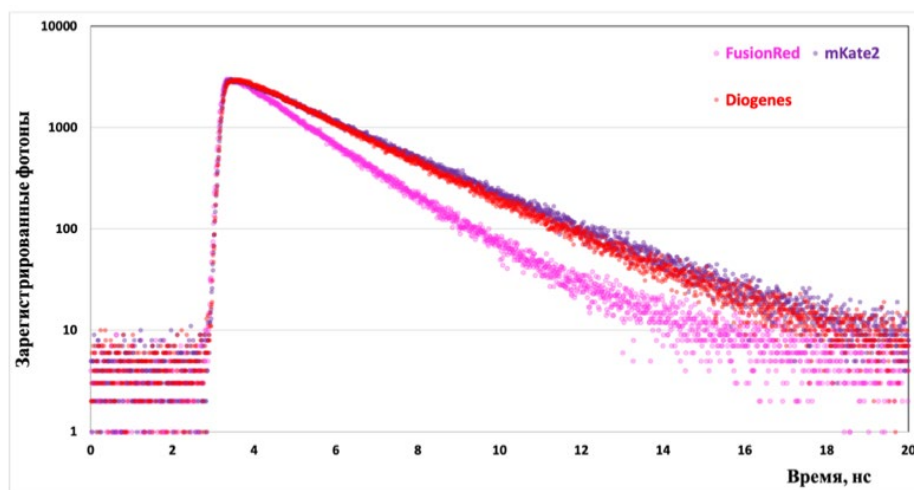


Рис. S11. Сравнение кривых затухания флуоресценции FusionRed, Diogenes и mKate2 при однофотонном возбуждении фемтосекундным лазером с частотой повторения 80 МГц, 590 нм. Шариками показаны экспериментальные данные, сплошными линиями — экспоненциальные кривые аппроксимации. Для FusionRed использовали биэкспоненциальную аппроксимацию, для mKate2 и Diogenes — моноэкспоненциальную. Средние значения времен жизни указаны рядом с кривыми. Для аппроксимации использовалась деконволюция с IRF. Измеренная аппаратная функция (IRF) показана серым

A



B

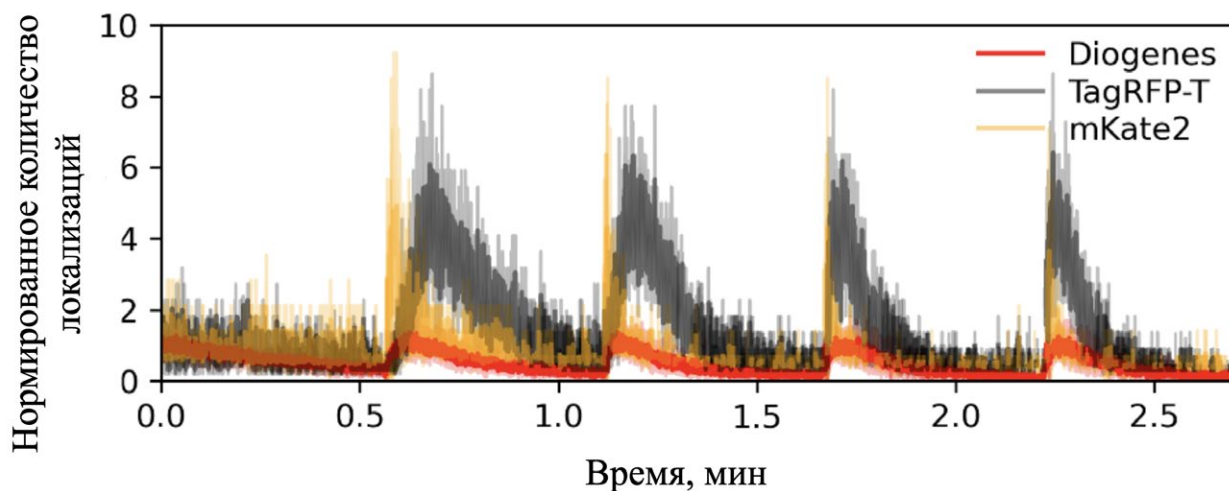
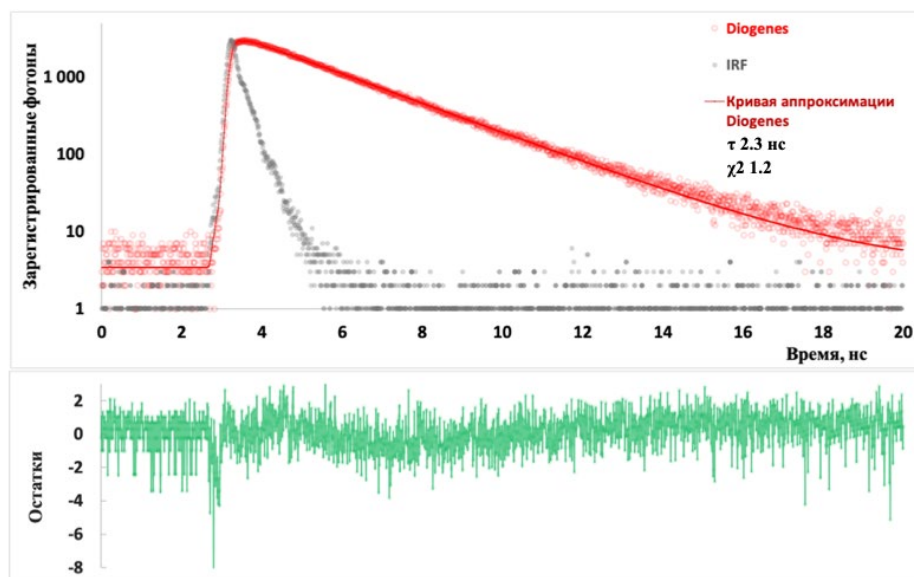


Рис. S13. Влияние лазерного освещения с длиной волны 405 нм на плотность локализации Diogenes, TagRFP-T и mKate2, слитых с виментином, в живых клетках HeLa во время визуализации при следующих условиях: лазер 2 кВт см⁻², 561 нм, время кадра 16.7 мс, 10 000 кадров. Интервал между вспышками лазерного излучения с длиной волны 405 нм составлял 22 с при продолжительности импульсов 0.4 с и плотности мощности освещения ~215 Вт·см⁻²

Рис. S12. Кривые затухания флуоресценции для FusionRed, mKate2 и Diogenes при однофотонном возбуждении пикосекундным диодным лазером с частотой повторения 20 МГц, 450 нм (А). Кривая затухания флуоресценции Diogenes и ее моноэкспоненциальная аппроксимация (Б). Для аппроксимации использовали деконволюцию с IRF. Измеренная аппаратная функция (IRF) показана серым

ПРИЛОЖЕНИЯ К СТАТЬЕ К. А. ИВАНЕНКО И СОАВТ. «ГИПОМЕТИЛИРУЮЩИЙ АГЕНТ 5-АЗАЦИТИДИН УСИЛИВАЕТ ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРОВ RAS И Sp1 В КЛЕТКАХ НЕЙРОБЛАСТОМЫ»

Таблица S1. Концентрации и производители использованных в работе препаратов

Название	Концентрация	Производитель
5-Азациитидин	0–20 мкМ	Sigma-Aldrich
BI2536	10 нМ	MedChemExpress
PD184352	10 нМ	Selleckchem
Акситиниб	0.5 мкМ	Sigma-Aldrich
Белинонат	0.1 мкМ	Selleckchem
Бортезомиб	0.75 нМ	Selleckchem
Воласертиб	25 нМ	Selleckchem
Воринонат	1 мкМ	Selleckchem
Гефитиниб	1 мкМ	Selleckchem
Дактолисиб	50 нМ	Selleckchem
Дексаметазон	25 мкМ	Selleckchem
Лонафарниб	5 мкМ	Selleckchem
Метформин	50 мкМ	Macklin
Митрамицин А	15 нМ	Sigma-Aldrich
Пальбоциклиб	0.1 мкМ	Macklin
Сорафениб	2.5 мкМ	Macklin
Стауроподин	10 нМ	Macklin
Талазопариб	25 нМ	Selleckchem
Энтинонат	1 мкМ	MedChemExpress
Энтректиниб	1 мкМ	Selleckchem

В таблице указаны конечные концентрации препаратов, которые использовали в работе.

Таблица S2. Характеристика красителей, использованных в работе

Краситель	Концентрация	Время окрашивания	Длина волны возбуждения канала, нм	Длина волны эмиссии канала, нм
TMRE	0.1 мкМ	30 мин	541–551	565–605
Tubulin Tracker™ Deep Red	0.33 мкг/мл	30 мин	590–650	662–738
LumiTracker® LysoGreen	0.1 мкМ	5 мин	460–500	512–542
Hoechst-33342	1 мкг/мл	30 мин	325–375	435–485
HMRhoNox-M	2 мкМ	30 мин	541–551	565–605
NucView® 488	2 мкМ	30 мин	460–500	512–542
7-Аминоактиномицин	1 мкг/мл	0 мин	590–650	662–738

Клетки окрашивали красителями в конечных концентрациях, указанных в таблице. Красители регистрировали на флуоресцентном микроскопе в каналах с указанными длинами волн возбуждения и эмиссии.

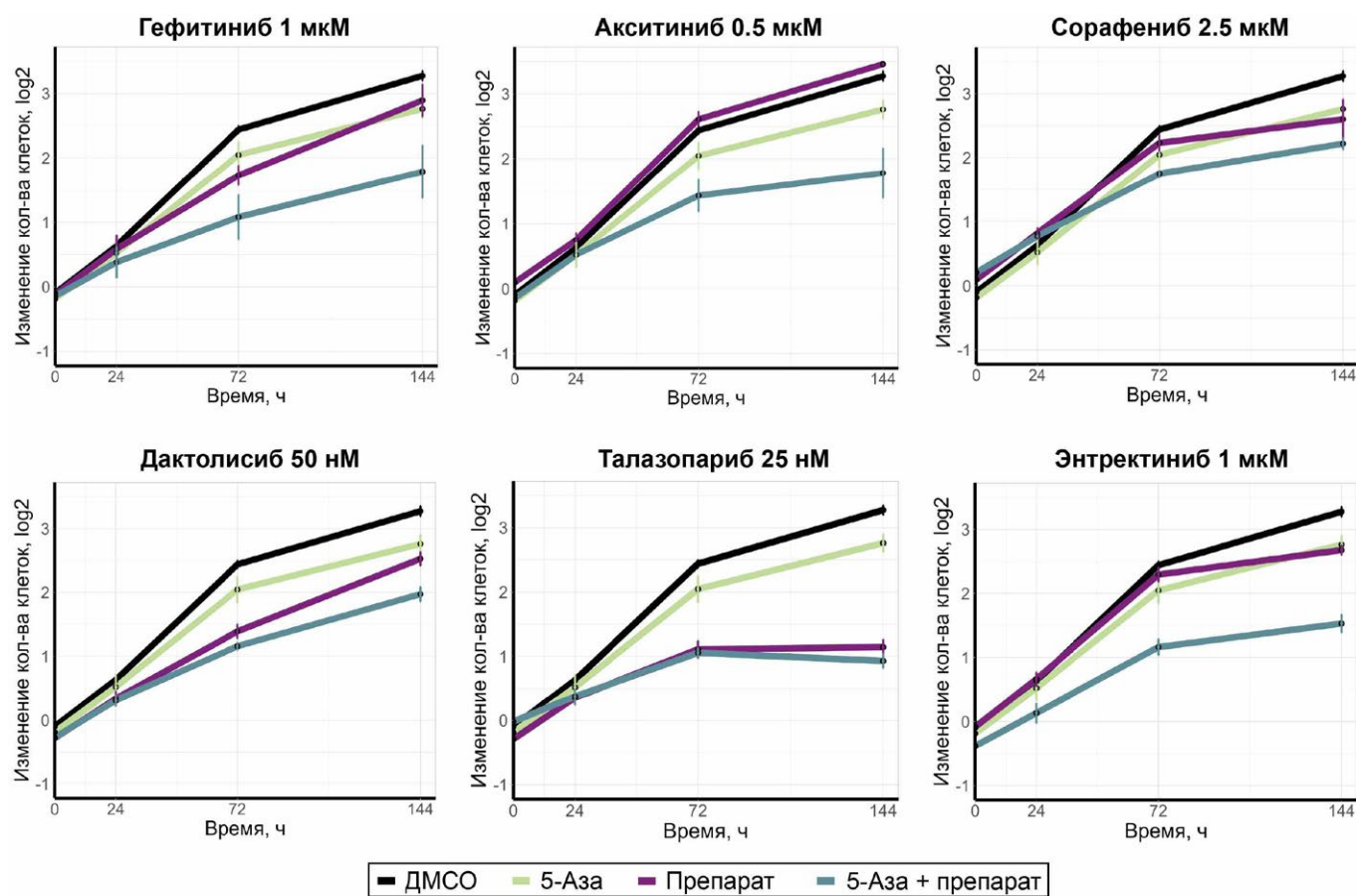


Рис. S1. Эффективность комбинаций 5-азациитидина (5-Аза) с противоопухолевыми препаратами для клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. Клетки одновременно обработали 5-Аза в концентрации 2.5 мкМ и противоопухолевым препаратом (препараты и их концентрации указаны на рисунке), затем инкубировали с ними в течение 144 часов. В качестве контроля использовали ДМСО. На графиках показали среднее значение из 3 повторов, отразили стандартное отклонение (SD)