Том 58, Номер 2

ISSN 0026-8984 Март–Апрель 2024







# содержание

## Том 58, номер 2, 2024

## ОБЗОРЫ

Увеальная меланома: молекулярно-генетические механизмы развития и подходы к терапии	
М. В. Жильникова, О. С. Троицкая, Д. Д. Новак, В. В. Атаманов, О. А. Коваль	189
Молекулярно-генетические механизмы определения пола у тополя	
Н. С. Гладыш, М. А. Ковалев, М. С. Ланцова, М. И. Попченко, Н. Л. Большева, А. М. Старкова, Е. В. Булавкина, Д. С. Карпов, А. А. Кудрявцев, А. В. Кудрявцева	204
Регуляция транскрипции промоторами РНК-полимеразы III в норме и патологии	
А. М. Шварц, К. А. Татосян, Д. В. Стасенко, Д. А. Крамеров	220
Оральный микробиом в развитии рака полости рта	
Е. С. Колегова, А. А. Щеголева, Л. А. Кононова, Е. В. Денисов	234

## ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

Нокаут генов <i>Hsp70</i> модулирует возрастные изменения транскриптома в мышцах ног, снижает скорость локомоций и продолжительность жизни <i>Drosophila melanogaster</i>	
И. В. Кукушкина, П. А. Махновский, В. Г. Згода, Н. С. Курочкина, Д. В. Попов	246
Особенности экспрессии длинных некодирующих PHK TP53TG1, LINC00342, MALAT1, H19 и MEG3 при сахарном диабете типа 2	
О. В. Кочетова, Д. Ш. Авзалетдинова, Г. Ф. Корытина	260
Аллель rs2564978(T), ассоциированный с тяжелым течением гриппа А, нарушает сайт связывания фактора миелоидной дифференцировки PU.1 и снижает активность промотора гена <i>CD55/DAF</i> в макрофагах	
А. Н. Уварова, Е. А. Ткаченко, Е. М. Стасевич, Э. А. Богомолова, Э. А. Жеремян, Д. В. Купраш, К. В. Корнеев	270
Изменения в геноме вируса клещевого энцефалита при культивировании	
В. А. Терновой, Е. П. Пономарева, Е. В. Протопопова, Н. Л. Тупота, Т. П. Микрюкова, В. Б. Локтев	282
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ	
"Биполярное" действие ингибитора васкулогенной мимикрии на экспрессию генов в клетках меланомы	
Н. А. Чуриков, А. А. Вартанян, Е. С. Клушевская, И. Р. Алембеков, А. Н. Кретова, В. Р. Чечеткин, Г. И. Кравацкая, В. С. Косоруков, Ю. В. Кравацкий	295
Метод индуцируемого нокдауна существенных для развития генов в культуре клеток OSC Drosophila melanogaster	
С. В. Марфина, Е. А. Михалева, Н. В. Акуленко, С. С. Рязанский	305
СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ	
Структурные особенности агрегатов скелетномышечного титина	
Л. Г. Бобылёва, Т. А. Урюпина, Н. В. Пеньков, М. А. Тимченко, А. Д. Уланова, А. Г. Габдулхаков, И. М. Вихлянцев, А. Г. Бобылёв	314

Оценка цитотоксичности производных 5-ариламиноурацилов

В. А. Кезин, Е. С. Матюгина, С. А. Суржиков, М. С. Новиков, А. А. Маслова, И. Л. Карпенко, А. В. Иванов, С. Н. Кочетков, А. Л. Хандажинская

325

——— обзоры —

УДК 616-006.6

# УВЕАЛЬНАЯ МЕЛАНОМА: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ

© 2024 г. М. В. Жильникова<sup>а, b</sup>, О. С. Троицкая<sup>а</sup>, Д. Д. Новак<sup>а</sup>, В. В. Атаманов<sup>а, c</sup>, О. А. Коваль<sup>а, b, \*</sup>

<sup>а</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия <sup>b</sup>Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия <sup>c</sup>Новосибирский филиал Национального медицинского исследовательского центра "Межотраслевой научнотехнический комплекс Микрохирургия глаза" им. академика С.Н. Федорова, Новосибирск, 630096 Россия

\*e-mail: o.koval@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 02.06.2023 г. После доработки 30.08.2023 г.

Принята к публикации 09.09.2023 г.

Увеальная меланома (УМ) — это опухоль нейроэктодермального происхождения, которая возникает в результате злокачественной трансформации меланоцитов сосудистой оболочки глазного яблока: радужки, цилиарного тела и хориоидеи. УМ составляет 5% всех выявляемых случаев меланомы, однако она крайне агрессивна: у половины пациентов с УМ метастазы развиваются в первые 1-2 года после появления опухоли. Молекулярные механизмы канцерогенеза УМ изучены недостаточно, но показано, что они отличаются от механизмов патогенеза меланомы кожи. Активирующие мутации в генах GNAQ и GNA11, кодирующих большие субъединицы белка G - Gq и G11 соответственно, находят у 90% пациентов с УМ. Основным сигнальным каскадом, ведущим к трансформации меланоцитов увеального тракта, является сигнальный путь Gaq/PKC/MAPK, а основные белки-регуляторы этого каскада служат мишенями при разработке таргетных препаратов. Наиболее часто развитие метастатической формы УМ связывают с мутациями в генах BAP1, EIF1AX, GNA11, GNAQ и SF3B1. Прогнозировать метастазирование с высокой эффективностью позволяет коммерческая тестовая панель экспрессии из 15 генов в комбинации с мутационной панелью из семи генов, дополненная данными о размере первичной опухоли. Уровень риска развития метастазов определяет выбор терапии и режим наблюдения за пациентами. При этом отсутствует системная терапия метастатической УМ: новые препараты, проходящие клинические испытания, в большинстве случаев относятся либо к таргетной терапии, направленной на ингибирование белковых продуктов мутантных генов, либо к иммунотерапии, призванной стимулировать иммунный ответ против специфических антигенов. В представленном обзоре рассмотрены не только указанные подходы, но и потенциальные терапевтические мишени эпигенетической регуляции развития УМ.

Ключевые слова: увеальная меланома, меланосомы, драйверные мутации, BAP1, GNAQ/11, тебентафусп, эпигенетические мишени

DOI: 10.31857/S0026898424020017, EDN: NQWJSC

Сокращения:  $\alpha$ -МСГ –  $\alpha$ -меланоцитстимулирующий гормон; УМ – увеальная меланома; УФ – ультрафиолетовое излучение; ВАР1 – BRCA-ассоциированный белок 1; с-Меt – рецептор фактора роста гепатоцитов; САR – химерный антигенный рецептор; СҮSTLR2 – цистеиниллейкотриеновый рецептор 2; DAG – диацилглицерин; EGF – эпидер-мальный фактор роста; EIF1AX – эукариотический фактор инициации трансляции 1А, сцепленный с X-хромосомой; FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США; FGF – фактор роста фибробластов; *GNAQ, GNA11* – гены, кодирующие  $\alpha$ -субъединицы G-белка (Gaq); HER2,3 – рецептор эпидер-мального фактора роста человека 2,3; HGF – фактор роста гепатоцитов; HLA –лейкоцитарный антиген человека; IP3 – инозитол-1,4,5-трифосфат; MAPK – активируемая митогенами протеинкиназа; MC1R – рецептор меланокор-тина-1; Mel-CAM – поверхностный гликопротеин, молекула клеточной адгезии меланомы; MITF – фактор транскрипции, ассоциированный с микрофтальмией; PD-1 – белок программируемой клеточной гибели; PDGF-B – тром-боцитарный фактор роста B; PKC – протеинкиназа C; PLCB4 – фосфолипаза C бета 4; SF3B1 – субъединица фактора сплайсинга 3b; TCR – T-клеточный рецептор; VEGF-A – фактор роста эндотелия сосудов А.

#### ЖИЛЬНИКОВА и др.

#### УВЕАЛЬНАЯ МЕЛАНОМА

Увеальная меланома (УМ) развивается из меланоцитов сосудистой оболочки глаза. Источником меланоцитарной опухоли могут служить пигментные клетки радужки, цилиарного тела и собственно сосудистой оболочки глаза – хориоидеи, на которую приходится до 90% случаев заболевания [1]. УМ обычно является односторонним заболеванием и обнаруживается у пациентов в возрасте 50–70 лет, хотя меланома радужки может встречаться и у более молодых людей. Меланома хориоидеи, как правило, более злокачественна, позже диагностируется, чаще метастазирует и в целом имеет наиболее неблагоприятные прогнозы [2].

Частота УМ варьирует от 1 до 9 случаев на 10<sup>6</sup> человек в год. При этом мужчины болеют чаще, чем женщины (5.8 против 4.4 случаев на 1 млн человек), у них чаще образуются метастазы (26 против 12.96% через 1 г. после постановки диагноза), а смертность в 2 раза выше [3].

#### ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ФУНКЦИИ МЕЛАНОЦИТОВ

Меланоциты — клетки нейроэктодермального происхождения, содержащие пигмент меланин. Меланоциты локализуются во многих тканях и органах человека: в базальном слое эпидермиса, волосяных фолликулах, радужной оболочке, пигментном слое сетчатки и сосудистой оболочке глаза, сосудистой полоске внутреннего уха, а также в некоторых ядрах головного мозга, например, в голубом пятне и черной субстанции [4].

Меланоциты происходят из клеток нервного гребня — структуры, образующейся между поверхностной эктодермой и нервной трубкой после замыкания последней. Клетки нервного гребня способны дифференцироваться в меланобласты, которые мигрируют в различные участки и дифференцируются в меланоциты и меланоцитарные стволовые клетки. Зрелые меланоциты с помощью многочисленных дендритов формируют контакты с окружающими клетками [5]. Мутации в генах транскрипционных факторов и сигнальных молекул, регулирующих миграцию меланобластов, приводят к гипопигментации, обусловленной недостатком меланоцитов [4].

В меланоцитах синтезируются две основные формы меланина — черный/коричневый эумеланин и красный/желтый феомеланин. Синтез меланина происходит в лизосомоподобных структурах меланоцитов — меланосомах, проходящих по мере накопления в них меланина четыре стадии зрелости (рис. 1) [6].



Рис. 1. Стадии созревания меланосом. АГ – аппарат Гольджи.

Главным регулятором пигментации у многих видов позвоночных, в том числе у человека, является α-меланоцитстимулирующий гормон  $(\alpha - MC\Gamma)$ , который синтезируется в кератиноцитах и фибробластах, окружающих меланоциты. Недостаточная продукция паракринных факторов кератиноцитами и фибробластами вызывает нарушения пигментации. α-МСГ действует как агонист рецептора меланокортина-1 (MC1R) на меланоцитах. Сигнальный каскад MC1R приводит к активации фактора транскрипции, ассоциированного с микрофтальмией (MITF), который регулирует экспрессию генов ряда ферментов, участвующих в синтезе меланина (например, тирозингидроксилазы или тирозиназы). Мутации в гене *MC1R* приводят к появлению на поверхности меланоцитов нефункциональных рецепторов к α-МСГ и, как следствие, снижают меланогенез в ответ на УФ, что повышает их уязвимость для злокачественной трансформации в меланому [7].

Субстратом для синтеза эумеланина и феомеланина служит тирозин. Тирозингидроксилаза последовательно катализирует гидроксилирование *L*-тирозина в *L*-дофу и ее окисление до дофахинона. Далее пути биосинтеза эумеланина и феомеланина расходятся. Образовавшийся из дофахинона дофахром спонтанно или под воздействием таутомеразы ТУRР2 превращается в индольные, а затем под воздействием белка 1, связанного с тирозиназой (TYRP1), в хиноновые соединения, которые полимеризуются и формируют эумеланин. Феомеланин получается из спонтанно образовавшейся из дофахинона циклодофы, которая конъюгирует с тиолсодержащими молекулами – *L*-цистеином или глутатионом. Активные формы кислорода ускоряют полимеризацию звеньев меланина. В отдельных меланоцитах обычно синтезируются как эумеланины, так и феомеланины, причем соотношение этих двух форм определяется балансом ферментов [9].

Транспорт зрелых меланосом из перинуклеарной зоны к периферии меланоцита и затем к окончанию дендрита опосредуется микротрубочками и актиновыми филаментами. Секреция кератиноцитами эндотелина и ацетилхолина приводит к Са<sup>2+</sup>-зависимому экзоцитозу меланосом, накопленных в окончаниях меланоцитарных дендритов, которые захватываются кератиноцитами [10]. Нарушение транспорта меланосом приводит к гипопигментации кожи и волос [4]. Оказавшись в кератиноцитах, меланосомы распределяются над ядром, образуя колпачковидные структуры. Меланин служит физическим барьером, рассеивающим и поглощающим УФ-излучение [7].

#### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ

Молекулярные механизмы канцерогенеза УМ отличаются от механизмов, определяющих возникновение меланомы кожи, хотя факторами риска обеих разновидностей меланомы считаются определенные фенотипические особенности: светлая кожа, глаза и волосы, повышенная чувствительность к солнцу, большое число невусов — доброкачественных скоплений меланоцитов. Кроме того, в развитии увеальной и особенно хориоидальной меланомы УФ отводится незначительная роль; в геноме лишь примерно у трети детектируемых УМ обнаруживают нуклеотидные замены, ассоциированные с УФ-повреждениями. Воздействие УФ рассматривают как одну из возможных причин возникновения только меланомы радужки, более доступной для излучения. Так, в клетках меланомы радужки обнаружены драйверные мутации в генах *BRAF*, NRAS и KIT, как и в кожной меланоме [11].

Драйверными мутациями, необходимыми для опухолевой трансформации меланоцитов сосудистой оболочки, являются мутации в гене GNAQ, кодирующем субъединицу  $\alpha$ -q белка G (гуанинсвязывающий белок), или в его паралоге – гене GNA11, кодирующем субъединицу α-11 белка G. Более 90% всех случаев УМ несут мутации в этих генах в позициях Q209 и R183, усиливающие GTPазную активность белка G [12, 13]. Сигнальный путь Gall/O ассоциирован с геном CYSTLR2, кодирующим цистеиниллейкотриеновый рецептор 2, который участвует в регуляции пролиферации и клеточного роста. Сигнальный каскад запускается связыванием лейкотриенов с CYSTLR2, однако мутации в GNAO и GNA11 ведут к конститутивной CYSTLR2-независимой активации белка G. Также мутация Leu129Gln в самом гене CYSTLR2, которая встречается в 10% случаев УМ, ведет к потере чувствительности рецептора к стимуляции лейкотриеном и постоянной лиганднезависимой активации рецептора [14]. Это приводит к активации сигнальных путей, способствующих росту и пролиферации клеток, основные из которых МАРК и FAK/YAP [15]. Мутации в гене GNAQ относятся к ранним событиям онкогенеза, их наличие не позволяет дифференцировать риск метастазирования [16]. Клетки, не несущие мутаций в генах GNAQ и GNA11, часто содержат мутации в гене фосфолипазы С β4 (*PLCB4*), с которой взаимодействует GNAQ/11 и гидролизует мембранный фосфолипид PIP2 (фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат) до диацилглицерина (DAG) и инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3). DAG и IP3 как вторичные посредники регулируют множество клеточных процессов, основной из которых - активация протеинкиназы С (РКС). РКС фосфорилирует фактор RasGRP3

#### ЖИЛЬНИКОВА и др.

в положении T133 и активирует путь MAPK. Ранее считали, что неканоническая активация пути FAK/YAP через GNAQ/11 в УМ не зависит от PLC $\beta$  [17, 18], но недавно было показано, что PKC, активированная PLC $\beta$ -зависимым путем, может также фосфорилировать белки из каскада FAK (киназа фокальной адгезии), что ведет к активации онкогенного пути YAP [19]. Тем не менее этот путь реализуется значительно реже, чем пути MAPK.

Схематически онкогенный каскад в клетках УМ представлен на рис. 2. Наиболее исчерпывающее исследование потенциальных механизмов трансформации меланоцитов с развитием УМ было проведено на клеточных моделях УМ с применением методов геномного редактирования и фармакологических ингибиторов всех стадий передачи сигнала, расположенных ниже рецептора CYSTLR2 [19]. Оказалось, что все онкогенные пути в УМ проходят через PLCβ, а путь CYSTLR2→GNAQ/11→PLCβ является линейным сигнальным модулем. В подавляющем большинстве образцов УМ, но не меланомы кожи, выявлен высокий уровень активности PLCβ и большое количество RasGRP3.



**Рис. 2**. Сигнальный каскад цистеиниллейкотриенового рецептора 2. ЭПР – эндоплазматический ретикулум. Объяснения в тексте.

Второе важное мутационное событие - потеря одной копии хромосомы 3 и соматические мутации в гене *BAP1* на сохранившейся гомологичной хромосоме 3р21.1, инактивирующие этот белок с функцией опухолевого супрессора. Мутации в гене ВАР1 обычно встречаются у пациентов, возраст которых (30-59 лет) меньше среднего возраста (62 года) пациентов с УМ [16]. По статистике такие пациенты имеют высокий риск метастазирования. Белок ВАР1 (BRCA-ассоциированный белок 1) - это С-концевая убиквитингидролаза, которая локализуется в ядре и удаляет убиквитиновые метки с белкового субстрата, преимущественно с гистона Н2А. ВАР1 является многофункциональным белком, он регулирует клеточный цикл и рост клеток, репарацию повреждений ДНК, процессы клеточной гибели и перестройку хроматина [20]. Потеря функции ВАР1 ингибирует гомологичную репарацию ДНК, в результате чего двухцепочечные разрывы ДНК в клетке начинают чаще репарироваться с негомологичным

соединением концов [1]. Кроме того, инактивация ВАР1 ведет к потере способности клеток дифференцироваться в меланоциты и усиливает метастазирование. Применение ингибиторов деацетилазы гистонов (HDAC) компенсирует отсутствие ВАР1 и возвращает клеткам способность дифференцироваться в меланоциты в экспериментах *in vitro* [21]. Таким образом, препараты, стимулирующие дифференцировку меланоцитов, могут иметь терапевтический потенциал при УМ. В некоторых УМ обнаруживаются мутации в кодоне R625 гена SF3B1 (фактор сплайсинга ЗВ субъединицы 1), что ведет к появлению альтернативных форм некоторых мРНК и некодирующих регуляторных РНК, а также в гене *EIFIAX* (эукариотический фактор инициации трансляции 1А, сцепленный с Х-хромосомой) [22].

К распространенными хромосомными аномалиями при УМ относятся также делеции 1р, 6q и 8p и увеличение числа фрагментов 1q, бр и 8q. Кроме того, наблюдается нарушение регуляции экспрессии генов, участвующих в дифференцировке и функционировании меланоцитов, что ведет к возвращению меланоцитов в недифференцированное состояние [23].

#### МЕТАСТАЗИРОВАНИЕ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ

Благодаря высокой степени васкуляризации сосудистой оболочки глаза клетки УМ распространяются в отдаленные органы через кровоток. Метастазы УМ обнаруживают более чем у половины пациентов, наиболее часто в печени (свыше 90% метастазов), легких, костях, коже и лимфоузлах. Отмечено, что УМ образует метастазы еще до того, как появляется клиническая возможность диагностировать саму опухоль, — это так называемые микрометастазы или отдельные опухолевые меланоциты. Среднее время жизни пациентов с обнаруженными метастазами — от 6 до 12 мес. [24].

Для того, чтобы покинуть первичную опухоль и закрепиться в новом органе, клетки УМ должны приобрести дополнительные мутации. В метастазах, как и в первичных опухолях, обнаруживают мутации в генах GNAQ (или GNA11), BAP1 и SF3B1, что указывает на их более раннее появление и позволяет считать драйверными [1]. К более поздним мутационным событиям, ассоциированным с метастазированием, относятся мутации в генах факторов перестройки хроматина (*PBRM1* и *EZH2*), а также в генах *CDKN2A*, *ТР53*, однако не установлено точно, какой вклад каждая из этих мутаций вносит в процесс метастазирования [25]. Ретроспективное изучение изменений в транскриптоме клеток меланомы с неблагоприятным прогнозом показало, что в метастазирующих опухолях существенно изменена экспрессия генов, связанных с процессами программируемой клеточной гибели – пироптозом и аутофагией. Нарушения в экспрессии пяти генов, связанных с пироптозом - GSDMC, GSDMD, IL6, NLRP6 и PLCG1, положительно коррелировали с формированием неблагоприятного микроокружения опухоли, что позволяло меланоцитам пролиферировать, инвазировать и быстро мигрировать по мере развития опухоли [26]. В образцах УМ с высоким риском развития метастазов увеличена экспрессия генов, связанных с ангиогенезом, сигнальным путем IL6-JAK-STAT3, окислительным фосфорилированием и метаболизмом активных форм кислорода. Отмечена также высокая экспрессия гена DLC-1, кодирующего Rho-зависимую GTPaзу (RhoGAP), связанную с инвазией и метастазированием меланомы кожи через активацию пути FOXK1/MMP9 [27].

Из первичной опухоли метастазирующие клетки проникают сначала через кровеносную систему в кроветворные органы - костный мозг и селезенку, а затем в печень. Преимущественное метастазирование клеток УМ в печень связывают с синтезом в ней различных факторов роста, рецепторы которых, часто в повышенном количестве, присутствуют на поверхности опухолевых меланоцитов. Так, меланоциты экспрессируют рецептор с-Met. лигандом которого является фактор роста гепатоцитов (HGF), синтезируемый звездчатыми клетками печени [25]. Активированные звездчатые клетки секретируют также большой репертуар факторов роста фибробластов (FGF). Присутствие на поверхности опухолевых меланоцитов большого количества рецепторов FGF (FGFR) связано с низкой выживаемостью пациентов с УМ. Применение ингибиторов FGFR снижало FGF-зависимую пролиферацию опухолевых меланоцитов in vitro [28]. В печени клетки УМ могут располагаться либо вблизи портальных вен. либо в перисинусоидальных пространствах. В ответ на гипоксию меланоциты начинают активно продуцировать фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), стимулируя ангиогенез [25].

В некоторых клеточных линиях УМ выявлена экспрессия рецепторов семейства эпидермального фактора роста (EGFR/HER1, HER2, HER3), что также может быть одной из причин преобладающего развития метастазов именно в печени [29, 30]. Кроме того, прогрессированию и метастазированию УМ способствуют молекулы клеточный адгезии Mel-CAM, представленные на клетках первичной опухоли [31]. Mel-CAM является рецептором факторов роста и различных компонентов внеклеточного матрикса (ламинин, галектин-3), а также корецептором VEGFR2 (лиганд VEGF-A) и PDGFR-β (лиганд PDGF-B), что определяет его роль в опухолевом ангиогенезе [32]. Также отмечено участие Mel-САМ в васкулогенной мимикрии опухолевых клеток, что выражается в формировании капилляроподобных структур и стимуляции эпителиально-мезенхимального перехода опухолевых меланоцитов. Показано, что таргетное ингибирование Mel-CAM с помощью малых интерферирующих РНК или моноклональных антител снижает метастазирование и рост опухоли [33].

Поскольку клетки УМ распространяются по организму гематогенным путем, основными малоинвазивными методами оценки риска метастазирования и поиска новых маркеров метастазирования могут быть жидкостная биопсия крови и анализ образцов костного мозга. Показано, что активация звездчатых клеток печени и последующие изменения внеклеточного матрикса могут регулироваться секретомом из экзосом опухолевых меланоцитов. Такие эк-

зосомы содержат белки, нуклеиновые кислоты и метаболиты, которые доставляют в преметастатические ниши, подготавливая микроокружение к инвазии опухолевых клеток [34]. С целью ранней диагностики изучено присутствие клеток метастатической УМ (МУМ) с антигенами MCSP (протеохондроитинсульфат, ассоциированный с меланомой) и НМВ45 в образцах костного мозга пациентов [35]. Показано, что на ранних сталиях развития МУМ опухолевые клетки присутствуют в костном мозге и представляют собой "дремлющую" опухолевую нишу. Спустя 8.5 лет у 43% пациентов с диагностированными опухолевым меланоцитами в костном мозге было зафиксировано развитие метастазов, что подтвердило концепцию опухолевой ниши из отдельных клеток меланомы, дремлющих в отдаленных органах на ранних этапах развития первичной опухоли [36]. Подобные дремлющие клетки меланомы детектированы и в печени на самых ранних стадиях УМ [37]. Традиционные методы терапии, направленные на быстро делящиеся клетки, будут неэффективны в отношении дремлющих клеток меланомы. Предполагается, что дремлющий режим диссеминированных опухолевых клеток является результатом баланса между анти- и протуморогенными иммунными и воспалительными реакциями, сбоя в активации ангиогенного переключателя, генетической модуляции метастазирования генами-супрессорами и связанными с ними сигнальными путями.

В качестве метода предсказания метастазов опробован также поиск клеток меланомы, циркулирующих в крови пациентов [38, 39]. Как правило, циркулирующие клетки меланомы определяют методом ПЦР по экспрессии в них мРНК тирозиназы или иммуноокрашиванием антигена MCSP [39]. Тем не менее прогностическая значимость детекции циркулирующих опухолевых клеток для оценки риска развития МУМ до сих пор не подтверждена. Можно надеяться, что усовершенствование методов детекции циркулирующих клеток меланомы, позволяющее одновременно определять присутствие нескольких специфических маркеров клетки, позволит снизить неспецифические эффекты и повысить прогностическую значимость жидкостной биопсии при УМ.

#### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ И ОЦЕНКА РИСКА МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ

Риск метастазирования УМ во многом зависит от гистологического типа клеток меланомы. Выделяют веретенообразные клетки с мелким ядром без видимых ядрышек, веретенообразные с крупным ядром и отчетливыми ядрышками, эпителиоидные полигональной формы с одним или несколькими ядрышками и клетки промежуточного типа, более мелкие, чем эпителиоидные. Опухоли с преобладанием эпителиоидных клеток обладают повышенной способностью к формированию метастазов по сравнению с опухолями, состоящими из веретенообразных клеток или имеющими смешанный клеточный состав [40]. На основании профиля экспрессии генов, способности к метастазированию, а также метаболических и иммунологических характеристик можно выделить молекулярные подтипы УМ. Robertson A. G. и соавт. впервые выделили четыре молекулярных подтипа УМ [13]. Молекулярные классификации УМ, предложенные Ortega M. и соавт. [41] и Jager M. G. и соавт. [25], во многом схожи, поэтому далее будет рассмотрен их обобщенный вариант.

УМ по благоприятности прогнозов можно разделить на два класса (табл. 1): прогностически благоприятный класс 1 и прогностически неблагоприятный класс 2. Между этими классами существуют цитогенетические различия, основное из которых — моносомия хромосомы 3, характерная для опухолей класса 2.

Кроме того, в каждом из классов выделяют по два подкласса: А и В в классе 1, С и D в классе 2. Подклассу А класса 1 в меньшей степени свойственны геномные мутации, он характеризуется низким риском метастазирования и имеет мутации в гене EIF1AX. В подклассе В увеличено число копий хромосомы 6р и иногда части хромосомы 8q, повышен риск метастазирования и представлены мутации в гене SF3B1. Наиболее высокий риск метастазирования характерен для подклассов C и D с потерей или инактивирующей мутацией в гене BAP1 и увеличением числа копий хромосомы 8 до трех и более. Мутации в генах EIF1AX, SF3B1 и BAP1 являются взаимоисключающими и служат ключевыми прогностическими маркерами в определении дальнейших преобразований каждого подкласса УМ.

На основе работ Onken M.D. и соавт. [43] компанией "Castle Biosciences" (США) разработан тест DecisionDx-UM транскрипционного анализа 15 генов в образцах первичной УМ для предсказания риска метастазирования в течение 5 лет [44, 45]. В образцах определяют уровень экспрессии генов CDH1, ECM1, EIF1B, FXR1, HTR2B, ID2, LMCD1, LTA4H, MTUS1, RAB31, ROBO1, SATB1 и трех контрольных генов. Показано, что DecisionDx-UM-тестирование обеспечивает значительное повышение прогностической точности у пациентов с УМ по сравнению с клинической классификацией TNM, учитывающей наличие метастазов в лимфоузлах и результаты анализа статуса хромосомы 3. Статус

Класс УМ	Под- класс	Клинико- патологические факторы	Хромосома 3, число копий	Хромосома 8q	Хромосома бр	Ключевая мутация в гене	Риск метас- тазиро- вания	Воспа- ление
1	А	-	2	Две копии	Увеличение чис- ла копий части/ целой хромо- сомы	EIF1AX	< 2%	-
	В	Возраст < 50 лет	2	Увеличение чис- ла копий части хромосомы	Увеличение числа копий	SF3B1	< 21%	-
2	С	Большой диаметр опухоли, хорошая	1	Три копии и более	Две копии	BAP1	74%	-
	D	васкуляризация, высокая митотиче- ская активность	1	Три копии и более; изохромосома 8q	Две копии	BAP1	74%	+

Таблица 1. Молекулярная классификация увеальной меланомы\*

\*Адаптировано по [25].

хромосомы 3 не обеспечивает прогностической информации, которая не зависит от результатов DecisionDx-UM-теста (GEP-тест). Для более точного прогнозирования позже была разработана дополнительная панель DecisionDx-UM-Seq, в которой методом секвенирования оценивают мутации в семи генах, значимых для метастазирования УМ (GNAO, GNA11, CYSLTR2, *PLCB4* и *SF3B1*), и определяют в них "горячие" точечные мутации. В гене EIF1AX выявляют мутации в первом и втором экзонах, в гене ВАР1 анализируют мутации во всех экзонах. В ретроспективных исследованиях показано, что мутации в генах *EIF1AX* и *SF3B1* ассоциированы с лучшим прогнозом по сравнению с мутациями в гене BAP1 [22, 46]. УМ с мутацией в гене EIF1AX относятся к опухолям с наименьшим риском метастазов. К первому классу относятся УМ с низким риском метастазирования в течение 5 лет – в классе 1*А* риск развития метастазов составляет до 2%, в классе 1В до 21%; ко второму классу – УМ с высоким риском метастазирования – до 72% [44]. На основании данных классификации УМ принимают решение о выборе терапии и частоте наблюдений пациентов в течение года и далее [47]. Кроме того, опубликованы работы, ставящие под сомнение однозначность выводов на основании только DecisionDx-UM-теста. Показано, что прогностический риск может быть оценен более точно, если учитывать результаты дискриминационного теста DecisionDx-UM и размеры опухоли у пациентов с УМ хориоидеи или цилиарного тела. Учет размера опухоли улучшал прогнозирование на основе DecisionDx-UM-теста [48]. Тем не менее нужно учитывать и другие показатели, кроме размера, например, стадию заболевания и гистологический тип клеток УМ [49, 50].

#### ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ ТЕРАПИЯ УВЕАЛЬНОЙ МЕЛАНОМЫ

#### Терапия первичной опухоли

Выбор терапевтического подхода к лечению первичной УМ зависит от многих факторов, в числе которых размер и локализация опухоли, а также возраст и состояние здоровья пациента. Большие (> 8 мм) опухоли преимущественно удаляют путем энуклеации, при этом частота повторного развития опухоли достаточно низкая [51]. Однако в последнее время наблюдаются тенденции к выбору способов терапии первичной УМ, позволяющих сохранить глаз и зрение. Так, применяют два хирургических подхода – трансретинальную и транссклеральную эндорезекцию, которые обеспечивают высокие шансы сохранения зрения, однако повышают риск рецидива опухоли по сравнению с энуклеацией. Также распространена лучевая терапия, в частности, брахитерапия радиоизотопами <sup>125</sup>I и <sup>106</sup>Ru, при которой излучение воздействует непосредственно на глазную опухоль. Этот подход позволяет минимизировать возможные негативные воздействия на другие ткани, а частота рецидива остается низкой [52].

#### Терапия метастатической увеальной меланомы

Применение таких химиопрепаратов, как дакарбазин, темозоломид, цисплатин, треосульфан, фотемустин, винкристин, а также их различных комбинаций оказалось неэффективным при МУМ [53]. УМ имеет ряд особенностей, которые делают ее менее восприимчивой к современным иммунотерапевтическим подходам, чем меланома кожи. Показано, что адоптивный перенос аутологичных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) не способствует регрессии метастатической УМ [54].

Схемы системной терапии МУМ в настоящее время не разработаны. В 2022 году FDA одобрило первый лекарственный препарат против метастатической УМ – КІММТКАК (общее название тебентафусп) (URL: https:// www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/novel-drug-approvals-2022). Teбентафусп – это химерный белок, состоящий из эффекторной анти-CD3-части и вариабельного фрагмента Т-клеточного рецептора (TCR), специфичного к фрагменту антигена gp100 [55]. Такая химерная молекула двойной специфичности формирует "синапс", сближающий CD3<sup>+</sup> Т-клетки с клетками УМ. Мембранный гликопротеин gp100 экспрессируется на высоком уровне в трансформированных меланоцитах, на среднем уровне в нормальных меланоцитах и участвует в созревании меланосом, поэтому его рассматривают как потенциальную терапевтическую мишень. Однако антиген gp100 узнается в комплексе с HLA-A\*0201, найденным только примерно у половины представителей европеоидной расы, что ограничивает применение препарата [56]. Согласно недавно опубликованным результатам международного клинического исследования III фазы, медиана общей выживаемости у получавших тебентафусп пациентов с УМ была значительно увеличена по сравнению с пациентами контрольной группы — с 16 до 21.7 мес. соответственно [57]. Поскольку одобрено применение тебентафуспа пациентами с подтипом HLA-A2\*02:0, встает необходимость в разработке подобного препарата для других подтипов HLA. Таким препаратом может стать RO7293583, биспецифическое антитело к CD3 и TYRP1, испытания которого проходят на пациентах с ТҮКР1-положительной меланомой вне зависимости от подтипа HLA (NCT04551352) [58]. ТҮКР1, связанный с тирозиназой белок 1, поддерживает стабильность тирозиназы и участвует в синтезе эумеланина и поддержании структур меланосом.

Избежать ограничений в виде различных вариантов HLA для T-клеточной терапии у пациентов можно благодаря применению T-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR-Tклеток). В доклинических испытаниях показано, что препараты CAR-T, нацеленные на HER2, эффективно уничтожают клетки УМ [59]. В настоящий момент в фазе I клинических испытаний проходит препарат на основе CAR-T-клеток к антигену GD2 (NCT03635632). Этот антиген широко экспрессируется в опухолях нейроэктодермального происхождения, в том числе в клетках УМ, и усиливает пролиферацию, миграцию и адгезию опухолевых клеток [60].

Комбинация таргетной терапии и радиотерапии помогла добиться устойчивого ответа на лечение пациентов с МУМ. Так, эффективные при кожной меланоме препараты на основе антител - ниволумаб и ипилимумаб использовали в сочетании с радиоэмболизацией с препаратом иттрия (Ү-90) [61]. Ниволумаб представляет собой антитело к белку программируемой клеточной гибели PD-1, который экспрессируется на Т-клетках. При канцерогенезе PD-1 взаимодействует со своим лигандом PD-L1, в избытке представленном на поверхности опухолевых клеток, что приводит к снижению пролиферации Т-клеток и их гибели. Применение ниволумаба позволяет блокировать это взаимодействие и запустить иммунный ответ против опухолевых меланоцитов. Ипилимумаб – антитело к рецептору CTLА-4 Т-лимфоцитов, взаимодействие которого с СD80 и СD86 на поверхности меланоцитов предотвращает активацию иммунных клеток. Соответственно, применение ипилимумаба стимулирует активацию Т-клеток, специфичных к опухолевым антигенам [62]. В настояший момент проходят клинические испытания (NCT02913417, NCT03472586) комбинированной терапии ниволумабом и ипилимумабом при УМ.

Как уже отмечено, в клетках УМ постоянно активирован сигнальный путь, в который вовлечена РКС и нижестоящий сигнальный каскад Ras/Raf/MEK/ERK. Соответственно, белки этого сигнального каскада могут служить молекулярными мишенями для противоопухолевых средств. Одним из первых исследованных вешеств. воздействующих на данный сигнальный путь, был ингибитор киназы МЕК – селуметиниб, который проходит фазу I клинических испытаний (NCT02768766). Тем не менее ингибирование МЕК часто активирует аутофагию, способствующую выживанию опухолевых клеток. Описано успешное применение комбинации ингибитора МЕК и ингибитора аутофагии гидроксихлорохина [63]. В качестве потенциальной мишени рассматривается и РКС, для которой разработаны ингибиторы, такие как сотрастаурин (первого поколения) и препарат LXS196. или даровасертиб. проходящий в настоящее время клинические испытания (I/II фазы по ускоренному протоколу для орфанных препаратов) на когорте из 68 пациентов с метастатической формой УМ [64-68]. Даровасертиб представляет собой малую молекулу с молекулярной массой 472.48, способную ингибировать классические изоформы РКС ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), а также ее новые изоформы  $\delta, \epsilon, \eta, \theta$ .

Клетки УМ несут рецепторы половых гормонов, в частности, эстрогенов. Высокая экспрессия рецепторов эстрогенов ассоциирована с преимущественно эпителиоидной морфологией клеток, моносомией хромосомы 3 и мутацией в *BAP1*, которые часто ассоциированы с последующим метастазированием [69]. Поэтому рецепторы эстрогенов рассматриваются как возможные мишени для гормональной терапии УМ с использованием их селективных модуляторов. Так, *in vitro* показано, что использование тамоксифена, антагониста рецептора эстрогена, снижает взаимодействие клеток УМ с матриксом, предотвращая инвазию и метастазирование опухоли [70].

В развитии УМ участвуют нарушения эпигенетической регуляции экспрессии генов, в частности, аберрантное метилирование ДНК и модификации гистонов, а также некодирующие РНК, такие как микроРНК и длинные некодирующие РНК [71]. Экспрессия генов микроРНК регулируется уровнем метилирования их промоторов, поэтому гипометилирующие агенты, такие как 5-аза-2'-дезоксицитидин, способствуют повышению экспрессии микроРНК, что показано для микроРНК-137 [72]. В клетках УМ микроРНК-137 действует как опухолевый супрессор, поэтому активация ее экспрессии может подавлять опухолевую прогрессию. Показано, что микроРНК 181а-5р ингибирует развитие УМ посредством взаимодействия с белками GNAO и AKT3 [73], поэтому активация экспрессии микроРНК 181а-5р может подавлять опухолевую прогрессию.

В доклинических испытаниях успешными оказались ингибиторы деацетилазы гистонов (HDAC) и ДНК-метилтрансферазы, вызывающие остановку роста и инвазии клеток УМ [52]. Показано, что ингибирование HDAC способствует переходу УМ из класса высокого риска метастазирования в класс низкого риска метастазирования [74]. Ингибиторы HDAC, такие как вориностат (SAHA) и панобиностат (LBH589), могут использоваться в адъювантной терапии пациентов с УМ из подкласса высокого риска метастазирования, участвуя в предотврашении разрастания микрометастазов [21]. При скрининге хинолиновых производных в качестве потенциальных ингибиторов HDAC показано, что ингибирование HDAC-6 наиболее эффективно подавляет жизнеспособность клеток УМ в культуре [75]. Поэтому HDAC-6 рассматривается как многообещающая терапевтическая мишень при УМ. Селективный ингибитор HDAC-6, АСҮ-1215 (риколиностат) подавлял рост клеток УМ in vitro и in vivo [76]. Также предложен универсальный пан-HDAC ингибитор энтиностат, который, в том числе в комбинации с пембролизумабом, уже испытывается на пациентах [77].

Таблица 2. Таргетные препараты, одобренные для лечения УМ и МУМ и проходящие испытания

Молеку- лярная мишень	Агент	Препарат	Показания	Стадия испытаний	Ссылка
gp100	Химерное антитело с двойной специфично- стью	мерное антитело войной специфично- ю Тебентафусп УМ, МУМ, генотип CD3+-Т кле- ток HLA-A*0201		Фаза II	[55-57]
TYRP1	Химерное антитело с двойной специфично- стью	RO7293583	ТҮRР-положительные УМ, мела- нома кожи, меланома слизистых оболочек, не зависит от типа HLA T-клеток	Фаза I	[58]
PD-1	Антитело	Ниволумаб Пембролизумаб	МУМ	Фаза II	[61, 79]
CTLA-4	Антитело	Ипилимумаб	МУМ	Фаза II	[61]
GD2	CAR-Т-клетки	-	GD2-положительные УМ и мела- нома кожи	Фаза I	[60, 79]
HER2	CAR-Т-клетки	-	HER2-положительные УМ и ме- ланома кожи, резистентные к ан- ти-PD-1 терапии	Иссл	[59]
	Ингибитор GTРазной активности	Имидазопиперазин (GQ262)	УМ с мутациями в GNAQ/11	Иссл	[80]
Gaq		FR900359 (цикличе- ский диксипептид)	УМ, МУМ	Иссл	[81, 82]
		YM-254890 (циклический дикси- пептид)	УМ, МУМ с активирующими мутациями в GNAQ/11 и дикого типа	Иссл	[82-84]
РКС	Ингибитор изоформы РКС β	Сотрастаурин (АЕВ071)	Солидные опухоли, в том числе УМ	Фаза II пре- кращена	[64, 65]
	Ингибитор изоформ РКС (α, β, δ, є, η, θ)	Даровасертиб (LXS196)	МУМ	Фаза I/ II	[65–67, 85]

#### ЖИЛЬНИКОВА и др.

Молеку- лярная мишень	Агент	Препарат	Показания	Стадия испытаний	Ссылка
MEK	Специфический ингиби- тор киназной активно- сти MEK1/2	Селуметиниб (AZD6244, ARRY- 142886)	МУМ с активирующими мутация- ми в GNAQ/11	Фаза III	[86]
	Аллостерический ин- гибитор тирозинкиназ второго поколения	Траметиниб	МУМ	Фаза II	[85, 87]
	Ингибитор тирозинки- наз с широкой специ- фичностью	Кабозантиниб	МУМ	Фаза II	[88]
FAK	Обратимый селективный ингибитор киназной активности	VS-4718	МУМ	Фаза I	[85]
C-Met	Ингибитор МЕТ и фак- тора роста гепатоцитов HGFR	Кризотиниб	МУМ	Фаза II	[83, 89]
VEGF	Рекомбинантное гума- низированное антитело стин)		МУМ	Фаза II	[90]
	Фрагмент гуманизиро- ванного антитела	Ранибизумаб	МУМ	Иссл	[91]
HDAC	Ингибитор гистондеа- цетилаз	Вориностат (SAHA)	МУМ	Фаза II	[21, 92]
	Ингибитор HDAC6	Риколиностат (АСҮ- 1215)	МУМ	Фаза Ib	[75]

Окончание таблицы 2

Примечание. МУМ – метастатическая увеальная меланома; Иссл – фаза доклинических исследований.

В табл. 2 представлены основные таргетные препараты, проходящие доклинические и клинические исследования, в качестве средств для лечения УМ. На настоящий момент в базу данных ClinicalTrials.gov депонированы данные более чем о 70 продолжающихся клинических испытаниях препаратов и их комбинаций для противоопухолевой терапии УМ, значительная часть из которых предназначена для иммунотерапии и таргетной терапии, что подтверждает приоритетность этих направлений.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метастатические формы УМ плохо отвечают как на стандартные методы химиотерапии. так и на большинство новых иммунотерапевтических подходов. Редкая встречаемость МУМ не позволяет проводить широкомасштабные клинические испытания новых методов и препаратов, что ограничивает прогресс в лечении. Тем не менее нельзя не отметить успех, связанный с созданием биспецифических рекомбинантных антител, таких, например, как gp100-таргетированный препарат тебентафусп, одобренный FDA в 2022 году. Очевидно, что в ближайшее время подобные препараты будут разработаны и для других специфических мишеней УМ. Более глубокое понимание активации молекулярных каскадов, расположенных как ниже, так и выше GNAQ/11, также может стать источником потенциальных мишеней УМ для создания терапевтических ингибиторов.

Среди других потенциальных мишеней можно выделить эпигенетические маркеры клеток УМ, такие как деацетилазы гистонов, ингибиторы, которые уже проходят клинические испытания, и микроРНК, положительные эффекты регуляции которых пока оцениваются только в фундаментальных исследованиях и требуют более детального изучения.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (№ 23-14-00285) (разделы "Молекулярные механизмы развития увеальной меланомы", "Метастазирование увеальной меланомы", "Молекулярно-генетическая классификация увеальной меланомы и оценка риска метастазирования" и "Противоопухолевая терапия увеальной меланомы") и выполнено в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН (№ 121030200173-6) (разделы "Увеальная меланома" и "Происхождение и функции меланоцитов").

Настоящая работа выполнена без привлечения людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Smit K.N., Jager M.J., De Klein A., Kiliç E. (2020) Uveal melanoma: towards a molecular understanding. *Prog. Retin. Eye Res.* **75**, 100800.
- Shields C.L., Manalac J., Das C., Ferguson K., Shields J.A. (2014) Choroidal melanoma: clinical features, classification, and top 10 pseudomelanomas. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 25(3), 177–185.
- Singh A.D., Turell M.E., Topham A.K. (2011) Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology*. 118(9), 1881–1885.
- Lin J.Y., Fisher D.E. (2007) Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*. 445(7130), 843–850.
- Bertrand J., Steingrimsson E., Jouenne F., Paillerets B., Larue L. (2020) Melanoma risk and melanocyte biology. *Acta Derm. Venereol.* 100(11), 272–283.
- D'Alba L., Shawkey M.D. (2019) Melanosomes: biogenesis, properties, and evolution of an ancient organelle. *Physiol. Rev.* 99(1), 1–19.
- Upadhyay P.R., Ho T., Abdel-Malek Z.A. (2021) Participation of keratinocyte- and fibroblast-derived factors in melanocyte homeostasis, the response to UV, and pigmentary disorders. *Pigment. Cell Melanoma Res.* 34(4), 762–776.
- 8. Ohbayashi N., Fukuda M. (2020) Recent advances in understanding the molecular basis of melanogenesis in melanocytes. *F1000Res.* **9**, 608.
- Solano F. (2020) Photoprotection and skin pigmentation: melanin-related molecules and some other new agents obtained from natural sources. *Molecules*. 25(7), 1537.
- Li M., Knapp S.K., Iden S. (2020) Mechanisms of melanocyte polarity and differentiation: What can we learn from other neuroectoderm-derived lineages? *Curr. Opin. Cell Biol.* 67, 99–108.
- Van Der Kooij M.K., Speetjens F.M., Van Der Burg S.H., Kapiteijn E. (2019) Uveal versus cutaneous melanoma; same origin, very distinct tumor types. *Cancers.* 11(6), 845.
- Van Raamsdonk C.D., Griewank K.G., Crosby M.B., Garrido M.C., Vemula S., Wiesner T., Obenauf A.C., Wackernagel W., Green G., Bouvier N., Sozen M.M., Baimukanova G., Roy R., Heguy A., Dolgalev I., Khanin R., Busam K., Speicher M.R., O'Brien J., Bastian B.C. (2010) Mutations in *GNA11* in uveal melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363(23), 2191–2199.
- Robertson A.G., Shih J., Yau C., Gibb E.A., Oba J., Mungall K.L., Hess J.M., Uzunangelov V., Walter V., Danilova L., Lichtenberg T.M., Kucherlapati M., Kimes P.K., Tang M., Penson A., Babur O., Akbani R., Bristow C.A., Hoadley K.A., Iype L., Chang M.T., Cherniack A.D., Benz C., Mills G.B., Verhaak R.G.W., Griewank K.G., Felau I., Zenklusen J.C., Gershenwald J.E., Schoenfield L., Lazar A.J., Abdel-Rahman M.H., Roman-Roman S., Stern M.-

H., Cebulla C.M., Williams M.D., Jager M.J., Coupland S.E., Esmaeli B., Kandoth C., Woodman S.E., (2017) Integrative analysis identifies four molecular and clinical subsets in uveal melanoma. *Cancer Cell.* **32**(2), 204–220. e15.

- Moore A.R., Ceraudo E., Sher J.J., Guan Y., Shoushtari A.N., Chang M.T., Zhang J.Q., Walczak E.G., Kazmi M.A., Taylor B.S., Huber T., Chi P., Sakmar T.P., Chen Y. (2016) Recurrent activating mutations of G-protein-coupled receptor CYSLTR2 in uveal melanoma. *Nat. Genet.* 48(6), 675–680.
- Park J.J., Diefenbach R.J., Joshua A.M., Kefford R.F., Carlino M.S., Rizos H. (2018) Oncogenic signaling in uveal melanoma. *Pigment. Cell Melanoma Res.* 31(6), 661–672.
- Harbour J.W., Onken M.D., Roberson E.D.O., Duan S., Cao L., Worley L.A., Council M.L., Matatall K.A., Helms C., Bowcock A.M. (2010) Frequent mutation of *BAP1* in metastasizing uveal melanomas. *Science*. 330(6009), 1410–1413.
- 17. Feng X., Arang N., Rigiracciolo D.C., Lee J.S., Yeerna H., Wang Z., Lubrano S., Kishore A., Pachter J.A., König G.M., Maggiolini M., Kostenis E., Schlaepfer D.D., Tamayo P., Chen Q., Ruppin E., Gutkind J.S. (2019) A platform of synthetic lethal gene interaction networks reveals that the GNAQ uveal melanoma oncogene controls the hippo pathway through FAK. *Cancer Cell.* 35(3), 457–472.e5.
- Paradis J.S., Acosta M., Saddawi-Konefka R., Kishore A., Lubrano S., Gomes F., Arang N., Tiago M., Coma S., Wu X., Ford K., Day C.-P., Merlino G., Mali P., Pachter J.A., Sato T., Aplin A.E., Gutkind J.S. (2021) Synthetic lethal screens reveal cotargeting FAK and MEK as a multimodal precision therapy for *GNAQ*-driven uveal melanoma. *Clin. Cancer Res.* 27(11), 3190–3200.
- Ma J., Weng L., Bastian B.C., Chen X. (2021) Functional characterization of uveal melanoma oncogenes. *Oncogene*. 40(4), 806–820.
- 20. Louie B.H., Kurzrock R. (2020) BAP1: not just a BRCA1-associated protein. *Cancer Treat. Rev.* **90**, 102091.
- Landreville S., Agapova O.A., Matatall K.A., Kneass Z.T., Onken M.D., Lee R.S., Bowcock A.M., Harbour J.W. (2012) Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest and differentiation in uveal melanoma. *Clin. Cancer Res.* 18(2), 408–416.
- Furney S.J., Pedersen M., Gentien D., Dumont A.G., Rapinat A., Desjardins L., Turajlic S., Piperno-Neumann S., De La Grange P., Roman-Roman S., Stern M.-H., Marais R. (2013) *SF3B1* mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. *Cancer Discov.* 3(10), 1122–1129.
- 23. Souto E.B., Zielinska A., Luis M., Carbone C., Martins-Gomes C., Souto S.B., Silva A.M. (2019) Uveal melanoma: physiopathology and new *in situ*-specific therapies. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **84**(1), 15–32.
- 24. Seedor R.S., Eschelman D.J., Gonsalves C.F., Adamo R.D., Orloff M., Amjad A., Sharpe-Mills E.,

Chervoneva I., Shields C.L., Shields J.A., Mastrangelo M.J., Sato T. (2020) An outcome assessment of a single institution's longitudinal experience with uveal melanoma patients with liver metastasis. *Cancers.* **12**(1), 117.

- Jager M.J., Shields C.L., Cebulla C.M., Abdel-Rahman M.H., Grossniklaus H.E., Stern M.-H., Carvajal R.D., Belfort R.N., Jia R., Shields J.A., Damato B.E. (2020) Uveal melanoma. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 6(1), 24.
- 26. Zhang F., Deng Y., Wang D., Wang S. (2022) Construction and validation of a pyroptosis-related gene signature associated with the tumor microenvironment in uveal melanoma. *Sci. Rep.* **12**(1), 1640.
- Yang X., Hu F., Liu J.A., Yu S., Cheung M.P.L., Liu X., Ng I.O.-L., Guan X.-Y., Wong K.K.W., Sharma R., Lung H.L., Jiao Y., Lee L.T.O., Cheung M. (2020) Nuclear DLC1 exerts oncogenic function through association with FOXK1 for cooperative activation of MMP9 expression in melanoma. *Oncogene*. **39**(20), 4061–4076.
- Seitz T., John N., Sommer J., Dietrich P., Thasler W.E., Hartmann A., Evert K., Lang S.A., Bosserhoff A., Hellerbrand C. (2022) Role of fibroblast growth factors in the crosstalk of hepatic stellate cells and uveal melanoma cells in the liver metastatic niche. *Int. J. Mol. Sci.* 23(19), 11524.
- Trocmé E., Mougiakakos D., Johansson C.C., All-Eriksson C., Economou M.A., Larsson O., Seregard S., Kiessling R., Lin Y. (2012) Nuclear HER3 is associated with favorable overall survival in uveal melanoma. *Int. J. Cancer.* 130(5), 1120–1127.
- Amaro A., Mirisola V., Angelini G., Musso A., Tosetti F., Esposito A.I., Perri P., Lanza F., Nasciuti F., Mosci C., Puzone R., Salvi S., Truini M., Poggi A., Pfeffer U. (2013) Evidence of epidermal growth factor receptor expression in uveal melanoma: inhibition of epidermal growth factor-mediated signalling by Gefitinib and Cetuximab triggered antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Eur. J. Cancer.* 49(15), 3353–3365.
- Lai K., Sharma V., Jager M.J., Conway R.M., Madigan M.C. (2007) Expression and distribution of MUC18 in human uveal melanoma. *Virchows Arch.* 451(5), 967–976.
- Wang Z., Xu Q., Zhang N., Du X., Xu G., Yan X. (2020) CD146, from a melanoma cell adhesion molecule to a signaling receptor. *Sig. Transduct. Target Ther.* 5(1), 148.
- Zhang R., Chen X., Chen S., Tang J., Chen F., Lin Y., Reinach P.S., Yan X., Tu L., Duan H., Qu J., Hou Q. (2022) Inhibition of CD146 lessens uveal melanoma progression through reducing angiogenesis and vasculogenic mimicry. *Cell Oncol.* 45(4), 557–572.
- 34. Piquet L., Coutant K., Mitchell A., Ben Anes A., Bollmann E., Schoonjans N., Bérubé J., Bordelea F., Brisson A., Landreville S. (2022) Extracellular vesicles from ocular melanoma have pro-fibrotic and pro-angiogenic properties on the tumor microenvironment. *Cells.* 11(23), 3828.

- 35. Eide N., Hoifødt H.K., Nesland J.M., Faye R.S., Qvale G.A., Faber R.T., Jebsen P., Kvalheim G., Fodstad Ø. (2013) Disseminated tumour cells in bone marrow of patients with uveal melanoma. *Acta Ophthalmol.* **91**(4), 343–348.
- 36. Eide N., Faye R.S., Høifødt H.K., Sandvik L., Qvale G.A., Faber R., Jebsen P., Kvalheim G., Fodstad Ø. (2019) The results of stricter inclusion criteria in an immunomagnetic detection study of micrometastatic cells in bone marrow of uveal melanoma patients – relevance for dormancy. *Pathol. Oncol. Res.* 25(1), 255–262.
- Mallone F., Sacchetti M., Lambiase A., Moramarco A. (2020) Molecular insights and emerging strategies for treatment of metastatic uveal melanoma. *Cancers.* 12(10), 2761.
- Torres V., Triozzi P., Eng C., Tubbs R., Schoenfiled L., Crabb J.W., Saunthararajah Y., Singh A.D. (2011) Circulating tumor cells in uveal melanoma. *Future Oncol.* 7 (1), 101–109.
- Jin E., Burnier J.V. (2021) Liquid biopsy in uveal melanoma: are we there yet? Ocul. Oncol. Pathol. 7(1), 1–16.
- 40. Amaro A., Gangemi R., Piaggio F., Angelini G., Barisione G., Ferrini S., Pfeffer U. (2017) The biology of uveal melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* **36**(1), 109–140.
- Ortega M., Fraile-Martínez O., García-Honduvilla N., Coca S., Álvarez-Mon M., Buján J., Teus M. (2020) Update on uveal melanoma: translational research from biology to clinical practice (Review). *Int. J. Oncol.* 57(6), 1262–1279.
- 42. Smolková B., Demková L. (2020) Epigenetic changes in malignant uveal melanoma and possibilities of their therapeutic targeting. *Cesk. Slov. Oftalmol.* **76**(2), 103–110.
- 43. Onken M.D., Worley L.A., Char D.H., Augsburger J.J., Correa Z.M., Nudleman E., Aaberg T.M., Altaweel M.M., Bardenstein D.S., Finger P.T., Gallie B.L., Harocopos G.J., Hovland P.G., Mc-Gowan H.D., Milman T., Mruthyunjaya P., Simpson E.R., Smith M.E., Wilson D.J., Wirostko W.J., Harbour J.W. (2012) Collaborative ocular oncology group report number 1: prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma. *Ophthalmology*. **119**(8), 1596–1603.
- 44. Aaberg T.M., Covington K.R., Tsai T., Shildkrot Y., Plasseraud K.M., Alsina K.M., Oelschlager K.M., Monzon F.A. (2020) Gene expression profiling in uveal melanoma: five-year prospective outcomes and meta-analysis. *Ocul. Oncol. Pathol.* 6(5), 360– 367.
- 45. Williams B.K., Siegel J.J., Alsina K.M., Johnston L., Sisco A., LiPira K., Selig S.M., Hovland P.G. (2022) Uveal melanoma patient attitudes towards prognostic testing using gene expression profiling. *Melanoma Manag.* 9(3), 2867.
- 46. Decatur C.L., Ong E., Garg N., Anbunathan H., Bowcock A.M., Field M.G., Harbour J.W. (2016) Driver mutations in uveal melanoma: associations

with gene expression profile and patient outcomes. *JAMA Ophthalmol.* **134**(7), 728.

- Plasseraud K.M., Cook R.W., Tsai T., Shildkrot Y., Middlebrook B., Maetzold D., Wilkinson J., Stone J., Johnson C., Oelschlager K., Aaberg T.M. (2016) Clinical performance and management outcomes with the *DecisionDx-UM* gene expression profile test in a prospective multicenter study. *J. Oncol.* 2016, 1–9.
- Binkley E.M., Bena J.F., Davanzo J.M., Hinz C., Boldt H.C., Singh A.D. (2020) Gene expression profiling prognostication of posterior uveal melanoma. *Ophthalmol. Retina.* 4(6), 620–629.
- Ballhausen A., Urias E., Gruschkus S.K., Williams M., Glover M.S., Qin Y., Gombos D.S., Patel S.P. (2021) Metastatic risk factors associated with class 1A uveal melanoma patients. *Cancers*. 13(13), 3292.
- Augsburger J.J., Skinner C.C., Correa Z.M. (2022) Comparative metastatic rates in GEP class 1A versus 1B posterior uveal melanoma: results contrary to expectations. *Ocul. Oncol. Pathol.* 8(4–6), 242–249.
- Slater K., Hoo P.S., Buckley A.M., Piulats J.M., Villanueva A., Portela A., Kennedy B.N. (2018) Evaluation of oncogenic cysteinyl leukotriene receptor 2 as a therapeutic target for uveal melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 37(2–3), 335–345.
- Chokhachi Baradaran P., Kozovska Z., Furdova A., Smolkova B. (2020) Targeting epigenetic modifications in uveal melanoma. *Int. J. Mol. Sci.* 21(15), 5314.
- Gupta A., Gomes F., Lorigan P. (2017) The role for chemotherapy in the modern management of melanoma. *Melanoma Manag.* 4(2), 125–136.
- 54. Chandran S.S., Somerville R.P.T., Yang J.C., Sherry R.M., Klebanoff C.A., Goff S.L., Wunderlich J.R., Danforth D.N., Zlott D., Paria B.C., Sabesan A.C., Srivastava A.K., Xi L., Pham T.H., Raffeld M., White D.E., Toomey M.A., Rosenberg S.A., Kammula U.S. (2017) Treatment of metastatic uveal melanoma with adoptive transfer of tumour-infiltrating lymphocytes: a single-centre, two-stage, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 18(6), 792–802.
- Damato B.E., Dukes J., Goodall H., Carvajal R.D. (2019) Tebentafusp: T cell redirection for the treatment of metastatic uveal melanoma. *Cancers.* 11(7), 971.
- 56. Middleton M.R., McAlpine C., Woodcock V.K., Corrie P., Infante J.R., Steven N.M., Evans T.R.J., Anthoney A., Shoushtari A.N., Hamid O., Gupta A., Vardeu A., Leach E., Naidoo R., Stanhope S., Lewis S., Hurst J., O'Kelly I., Sznol M. (2020) Tebentafusp, a TCR/anti-CD3 bispecific fusion protein targeting gp100, potently activated antitumor immune responses in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* 26(22), 5869–5878.
- Martinez-Perez D., Viñal D., Solares I., Espinosa E., Feliu J. (2021) Gp-100 as a novel therapeutic target in uveal melanoma. *Cancers.* 13(23), 5968.
- 58. Sandker G.G.W., Middelburg J., Wilbrink E., Molkenboer-Kuenen J., Aarntzen E.H.J.G., Van Hall

T., Heskamp S. (2023) Imaging the pharmacokinetics and therapeutic availability of the bispecific CD3x-TRP1 antibody in syngeneic mouse tumor models. *bioRxiv*. **2023.06**. doi: 10.1101/2023.06.06.543829.

- 59. Forsberg E.M.V., Lindberg M.F., Jespersen H., Alsén S., Bagge R.O., Donia M., Svane I.M., Nilsson O., Ny L., Nilsson L.M., Nilsson J.A. (2019) HER2 CAR-T cells eradicate uveal melanoma and T-cell therapy–resistant human melanoma in IL2 transgenic NOD/SCID IL2 receptor knockout mice. *Cancer Res.* **79**(5), 899–904.
- 60. Nazha B., Ina C., Owonikoko T.K. (2020) Disialoganglioside GD2 expression in solid tumors and role as a target for cancer therapy. *Front. Oncol.* **10**, 1000.
- Pelster M.S., Gruschkus S.K., Bassett R., Gombos D.S., Shephard M., Posada L., Glover M.S., Simien R., Diab A., Hwu P., Carter B.W., Patel S.P. (2021) Nivolumab and ipilimumab in metastatic uveal melanoma: results from a single-arm phase II study. *J. Clin. Oncol.* 39(6), 599–607.
- 62. Koppolu V., Rekha Vasigala V. (2018) Checkpoint immunotherapy by nivolumab for treatment of metastatic melanoma. *J. Can. Res Ther.* **14**(6), 1167.
- Truong A., Yoo J.H., Scherzer M.T., Sanchez J.M.S., Dale K.J., Kinsey C.G., Richards J.R., Shin D., Ghazi P.C., Onken M.D., Blumer K.J., Odelberg S.J., McMahon M. (2020) Chloroquine sensitizes *GNAQ/11*-mutated melanoma to MEK1/2 inhibition. *Clin. Cancer Res.* 26(23), 6374–6386.
- 64. Wu X., Li J., Zhu M., Fletcher J.A., Hodi F.S. (2012) Protein kinase C inhibitor AEB071 targets ocular melanoma harboring GNAQ mutations via effects on the PKC/Erk1/2 and PKC/NF-κB pathways. *Mol. Cancer Ther.* 11(9), 1905–1914.
- 65. Park J.J., Stewart A., Irvine M., Pedersen B., Ming Z., Carlino M.S., Diefenbach R.J., Rizos H. (2022) Protein kinase inhibitor responses in uveal melanoma reflects a diminished dependency on PKC-MAPK signaling. *Cancer Gene Ther.* 29(10), 1384–1393.
- Piperno-Neumann S., Carlino M.S., Boni V., Loirat D., Speetjens F.M., Park J.J., Calvo E., Carvajal R.D., Nyakas M., Gonzalez-Maffe J., Zhu X., Shirley M.D., Ramkumar T., Fessehatsion A., Burks H.E., Yerramilli-Rao P., Kapiteijn E. (2023) A phase I trial of LXS196, a protein kinase C (PKC) inhibitor, for metastatic uveal melanoma. *Br. J. Cancer.* 128(6), 1040–1051.
- 67. Chua V., Lapadula D., Randolph C., Benovic J.L., Wedegaertner P.B., Aplin A.E. (2017) Dysregulated GPCR signaling and therapeutic options in uveal melanoma. *Mol. Cancer Res.* **15** (5), 501–506.
- 68. Lietman C.D., McKean M. (2022) Targeting GNAQ/11 through PKC inhibition in uveal melanoma. *Cancer Gene Ther.* **29**(12), 1809–1813.
- Schoenfield L., Janse S., Kline D., Aronow M.E., Singh A.D., Craven C., Abdel-Rahman M., Cebulla C.M. (2021) Estrogen receptor is expressed in uveal melanoma: a potential target for therapy. *Ocul. Oncol. Pathol.* 7(4), 303–310.

- Miller M., Schoenfield L., Abdel-Rahman M., Cebulla C.M. (2021) Is uveal melanoma a hormonally sensitive cancer? A review of the impact of sex hormones and pregnancy on uveal melanoma. *Ocul. Oncol. Pathol.* 7(4), 239–250.
- Smit K.N., Chang J., Derks K., Vaarwater J., Brands T., Verdijk R.M., Wiemer E.A.C., Mensink H.W., Pothof J., De Klein A., Kilic E. (2019) Aberrant microRNA expression and its implications for uveal melanoma metastasis. *Cancers.* 11(6), 815.
- Chen X., Wang J., Shen H., Lu J., Li C., Hu D.-N., Dong X.D., Yan D., Tu L. (2011) Epigenetics, microRNAs, and carcinogenesis: functional role of microRNA-137 in uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52(3), 1193–1199.
- Wang R., Tahiri H., Yang C., Landreville S., Callejo S., Hardy P. (2023) MiR-181a-5p inhibits uveal melanoma development by targeting GNAQ and AKT3. *Am. J. Cancer Res.* 13(1), 293–306.
- Moschos M.M., Dettoraki M., Androudi S., Kalogeropoulos D., Lavaris A., Garmpis N., Damaskos C., Garmpi A., Tsatsos M. (2018) The role of histone deacetylase inhibitors in uveal melanoma: current evidence. *Anticancer Res.* 38(7), 3817–3824.
- Nencetti S., Cuffaro D., Nuti E., Ciccone L., Rossello A., Fabbi M., Ballante F., Ortore G., Carbotti G., Campelli F., Banti I., Gangemi R., Marshall G.R., Orlandini E. (2021) Identification of histone deacetylase inhibitors with (arylidene)aminoxy scaffold active in uveal melanoma cell lines. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 36(1), 34–47.
- 76. Sundaramurthi H., García-Mulero S., Tonelotto V., Slater K., Marcone S., Piulats J.M., Watson R.W., Tobin D.J., Jensen L.D., Kennedy B.N. (2022) Uveal melanoma cell line proliferation is inhibited by ricolinostat, a histone deacetylase inhibitor. *Cancers.* 14(3), 782.
- 77. Ny L., Jespersen H., Karlsson J., Alsén S., Filges S., All-Eriksson C., Andersson B., Carneiro A., Helgadottir H., Levin M., Ljuslinder I., Olofsson Bagge R., Sah V.R., Stierner U., Ståhlberg A., Ullenhag G., Nilsson L.M., Nilsson J.A. (2021) The PEMDAC phase 2 study of pembrolizumab and entinostat in patients with metastatic uveal melanoma. *Nat. Commun.* **12**(1), 5155.
- Jansen Y.J.L., Seremet T., Neyns B. (2020) Pembrolizumab for the treatment of uveal melanoma: a case series. *Rare Tumors*. 12, 203636132097198.
- 79. Gargett T., Yu W., Dotti G., Yvon E.S., Christo S.N., Hayball J.D., Lewis I.D., Brenner M.K., Brown M.P. (2016) GD2-specific CAR T cells undergo potent activation and deletion following antigen encounter but can be protected from activation-induced cell death by PD-1 blockade. *Mol. Ther.* 24(6), 1135–1149.
- Ge Y., Deng J.-J., Zhu J., Liu L., Ouyang S., Song Z., Zhang X., Xiong X.-F. (2022) Discovery of small molecule Gαq/11 protein inhibitors against uveal melanoma. *Acta Pharm. Sin. B.* 12(8), 3326–3340.
- Onken M.D., Makepeace C.M., Kaltenbronn K.M., Kanai S.M., Todd T.D., Wang S., Broekelmann T.J., Rao P.K., Cooper J.A., Blumer K.J. (2018) Target-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

ing nucleotide exchange to inhibit constitutively active G protein  $\alpha$  subunits in cancer cells. *Sci. Signal.* **11**(546), eaao6852.

- Onken M.D., Makepeace C.M., Kaltenbronn K.M., Choi J., Hernandez-Aya L., Weilbaecher K.N., Piggott K.D., Rao P.K., Yuede C.M., Dixon A.J., Osei-Owusu P., Cooper J.A., Blumer K.J. (2021) Targeting primary and metastatic uveal melanoma with a G protein inhibitor. *J. Biol. Chem.* 296, 100403.
- 83. Hitchman T.D., Bayshtok G., Ceraudo E., Moore A.R., Lee C., Jia R., Wang N., Pachai M.R., Shoushtari A.N., Francis J.H., Guan Y., Chen J., Chang M.T., Taylor B.S., Sakmar T.P., Huber T., Chi P., Chen Y. (2021) Combined inhibition of  $G\alpha q$ and MEK enhances therapeutic efficacy in uveal melanoma. *Clin. Cancer Res.* **27** (5), 1476–1490.
- 84. Lapadula D., Lam B., Terai M., Sugase T., Tanaka R., Farias E., Kadamb R., Lopez-Anton M., Heine C.C., Modasia B., Aguirre-Ghiso J.A., Aplin A.E., Sato T., Benovic J.L. (2023) IGF1R inhibition enhances the therapeutic effects of Gq/11 inhibition in metastatic uveal melanoma progression. *Mol. Cancer Ther.* 22(1), 63–74.
- 85. Tarin M., Némati F., Decaudin D., Canbezdi C., Marande B., Silva L., Derrien H., Jochemsen A.G., Gardrat S., Piperno-Neumann S., Rodrigues M., Mariani P., Cassoux N., Stern M.-H., Roman-Roman S., Alsafadi S. (2023) FAK inhibitor-based combinations with MEK or PKC inhibitors trigger synergistic antitumor effects in uveal melanoma. *Cancers*. 15(8), 2280.
- 86. Carvajal R.D., Piperno-Neumann S., Kapiteijn E., Chapman P.B., Frank S., Joshua A.M., Piulats J.M., Wolter P., Cocquyt V., Chmielowski B., Evans T.R.J., Gastaud L., Linette G., Berking C., Schachter J., Rodrigues M.J., Shoushtari A.N., Clemett D., Ghiorghiu D., Mariani G., Spratt S., Lovick S., Barker P., Kilgour E., Lai Z., Schwartz G.K., Nathan P. (2018) Selumetinib in combination with dacarbazine in patients with metastatic uveal melanoma: a phase III, multicenter, randomized trial (SUMIT). J. Clin. Oncol. 36(12), 1232–1239.
- Amaro A.A., Gangemi R., Emionite L., Castagnola P., Filaci G., Jager M.J., Tanda E.T., Spagnolo F., Mascherini M., Pfeffer U., Croce M. (2023) Cerivastatin synergizes with trametinib and enhances its efficacy in the therapy of uveal melanoma. *Cancers*. 15(3), 886.
- Luke J.J., Olson D.J., Allred J.B., Strand C.A., Bao R., Zha Y., Carll T., Labadie B.W., Bastos B.R., Butler M.O., Hogg D., Munster P.N., Schwartz G.K. (2020) Randomized phase II trial and tumor mutational spectrum analysis from cabozantinib versus chemotherapy in metastatic uveal melanoma (Alliance A091201). *Clin. Cancer Res.* 26(4), 804–811.
- Khan S., Lutzky J., Shoushtari A.N., Jeter J., Marr B., Olencki T.E., Cebulla C.M., Abdel-Rahman M., Harbour J.W., Sender N., Nesson A., Singh-Kandah S., Hernandez S., King J., Katari M.S., Dimapanat L., Izard S., Ambrosini G., Surriga O., Rai A.J., Chiuzan C., Schwartz G.K., Carvajal R.D. (2022) Adju-

vant crizotinib in high-risk uveal melanoma following definitive therapy. *Front. Oncol.* **12**, 976837.

- Yang H., Jager M.J., Grossniklaus H.E. (2010) Bevacizumab suppression of establishment of micrometastases in experimental ocular melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51(6), 2835.
- Li J., Cui Y., Wang Q., Guo D., Pan X., Wang X., Bi H., Chen W., Liu Z., Zhao S. (2014) The prolif-

eration of malignant melanoma cells could be inhibited by ranibizumab via antagonizing VEGF through VEGFR1. *Mol. Vis.* **20**, 649–660.

92. Haas N.B., Quirt I., Hotte S., McWhirter E., Polintan R., Litwin S., Adams P.D., McBryan T., Wang L., Martin L.P., vonMehren M., Alpaugh R.K., Zweibel J., Oza A. (2014) Phase II trial of vorinostat in advanced melanoma. *Invest. New. Drugs.* 32(3), 526–534.

# UVEAL MELANOMA: MOLECULAR-GENETIC MECHANISMS OF ARISING AND THE THERAPEUTIC APPROACHES

M. V. Zhilnikova<sup>1,2</sup>, O. S. Troitskaya<sup>2</sup>, D. D. Novak<sup>1</sup>, V. V. Atamanov<sup>1,3</sup>, O. A. Koval<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>2</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia

<sup>3</sup>Novosibirsk Branch of S.N. Fedorov National Medical Research Center "Interindustry Scientific and Technical Complex

Eye Microsurgery", Novosibirsk, 630096 Russia

\*e-mail: o.koval@ngs.ru

Uveal melanoma (UM) is a tumor of neuroectodermal origin, which results from malignant transformation of melanocytes of the eye vasculature: iris, ciliary body and chorioidea. UM represents up to 5% of all melanoma cases, but it is extremely aggressive, since half of patients with UM develop metastases within the first 1-2 years after the tumor appearance. Molecular mechanisms of uveal melanoma carcinogenesis are poorly understood, and have already been shown to be different from those of skin melanoma. Activating mutations in the GNAO and GNA11 genes, encoding the large G protein subunits Gq and G11, respectively, are found in 90% of UM patients. The main signaling cascade leading to the transformation of melanocytes of the uveal tract is the signaling pathway Gaq/PKC/MAPK, and the major regulators of this cascade are targets for the development of drugs. The development of the metastatic form of UM is most often associated with mutations in the genes BAP1, EIFIAX, GNA11, GNAQ, and SF3B1. A combination of a commercial expression test panel of 15 genes and a mutation panel of 7 genes, supplemented with data on the size of the primary tumor, has been shown to be highly effective prognostic signature in prediction the risk of metastases. The risk of metastases determines the choice of therapy and patient follow-up regimen. At the same time, no systemic therapy for the treatment of metastatic UM has been developed to date; new drugs undergoing clinical trials mostly refer to either targeted therapy aimed at inhibiting the protein products of mutant genes, or immunotherapy designed to stimulate an immune response against specific antigens. In addition to these approaches, the review also considers potential therapeutic targets of epigenetic regulation of UM development.

Keywords: uveal melanoma, melanosomes, driver mutations, BAP1, GNAQ/11, tebentafusp, epigenetic targets. ——— ОБЗОРЫ —

УДК 577.218

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА У ТОПОЛЯ

© 2024 г. Н. С. Гладыш<sup>а, b\*</sup>, М. А. Ковалев<sup>а</sup>, М. С. Ланцова<sup>а</sup>, М. И. Попченко<sup>а</sup>, Н. Л. Большева<sup>а</sup>, А. М. Старкова<sup>а, b</sup>, Е. В. Булавкина<sup>а</sup>, Д. С. Карпов<sup>а</sup>, А. А. Кудрявцев<sup>а</sup>, А. В. Кудрявцева<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия <sup>b</sup>Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 127434 Россия \* e-mail: natalyagladish@gmail.com

Поступила в редакцию 15.11.2022 г. После доработки 21.07.2023 г. Принята к публикации 04.10.2023 г.

Изучение молекулярно-генетических механизмов определения пола у тополя (*Populus*) имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. Тополь активно применяют в озеленении населенных пунктов, при этом целесообразно использовать с этой целью мужские растения, обладающие гипоаллергенностью и повышенной устойчивостью к загрязнению окружающей среды, стрессовым условиям и патогенам. Однако определение пола у тополя затрудняется сложной генетической структурой пол-определяющей области его генома (SDR). В настоящем обзоре рассмотрено появление, эволюция, структура и функции SDR у представителей рода *Populus*. Детально обсуждаются современные представления о структуре и функционировании ключевого регулятора выбора пола, кодируемого ортологами генов *ARR16/ARR17 Arabidopsis*, а также возможная роль в этом процессе других генов, дифференциально экспрессируемых в мужских и женских растениях, в том числе микроPHK. Большое разнообразие видов и высокая сложность организации SDR делают необходимым дальнейшее изучение молекулярных механизмов определения пола у тополя.

**Ключевые слова:** тополь, *Populus*, генетика пола, двудомность, SDR, ортологи *ARR16/ARR17* **DOI**: 10.31857/S0026898424020021, **EDN:** NOIGMX

#### введение

Представители рода тополь (*Populus*) отличаются от других древесных растений высокой скоростью формирования биомассы [1], поэтому тополь можно рассматривать как источник относительно дешевого сырья для производства бумаги и других изделий из древесины, а также как растение, обладающее большим потенциалом для использования в фиторемедиации [2]. Тополя активно применяют в озеленении, однако с этой целью необходимо использовать мужские растения, так как семена тополя, так называемый тополиный пух, могут негативно влиять на состояние людей. Пух адсорбирует из возду-

ха загрязняющие вещества, а также пыльцевые аллергены, усиливая тем самым аллергические реакции у чувствительных людей и ухудшая качество их жизни. Кроме того, пух, раздражая слизистые носоглотки, может способствовать развитию заболеваний верхних дыхательных путей [3]. Получены также данные о том, что женские растения тополя менее устойчивы к ряду стрессовых воздействий [4]. Все это указывает на необходимость использования мужских растений тополя в озеленении городов.

Однако тополь, как и другие двудомные растения, обладает сложной системой определения пола, которая может существенно различаться

Сокращения: WGD — удвоение полного генома (whole genome duplication); WGT — трипликация полного генома (whole genome triplication); SDR — область, определяющая пол (sex determination region); *RR* — регуляторы ответа на цитокинины (response regulators); X-SDR — SDR, находящийся на X-хромосоме; Y-SDR — SDR, находящийся на Y-хромосоме; YHS — Y-специфичная гемизиготная последовательность (Y-specific hemizygous sequence); LTR-RT — ретротранспозоны с длинными концевыми повторами (long terminal repeat retrotransposon); SNP — однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism); днРНК — длинная некодирующая PHK (long non-coding RNA).

в разных таксономических группах [5]. Предполагается, что в процессе эволюции двудомность возникала неоднократно и независимо в пределах разных таксонов [6]. На сложность структуры области, определяющей пол (SDR), повлияли события удвоения генома и распространения мобильных элементов [7–9], которые способствовали полной или частичной потере удвоенных генов. Более того, активность локуса SDR может контролироваться эпигенетическими модификациями [10].

Тополь может служить модельным древесным растением при изучении SDR-локусов, чему способствует возможность проведения различных видов исследований [11], а также развитие омиксных технологий, позволяющих изучать связь между генотипической и фенотипической изменчивостью [12]. Кроме того, структура SDR-локусов и функции их ключевых элементов у тополя изучены достаточно подробно [13–15]. Немаловажен и тот факт, что у тополя пол регулируется лишь одним геном – ортологом ARR16/ ARR17 (Arabidopsis response regulator 17) [16].

В настоящем обзоре описано возникновение, развитие, структура и функции SDR у представителей семейства Salicaceae с бо́льшим вниманием к роду *Populus*. Кроме того, представлены современные данные о молекулярных механизмах регуляции выбора пола у тополя и о возможной роли в этом процессе генов, экспрессия которых различается в мужских и женских растениях.

# ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА У ТОПОЛЯ

Благодаря способности накапливать тяжелые металлы (кадмий, свинец, медь, цинк и др.), а также ртуть [2, 17], различные виды тополя могут служить цели очищения воздуха в крупных населенных пунктах, особенно тех, на территории которых находятся промышленные объекты. Тополя могут использоваться и для оценки загрязнения урбанизированных территорий тяжелыми металлами [17]. Тополь входит в число наиболее быстрорастущих деревьев [1], следовательно, быстрее формирует биомассу, поглощает больше углекислого газа и выделяет больше кислорода по сравнению с другими деревьями, т. е. эффективнее улучшает состав атмосферы в населенных пунктах. Кроме того, с использованием генетических подходов ведется работа по увеличению продуктивности тополя [18]. Однако проблемой для горожан может быть так называемый тополиный пух, или семена, продуцируемые женскими растениями. Сам пух не аллергенен, однако он сорбирует из воздуха другие аллергены, например, пыльцу. Более того, пух раздражает слизистые носоглотки и может способствовать развитию хронических заболеваний верхних дыхательных путей [3]. К другим негативным свойствам пуха относится высокая пожароопасность его больших скоплений.

В недавних исследованиях показано, что женские особи менее устойчивы, чем мужские, к таким стрессовым воздействиям окружающей среды, как засуха [19, 20], повышенная соленость и защелачивание почвы [21], окислительный стресс [4, 21], тяжелые металлы [20, 21], а также к действию грибковых патогенов [23]. Повышенная устойчивость мужских растений к стрессовым условиям ассоциирована со сверхэкспрессией и повышенной активностью защитных белков. Например, в условиях, стимулирующих образование активных форм кислорода, у тополей мужского пола активность таких ферментов антиоксидантной защиты, как пероксидаза, супероксид-дисмутаза, каталаза, глутатионредуктаза и аскорбатпероксидаза, выше, чем у растений женского пола [21, 24]. Различия в активности ферментов антиоксидантной защиты могут быть связаны с различиями в уровне экспрессии кодирующих их генов [25], что, в свою очередь, обусловлено различиями в метилировании этих генов в мужских и женских растениях [26]. Так, у женских особей гиперметилированы гены, относящиеся к функциональным категориям "протеолиз", "окисле-ние-восстановление", "фосфорилирование", "трансмембранный транспорт" и "регуляция транскрипции" [26]. Не исключено, что связанные с полом различия в уровнях метилирования и экспрессии генов, участвующих в стрессовых ответах, могут быть обусловлены полспецифичными полиморфизмами [27] и дифференциальной экспрессией микроРНК, контролирующих ответ на воздействие стресса [28]. Опубликованы данные о том, что несмотря на повышенную чувствительность к отдельным видам стресса, женские растения могут быть более устойчивыми к некоторым сочетаниям стрессовых воздействий. Примером может служить сочетание засухи и инфекций, хорошо коррелирующее с полспецифичным составом микробиома, ассоциированного с растениями [29-31].

#### ЭВОЛЮЦИЯ СИСТЕМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА У SALICACEAE

Эволюция растений, включая Salicaceae, тесно связана с серией последовательных полногеномных дупликаций (WGD) [16], которые сыграли ключевую роль в появлении новых таксонов. Так, семейства Brassicaceae и Salicaceae, представителями которых являются *Arabidopsis thaliana* и *P. trichocarpa* соответственно, разделились около 100–120 млн лет назад после β-WGD

#### ГЛАДЫШ и др.

у их общего предка, жившего около 125 млн лет назад [16]. В дальнейшей эволюции Salicaceae важную роль сыграла специфичная для этого семейства саликоидная WGD (*Salicoid* WGD), произошедшая в палеоцене (примерно 60–65 млн лет назад) перед разделением родов *Salix* (ива) и *Populus* (рис. 1). В результате этой геномной дупликации количество хромосом в гаплоидном наборе увеличилось с 7–10 до 16–21 (у большинства современных тополей 19 хромосом). Считается, что эта WGD позволила представителям родов *Populus* и *Salix* занять множество экологических ниш в Северном полушарии [32]. Формирование двудомности и полов (т. е. SDR- локуса) у Salicaceae произошло после саликоидной WGD порядка 45 млн лет назад [33–35]. Саликоидная WGD затронула примерно 92% генома тополя, что привело к появлению около 8000 пар паралогичных генов [36], включая гены в SDR [37]. Не исключено также, что усложнение структуры SDR могло идти за счет удвоения сегментов генома [38] и тандемных дупликаций [39]. Как следствие, каждая из 19 хромосом американского тополя *P. trichocarpa* имеет обширные участки гомологии с другими хромосомами. В частности, хромосома 19, содержащая SDR, имеет значительное сходство с хромосомой 13 [36].



**Рис. 1.** Филогения и эволюция системы определения пола у Salicaceae. В ходе эволюции растений их геномы подверглись множеству полногеномных дупликаций, включая ζ-WGD, ε-WGD, γ-WGT, τ-WGD, β-WGD, α-WGD и саликоидную WGD. Представители родов *Salix* и *Populus* разошлись после саликоидной WGD предковых форм. Род *Populus* делится на секции Abaso, Turanga, Populus, Leucoides, Aigeiros и Tacamahaca, из которых последние три объединяют в группу ATL. Среди тополей встречаются виды, обладающие как ZW, так и XY системами определения пола. У некоторых тополей, например, у *P. tremula*, *P. deltoides*, *P. balsamifera* внутри SDR находятся дуплицированные фрагменты ортологов гена *ARR17*.

В семействе Salicaceae выделяют более 50 родов, включающих около 1000 видов, из которых на род *Salix* приходится 330–500 видов и на род *Populus* – 22–45 видов [40]. Род *Salix*, традиционно используемый в качестве группы сравнения, состоит из двух клад, разошедшихся в миоцене. Наиболее интенсивно процесс видообразования *Salix* и *Populus* шел в плиоцене [40, 41]. Сложность организации генома, легкость скрещивания близкородственных видов и сетчатая эволюция затрудняют исследование филогении тополя [42]. В настоящее время род *Populus* подразделяется на шесть секций: Abaso, Turanga, Leucoides, Populus, Tacamahaca и Aigeiros. Полногеномное секвенирование показало, что первой обособилась секция Abaso, затем Turanga, потом разошлись секция Populus и группа ATL, объединяющая секции Aigeiros, Tacamahaca и Leucoides (рис. 1).

Помимо WGD, большую роль в эволюции половых хромосом и SDR у Salicaceae сыграли мобильные элементы [43]. Чаще всего в SDR тополя встречаются ДНК-транспозоны из группы Helitron и ретротранспозоны с длинными концевыми повторами (LTR-RT) суперсемейств Соpia и Gypsy [39, 43]. Мобильные элементы, как и другие виды повторяющихся последовательностей, могут вызывать супрессию рекомбинации и гиперметилирование генов, оказавшихся поблизости от участка интеграции [7]. Связанная с этим репрессия транскрипции [44] может способствовать последующей дегенерации генов в половых локусах [8, 45] и в конечном счете изменению структуры и размеров половых хромосом [9]. Кроме того, особенности механизма репликации Helitron-подобных транспозонов позволяют им захватывать и перемещать целые гены или их фрагменты [46], тем самым эти транспозоны могли способствовать увеличению числа копий генов в SDR [43].

У двудомных растений встречаются как гомоморфные (отличающиеся незначительно), так и гетероморфные (сильно отличающиеся размерами и количеством активных генов) половые хромосомы. У видов с гетероморфными половыми хромосомами выделяют две системы детерминации пола: ХҮ и ZW. У растений с ХҮсистемой мужские особи являются гетерогаметными, а женские особи гомогаметными, а у растений с ZW-системой, наоборот, мужской пол гомогаметен, а женский – гетерогаметен. В пределах рода *Рориlus* описаны виды, обладающие как XY, так и ZW-системами [43, 44] (рис. 1).

Подобная гетерогенность свидетельствует в пользу независимого происхождения половых систем у видов рода *Populus*, что еще более затрудняет определение пола. Действительно, консервативной является только детерминация пола, обусловленная ортологом *ARR16/17*, тогда как в ходе эволюции перестройки половых хромосом и переход между ХҮ- и ZW-системами происходили неоднократно [55]. Как минимум, некоторые (например, *S. purpurea*) ивы имеют ZW-систему. Определение пола в секции Abaso на данный момент не изучено, для *P. euphratica* (секция Turanga) и представителей группы ALT характерна XY-система, а в группе Populus обнаружены обе системы [55, 59].

Переход от однодомности к двудомности связывают с появлением SDR-локуса. В настоящее время доминируют две гипотезы возникновения двудомных растений. Классическая "двухгенная модель" предполагает, что два пола появились путем распространения двух измененных генов мужской и женской стерильности. Во избежание гермафродитизма или полной стерильности эти мутации должны закрепляться на двух гомологичных хромосомах [47]. В пользу этой гипотезы свидетельствует наличие в SDR киви (Actinidia deliciosa) и ряда других двудомных растений двух генов, определяющих пол [48-52]. Предложенная в 2016 году "одногенная модель" постулирует, что эволюционному переходу от однодомности к двудомности способствовала мутация одного гена, кодирующего высокоуровневый регулятор [53]. Через сигнальные пути и эффекторы мутантный регулятор мог контролировать образование цветков определенного пола [54]. Генов, вовлеченных в выбор определенного пола, может быть несколько, но лишь один, основной при "включенном" или "выключенном" состоянии определяет пол [53]. Экспериментальное подтверждение "одногенной модели" получено для рода Populus. Доказано, что PtRR9, ортолог ARR16/ARR17 A. thaliana, отвечает за выбор пола у *P. tremula* [55].

В результате эволюции современные виды тополя имеют большие по размеру (чаще всего около 100 т. п. н. [27, 56]) SDR-локусы, обогащенные паралогичными генами и повторяющимися элементами. Подобная структура серьезно затрудняет определение последовательности всего локуса, идентификацию его функционально важных элементов и исследование молекулярно-генетических механизмов определения пола [39, 57]. Ярким примером может служить *P. trichocarpa*, у которого в ранних исследованиях предполагали существование системы ZW, но позднее с помощью технологий секвенирования генома третьего поколения (РасВіо) убедительно показали, что этот вид обладает системой XY [27].

#### ОБЩАЯ СТРУКТУРА SDR У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *POPULUS*

У подавляющего числа видов тополя SDR находится на хромосоме 19. У *P. trichocarpa* и *P. nigra* (секции Tacamahaca и Aigeiros) SDR локализован в субтеломерном участке хромосомы [27, 57], а у *P. tremula*, *P. tremuloides* и *P. alba* (секция Populus) – в прицентромерной области [14, 58]. Следует отметить, что SDR *P. trichocarpa* состоит из двух субтеломерных участков хромосомы 19: один находится на левом плече, а другой на правом [39]. В настоящее время лишь у *P. euphratica*, представителя секции Turanga, SDR картирован в субтеломерном районе хромосомы 14 [43]. В зависимости от способа анализа генома, вида и пола экспериментально оцененная средняя длина SDR варьирует от 100 [27] до 140 т. п. н. [39, 56]. Например, у *P. deltoides* длина SDR на X-хромосоме (X-SDR) составляет 100 т. п. н., тогда как длина SDR, находящейся на Y-хромосоме (Y-SDR), составляет 140 т. п. н. [56]. Самый большой SDR длиной 1.71 млн п. н. обнаружен в W-аллеле *P. giongdaoensis* [59].

Ключевыми генами SDR считаются ортологи ARR16/ARR17, входящие в семейство регуляторов ответа на цитокинины (RR), которые являются эффекторами высококонсервативного цитокининового пути передачи сигнала и регулируют процессы роста и развития растений [43, 60, 61]. Гены группы *RR* функционально и по последовательности подразделяются на четыре типа: A (RRA), B (RRB), C (RRC) и псевдо-RR (*PRR*) [62]. У тополя описано 33 *RR* гена. относящихся к трем типам - RRA, RRB и псевдо-RR [37]. RRB кодируют транскрипционные факторы с ДНК-связывающим доменом Муb, положительно отвечающие на активацию цитокининовых рецепторов, а гены группы RRA, в которую входят ортологи ARR16/ARR17, кодируют негативные регуляторы цитокининзависимых процессов, не имеющих собственного ДНК-связывающего домена [16, 63–65]. *PRR* кодируют транскрипционные факторы, обладающие димеризационным N-концевым и ДНК-связывающим С-концевым доменами, обеспечивающие регуляцию суточных ритмов и ассоциированных с ними процессов [37, 66].

Помимо ортологов ARR16/ARR17, контролирующих пол, SDR тополя содержат и другие сцепленные с полом гены, которые имеются как в Y-SDR, так и в X-SDR и отличаются полспецифичными полиморфизмами (рис. 2). В ранних исследованиях в SDR P. trichocarpa и P. balsamifera обнаружено 13 генов, среди которых ACD1-LIKE, ATHEMA1, TCP-1/cpn60, ATCLC-C, MET1, RFL1, NB-ARC и EGM1 [27]. Однако позднее было подтверждено присутствие лишь четырех известных генов: TCP-1, CLC-C, MET1, NB-ARC [39]. Сложность определения генного состава SDR связана с обилием мобильных элементов, которые приводят к артефактам сборки прочтений и тем самым затрудняют определение точной последовательности этого участка генома. Присутствие в SDR TCP-1, CLC-с и MET1 подтверждено также у P. deltoides [56], P. × sibirica [15] и P. tomentosa [25]; показана их дифференциальная полспецифичная экспрессия. Ген *TCP-1* (tailless complex polypeptide 1) кодирует цитозольный эукариотический белок из группы шаперонинов [67]. CLC (Chloride Channel) – семейство белков, включающее анионные каналы и анион/катионные антипортеры, регулирующие метаболизм Cl<sup>-</sup> и NO<sub>3</sub><sup>-</sup> в разных клеточных компартментах. В частности, CLC-a, b, c, g находятся на мембране вакуоли, d и f – на мембранах комплекса Гольджи, е — на внутренних мембранах хлоропластов [68]. *MET1* кодирует, по-видимому, основную ДНК-метилтрансферазу растений, поддерживающую метилирование в том числе СрG-островков [69].

У *P. tremula* в состав SDR входит ген *TOZ19*, который, как и его ортолог у *A. thaliana*, связан с синтезом рРНК в ядрышках и важен для эмбрионального развития [70], при этом в Y-SDR содержится его полноразмерная версия, а в X-SDR – лишь 3'-конец [55, 71]. Общее количество генов в SDR-локусах, как правило, коррелирует с общим размером локуса. Например, SDR *P. trichocarpa*, имеющий обычный для тополей размер, содержит минимум пять генов [39], а в гигантских W- и Z-SDR *P. qiongdaoensis* расположены 122 и 50 генов соответственно [59]. Функции большей части этих генов неизвестны.

В SDR можно выделить и полспецифичные области, содержащие регуляторные гены. Так, в Y-SDR P. deltoides найдены две длинные Ү-специфичные гемизиготные последовательности (YHS): YHS1 - около 35 т.п. н., а YHS2 - около 4.3 т.п. н. YHS1 содержит два мужских гена: один, названный *FERR-R*, содержит частичные дупликации гена FERR (другое название ортолога ARR16/ARR17) и подавляет формирование женских генеративных органов, а другой, названный MSL [56], относится к суперсемейству ретротранспозонов Gypsy. MSL состоит из трех частей: MSL-1. MSL-2 и MSL-3, при этом обе цепи ДНК транскрибируются с образованием длинных некодирующих РНК (днРНК), которые регулируют развитие по мужскому фенотипу. Последовательности, гомологичные MSL, обнаружены на разных хромосомах в геноме разных видов тополя: например, P. deltoides, P. alba, P. trichocarpa, P. tomentosa и P. *euphratica* [56, 72].

В области YHS2 у *P. deltoides* обнаружен только один ген *Tn*, отсутствующий в X-SDR. Функция этого гена в регуляции процессов, связанных с полом, в настоящее время неясна. Эти данные показывают, что в формировании пола и/или в регуляции признаков, ассоциированных с полом, у тополя могут участвовать несколько генов, включая мобильные элементы [56].

Рассматривая различия в составе генов локусов Y-SDR и X-SDR, необходимо отметить многочисленные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), включая полспецифичные, которые могут облегчить задачу идентификации пола у тополя. Эволюционно появление SNP связано с дупликацией аллелей (благодаря WGD или транспозон-опосредованным тандемным дупликациям) и их последующей дивергенцией. Общее количество SNP, различающихся между



**Рис. 2.** Молекулярные функции некоторых не-*RR* генов, картированных в SDR тополей, и структура мобильных элементов SDR. К генам, находящимся как в X-, так и в Y-SDR, относятся *TCP-1* – кодирует цитозольный шаперонин, *CLC-с* – протон-хлоридный антипортер на поверхности вакуоли, *MET1* – ДНК-метилтрансфераза. У *P. tremula* полноразмерный ген *TOZ19* имеется только на Y-SDR. В SDR в большом количестве встречаются мобильные элементы из суперсемейств Соріа и Gypsy – LTR-RT, структурно они отличаются порядком расположения генов.

полами, может быть очень большим. Например, у P. trichocarpa выявлено более 3500000, a у P. balsamifera - более 1000000 SNP [27]. Следует отметить, что часть полиморфизмов может быть консервативной и встречаться у других представителей секции, подтверждая их родство. Так, часть полиморфизмов P. trichocarpa найдена у других видов секции ALT: P. balsamifera, P. deltoides и P. nigra; но эти SNP отсутствуют у P. tremuloides, принадлежащего секции Populus [73]. Среди консервативных SNP в генах SDR встречаются и конститутивные SNP, которые потенциально могут быть использованы как маркеры пола. Например, в ортологах генов ARR16/ ARR17 P.  $\times$  sibirica обнаружено от 16 до 49 SNP, и по шести из них всегда выявляются и специфичные для Х- и Ү-аллелей [74]. Другим примером может служить ген *MET1*, активно накапливающий полспецифичные SNP. У P. × sibirica этот ген содержит от 80 до 179 SNP, причем 11 из них являются строго У-специфичными [75]. Не исключено, что некоторые полиморфизмы могут снижать активность кодируемой этим геном ДНК-метилтрансферазы и приводить к снижению общего уровня метилирования ДНК у мужских растений. Показано, что ДНК женских растений *P. tomentosa* имеет более высокий уровень метилирования, чем мужских [76]. Таким образом, конститутивные полспецифичные SNP могут служить перспективными маркерами в определении пола у тополя. Методы детекции SNP быстрее, дешевле и надежнее, чем полногеномое секвенирование, необходимое для установления всей последовательности

SDR. Однако необходима тщательная валидация этих SNP-маркеров.

SDR тополя содержит большое количество мобильных элементов, формирующих большой размер SDR и сыгравших важную роль в эволюции половых локусов. Часто встречаются ДНК-транспозоны групп Helitron и LTR-RT суперсемейств Gypsy и Соріа. Представители последних двух групп имеют сходную структуру: на концах находятся LTR, между которыми пять генов, кодирующих группоспецифичный антиген (GAG), протеазу (PR), интегразу (INT), обратную транскриптазу (RT), рибонуклеазу H (RH). Суперсемейства различаются лишь порядком расположения генов (в направлении 5'  $\rightarrow$  3'): y Copia это – *GAG*, *PR*, *INT*, *RT* и *RH*, a y Gypsy – *GAG*, *PR*, *RT*, *RH* и *INT* (рис. 2). Отметим, что 30-40% генома тополя приходится на повторяющиеся последовательности, из которых более половины относятся к LTR-RT и в первую очередь к суперсемействам Gypsy и Copia [59, 77, 78]. Таким образом, появление LTR-RT в SDR вполне закономерно. Расположение LTR-RT, а также Helitron-подобных элементов вблизи генов RR в SDR P. trichocarpa, P. euphratica и P. alba, указывает на их сильное влияние на структуру и функционирование SDR [39, 43].

#### ОРТОЛОГИ *ARR16/ARR17* И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА У ТОПОЛЯ

У тополя, как и у других представителей семейства Salicaceae, главными регуляторами пола являются ортологи генов *ARR16/ARR17*, локализованные в SDR. Это подтверждается тем, что ортологи *ARR16/ARR17* экспрессируются преимущественно в репродуктивных тканях, а их дифференциальное метилирование и экспрессия ассоциированы с полом [10, 79].

Доказательством служат результаты эксперимента на *P. tremula*, в котором нокаут ортолога ARR16/ARR17 при помощи системы CRISPR/ Cas9 превратил женские растения в мужские [55]. WGD и иные механизмы дупликации генов способствовали увеличению количества полных и частичных копий генов RR, включая ортологов ARR16/ARR17, в SDR тополя. Рекордсменом по количеству частичных копий ортологов ARR16/ARR17 среди тополей является P. euphratica: он содержит шесть коротких (S1, S2, S3, S4, S5, S6) и четыре длинных (L1, L2, L3, L4) фрагмента, которые появились, по-видимому, в результате перемещения мобильных элементов [43]. Это предположение подтверждается присутствием во всех коротких последовательностях, кроме S2, представителя группы Helitron-подобных транспозонов, а во всех длинных – элементов суперсемейства Соріа [43].

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

Предложен вероятный эволюционный сценарий формирования SDR со сложной структурой в секции Populus [59]. У общего предка секции Populus могло быть два аллеля SDR: первый (предок SDR на Z-хромосоме P. qiongdaoensis и P. alba и X-хромосоме P. tremula) не содержал ортологов ARR16/ARR17, а второй (предок SDR на W-хромосоме P. qiongdaoensis и P. alba и Y-хромосоме *P. tremula*) имел две обращенные друг к другу копии ортологов ARR16/ARR17. к 5'-концам которых примыкали транспозоны из группы Helitron [59]. Далее в эволюционной ветви *P. giongdaoensis* в предковой форме W-хромосомы произошла частичная дупликация этой пары генов. Новообразованные дупликаты оказались дефектными, тогда как активность исходных генов и механизм определения пола сохранились [59]. В эволюционной ветви предков *P. alba* и *P. tremula* произошла транслокация полной копии ортолога ARR16/ARR17 из прицентромерного в субтеломерный район W-хромосомы с последующей двойной дупликацией. Показано, что рядом с каждым дупликатом ортолога ARR16/ARR17 у P. alba находятся Helitron- и Соріа-подобные элементы, которые, по-видимому, опосредовали транслокацию и дупликацию ортологов ARR16/ARR17 [43]. Исходный SDR у *P. alba* элиминировался. Таким образом, у женских растений *P. alba* (ZW) на W-хромосоме локализованы три копии ортологов ARR16/ARR17, а у мужских (ZZ) – ни одной. У *P. tremula* в исходном SDR сохранились фрагменты ортологов ARR16/ARR17, один из которых дуплицировался. В отличие от *P. alba*, у *P.* tremula сформировалась ХУ-система, в которой у женских растений (XX) в X-SDR находятся две копии PtRR9, а у мужских растений (XY) в состав Y-SDR входят не только две копии PtRR9, но и фрагменты исходных генов, которые теперь служат репрессорами PtRR9 [55, 59].

Наиболее детально изучены молекулярные механизмы определения пола у видов секции ATL: P. trichocarpa, P. balsamifera и P. deltiodes. P. trichocarpa обладает двумя SDR, расположенными в субтеломерных участках левого и правого плечей хромосомы 19 (XY). В Y-SDR в левом плече У-хромосомы находятся пять частичных дупликатов ортолога ARR16/ARR17, названного PtRR9. Полноразмерный PtRR9 локализован в субтеломерном районе правого плеча Ү-хромосомы (рис. 3). Х-хромосома содержит только ген *PtRR9* (в той же позиции, что и на Y-хромосоме) и не содержит частичных дупликатов на SDR. Показано, что у мужских растений с частичных дупликатов гена *PtRR9* в SDR транскрибируются днРНК, комплементарные всем экзонам PtRR9, кроме экзонов 5 и 6 [39]. Это хорошо коррелирует со статусом метилирования экзонов PtRR9, наблюдаемым у P. basamifera: наиболее сильно метилированными у мужских растений по сравнению с женскими оказались экзоны 1 и 4, тогда как экзон 5 не метилирован [10]. В свою очередь, высокий уровень метилирования экзонов *PtRR9* соответствует подавлению экспрессии этого гена у мужских особей. Кроме того, частичные дупликаты ортологов *ARR16/ARR17* образуют инвертированные повторы, а значит, транскрибируемая с них РНК может образовывать двухцепочечную РНК. Эта РНК может процессироваться системой РНК-интерференции с образованием малых РНК, способных репрессировать полные ортологи *ARR16/ARR17* как путем метилирования ДНК, так и путем деградации мРНК [10, 39].



**Рис. 3.** Молекулярно-генетические механизмы определения пола у представителей секции APL: *P. trichocarpa* и *P. deltoides*. Схематично представлены структуры Y-SDR и механизмы регуляции экспрессии ортологов *ARR16/ARR17* у *P. trichocarpa* и *P. deltoides*. У обоих видов в субтеломерных участках хромосомы 19 находятся SDR. В SDR, расположенном на левом плече, локализованы частичные дупликаты ортологов *ARR16/ARR17* (у *P. deltoides* эта область называется *FERR-R*), которые имеют общее эволюционное происхождение с находящимися на противоположном конце той же хромосомы ортологами *ARR16/ARR17* (у *P. deltoides* этот ген называется *FERR*).

Сходный механизм детерминации пола описан у P. deltoides. В субтеломерном районе правого плеча хромосомы 19 локализован ген FERR (он же PdRR9 [38], ортолог ARR16/ARR17). У мужских особей в левом плече этой же хромосомы (Ү-хромосомы) расположен Y-SDR (он отсутствует в X-хромосоме). В Y-SDR выделяют три области [80]. В одной из этих областей находятся гены MSL и FERR-R, последний представляет собой частичные дупликаты гена FERR, расположенные в порядке голова к хвосту. В состав *FERR-R* входят восемь фрагментов (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8), с которых транскрибируются длинные некодирующие РНК, вызывающие РНК-зависимое метилирование гена FERR и деградацию его транскриптов в цитоплазме. В результате в цветках мужских растений экспрессируется только FERR-R, а в женских – FERR [56].

Помимо репрессоров ортологов ARR16/ ARR17 в Y-SDR некоторых видов тополя находится репрессор гена HEMA1, кодирующего одну из трех (другие кодируются паралогами HEMA2 и HEMA3) глутамил-тРНК-редуктаз ферментов, катализирующих скорость-лимитирующую стадию в пути биосинтеза хлорофилла [81, 80]. Репрессор HEMA1 представляет собой два инвертированных повтора, находящихся в спейсере 2 у P. trichocarpa или в области S5 у P. deltoides на хромосоме 9 (рис. 3) [39, 56]. Помимо P. trichocarpa и P. deltoides, репрессоры HEMA1 обнаружены в Y-SDR у P. euphratica и P.

*pruinosa* (секция Turanga), их наличие возможно и у других представителей рода *Populus* [55]. По аналогии с ортологами *ARR16/ARR17* можно предположить, что у мужских особей *HEMA1* репрессирован. Однако связь с полом и функциональная роль репрессии *HEMA1* в настоящее время не установлены.

Понимание механизмов определения пола у тополя открывает возможности для направленной модификации этого растения. Например, нокаут гомолога ARR16/ARR17 у женских особей P. tremula при помощи системы CRISPR/ Cas9 способствовал развитию у них мужских цветков [55]. Согласно неопубликованным данным, недостаточная экспрессия FERR-R у генетически мужских особей *Р. lasiocarpa* приводит к гипометилированию гена *FERR*, в связи с чем растения приобретают промежуточный половой фенотип с мужскими и женскими цветками [72].  $P. \times$  canescens способны к направленной смене пола во взрослом состоянии: около 30% потомков F1. полученных при скрешивании ? *P. alba* × ♂ *P. tremula*, будучи генетически женскими, демонстрировали половую лабильность в течение жизни, так как сначала на них развивались только мужские цветки, с течением времени формировались одновременно мужские, женские и обоеполые, а затем только женские [82]. Случаи отклонения от двудомности ранее были описаны у P. tremuloides, P. tremula, P. trichocarpa, P. deltoides, P. euphratica, P. tomentosa, P. nigra и др. [82].

По-видимому, микроРНК-зависимое метилирование SDR и других полспецифичных генов, находящихся вне половых хромосом, в генеративных органах широко распространено не только у тополя [83], но и у других двудомных растений [84—87]. Далее рассмотрим микроРНК и их гены-мишени, дифференциальная экспрессия которых ассоциирована с полом.

#### микроРНК, ИХ МИШЕНИ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННАЯ С ПОЛОМ

Различия между женскими и мужскими особями у тополя обусловлены экспрессией прежде всего ортологов *ARR16/ARR17* в SDR, наблюдаемой только в женских генеративных органах [55]. Установлено, что в генеративных органах наблюдается полспецифичная экспрессия большого числа других генов. Так, у *P.* × *sibirica* обнаружено несколько тысяч генов, экспрессия которых различается в мужских и женских растениях, и большая часть этих генов приходится на цветки [15]. Следует отметить, что на соматических хромосомах тополя, помимо полопределяющего ортолога *ARR16/ARR17*, находятся его многочисленные паралоги из группы *RRA* [38]. "Соматические" гены *RRA* экспрессируются как в вегетативных, так и в генеративных органах, при этом некоторые из них проявляют полспецифичную экспрессию в генеративных органах [38]. Эти данные указывают на возможное участие паралогов *ARR16/ARR17* в формировании первичных половых признаков у тополя, скорее всего, за счет прямой или опосредованной регуляции полспецифичной экспрессии генов.

В исследовании Cronk и соавт. изучена связь между экспрессией генов и развитием мужских и женских генеративных почек у P. balsamifera с июня по октябрь, а затем в марте и мае следующего года [25]. Показано, что профиль экспрессии генов меняется незначительно в первые месяцы развития почек, что, возможно, связано с летней диапаузой. В осенний период (сентябрь-октябрь) начинается подготовка к зиме, что ведет к повышению экспрессии ряда генов. Экспрессия еще большего числа генов изменяется в марте, и пик количества дифференциально экспрессируемых генов приходится на май, когда формируются сами генеративные органы. В это время полспецифично меняется экспрессия более 2000 генов. Среди них выделяются гены, связанные с модификацией хроматина, которые экспрессируются пятью сменяющими друг друга волнами: ранние (DDM1, KYP, argonaute, CMT3, CDK1, CDK2, AUR1, AUR3, BRCA1-homologue, ATXR6, JMJ12, JMJ13, RRC2, *CLF*, *VRN5*), ранне-средние (*DRD1*, *AGO4*, *SHH1*, *JMJ27*, *TAF14B*, *ATX1*, *FLD*), средние (*CYP71*, *JMJ16*, *JMJ17*, *JMJ20*, *HDA6*), поздние (HDA19, ENY2, UBC2) и очень поздние (SUVH5 (в основном, у мужских растений), SAHH1). Модификация гистонов и последующее изменение структуры хроматина предшествуют дальнейшим изменениям экспрессии генов [88]. Выделенные группы регуляторов структуры хроматина могут быть эффекторами сигнальных путей, интегрирующих параметры окружающей среды (свет, температура и т. д.), чтобы контролировать последовательное изменение экспрессии определенных наборов других генов, обеспечивать тем самым этапность развития генеративных органов. Этими же авторами обнаружена сравнительно небольшая группа из 110 генов, экспрессия которых зависит от пола и не зависит от стадии развития почки [25]. В первую очередь к этим генам относится PbRR9 (ортолог ARR16/ ARR17), экспрессирующийся только в женских цветках, а также ортологи ARR9 и ARR22. Несмотря на то, что ортологи ARR9 и ARR22 не находятся на половой хромосоме, их экспрессия коррелирует с активностью PbRR9, и уровень их мРНК выше в мужских цветках, чем в женских. Возможно, экспрессия ортологов ARR9 и ARR22 регулируется по механизму отрицательной обратной связи со стороны гомолога PbRR9.

Также в мужских цветках повышена экспрессия двух гомологов, относящихся к генам с MADSбоксом: PI и AP3. У А. thaliana гетеродимер PI/ AP3 отрицательно регулирует развитие лепестков и тычинок, в том числе, путем репрессии генов GATA21 и GNC, кодирующих гетеродимерный фактор транскрипции [89]. В соответствии с этими данными гомологи GATA21 и GNC у тополя активнее экспрессируются в женских цветках, чем в мужских [25]. У мужских растений повышена экспрессия генов, кодирующих компоненты рецепции и передачи сигналов цитокининов: *АНК4*, *АНР5* (кодируют рецепторы цитокининов), CRF5 (RR регулятор типа B), ADA2(транскрипционный адаптер 2). Интересно, что аллели генов, находящихся в SDR: MET1, *CLC-с* и *TCP1*, а также *CHR11* (кодирует белок, занимающийся ремоделированием хроматина), экспрессируются полспецифично. Один аллель сверхэкспрессируется в мужских растениях. а второй – в женских. Полспецифично экспрессируются гены, связанные с устойчивостью к заболеваниям и ответом на окислительный стресс (гены из суперсемейства пероксидаз) [25]. Это может объяснять связанные с полом различия в устойчивости к патогенам [23] и окислительному стрессу [4, 21], наблюдаемые у тополя, что важно учитывать при озеленении населенных пунктов.

У P. tomentosa различия между мужскими и женскими цветками проявляются в экспрессии 24 генов, причем многие из них расположены на половой 19-й хромосоме [76]. Так, у женских растений повышена экспрессия *MET1* (хромосоме 19) и DMT3, кодирующих ДНК-метилтрансферазы, что хорошо коррелирует с повышенным общим уровнем метилирования ДНК в женских цветках. В мужских цветках сверхэкспрессирован ген *DDM1* ДНК-метилтрансферазы (хромосома 19). Эти данные указывают на вовлеченность ДНК-метилтрансфераз в полспецифичную регуляцию экспрессии генов. Большая часть других полспецифично экспрессируемых генов участвует в ранних этапах развития цветков и в путях передачи сигналов, запускаемых такими гормонами, как цитокинины, гиббереллины, индолилуксусная и абсцизовая кислоты (рис. 4). Например, в женских растениях сверхэкспрессированы гены АТА, РМЗО, MSL3, MYB79, GI, RGF1, TFL1, PIL5, PIN13, SAUR39, *GA20ox2*, *CKX3*, а в мужских – *A9.2*, *EXPA10*, *SVP*, COL9, AGL24, UFO, SAP, SAUR13, GA200x7 [76].

Интересно, что у *P. tomentosa* обнаружены гены, метилирование которых связано с повышением их экспрессии. Так, в женских растениях полностью и наполовину метилированы гены *PtGT2* (гомолог *MF26*) и *PtPAL3* (гомолог *MF29*), тогда как оба гена не метилированы в мужских. В мужских растениях полностью метилирован *PtCER4* (гомолог *MF35*), не метилированный в женских растениях. При этом *PtGT2* и *PtPAL3* активнее экспрессируются в женских растениях, а *PtCER4* – в мужских [81].

МикроРНК активно участвуют в регуляции экспрессии генов, опосредуя их метилирование. Имеются зависимые от пола отличия в структуре микроРНК: в мужских цветках Р. tomentosa микроРНК состоит из 21 или 24 нуклеотидов, тогда как в женских преобладают микроРНК длиной 21 нуклеотид [90]. Кроме того, число микроРНК, экспрессируемых в женских цветках, больше, чем в мужских (94 против 40 в случае канонических микроРНК и 61 против 11 в случае новых микроРНК) [90]. Возможно, повышенное количество микроРНК вносит вклад в повышенный общий уровень метилирования генома, наблюдаемый в женских растениях [76]. В ходе картирования метилированных участков генома *P. tomentosa* установлено, что 15.1% прочтений приходится на гены, из которых 95.7% белоккодирующие, а остальные 4.3% – это гены микроРНК [91]. В белоккодирующих генах сильнее метилированы CpGостровки в промоторной области, а также тело гена, а в генах микроРНК – СНН-островки. а также 3'- и 5'-нетранслируемые области. Выявлены также половые различия в степени метилирования СНН-островков, которые чаще находятся в межгенных областях и сильнее всего метилированы у мужских растений. Половые различия в метилировании генов и межгенных участков могут быть связаны с дифференциальной экспрессией генов ДНК-метилтрансфераз, локализованных на половых хромосомах (например, MET1, DMT3 и DDM1 [76]). Наблюдается обратная зависимость между уровнем экспрессии микроРНК и их мишеней. Например, в женских растениях по сравнению с мужскими повышена экспрессия miR169-q, t, u (при этом понижена экспрессия мРНК их гена-мишени *NFYA*); *miR-164a*, *e* (и понижена – мРНК их мишеней CUC1 и CUC2); miR-159a, miR-319f (и понижена – мРНК их мишеней *МҮВ33, МҮВ65, МҮВ101, ТСР2, ТСР3, ТСР10, ТСР24*); понижена – экспрессия 172b, і (и повышена мРНК их мишени AP2); miR-156l, k (и понижена мРНК их мишеней SPL9, SPL10) [91]. Большая часть мишеней микроРНК связана с развитием цветка (COL2, AP2, UFO и PM36 негативно регулируются F-специфичными микроPHK; EPR1 и PFT1 негативно регулируются М-специфичными микроРНК). Следующая по количеству группа генов-мишеней связана с метаболизмом фитогормонов (PINI ARATH, IAA4, GA2ox, EREBF4, SAUR29, ABA3 и ABI3 негативно регулируются F-специфичными микроРНК), транспортом  $Ca^{2+}$  (*EDA39* и *AT1G21630* негативно регулируются F-специфичными микроРНК;



**Рис. 4.** Функциональные группы генов, экспрессия которых полспецифично контролируется микроРНК. Наибольшее количество мишеней микроРНК описано у генов, отвечающих за развитие цветка. На втором месте по количеству мишеней, регулируемых микроРНК, находится группа генов, отвечающая за метаболизм гормонов.

*CDP* негативно регулируется М-специфичной микроРНК) и метилированием ДНК (три микроРНК; *DDM1* негативно регулируются F-специфичными микроРНК; *MET1* негативно регулируется М-специфичной miR167) (рис. 4). Следует отметить, что значительная часть мишеней микроРНК локализована на половой хромосоме 19.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Деревья рода *Populus* активно применяются в озеленении крупных населенных пунктов, при этом наиболее предпочтительно использование мужских особей. Однако сложный эволюционный путь привел к формированию у тополя сложного по структуре и механизмам функционирования полового локуса, обогащенного мобильными элементами и дупликатами полспецифичных генов. При этом в пределах рода

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

наблюдаются существенные вариации в строении полового локуса и механизмах определения пола: они могут значительно различаться между секциями. Несмотря на то, что у тополей ключевым регулятором пола служит один ген ортолог ARR16/ARR17, обилие полных и частичных копий этого гена и наличие нескольких уровней регуляции его активности делает определение пола у различных видов тополей непростой задачей. Дальнейшие исследования, направленные на более глубокое понимание структуры и механизмов определения пола, важны не только с практической точки зрения, но представляют также большой фундаментальный интерес, поскольку могут приблизить нас к пониманию эволюционных механизмов, способствовавших формированию этой разнообразной и успешной группы деревьев.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00404). Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Wang Z., MacFarlane D.W. (2012) Evaluating the biomass production of coppiced willow and poplar clones in Michigan, USA, over multiple rotations and different growing conditions. *Biomass Bioenergy*. **46**, 380–388.
- 2. Tozser D., Horvath R., Simon E., Magura T. (2023) Heavy metal uptake by plant parts of *Populus* species: a meta-analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **30**(26), 69416–69430.
- Панкова В.Б., Федина И.Н., Накатис Я.А., Лавренова Г.В. (2016) Заболевания верхних дыхательных путей, вызванные воздействием промышленных аэрозолей. *Рос. ринология.* 24(4), 30-36.
- Melnikova N.V., Borkhert E.V., Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V., Dmitriev A.A. (2017) Sex-specific response to stress in *Populus. Front. Plant Sci.* 8, 1827.
- Renner S.S., Ricklefs R.E. (1995) Dioecy and its correlates in the flowering plants. *Am. J. Botany.* 82(5), 596–606.
- Grant S., Houben A., Vyskot B., Siroky J., Pan W.-H., Macas J., Saedler H. (1994) Genetics of sex determination in flowering plants. *Developmental Genet*. 15(3), 214–230.
- Hobza R., Cegan R., Jesionek W., Kejnovsky E., Vyskot B., Kubat Z. (2017) Impact of repetitive elements on the Y chromosome formation in plants. *Genes*, 8(11), 302.
- Papadopulos A.S., Chester M., Ridout K., Filatov D.A. (2015) Rapid Y degeneration and dosage compensation in plant sex chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**(42), 13021–13026.
- Puterova J., Kubat Z., Kejnovsky E., Jesionek W., Cizkova J., Vyskot B., Hobza R. (2018) The slowdown of Y chromosome expansion in dioecious *Silene latifolia* due to DNA loss and male-specific silencing of retrotransposons. *BMC Genomics.* 19(1), 153.
- Brautigam K., Soolanayakanahally R., Champigny M., Mansfield S., Douglas C., Campbell M.M., Cronk Q. (2017) Sexual epigenetics: gender-specific methylation of a gene in the sex determining region of *Populus balsamifera*. Sci. Rep. 7, 45388.
- 11. Taylor G. (2002) *Populus: Arabidopsis* for forestry. Do we need a model tree? *Ann. Bot.* **90**(6), 681–689.
- Jansson S., Douglas C.J. (2007) *Populus*: a model system for plant biology. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 58, 435–458.
- 13. Hou J., Ye N., Zhang D., Chen Y., Fang L., Dai X., Yin T. (2015) Different autosomes evolved into sex

chromosomes in the sister genera of *Salix* and *Populus*. *Sci. Rep.* **5**, 9076.

- Kersten B., Pakull B., Groppe K., Lueneburg J., Fladung M. (2014) The sex-linked region in *Populus tremuloides* Turesson 141 corresponds to a pericentromeric region of about two million base pairs on *P. trichocarpa* chromosome 19. *Plant Biol.* (Stuttg.). 16(2), 411–418.
- Pushkova E.N., Krasnov G.S., Lakunina V.A., Novakovskiy R.O., Povkhova L.V., Dvorianinova E.M., Beniaminov A.D., Fedorova M.S., Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V., Dmitriev A.A., Melnikova N.V. (2021) Genome and transcriptome sequencing of *Populus × sibirica* identified sex-associated allele-specific expression of the *CLC* gene. *Front. Genet.* 12, 676935.
- 16. Kaltenegger E., Leng S., Heyl A. (2018) The effects of repeated whole genome duplication events on the evolution of cytokinin signaling pathway. *BMC Evol. Biol.* **18**(1), 76.
- Юсупов Д.В., Рихванов Л.П., Робертус Ю.В., Ляпина Е.Е., Турсуналиева Е.М., Барановская Н.В., Осипова Н.А. (2018) Ртуть в листьях тополя на урбанизированных территориях Юга Сибири и Дальнего Востока. Экология и промышленность России. 22(12), 56–62.
- Tao Y., Chiu L.-W., Hoyle J.W., Dewhirst R.A., Richey C., Rasmussen K., Du J., Mellor P., Kuiper J., Tucker D., Crites A., Orr G.A., Heckert M.J., Godinez-Vidal D., Orozco-Cardenas M.L., Hall M.E. (2023) Enhanced photosynthetic efficiency for increased carbon assimilation and woody biomass production in engineered hybrid poplar. *Forests.* 14(4), 827.
- 19. He F., Wu Z., Zhao Z., Chen G., Wang X., Cui X., Zhu T., Chen L., Yang P., Bi L., Lin T. (2022) Drought stress drives sex-specific differences in plant resistance against herbivores between male and female poplars through changes in transcriptional and metabolic profiles. *Sci. Total Environ.* **845**, 157171.
- Han Y., Wang L., Zhang X., Korpelainen H., Li C. (2013) Sexual differences in photosynthetic activity, ultrastructure and phytoremediation potential of *Populus cathayana* exposed to lead and drought. *Tree Physiol.* 33(10), 1043–1060.
- Yu L., Tang S., Guo C., Korpelainen H., Li C. (2023) Differences in ecophysiological responses of *Populus euphratica* females and males exposed to salinity and alkali stress. *Plant Physiol. Biochem.* **198**, 107707.
- 22. Lin T., Tang J., He F., Chen G., Shi Y., Wang X., Han S., Li S., Zhu T., Chen L. (2022) Sexual differences in above- and belowground herbivore resistance between male and female poplars as affected by soil cadmium stress. *Sci. Total Environ.* **803**, 150081.
- 23. Lin T., Lu Q., Zheng Z., Li S., Li S., Liu Y., Zhu T., Chen L., Yang C., Han S. (2023) Soil cadmium stress affects the phyllosphere microbiome and associated pathogen resistance differently in male and female poplars. *J. Exp. Bot.* **74**(6), 2188–2202.
- 24. Li Y., Duan B., Chen J., Korpelainen H., Niinemets U., Li C. (2016) Males exhibit competitive advantages

over females of *Populus deltoides* under salinity stress. *Tree Physiol.* **36**(12), 1573–1584.

- Cronk Q., Soolanayakanahally R., Brautigam K. (2020) Gene expression trajectories during male and female reproductive development in balsam poplar (*Populus balsamifera* L.). *Sci. Rep.* **10**(1), 8413.
- 26. Zhang S., Wu Z., Ma D., Zhai J., Han X., Jiang Z., Liu S., Xu J., Jiao P., Li Z. (2022) Chromosome-scale assemblies of the male and female *Populus euphratica* genomes reveal the molecular basis of sex determination and sexual dimorphism. *Commun. Biol.* 5(1), 1186.
- Geraldes A., Hefer C.A., Capron A., Kolosova N., Martinez-Nunez F., Soolanayakanahally R.Y., Stanton B., Guy R.D., Mansfield S.D., Douglas C.J., Cronk Q.C. (2015) Recent Y chromosome divergence despite ancient origin of dioecy in poplars (*Populus*). *Mol. Ecol.* 24(13), 3243–3256.
- 28. Ci D., Song Y., Tian M., Zhang D. (2015) Methylation of miRNA genes in the response to temperature stress in *Populus simonii*. *Front. Plant Sci.* **6**, 921.
- Lin T., Tang J., Li S., Li S., Han S., Liu Y., Yang C., Chen G., Chen L., Zhu T. (2023) Drought stress mediated differences in phyllosphere microbiome and associated pathogen resistance between male and female poplars. *Plant J.* 115(4), 1100–1113.
- Liu L., Lu L., Li H., Meng Z., Dong T., Peng C., Xu X. (2021) Divergence of phyllosphere microbial communities between females and males of the dioecious *Populus cathayana*. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 34(4), 351–361.
- Guo Q., Liu L., Liu J., Korpelainen H., Li C. (2022) Plant sex affects plant-microbiome assemblies of dioecious *Populus cathayana* trees under different soil nitrogen conditions. *Microbiome*. 10(1), 191.
- Zhang Z.S., Zeng Q.Y., Liu Y.J. (2021) Frequent ploidy changes in Salicaceae indicates widespread sharing of the salicoid whole genome duplication by the relatives of *Populus* L. and *Salix* L. *BMC Plant Biol.* 21(1), 535.
- Manchester S.R., Judd W.S., Handley B. (2006) Foliage and fruits of early poplars (Salicaceae: *Populus*) from the Eocene of Utah, Colorado, and Wyoming. *Internat. J. Plant Sci.* 167(4), 897–908.
- Paolucci I., Gaudet M., Jorge V., Beritognolo I., Terzoli S., Kuzminsky E., Muleo R., Scarascia Mugnozza G., Sabatti M. (2010) Genetic linkage maps of *Populus alba* L. and comparative mapping analysis of sex determination across *Populus* species. *Tree Genet. Genomes.* 6(6), 863–875.
- 35. Tuskan G.A., DiFazio S., Faivre-Rampant P., Gaudet M., Harfouche A., Jorge V., Labbé J.L., Ranjan P., Sabatti M., Slavov G., Street N., Tschaplinski T.J., Yin T. (2012) The obscure events contributing to the evolution of an incipient sex chromosome in *Populus*: a retrospective working hypothesis. *Tree Genet. Genomes.* 8(3), 559–571.
- Tuskan G.A., Difazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., Schein J., Sterck L., Aerts

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

A., Bhalerao R.R., Bhalerao R.P., Blaudez D., Boerjan W., Brun A., Brunner A., Busov V., Campbell M., Carlson J., Chalot M., Chapman J., Chen G.L., Cooper D., Coutinho P.M., Couturier J., Covert S., Cronk Q., Cunningham R., Davis J., Degroeve S., Dejardin A., Depamphilis C., Detter J., Dirks B., Dubchak I., Duplessis S., Ehlting J., Ellis B., Gendler K., Goodstein D., Gribskov M., Grimwood J., Groover A., Gunter L., Hamberger B., Heinze B., Helariutta Y., Henrissat B., Holligan D., Holt R., Huang W., Islam-Faridi N., Jones S., Jones-Rhoades M., Jorgensen R., Joshi C., Kangasjarvi J., Karlsson J., Kelleher C., Kirkpatrick R., Kirst M., Kohler A., Kalluri U., Larimer F., Leebens-Mack J., Leple J.C., Locascio P., Lou Y., Lucas S., Martin F., Montanini B., Napoli C., Nelson D.R., Nelson C., Nieminen K., Nilsson O., Pereda V., Peter G., Philippe R., Pilate G., Poliakov A., Razumovskaya J., Richardson P., Rinaldi C., Ritland K., Rouze P., Ryaboy D., Schmutz J., Schrader J., Segerman B., Shin H., Siddiqui A., Sterky F., Terry A., Tsai C.J., Uberbacher E., Unneberg P., Vahala J., Wall K., Wessler S., Yang G., Yin T., Douglas C., Marra M., Sandberg G., Van de Peer Y., Rokhsar D. (2006) The genome of black cottonwood, Populus trichocarpa (Torr. & Gray). Science. 313(5793), 1596-1604.

- Ramirez-Carvajal G.A., Morse A.M., Davis J.M. (2008) Transcript profiles of the cytokinin response regulator gene family in *Populus* imply diverse roles in plant development. *New Phytol.* 177(1), 77–89.
- 38. Lu J., Wei S., Yin T., Chen Y. (2023) Genome-wide identification and analysis of the molecular evolution and expression of type-A response regulator genes in *Populus deltoids*. *Industrial Crops Products*. **194**, 116336.
- Zhou R., Macaya-Sanz D., Schmutz J., Jenkins J.W., Tuskan G.A., DiFazio S.P. (2020) Sequencing and analysis of the sex determination region of *Populus trichocarpa*. *Genes* (Basel). 11(8), 843.
- Zhang L., Xi Z., Wang M., Guo X., Ma T. (2018) Plastome phylogeny and lineage diversification of Salicaceae with focus on poplars and willows. *Ecol. Evol.* 8(16), 7817–7823.
- 41. Liu X., Wang Z., Wang D., Zhang J. (2016) Phylogeny of *Populus–Salix* (Salicaceae) and their relative genera using molecular datasets. *Biochem. Systemat. Ecol.* 68, 210–215.
- 42. Wang Z., Du S., Dayanandan S., Wang D., Zeng Y., Zhang J. (2014) Phylogeny reconstruction and hybrid analysis of *Populus* (Salicaceae) based on nucleotide sequences of multiple single-copy nuclear genes and plastid fragments. *PLoS One.* **9**(8), e103645.
- 43. Yang W., Wang D., Li Y., Zhang Z., Tong S., Li M., Zhang X., Zhang L., Ren L., Ma X., Zhou R., Sanderson B.J., Keefover-Ring K., Yin T., Smart L.B., Liu J., DiFazio S.P., Olson M., Ma T. (2021) A general model to explain repeated turnovers of sex determination in the Salicaceae. *Mol. Biol. Evol.* 38(3), 968– 980.
- 44. Zemp N., Tavares R., Muyle A., Charlesworth D., Marais G.A., Widmer A. (2016) Evolution of sex-bi-

ased gene expression in a dioecious plant. *Nat. Plants.* **2**(11), 16168.

- Wu M., Moore R.C. (2015) The evolutionary tempo of sex chromosome degradation in *Carica papaya*. J. Mol. Evol. 80(5–6), 265–277.
- 46. Li S.-F., Zhang X.-Y., Yang L.-L., Jia K.-L., Li J.-R., Lan L.-N., Zhang Y.-L., Li N., Deng C.-L., Gao W.-J. (2023) Landscape and evolutionary dynamics of Helitron transposons in plant genomes as well as construction of online database HelDB. J. Systematics Evol. 61(5), 919–931.
- Charlesworth D., Charlesworth B. (1978) Population genetics of partial male-sterility and the evolution of monoecy and dioecy. *Heredity*. 41(2), 137–153.
- Akagi T., Henry I.M., Ohtani H., Morimoto T., Beppu K., Kataoka I., Tao R. (2018) A Y-encoded suppressor of feminization arose via lineage-specific duplication of a cytokinin response regulator in kiwifruit. *Plant Cell.* **30**(4), 780–795.
- Akagi T., Pilkington S.M., Varkonyi-Gasic E., Henry I.M., Sugano S.S., Sonoda M., Firl A., McNeilage M.A., Douglas M.J., Wang T., Rebstock R., Voogd C., Datson P., Allan A.C., Beppu K., Kataoka I., Tao R. (2019) Two Y-chromosome-encoded genes determine sex in kiwifruit. *Nat. Plants.* 5(8), 801–809.
- 50. Harkess A., Zhou J., Xu C., Bowers J.E., Van der Hulst R., Ayyampalayam S., Mercati F., Riccardi P., McKain M.R., Kakrana A., Tang H., Ray J., Groenendijk J., Arikit S., Mathioni S.M., Nakano M., Shan H., Telgmann-Rauber A., Kanno A., Yue Z., Chen H., Li W., Chen Y., Xu X., Zhang Y., Luo S., Chen H., Gao J., Mao Z., Pires J.C., Luo M., Kudrna D., Wing R.A., Meyers B.C., Yi K., Kong H., Lavrijsen P., Sunseri F., Falavigna A., Ye Y., Leebens-Mack J.H., Chen G. (2017) The asparagus genome sheds light on the origin and evolution of a young Y chromosome. *Nat. Commun.* 8(1), 1279.
- Harkess A., Huang K., van der Hulst R., Tissen B., Caplan J.L., Koppula A., Batish M., Meyers B.C., Leebens-Mack J. (2020) Sex determination by two Y-linked genes in garden asparagus. *Plant Cell.* 32(6), 1790–1796.
- 52. Kazama Y., Ishii K., Aonuma W., Ikeda T., Kawamoto H., Koizumi A., Filatov D.A., Chibalina M., Bergero R., Charlesworth D., Abe T., Kawano S. (2016) A new physical mapping approach refines the sex-determining gene positions on the *Silene latifolia* Y-chromosome. *Sci. Rep.* 6, 18917.
- Renner S.S. (2016) Pathways for making unisexual flowers and unisexual plants: moving beyond the "two mutations linked on one chromosome" model. *Am. J. Bot.* 103(4), 587–589.
- Cronk Q., Muller N.A. (2020) Default sex and single gene sex determination in dioecious plants. *Front. Plant Sci.* 11, 1162.
- Muller N.A., Kersten B., Leite Montalvao A.P., Mahler N., Bernhardsson C., Brautigam K., Carracedo L.Z., Hoenicka H., Kumar V., Mader M., Pakull B., Robinson K.M., Sabatti M., Vettori C., Ingvarsson P.K., Cronk Q., Street N.R., Fladung M. (2020)

A single gene underlies the dynamic evolution of poplar sex determination. *Nat. Plants.* **6**(6), 630–637.

- 56. Xue L., Wu H., Chen Y., Li X., Hou J., Lu J., Wei S., Dai X., Olson M.S., Liu J., Wang M., Charlesworth D., Yin T. (2020) Evidences for a role of two Y-specific genes in sex determination in *Populus deltoides*. *Nat. Commun.* **11**(1), 5893.
- 57. Zhou R., Macaya-Sanz D., Carlson C.H., Schmutz J., Jenkins J.W., Kudrna D., Sharma A., Sandor L., Shu S., Barry K., Tuskan G.A., Ma T., Liu J., Olson M., Smart L.B., DiFazio S.P. (2020) A willow sex chromosome reveals convergent evolution of complex palindromic repeats. *Genome Biol.* 21(1), 38.
- 58. Pakull B., Kersten B., Luneburg J., Fladung M. (2015) A simple PCR-based marker to determine sex in aspen. *Plant Biol.* (Stuttg). **17**(1), 256–261.
- 59. Li Y., Wang D., Wang W., Yang W., Gao J., Zhang W., Shan L., Kang M., Chen Y., Ma T. (2023) A chromosome-level *Populus qiongdaoensis* genome assembly provides insights into tropical adaptation and a cryptic turnover of sex determination. *Mol. Ecol.* 32(6), 1366–1380.
- 60. Hwang I., Sheen J., Muller B. (2012) Cytokinin signaling networks. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 353–380.
- Leite Montalvao A.P., Kersten B., Kim G., Fladung M., Muller N.A. (2022) ARR17 controls dioecy in *Populus* by repressing B-class *MADS-box* gene expression. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 377(1850), 20210217.
- 62. Schaller G.E., Kieber J.J., Shiu S.H. (2008) Two-component signaling elements and histidyl-aspartyl phosphorelays. *Arabidopsis Book.* **6**, e0112.
- Muller B., Sheen J. (2007) Advances in cytokinin signaling. *Science*. 318(5847), 68–69.
- 64. Muller B., Sheen J. (2007) *Arabidopsis* cytokinin signaling pathway. *Sci STKE*. **2007**(407), cm5.
- Vaten A., Soyars C.L., Tarr P.T., Nimchuk Z.L., Bergmann D.C. (2018) Modulation of asymmetric division diversity through cytokinin and SPEECHLESS regulatory interactions in the *Arabidopsis* stomatal lineage. *Dev. Cell.* 47(1), 53–66 e55.
- Hotta C.T. (2022) The evolution and function of the PSEUDO RESPONSE REGULATOR gene family in the plant circadian clock. *Genet. Mol. Biol.* 45(3 Suppl 1), e20220137.
- 67. Willison K.R. (2018) The structure and evolution of eukaryotic chaperonin-containing TCP-1 and its mechanism that folds actin into a protein spring. *Biochem. J.* **475**(19), 3009–3034.
- Неделяева О., Шувалов А.В., Балнокин Ю.В. (2020). Хлоридные каналы и транспортеры семейства CLC у растений. Физиология Растений. 67(5), 767–784.
- 69. Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. (2011) DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochim. Biophys. Acta.* **1809**(8), 360–368.
- Griffith M.E., Mayer U., Capron A., Ngo Q.A., Surendrarao A., McClinton R., Jurgens G., Sundaresan V. (2007) The *TORMOZ* gene encodes a nucleo-

lar protein required for regulated division planes and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **19**(7), 2246–2263.

- Chen Y., Wu H., Dai X., Li W., Qiu Y., Yang Y., Yin T. (2023) Sex effect on growth performance and marker-aided sex discrimination of seedlings of *Populus deltoides*. J. Forestry Res. 34, 1639–1645.
- Mao J., Wei S., Chen Y., Yang Y., Yin T. (2023) The proposed role of MSL-lncRNAs in causing sex lability of female poplars. *Horticulture Res.* 10(5), uhad42.
- 73. Wang M., Zhang L., Zhang Z., Li M., Wang D., Zhang X., Xi Z., Keefover-Ring K., Smart L.B., Di-Fazio S.P., Olson M.S., Yin T., Liu J., Ma T. (2020) Phylogenomics of the genus *Populus* reveals extensive interspecific gene flow and balancing selection. *New Phytol.* 225(3), 1370–1382.
- Melnikova N.V., Kudryavtseva A.V., Borkhert E.V., Pushkova E.N., Fedorova M.S., Snezhkina A.V., Krasnov G.S., Dmitriev A.A. (2019) Sex-specific polymorphism of MET1 and ARR17 genes in *Populus×sibirica. Biochimie.* 162, 26–32.
- 75. Wybouw B., De Rybel B. (2019) Cytokinin a developing story. *Trends Plant Sci.* 24(2), 177–185.
- 76. Song Y., Ma K., Ci D., Chen Q., Tian J., Zhang D. (2013) Sexual dimorphic floral development in dioecious plants revealed by transcriptome, phytohormone, and DNA methylation analysis in *Populus tomentosa. Plant Mol. Biol.* 83(6), 559–576.
- 77. Zhang Z., Chen Y., Zhang J., Ma X., Li Y., Li M., Wang D., Kang M., Wu H., Yang Y., Olson M.S., Di-Fazio S.P., Wan D., Liu J., Ma T. (2020) Improved genome assembly provides new insights into genome evolution in a desert poplar (*Populus euphratica*). *Mol. Ecol. Resource.* 20(3), 781–794.
- Yang W., Wang K., Zhang J., Ma J., Liu J., Ma T. (2017) The draft genome sequence of a desert tree *Populus pruinosa. Gigascience.* 6(9), 1–7.
- 79. Chefdor F., Hericourt F., Koudounas K., Carqueijeiro I., Courdavault V., Mascagni F., Bertheau L., Larcher M., Depierreux C., Lamblin F., Racchi M.L., Carpin S. (2018) Highlighting type A RRs as potential regulators of the dkHK1 multi-step phosphorelay pathway in *Populus. Plant Sci.* 277, 68–78.
- Schmied J., Hedtke B., Grimm B. (2011) Overexpression of HEMA1 encoding glutamyl-tRNA reductase. J. Plant. Physiol. 168(12), 1372–1379.
- Zhao M.-H., Li X., Zhang X.-X., Zhang H., Zhao X.-Y. (2020) Mutation mechanism of leaf color in plants: a review. *Forests.* 11(8), 851.

- 82. Sabatti M., Gaudet M., Müller N.A., Kersten B., Gaudiano C., Scarascia Mugnozza G., Fladung M., Beritognolo I. (2020) Long-term study of a subdioecious *Populus* × *canescens* family reveals sex lability of females and reproduction behaviour of cosexual plants. *Plant Reprod.* 33(1), 1–17.
- Song Y., Ma K., Bo W., Zhang Z., Zhang D. (2012) Sex-specific DNA methylation and gene expression in andromonoecious poplar. *Plant Cell Rep.* 31(8), 1393–1405.
- Martin A., Troadec C., Boualem A., Rajab M., Fernandez R., Morin H., Pitrat M., Dogimont C., Bendahmane A. (2009) A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature*. 461(7267), 1135–1138.
- Zhang W., Wang X., Yu Q., Ming R., Jiang J. (2008) DNA methylation and heterochromatinization in the male-specific region of the primitive Y chromosome of papaya. *Genome Res.* 18(12), 1938–1943.
- Janousek B., Siroky J., Vyskot B. (1996) Epigenetic control of sexual phenotype in a dioecious plant, *Melandrium album. Mol. Gen. Genet.* 250(4), 483–490.
- Zhou P., Zhang X., Ma X., Yue J., Liao Z., Ming R. (2022) Methylation related genes affect sex differentiation in dioecious and gynodioecious papaya. *Hortic. Res.* 9, uhab065.
- Perrella G., Zioutopoulou A., Headland L.R., Kaiserli E. (2020) The impact of light and temperature on chromatin organization and plant adaptation. *J. Exp. Bot.* **71**(17), 5247–5255.
- Mara C.D., Irish V.F. (2008) Two GATA transcription factors are downstream effectors of floral homeotic gene action in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 147(2), 707–718.
- 90. Song Y., Ma K., Ci D., Zhang Z., Zhang D. (2013) Sexual dimorphism floral microRNA profiling and target gene expression in andromonoecious poplar (*Populus tomentosa*). *PLoS One.* 8(5), e62681.
- Song Y., Tian M., Ci D., Zhang D. (2015) Methylation of microRNA genes regulates gene expression in bisexual flower development in andromonoecious poplar. *J. Exp. Bot.* 66(7), 1891–1905.

### Molecular and Genetic Mechanisms of Sex Determination in Poplar

N. S. Gladysh<sup>1, 2\*</sup>, M. A. Kovalev<sup>1</sup>, M. S. Lantsova<sup>1</sup>, M. I. Popchenko<sup>1</sup>, N. L. Bolsheva<sup>1</sup>, A. M. Starkova<sup>1, 2\*</sup>, E. V. Bulavkina<sup>1</sup>, D. S. Karpov<sup>1</sup>, A. A. Kudryavtsev<sup>1</sup>, A. V. Kudryavtseva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia <sup>2</sup>Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, 127434 Russia

\* e-mail: natalyagladish@gmail.com

The study of molecular and genetic mechanisms of sex determination in poplar is of interest not only in the fundamental aspect, but also in the applied aspect. In landscaping of large settlements, it is advisable to use male individuals of *Populus* genus due to their hypoallergenicity and increased resistance to environmental pollution, stress conditions and pathogens. However, sex determination in poplars is complicated by the complex genetic structure of the sex-determining region of the genome (SDR). In this review, the emergence, evolution, structure and function of the SDR in the genus *Populus* are discussed. Current insights into the structure and function of the key regulator of sex selection in poplars, the orthologous *ARR16/ARR17* gene, and the possible role of other genes differentially expressed between male and female plants, including microRNAs, in this process are discussed in detail. The great diversity of species and the high complexity of SDR organization justify the need for further study of the molecular mechanisms of sex determination in poplars.

Keywords: Poplar, Populus, sex genetics, dicotypes, SDR, orthologs ARR16/ARR17

——— ОБЗОРЫ —

УДК 577.241

# РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ПРОМОТОРАМИ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ III В НОРМЕ И ПАТОЛОГИИ

© 2024 г. А. М. Шварц<sup>*a*, *b*</sup>, К. А. Татосян<sup>*a*, *c*</sup>, Д. В. Стасенко<sup>*a*</sup>, Д. А. Крамеров<sup>*a*, \*</sup>

<sup>а</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия <sup>b</sup>Department of Human Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Haifa, Haifa, 3498838, Israel <sup>c</sup>Department of Biochemistry, Rappaport Faculty of Medicine, Technion-Israel Institute of Technology,

*Haifa, 31096, Israel \*e-mail: kramerov@eimb.ru* Поступила в редакцию 03.10.2023 г. После доработки 03.10.2023 г. Принята к публикации 23.10.2023 г.

РНК-полимераза III синтезирует многочисленные некодирующие РНК длиной не более 400 нуклеотидов. Эти РНК принимают участие в синтезе белков (тРНК, 5S рРНК и 7SL РНК), созревании и сплайсинге разных типов РНК (RPR, MRP РНК и U6 РНК), регуляции транскрипции (7SK РНК), репликации (Y РНК) и внутриклеточном транспорте (vault РНК). Гены ВС200 и ВС1 РНК транскрибируются РНК-полимеразой III только в нейронах, где эти РНК регулируют синтез белков. Мутации регуляторных элементов генов, транскрибируемых РНК-полимеразой III, а также транскрипционных факторов этой РНК-полимеразы связаны с развитием целого ряда заболеваний, прежде всего, онкологических и неврологических. В связи с этим в последнее время активно исследуются механизмы регуляции экспрессии генов, содержащих различные промоторы РНК-полимеразы III. Данный обзор посвящен структурно-функциональной классификации промоторов полимеразы III, а также факторам, участвующим в регуляции промоторов разных типов. На ряде примеров рассмотрена роль описываемых факторов в патогенезе заболеваний человека.

Ключевые слова: РНК-полимераза III, гены, промоторы, факторы транскрипции, некодирующие РНК, млекопитающие, патологии человека

DOI: 10.31857/S0026898424020032, EDN: NNFJKS

#### ВВЕДЕНИЕ

Транскрипция генов и других участков эукариотического генома осуществляется тремя типами РНК-полимераза. РНК-полимераза I транскрибирует только гены длинных рибосомных РНК и распознает лишь один тип промотора. РНК-полимераза II транскрибирует очень широкий спектр генов – как кодирующих, так и некодирующих белки; при этом РНК-полимераза взаимодействует с чрезвычайно разнообразными белковыми факторами и через них с регуляторными элементами ДНК. По разнообразию транскрибируемых генов и известных типов регуляторных элементов РНК-полимераза III занимает промежуточное положение между двумя другими полимеразами. РНК-полиме-

раза III транскрибирует относительно короткие некодирующие РНК, играющие важную роль в различных аспектах жизнедеятельности клеток [1]. Так, 5S рРНК и тРНК участвуют в трансляции [2], 7SL PHK играют роль в определении места синтеза белков и в их секреции клеткой [3], U6 PHK вовлечена в сплайсинг пре-мРНК [4, 5], 4.5SH PHK противодействует возникновению ошибок при сплайсинге [6, 7], RPR и MRP РНК необходимы для процессинга пре-тРНК и пре-рРНК [8], vault РНК контролирует внутриклеточный транспорт и аутофагию [9], Y PHK участвует в репликации ДНК [10], 7SK РНК осуществляет регуляцию элонгации транскрипции РНК-полимеразы II [11]. Как правило, РНК, транскрибируемые РНК-полимеразой III,

Сокращения: SINE (short interspersed elements) – короткие диспергированные повторы ДНК; TFIII (transcription factor of RNA polymerase III) – транскрипционный фактор PHK-полимеразы III; TBP (TATA-binding protein) – TATA-связывающий белок; Brf (TFIIIB-related factor) – TFIIIB-родственный фактор; Bdp1 (B double prime 1 factor) – фактор В с двойным штрихом 1; CREB (cAMP-response element binding protein) – белок, связывающий элемент, отвечающий на сАМР; C/EBP (CCAAT-enhancer binding protein) – белок, связывающий энхансер CCAAT; SNAPc (snRNA activating protein complex) – белковый комплекс, активирующий малые ядерные PHK.

работают во всех типах клеток организма, однако некоторые из этих РНК обладают тканеспецифической активностью. Так, обнаружено, что экспрессия разных генов, кодирующих тРНК, может различаться в разных типах клеток [12]. РНК ВС1, ВС200 и G22 экспрессируются преимущественно в нейронах, где эти РНК играют важную роль в регуляции трансляции [7, 13, 14].

Помимо генов перечисленных выше некодирующих РНК, РНК-полимераза III транскрибирует мобильные генетические элементы, известные под аббревиатурой SINE (Short Interspersed Nuclear Elements). Десятки и сотни тысяч копий SINE присутствуют в геномах подавляющего большинства многоклеточных организмов [15, 16]. В ходе эволюции новые семейства SINE возникали огромное число раз. но всегда их источником служили нуклеотидные последовательности различных видов тРНК или значительно реже 5S pPHK, а также 7SL PHK. Интересно, что в редких случаях сами копии SINE могли породить гены коротких некодирующих PHK. Так. из SINE Alu приматов возникли гены РНК ВС200, G22 и snaR [14, 17]. Ген ВС1 РНК эволюционно близкородственен SINE ID грызунов [18], a SINE B1 и B2 мышеподобных грызунов породили, соответственно, гены 4.5SH РНК и 4.5SI РНК [19-21].

Рассматривая в этом обзоре промоторы PHK-полимеразы III, нельзя не упомянуть и терминаторы транскрипции этой полимеразы [22]. Механизмы терминации транскрипции у PHK-полимераз II и III полностью различны. В случае PHK-полимеразы III транскрипция прекращается на блоках, состоящих, по крайней мере, из четырех остатков тимидина –  $T_{\geq 4}$ . К умеренно эффективным (минимальным) терминаторам относятся также пентануклеотиды TCTTT и TATTT [23] и некоторые другие T-богатые последовательности [24].

Известно, что нарушение экспрессии как транскрибируемых РНК-полимеразой III генов, так и регулирующих эту транскрипцию способствует развитию ряда социально значимых заболеваний, включая онкологические и нарушения работы нервной системы [1].

Повышение уровня тРНК в целом и отдельных тРНК (тРНК<sup>Меt, Arg, Glu</sup>) в частности характерно для ряда онкологических заболеваний. Также в опухолевых клетках часто повышен уровень и других РНК, транскрибируемых РНК-полимеразой III и участвующих в синтезе белка, например, 7SL РНК [1]. Как указывалось выше, некоторые продукты транскрипции РНК-полимеразы III активно экспрессируются преимущественно в определенных типах клеток. Так, РНК ВС1 и ВС200 экспрессируются в основном в нервной ткани и потенциально связаны с развитием болезни Альцгеймера. Показано, что уровень ВС200 повышен в областях мозга, наиболее затронутых этой патологией, при этом уровень данной РНК оказался прямо пропорциональным тяжести заболевания [25].

Мутации в белке BRF1, который участвует в регуляции активности промоторов РНК-полимеразы III, приводят к нарушению развития центральной нервной системы у человека [26]. С другой стороны, повышенный уровень BRF1 наблюдается в клетках гепатоцеллюлярной карциномы, причем повышенный уровень данного белка коррелирует с негативным прогнозом для пациентов [27]. Любопытно, что фактор BRF1 отвечает за активацию РНК-полимеразы III в ответ на потребление алкоголя как в нормальных, так и в опухолевых клетках печени [27]. С другой стороны, ген *BRF1* может играть роль опухолевого супрессора, а его подавление стимулирует пролиферацию фибробластов. Кроме того, для клеток опухолей почек и прямой кишки характерна делеция гена BRF1 или снижение уровня его экспрессии [28]. Повышенный уровень экспрессии другого гена, регулирующего активность РНК-полимеразы III, BRF2 характерен для пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Амплификация этого гена часто наблюдается в клетках этого типа рака, а подавление его экспрессии снижает скорость деления опухолевых клеток [29].

Получены данные, свидетельствующие, что нарушение каталитической активности РНК-полимеразы III вследствие мутаций генов, кодирующих ее субъединицы, приводит к развитию синдрома Видемана - Раутенштрауха, который характеризуется чрезвычайно быстрым старением [30]. Однако достаточно неожиданными оказались результаты экспериментов с системным подавлением активности РНК-полимеразы III: сниженный уровень активности данного фермента приводил к увеличению продолжительности жизни дрожжей, беспозвоночных и даже мышей [5]. Предложено несколько механизмов влияния РНК-полимеразы III на продолжительность жизни. Одни авторы предполагают, что снижение активности данного фермента приводит к замедлению трансляции и предотвращению накопления неправильно свернутых белков, увеличение уровня которых может приводить к гибели клеток и развитию нейродегенеративных заболеваний [5, 31]. С другой стороны, повышенная активность РНК-полимеразы III, наблюдаемая при подавлении экспрессии ингибитора этой полимеразы, белка Maf1, приводит к увеличению образования R-петель, следствием чего является повышение количества повреждений ДНК и генетической нестабильности, что, в свою
очередь, приводит к ускорению старения [5]. Кроме того, опубликованы данные, указывающие на влияние повышенного уровня фрагментов тРНК на развитие возрастных заболеваний [32]. Таким образом, исследование механизмов регуляции активности промоторов РНК-полимеразы III может быть важным для понимания процессов развития многих патологий человека.

В настоящее время описаны три основных типа промоторов РНК-полимеразы III – типы 1, 2 и 3. Эти промоторы рекрутируют разные белковые комплексы [33] и, следовательно, могут регулироваться разными сигнальными путями. В нашем обзоре описаны структуры промоторов РНК-полимеразы III и спектр факторов, которые с ними взаимодействуют. (Рассмотрены преимущественно данные, полученные на клетках млекопитающих, хотя большое число исследований в этой области проведено на дрожжах). Обсуждается также, как изменения экспрессии генов, обладающих разными типами промоторов, могут участвовать в патогенезе заболеваний человека.

#### СТРУКТУРА И РЕГУЛЯЦИЯ ПРОМОТОРОВ ТИПА 1

Промотор РНК-полимеразы III первого типа характерен только для генов 5S рРНК. У Xenopus laevis этот промотор представляет собой ICR район, состоящий из трех функциональных элементов - бокса А (занимает позиции от +50 до +60), промежуточного элемента IE (от +67 до +72) и бокса C (от +80 до +90) [34, 35] (рис. 1а). Последовательность бокса А присутствует в большинстве промоторов, контролируемых РНК-полимеразой III, и имеet kohcehcyc – T(G/A)G(C/T)NNANNNG(N - любой нуклеотид). Бокс С - это наиболее консервативный элемент промоторов данного типа, консенсус этой последовательности (G/A)GATGGGNGAC. Кроме того, у большинства млекопитающих в 5'-фланкирующей последовательности в позиции -32/-21 генов 5S рРНК находится так называемый бокс D: GGCTCTTGGGGC [36, 37]. Его удаление приводит к существенному снижению эффективности транскрипции [36]. Ключевым фактором в регуляции транскрипции генов 5S рРНК является фактор TFIIIA, который напрямую взаимодействует с ICR районом (рис. 1a). TFIIIA, связанный с промотором, привлекает фактор TFIIIC [38, 39], который состоит из шести субъединиц [40] и в отличие от TFIIIA регулирует транскрипцию генов, содержащих промотор как первого, так и второго типа (см. ниже). Субъединицы фактора TFIIIC, TFIIIC102 и TFIIIC63, в свою очередь, последовательно привлекают фактор ТЕПІВ-в, состоящий из белков ТВР, BDP1 и BRF1, и непосредственно PHK-поли-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

меразу III [41-43]. Активность фактора TFIIIВ может быть усилена за счет взаимодействия с фактором МҮС или подавлена белками p53 и Rb1 [44, 45].

# ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОМОТОРОВ ТИПА 1 ПРИ ПАТОЛОГИЯХ

Опубликованы данные, указывающие на существование связи между уровнем экспрессии 5S pPHK и развитием некоторых заболеваний. Так, снижение уровня 5S pPHK обнаружено при гипомиелинизирующей лейкодистрофии. У пациентов с этим заболеванием найдена мутация R41W в гене *POLR3K*, кодирующем субъединицу RPC10 PHK-полимеразы III, которая слабо влияет на синтез тPHK, но при этом приводит к сильному подавлению экспрессии 5S pPHK [46]. Снижение уровня 5S pPHK наблюдается у пациентов с синдромом Видемана – Раутенштрауха [47].

Повышенный уровень транскрипционного фактора TFIIIC наблюдается в опухолях яичника. Этот фактор способствует, в том числе, экспрессии 5S pPHK [48]. В клетках рака молочной железы повышен уровень транскрип-ционных факторов BRF1 и ERa, способных повышать уровень 5S рРНК за счет активации промотора РНК-полимеразы III первого типа. Методом ChIP-qPCR показано связывание ERα с данным промотором в клетках рака молочной железы человека [1, 49]. Получены интересные данные о важной роли не вошедшей в состав рибосомы 5S рРНК в активации белка р53 – ключевого опухолевого супрессора. Оказалось, что 5S рРНК в составе рибонуклеопротеинового комплекса 5S-РНП ингибирует убиквитинлигазу MDM2, стабилизируя и активируя таким образом p53 [50]. Показано, что 5S pPHK участвует в активации р53 в ответ на некоторые химиотерапевтические препараты, а также играет ключевую роль при активации р53 другим опухолевым репрессором, белком p14 [50]. Поскольку сигналом к активации данного пути служит 5S рРНК, не вошедшая в состав субъединицы рибосомы, можно предположить, что этот механизм направлен на распознавание проблем в сборке рибосом, например, нарушения координации работы РНК-полимераз I и III.

#### СТРУКТУРА И РЕГУЛЯЦИЯ ПРОМОТОРОВ ТИПА 2

Все промоторы типа 2 содержат два бокса (А и В), расположенных внутри гена, т. е. в пределах транскрибируемой последовательности ДНК. Бокс А находится в позиции +12/+22 и отделен от бокса В участком длиной



**Рис. 1.** Схемы промоторов РНК-полимеразы III и белковых факторов, участвующих в инициации транскрипции на этих промоторах. Показаны промоторы трех типов. *а* – тип 1; *б* и *в* – тип 2; *е* – тип 3. Сайты связывания белковых факторов показаны прямоугольниками разного цвета в составе генов и последовательностей ДНК, их 5'-фланкирующих. Тонкими стрелками отмечены взаимодействия белковых факторов между собой и сайтами (боксами) в ДНК. Остальные объяснения в тексте.

30-40 п. н. (рис. 16, в). Консенсусная последовательность бокса А генов тРНК человека -T(G/A)G(C/T)NNA(G/A)(T/C/G)GG, тогда как бокса B – GGTTC(G/A)AN(C/T)C(C/T) [12, 51]. Промоторы типа 2 в генах тРНК и SINE устроены наиболее просто, они состоят только из боксов А и В (рис. 16). Гены тРНК млекопитающих не содержат в своих 5'-фланкирующих последовательностях ТАТА-боксов или других специфических последовательностей [52, 53]. Это же относится к большинству генов тРНК и других животных. Однако у растений и некоторых дрожжей эти гены содержат ТАТА-боксы или очень сходные с ними последовательности в позиции -30 /- 24 [52, 54]; ТАТА-боксы способствуют эффективной транскрипции генов тРНК у этих организмов. SINE почти никогда не содержат ТАТА-боксов в 5'-фланкирующих последовательностях, что легко понять, учитывая случайный характер интеграции копий SINE в геном [55, 56]. АТ-богатые последовательности в позиции – 30/– 24 делают транскрипцию SINE значительно более эффективной по сравнению с GC-богатыми [56]. Боксы А и В непосредственно связываются с транскрипционным фактором TFIIIC, который, как и в случае промотора типа 1, привлекает фактор ТFIIIВ-β, включающий белки TBP, BDP1 и BRF1, затем с образовавшимся комплексом соединяется РНК-полимераза III (рис. 16) [33, 57].

Некоторые гены с промотором типа 2 устроены несколько сложнее – помимо внутренних

А и В-боксов они имеют дополнительные боксы в 5'-фланкирующих последовательностях, важные для их эффективной и регулируемой транскрипции РНК-полимеразой III (рис. 1*в*). В табл. 1 перечислены такие гены – это гены 7SL PHK, vault PHK, BC200 и G22 PHK приматов, 4.5SH и 4.5SI РНК мышеподобных грызунов, EBER 1 и 2 РНК вируса Эпштейна - Барр и VA-I РНК аденовируса. Все эти гены содержат ТАТА-подобные боксы, расположенные приблизительно в позиции -30/-24. Такие боксы отличаются от ТАТА-боксов (ТАТАААА или других вариантов с чередующимися остатками Т и А) тем, что имеют два или три остатка С или G [56]. ТАТА-подобные боксы разных генов сушественно различаются, по-видимому, в ходе эволюции их нуклеотидные последовательности были тонко настроены на оптимальную работу своих генов [56, 66]. ТВР способен самостоятельно связываться с ТАТА-боксом, но не с ТА-ТА-подобным боксом, для взаимодействия с которым обязательно требуется его кооперация с двумя другими белками (BDP1 и BRF1), входящими в состав ТГІІІВ-β (рис. 1*в*) [33, 67]. ТАТА-подобные боксы безусловно важны для инициации транскрипции, так как внесение в них мутаций и, тем более, замена этих боксов на GC-богатые последовательности резко снижают эффективность транскрипции [56, 59, 61, 62]. Взаимодействие TFIII-В с ТАТА- или ТА-ТА-полобными боксами приволит к изгибанию и расплетению ДНК в этих сайтах, что необходимо для инициации транскрипции [57].

**Таблица 1**. Регуляторные элементы в 5'-фланкирующих последовательностях генов с промоторами типа 2 РНК-полимеразы III

Ген, кодирующий РНК	ТАТА-подобный бокс, позиция	Сайт связывания фактора транскрипции, позиция	Сайт связывания фактора транскрипции, позиция	Ссылка
тРНК (млекопитающие)	Нет	Нет	Нет	[52, 53]
SINE (млекопитающие)	Нет	Нет	Нет	[55, 58] [56]
7SL PHK (млекопитающие)	-29/-23	CREB -50/-43	До трех сайтов Sp1 в области –58 –96	[56, 59]
Vault PHK (мышь)	-30/-24	CREB -53/-46	Нет	[60]
ВС200 РНК (антропоиды) и G22 РНК (полуобезьяны )	-32/-26	Нет	Неидентифицированный фактор:80/70	[14]
4.5SH PHK (мышь, крыса, тушканчик)	-30/-24	CREB -51/-44	Сайт Sp1 в области —64 —86	[56]
4.5SI РНК (мышь, крыса, хомяк)	-30/-24	C/EBP -51/-42 или реже CREB -54/-47	Нет	[56, 61]
РНК EBER 1 и 2 (вирус Эпштейна – Барр)	-28/-22	CREB -51/-44	Сайт Sp1 -65/-60	[62, 63]
VA-I РНК (аденовирус чело- века)	-30/-24	CREB -38/-31	Нет	[64, 65]

В 5'-фланкирующих последовательностях шести из рассматриваемых генов (табл. 1) находятся также сайты узнавания белка CREB (cAMP-responsive element binding protein). B reнах 4.5SI PHK этот сайт чаще всего заменен другой последовательностью – сайтом узнавания белка C/EBP (CCAAT-enhancer binding protein). Показано, что эти сайты связывания белковых факторов значительно усиливают транскрипцию генов РНК-полимеразой III (ссылки в табл. 1). т. е. они играют роль энхансеров транскрипции. Есть данные, указывающие на то, что связывание белка AFT (он же CREB) с соответствующим сайтом гена 7SL PHK снимает репрессию транскрипции этого гена, вызванную белком р53 [68]. Возможно, связывание белковых факторов с сайтами узнавания CREB и C/EBP позволяет вышеперечисленным генам активно транскрибироваться в нормальных клетках, содержащих функциональный p53. В трех генах (7SL, 4.5SH и EBER PHK), приблизительно в области -60/-90, обнаруживаются один - три сайта узнавания фактора Sp1. Удаление этих сайтов умеренно снижало эффективность транскрипции генов 4.5SH и EBER PHK, так что этот район также, вероятно, служит энхансером и регулятором транскрипции [56, 62]. Отметим, что три упомянутых выше белковых фактора известны как широко распространенные транскрипционные факторы РНК-полимеразы II.

Рассматривая промоторы типа 2, необходимо отметить следующее любопытное наблюдение. Оказалось, что в геноме человека широко представлены боксы В, способные взаимодействовать с TFIIIC отдельно от боксов А. Такие элементы называются ETC – "extra TFIIIC" [69]. Они, за редким исключением, не способны инициировать транскрипцию и, по-видимому, участвуют в регуляции транскрипции PHK-полимеразой II [70], а также в организации хроматина [12].

Как уже отмечено выше, SINE содержат промоторы типа 2, образованные боксами А и В, а также, вероятно, случайные последовательности в позиции -30/-24, способные в той или иной степени выполнять функции ТАТА-подобного бокса. Так как копии SINE в геномах млекопитающих исчисляются ве-личинами порядка 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>, среди них всегда найдется множество с боксами А и В, не поврежденными мутациями, и подходящими последовательностями в позиции -30/-24. Такие копии должны быть способны к эффективной транскрипции [55, 56, 71], однако в нормальных клетках, а нередко и в клетках опухолевого происхождения, РНК, транскрибированные PHK-полимеразой III с SINE, содержатся в очень малом количестве. Ранее считалось, что это связано с метилированием ДНК SINE [72].

Однако позднее в опытах с SINE Alu человека и SINE B1 и B2 мыши было показано, что репрессия транскрипции SINE обусловлена другим типом эпигенетических модификаций метилированием гистонов, а именно триметилированием лизина 9 гистона 3 (H3K9me3) метилтрансферазой SUV39 [73, 74]. Такое метилирование гистона 3 в области расположения копии SINE приводит к тому, что с ДНК может связываться только TFIIIС и значительно реже также TFIIIB, тогда как РНК-полимераза III вообще не рекрутируется. Снятие метильных групп с H3 позволяет собраться на копии SINE всему комплексу, включая РНК-полимеразу III, что приводит к транскрипции SINE. Позже было показано, что модификации гистонов регулируют экспрессию и других генов, транскрибируемых РНК-полимеразой III. Например, более активные гены тРНК обладают более высоким уровнем триметилирования лизина 4 гистона 3 (H3K4me3), ацетилирования лизина 27 гистона 3 (НЗК27ас) [75] и более низким уровнем триметилирования лизина 9 гистона 3 (НЗК9те3) [76]. Предполагается, что в модификации гистонов генов, транскрибируемых полимеразой III, участвует белок BDP1, входящий в состав TFIIIВ [77]. Также в регуляции эпигенетических модификаций может быть задействован фактор TFIIIC, взаимодействующий с белком СТСF, который отвечает за регуляцию распространения эпигенентических модификаций по хроматину [78]. Кроме того, связанные с фактором МҮС белки GCN5 и р300 участвуют в ацетилировании ряда лизинов гистона 3, что приводит к активации промоторов генов тРНК [44]. В целом большинство модификаций промоторов сходны в генах, транскрибируемых РНК-полимеразами II и III.

## ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОМОТОРОВ ТИПА 2 ПРИ ПАТОЛОГИЯХ

Нарушение экспрессии генов, обладающих промоторами второго типа, наблюдается при некоторых патологиях. У пациентов с лейкодистрофией обнаружена делеция интрона 13 гена POLR3A, кодирующего самую большую субъединицу РНК-полимеразы III, что приводит к удалению экзона 14 при сплайсинге. В клетках с данной мутацией выявлено снижение уровня тРНК и 7SL РНК с одновременным повышением уровня 5S рРНК и 7SK РНК [79]. Мутации в нескольких генах, кодирующих разные субъединицы полимеразы III, приводят к понижению уровня тРНК в клетках. Наиболее сильно дефицит тРНК сказывается на образовании миелиновой оболочки нейронов и приводит к развитию неврологических заболеваний [75, 80]. Показано также, что мутация гена POLR3A, приводящая к замене метионина на валин в положении 852, приводит к подавлению экспрессии РНК 7SL и ВС200, тогда как экспрессия других продуктов РНК-полимеразы III не изменяется. С изменением уровня этих РНК связано развитие ряда заболеваний. Так, для опухолевых клеток характерен высокий уровень 7SL РНК. Понижение уровня этой РНК приводит к подавлению пролиферации разных типов опухолевых клеток. Интересно, что 7SL РНК может взаимодействовать с 3'-НТО мРНК опухолевого супрессора р53, подавляя его экспрессию [81].

Как сказано в предыдущей главе, в клетках рака молочной железы может быть повышен уровень транскрипционных факторов BRF1 и ERa. Помимо промотора гена 5S pPHK, данные факторы взаимодействуют с промотором гена тРНК<sup>Leu</sup>, что подтверждено методом ChIP-qPCR [1, 49]. В целом в опухолях разного типа повышен уровень тРНК. Это неудивительно, учитывая, что продукты целого ряда протоонкогенов (MYC, ERK, NOTCH1 и mTORC1) стимулируют активность РНК-полимеразы III [75]. Однако для некоторых онкологических заболеваний характерен повышенный уровень определенных типов тРНК. Так, в клетках рака молочной железы, обладающих высоким метастатическим потенциалом, повышен уровень тРНК<sup>Агд</sup><sub>ССС</sub> и тРНК<sup>Glu</sup><sub>UUC</sub> [82]. В агрессивных злокачественных опухолях легкого повышен уровень метиониновой тРНК. Любопытно, что изменение уровня отдельных тРНК характерно не только для опухолевых клеток, но и для клеток, ассоциированных с опухолью. Так, показано, что в фибробластах, ассоциированных с саркомой и способствующих развитию опухоли, также может быть повышен уровень метиониновой тРНК [83].

РНК ВС200 и ее аналог у грызунов ВС1, синтезирующиеся в основном в клетках нервной системы, предположительно участвуют в регуляции трансляции, в том числе, посредством взаимодействия с фактором инициации 4А и РАВР, а также с РНК-связывающим белком FMR1 [13, 84, 85]. Уровень ВС200 в тканях мозга снижается с возрастом. Отмечена также обратная корреляция между уровнем ВС200 в тканях мозга пациентов с синдромом Альцгеймера и тяжестью заболевания [25]. Уровень этой РНК повышен в клетках нескольких типов опухолей, причем в основном не нейронального происхождения. Так, повышение уровня ВС200 РНК обнаружено в клетках рака яичника, молочной железы, языка, печени, пищевода, кишечника и немелкоклеточного рака легкого. Показано, что высокий уровень ВС200 ассоциирован с повышенной способностью клеток к инвазивному росту [86-88]. Предполагается, что активность этой РНК связана со способностью стимулировать синтез белка S100A11, регулирующего подвижность клеток [89]. Интересно, что регуляция экспрессии BC200 в опухолевых клетках стимулируется известными протоонкогенами, такими как с-Мус и HNF4α [85, 90]. BC200 может участвовать в регуляции трансляции определенных PHK в опухолевых клетках, а также контролировать транскрипцию и сплайсинг ряда генов. На последние функции указывает способность данной PHK взаимодействовать в опухолевых клетках с белками TRIM24 и HNRNPK, участвующими в этих процессах [91, 92].

Одна из vault PHK, vtRNA2-1, также называемая nc886. связана с развитием ряла патологий. В настоящее время считается, что эта РНК не участвует в формировании комплекса vault, но участвует в регуляции активности дцРНКзависимой протеинкиназы (double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR) [93]. Nc886 РНК связывается с РКR, блокируя ее активность, за счет чего эта РНК способна подавлять клеточный ответ на интерферон- $\beta$ , что может способствовать размножению аденовирусов в клетке [94, 95]. Уровень этой РНК достаточно неоднозначно влияет на онкогенный потенциал клетки. Так, в нормальных клетках обычно активен только один аллель гена *nc886*, а другой метилирован. В ряде опухолей (пищевода, желудка, простаты и молочной железы) метилированы оба аллеля, что приводит к повышению активности PKR и стимуляции провоспалительного ответа клетки, ее пролиферации и выживанию. В других опухолях (рак почек, яичников, матки, щитовидной железы), наоборот, оба аллеля гена пс886 активны. РНК пс886 блокирует не только активность PKR, но и работу белка DICER, ответственного за образование миРНК. Таким образом, нарушение регуляции экспрессии целого ряда генов приводит к повышению способности клеток к росту и инвазии [1].

Элементы SINE, такие как Alu-повторы, в клетках человека, как правило, не экспрессируются [16]. Однако в опухолевых клетках уровень экспрессии этих элементов зачастую заметно повышен, что может приводить к усилению агрессивности опухолей [1, 96]. Повышенный уровень PHK Alu в неопухолевых клетках может приводить к их гибели за счет активации инфламмасом. Данный механизм может быть задействован в развитии возрастных заболеваний [97, 98].

# СТРУКТУРА И РЕГУЛЯЦИЯ ПРОМОТОРОВ ТИПА 3

Промоторы РНК-полимеразы III типа 3 выявлены в генах, кодирующих РНК U6, 7SK, RPR и MRP, а также Y-PHK [33, 99, 100]. Для про-

моторов этого типа характерно отсутствие внутренних боксов А, В или С, а функциональные элементы полностью расположены в 5'-фланкирующей последовательности гена (рис. 1г). Единственное исключение составляет ген селеноцистеиновой тРНК, который обладает внутренним боксом А, но не В. Промотор типа 3 состоит из канонического ТАТА-бокса, расположенного в районе позиции -30 относительно точки начала транскрипции, элемента PSE (proximal sequence element), который находится в позиции -60 ... -50, и элемента DSE (distal sequence element), локализованного приблизительно между позициями -240 и -210 (рис. 1г). ТАТА-бокс непосредственно взаимодействует с ТВР, который является частью комплекса TFIIIВ-а. В отличие от фактора ТFIIIВ-β, который связывается с промоторами типа 1 и 2, ТГІІІВ-а содержит вместо BRF1 белок BRF2 [33]. PSE содержит специфическую нуклеотидную последовательность, которая узнается белковым комплексом SNAPc (рис. 1г). DSE включает или последовательность SPH, взаимодействующую с фактором STAF, или октамерсвязывающий фактор транскрипции Oct-1 (рис. 1г) [101]. Также показано, что DSE может взаимодействовать с фактором Znf143 [102]. Сам SNAPc, состояший из пяти субъединиц. слабо взаимодействует с ДНК, как и ТВР. Однако действуя совместно, SNAPc и ТВР способны эффективно связываться с ДНК [103]. Сегмент из 50 аминокислотных остатков в N-концевой области белка SNAP190, крупнейшей субъединицы комплекса SNAPc, необходим для связывания с ТВР [104]. Интересно, что мини-комплексы SNAPc, в которых отсутствуют эти 50 аминокислотных остатков, также активируют транскрипцию. Это позволяет предположить, что в сборке инициирующего комплекса участвуют дополнительные механизмы привлечения ТВР к ДНК. Действительно, PSE способен эффективно рекрутировать ТВР, связанный с BRF2 [105]. Связывание SNAPc с PSE может стабилизироваться и путем взаимодействия с фактором Oct-1, связанным, в свою очередь, с DSE [101, 104, 106]. Предполагается, что прямое взаимодействие комплекса SNAPc, связанного с PSE, и Oct-1, связанного с DSE, может осуществляться за счет нуклеосомы, ассоциированной с областью между этими элементами [107]. Таким образом, все три комплекса (TFIIIB-а, SNAPc и STAF или Oct-1) кооперативно взаимодействуют с промотором типа 3 и привлекают РНК-полимеразу III.

# ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОМОТОРОВ ТИПА 3 ПРИ ПАТОЛОГИЯХ

Поскольку продукты генов, контролируемых промотором типа 3, участвуют в процессах регуляции экспрессии генов и клеточной пролифе-

рации, уровни таких РНК повышены в опухолях. Так, например, уровень U6 РНК повышен в раковых клетках и в сыворотке крови пациенток с раком молочной железы с метастазами. Экспрессия генов Y РНК, транскрипты которых играют важную роль в инициации репликации ДНК, увеличена в разных типах злокачественных опухолей [108–110]. Активация экспрессии этих РНК в опухолях может быть связана с повышенным уровнем фактора BRF2 [29, 111].

Снижение уровня транскрипционного фактора BRF2, наблюдаемое в условиях окислительного стресса, приводит к супрессии транскрипции селеноцистеиновой тРНК и снижению уровня синтеза селенпротеинов. Снижение уровня селенпротеинов ухудшает последствия окислительного стресса для клетки и повышает вероятность ее гибели. Напротив, повышение уровня фактора BRF2 способствует лучшей выживаемости клеток в условиях окислительного стресса [112]. Предполагается, что повышенный уровень BRF2, наблюдающийся в некоторых опухолях, стимулирует выживаемость опухолевых клеток [1].

Как упоминалось выше, в клетках пациентов с лейкодистрофией идентифицирована делеция интрона 13 гена *POLR3A*, которая приводит к удалению экзона 14 в процессе сплайсинга. В клетках с этой мутацией снижен уровень ряда PHK, синтез которых осуществляется PHK-полимеразой III, в том числе, 7SK, RPR и MRP [79]. Уровень 7SK PHK понижен также в клетках с мутациями гена *POLR3A*, характерными для пациентов с синдромом Видемана – Раутенштрауха [47].

Промоторы PHK-полимеразы III типа 3 обнаружены в интронах генов *GPR51*, *KCNIP4*, *ASCL3*, *SORL1* и *APBB2*, играющих важную роль в развитии болезни Альцгеймера. Активация этих промоторов может влиять на уровень транскрипции и регуляцию сплайсинга соответствующих генов, стимулируя развитие болезни Альцгеймера. Промоторы типа 3 активируются в клеточных линиях нейробластомы под действием воспалительных стимулов, что связано с увеличением экспрессии белка-предшественника амилоида (APP) и непосредственно секреции β-амилоида [113–116].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РНК, синтез которых инициируется промоторами РНК-полимеразы III, контролируют ключевые процессы экспрессии генов, прежде всего трансляции. Изменения уровня этих РНК значимо влияют на способность клеток к пролиферации, выживанию и активному функционированию. Опухолевые клетки отличаются

# ШВАРЦ и др.

от большинства нормальных клеток по целому ряду параметров, в том числе по активности экспрессии широкого спектра генов, связанных с пролиферацией и подвижностью. Не удивительно, что во многих типах опухолей обнаружена активация экспрессии тРНК, pPHK и 7SL РНК, необходимая для поддержания высокого уровня белкового синтеза. Как сказано выше, для некоторых опухолей особенно важен высокий уровень отдельных тРНК. Повышенный уровень этих тРНК может быть лимитирующим фактором при экспрессии таких важных для данного типа опухоли генов, как EXOSC2 и GRIPAP [82]. Об особенностях регуляции экспрессии генов в раковых клетках свидетельствует и тот факт, что для многих типов опухолей важен высокий уровень РНК ВС200, которая в норме экспрессируется в основном в клетках нервной ткани.

В результате обратной транскрипции некоторых РНК, синтезируемых РНК-полимеразой III, образовались мобильные генетические элементы [15, 117]. Как уже сказано, в норме экспрессия таких элементов подавлена за счет модификации хроматина. Однако в опухолевых клетках и в процессе старения происходит нарушение регуляции экспрессии SINE, что можно рассматривать как важный фактор патогенеза онкологических и возрастных заболеваний [1, 96-98]. Возможно, именно по этой причине снижение уровня РНК-полимеразы III существенно увеличивает продолжительность жизни ряда модельных животных [5]. С другой стороны, пониженный уровень РНК-полимеразы III снижает способность модельных млекопитающих реализовывать высокий уровень нутриентов и способствует развитию метаболических заболеваний и более ранней смерти при высококалорийной диете [118].

РНК-полимераза III может взаимодействовать не только с клеточными генами, но и с вирусной ДНК. Находясь в ядре, она может участвовать в синтезе некоторых вирусных РНК. Однако недавно обнаружили, что РНК-полимераза III может также выходить в цитоплазму и взаимодействовать с АТ-богатыми участками вирусной ДНК. В этом случае РНК, синтезированная данным ферментом, активирует антивирусную защиту клетки [119]. В связи с этим мутации генов разных субъединиц РНК-полимеразы III могут приводить к существенному снижению способности организма сопротивляться таким ДНК-содержащим вирусам, как вирус ветряной оспы [120].

Таким образом, РНК-полимераза III способна синтезировать широкий спектр РНК, участвующих в самых разнообразных патологических процессах. Изучение механизмов регуляции

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

экспрессии этих генов может быть полезным для разработки методов корректировки уровня определенных РНК. Одними из наиболее важных мишеней могут стать РНК, транскрибируемые с SINE. Разработка методов прицельного подавления экспрессии этих элементов может замедлить развитие целого ряда социально значимых заболеваний.

Работа получила поддержку Российского научного фонда (проект 19-14-00327).

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

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Yeganeh M., Hernandez N. (2020) RNA polymerase III transcription as a disease factor. *Genes Dev.* 34, 865–882.
- 2. Wolffe A.P. (1991) RNA polymerase III transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3**, 461–466.
- Walter P., Blobel G. (1982) Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature*. 299, 691–698.
- 4. Brow D.A., Guthrie C. (1988) Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals. *Nature*. **334**, 213–218.
- 5. Kulaberoglu Y., Malik Y., Borland G., Selman C., Alic N., Tullet J.M.A. (2021) RNA polymerase III, ageing and longevity. *Front. Genet.* **12**, 705122.
- Yoshimoto R., Nakayama Y., Yamamoto I., Tanaka S., Kurihara M., Suzuki Y., Kobayashi T., Kozuka-Hata H., Oyama M., Mito M., Iwasaki S., Yamazaki T., Hirose T., Araki K., Nakagawa S. (2022) 4.5SH RNA counteracts deleterious exonization of SINE B1 in mice. *Res. Square*. https://assets. researchsquare.com/files/rs-1949270/v1\_covered. pdf?c=1664371339
- 7. Yoshimoto R., Nakagawa S. (2023) SINE-derived short noncoding RNAs: their evolutionary origins, molecular mechanisms, and physiological significance. *Front. RNA Res.* **1**, 1–7.
- 8. Kikovska E., Svard S.G., Kirsebom L.A. (2007) Eukaryotic RNase P RNA mediates cleavage in the absence of protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 2062–2067.
- Horos R., Buscher M., Kleinendorst R., Alleaume A.M., Tarafder A.K., Schwarzl T., Dziuba D., Tischer C., Zielonka E.M., Adak A., Castello A., Huber W., Sachse C., Hentze M.W. (2019) The small non-coding vault RNA1-1 acts as a riboregulator of autophagy. *Cell.* 176, 1054–1067 e1012.

- 10. Kheir E., Krude T. (2017) Non-coding Y RNAs associate with early replicating euchromatin in concordance with the origin recognition complex. *J. Cell Sci.* **130**, 1239–1250.
- Quaresma A.J., Bugai A., Barboric M. (2016) Cracking the control of RNA polymerase II elongation by 7SK snRNP and P-TEFb. *Nucl. Acids Res.* 44, 7527–7539.
- Oler A.J., Alla R.K., Roberts D.N., Wong A., Hollenhorst P.C., Chandler K.J., Cassiday P.A., Nelson C.A., Hagedorn C.H., Graves B.J., Cairns B.R. (2010) Human RNA polymerase III transcriptomes and relationships to Pol II promoter chromatin and enhancer-binding factors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 620–628.
- 13. Lin D., Pestova T.V., Hellen C.U., Tiedge H. (2008) Translational control by a small RNA: dendritic BC1 RNA targets the eukaryotic initiation factor 4A helicase mechanism. *Mol. Cell Biol.* **28**, 3008–3019.
- 14. Ludwig A., Rozhdestvensky T.S., Kuryshev V.Y., Schmitz J., Brosius J. (2005) An unusual primate locus that attracted two independent Alu insertions and facilitates their transcription. *J. Mol. Biol.* **350**, 200–214.
- 15. Kramerov D.A., Vassetzky N.S. (2005) Short retroposons in eukaryotic genomes. *Int. Rev. Cytol.* 247, 165–221.
- 16. Kramerov D.A., Vassetzky N.S. (2011) SINEs. Wiley Interdiscip. Rev. RNA. 2, 772–786.
- 17. Parrott A.M., Tsai M., Batchu P., Ryan K., Ozer H.L., Tian B., Mathews M.B. (2011) The evolution and expression of the snaR family of small non-coding RNAs. *Nucl. Acids Res.* **39**, 1485–1500.
- Kim J., Martignetti J.A., Shen M.R., Brosius J., Deininger P. (1994) Rodent BC1 RNA gene as a master gene for ID element amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 3607–3611.
- 19. Gogolevskaya I.K., Kramerov D.A. (2002) Evolutionary history of 4.5SI RNA and indication that it is functional. *J. Mol. Evol.* **54**, 354–364.
- Gogolevskaya I.K., Koval A.P., Kramerov D.A. (2005) Evolutionary history of 4.5SH RNA. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1546–1554.
- Татосян К.А., Коваль А.П., Гоголевская И.К., Крамеров Д.А. (2017) 4.5SI и 4.5SH РНК: экспрессия в разных органах грызунов, содержание и распределение в клетке. *Молекуляр. биология*. 51, 142–149.
- Arimbasseri A.G., Rijal K., Maraia R.J. (2013) Transcription termination by the eukaryotic RNA polymerase III. *Biochim. Biophys. Acta.* 1829, 318–330.
- 23. Vassetzky N.S., Borodulina O.R., Ustyantsev I.G., Kosushkin S.A., Kramerov D.A. (2021) Analysis of SINE families B2, Dip, and Ves with special reference to polyadenylation signals and transcription terminators. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(18), 9897.
- Orioli A., Pascali C., Quartararo J., Diebel K.W., Praz V., Romascano D., Percudani R., van Dyk L.F., Hernandez N., Teichmann M., Dieci

G. (2011) Widespread occurrence of non-canonical transcription termination by human RNA polymerase III. *Nucl. Acids Res.* **39**, 5499–5512.

- 25. Mus E., Hof P.R., Tiedge H. (2007) Dendritic BC200 RNA in aging and in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 10679–10684.
- 26. Borck G., Hog F., Dentici M.L., Tan P.L., Sowada N., Medeira A., Gueneau L., Thiele H., Kousi M., Lepri F., Wenzeck L., Blumenthal I., Radicioni A., Schwarzenberg T.L., Mandriani B., Fischetto R., Morris-Rosendahl D.J., Altmuller J., Reymond A., Nurnberg P., Merla G., Dallapiccola B., Katsanis N., Cramer P., Kubisch C. (2015) BRF1 mutations alter RNA polymerase III-dependent transcription and cause neurodevelopmental anomalies. *Genome Res.* 25, 155–166.
- 27. Zhong Q., Xi S., Liang J., Shi G., Huang Y., Zhang Y., Levy D., Zhong S. (2016) The significance of Brfl overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 7, 6243–6254.
- Leal J.F., Fominaya J., Cascon A., Guijarro M.V., Blanco-Aparicio C., Lleonart M., Castro M.E., Ramon Y.C.S., Robledo M., Beach D.H., Carnero A. (2008) Cellular senescence bypass screen identifies new putative tumor suppressor genes. *Oncogene*. 27, 1961–1970.
- Lockwood W.W., Chari R., Coe B.P., Thu K.L., Garnis C., Malloff C.A., Campbell J., Williams A.C., Hwang D., Zhu C.Q., Buys T.P., Yee J., English J.C., Macaulay C., Tsao M.S., Gazdar A.F., Minna J.D., Lam S., Lam W.L. (2010) Integrative genomic analyses identify BRF2 as a novel lineage-specific oncogene in lung squamous cell carcinoma. *PLoS Med.* 7, e1000315.
- Wambach J.A., Wegner D.J., Patni N., Kircher M., Willing M.C., Baldridge D., Xing C., Agarwal A.K., Vergano S.A.S., Patel C., Grange D.K., Kenney A., Najaf T., Nickerson D.A., Bamshad M.J., Cole F.S., Garg A. (2018) Bi-allelic POLR3A loss-of-function variants cause autosomal-recessive wiedemann-rautenstrauch syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 103, 968–975.
- 31. Francisco S., Ferreira M., Moura G., Soares A.R., Santos M.A.S. (2020) Does proteostasis get lost in translation? Implications for protein aggregation across the lifespan. *Ageing. Res. Rev.* **62**, 101119.
- 32. Guzzi N., Bellodi C. (2020) Novel insights into the emerging roles of tRNA-derived fragments in mammalian development. *RNA Biol.* **17**, 1214–1222.
- 33. Schramm L., Hernandez N. (2002) Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes Dev.* **16**, 2593–2620.
- Bogenhagen D.F. (1985) The intragenic control region of the *Xenopus* 5S RNA gene contains two factor A binding domains that must be aligned properly for efficient transcription initiation. *J. Biol. Chem.* 260, 6466–6471.
- Arnold G.J., Kahnt B., Herrenknecht K., Gross H.J. (1987) A variant gene and a pseudogene for human

5S RNA are transcriptionally active *in vitro*. *Gene*. **60**, 137–144.

- 36. Hallenberg C., Frederiksen S. (2001) Effect of mutations in the upstream promoter on the transcription of human 5S rRNA genes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1520**, 169–173.
- Vierna J., Wehner S., Honer zu Siederdissen C., Martinez-Lage A., Marz M. (2013) Systematic analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans. *Heredity (Edinb)*. 111, 410–421.
- 38. Ogilvie M.K., Hanas J.S. (1997) Molecular biology of vertebrate transcription factor IIIA: cloning and characterization of TFIIIA from channel catfish oo-cytes. *Gene.* **203**, 103–112.
- 39. Paule M.R., White R.J. (2000) Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucl. Acids Res.* 28, 1283–1298.
- Dumay-Odelot H., Marck C., Durrieu-Gaillard S., Lefebvre O., Jourdain S., Prochazkova M., Pflieger A., Teichmann M. (2007) Identification, molecular cloning, and characterization of the sixth subunit of human transcription factor TFIIIC. *J. Biol. Chem.* 282, 17179–17189.
- 41. Lassar A.B., Martin P.L., Roeder R.G. (1983) Transcription of class III genes: formation of preinitiation complexes. *Science*. **222**, 740–748.
- Hsieh Y.J., Wang Z., Kovelman R., Roeder R.G. (1999) Cloning and characterization of two evolutionarily conserved subunits (TFIIIC102 and TFIIIC63) of human TFIIIC and their involvement in functional interactions with TFIIIB and RNA polymerase III. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4944–4952.
- 43. Hsieh Y.J., Kundu T.K., Wang Z., Kovelman R., Roeder R.G. (1999) The TFIIIC90 subunit of TFIIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity. *Mol. Cell Biol.* **19**, 7697–7704.
- Kenneth N.S., Ramsbottom B.A., Gomez-Roman N., Marshall L., Cole P.A., White R.J. (2007) TR-RAP and GCN5 are used by c-Myc to activate RNA polymerase III transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 104, 14917–14922.
- 45. White R.J. (2005) RNA polymerases I and III, growth control and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 69–78.
- 46. Dorboz I., Dumay-Odelot H., Boussaid K., Bouyacoub Y., Barreau P., Samaan S., Jmel H., Eymard-Pierre E., Cances C., Bar C., Poulat A.L., Rousselle C., Renaldo F., Elmaleh-Berges M., Teichmann M., Boespflug-Tanguy O. (2018) Mutation in POLR3K causes hypomyelinating leukodystrophy and abnormal ribosomal RNA regulation. *Neurol. Genet.* 4, e289.
- Baez-Becerra C.T., Valencia-Rincon E., Velasquez-Mendez K., Ramirez-Suarez N.J., Guevara C., Sandoval-Hernandez A., Arboleda-Bustos C.E., Olivos-Cisneros L., Gutierrez-Ospina G., Arboleda H., Arboleda G. (2020) Nucleolar disruption, activation of P53 and premature senescence in POL-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

R3A-mutated Wiedemann- Rautenstrauch syndrome fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* **192**, 111360.

- Winter A.G., Sourvinos G., Allison S.J., Tosh K., Scott P.H., Spandidos D.A., White R.J. (2000) RNA polymerase III transcription factor TFIIIC2 is overexpressed in ovarian tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 12619–12624.
- 49. Fang Z., Yi Y., Shi G., Li S., Chen S., Lin Y., Li Z., He Z., Li W., Zhong S. (2017) Role of Brf1 interaction with ERalpha, and significance of its overexpression, in human breast cancer. *Mol. Oncol.* **11**, 1752–1767.
- 50. Sloan K.E., Bohnsack M.T., Watkins N.J. (2013) The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell Rep.* **5**, 237-247.
- 51. Vassetzky N.S., Kramerov D.A. (2013) SINEBase: a database and tool for SINE analysis. *Nucl. Acids Res.* **41**, D83-89.
- 52. Giuliodori S., Percudani R., Braglia P., Ferrari R., Guffanti E., Ottonello S., Dieci G. (2003) A composite upstream sequence motif potentiates tRNA gene transcription in yeast. *J. Mol. Biol.* **333**, 1–20.
- Zhang G., Lukoszek R., Mueller-Roeber B., Ignatova Z. (2011) Different sequence signatures in the upstream regions of plant and animal tRNA genes shape distinct modes of regulation. *Nucl. Acids Res.* 39, 3331–3339.
- Hamada M., Huang Y., Lowe T.M., Maraia R.J. (2001) Widespread use of TATA elements in the core promoters for RNA polymerases III, II, and I in fission yeast. *Mol. Cell Biol.* 21, 6870–6881.
- Conti A., Carnevali D., Bollati V., Fustinoni S., Pellegrini M., Dieci G. (2015) Identification of RNA polymerase III-transcribed Alu loci by computational screening of RNA-Seq data. *Nucl. Acids Res.* 43, 817–835.
- Tatosyan K.A., Stasenko D.V., Koval A.P., Gogolevskaya I.K., Kramerov D.A. (2020) TATA-like boxes in RNA polymerase III promoters: requirements for nucleotide sequences. *Int. J. Mol. Sci.* 21(10), 3706.
- 57. Geiduschek E.P., Kassavetis G.A. (2001) The RNA polymerase III transcription apparatus. *J. Mol. Biol.* **310**, 1–26.
- 58. Roy A.M., West N.C., Rao A., Adhikari P., Aleman C., Barnes A.P., Deininger P.L. (2000) Upstream flanking sequences and transcription of SINEs. *J. Mol. Biol.* **302**, 17–25.
- 59. Englert M., Felis M., Junker V., Beier H. (2004) Novel upstream and intragenic control elements for the RNA polymerase III-dependent transcription of human 7SL RNA genes. *Biochimie*. **86**, 867–874.
- 60. Kickhoefer V.A., Emre N., Stephen A.G., Poderycki M.J., Rome L.H. (2003) Identification of conserved vault RNA expression elements and a non-expressed mouse vault RNA gene. *Gene.* **309**, 65–70.
- 61. Gogolevskaya I.K., Stasenko D.V., Tatosyan K.A., Kramerov D.A. (2018) Influence of 5'-flanking se-

quence on 4.5SI RNA gene transcription by RNA polymerase III. *Genome*. **61**, 367–370.

- 62. Howe J.G., Shu M.D. (1993) Upstream basal promoter element important for exclusive RNA polymerase III transcription of the *EBER 2* gene. *Mol. Cell Biol.* **13**, 2655–2665.
- Niller H.H., Salamon D., Ilg K., Koroknai A., Banati F., Bauml G., Rucker O., Schwarzmann F., Wolf H., Minarovits J. (2003) The *in vivo* binding site for oncoprotein c-Myc in the promoter for Epstein-Barr virus (EBV) encoding RNA (EBER) 1 suggests a specific role for EBV in lymphomagenesis. *Med. Sci. Monit.* 9, HY1-9.
- 64. Fowlkes D.M., Shenk T. (1980) Transcriptional control regions of the adenovirus VAI RNA gene. *Cell.* **22**, 405–413.
- Piras G., Dittmer J., Radonovich M.F., Brady J.N. (1996) Human T-cell leukemia virus type I Tax protein transactivates RNA polymerase III promoter *in vitro* and *in vivo*. J. Biol. Chem. 271, 20501–20506.
- 66. Stasenko D.V., Tatosyan K.A., Borodulina O.R., Kramerov D.A. (2023) Nucleotide context can modulate promoter strength in genes transcribed by RNA polymerase III. *Genes* (*Basel*). **14**(4), 802.
- 67. White R.J., Jackson S.P. (1992) Mechanism of TA-TA-binding protein recruitment to a TATA-less class III promoter. *Cell.* **71**, 1041–1053.
- 68. Chesnokov I., Chu W.M., Botchan M.R., Schmid C.W. (1996) p53 inhibits RNA polymerase III-directed transcription in a promoter-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 7084–7088.
- Moqtaderi Z., Struhl K. (2004) Genome-wide occupancy profile of the RNA polymerase III machinery in *Saccharomyces cerevisiae* reveals loci with incomplete transcription complexes. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4118–4127.
- Kleinschmidt R.A., LeBlanc K.E., Donze D. (2011) Autoregulation of an RNA polymerase II promoter by the RNA polymerase III transcription factor III C (TF(III)C) complex. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA. 108, 8385–8389.
- Chesnokov I., Schmid C.W. (1996) Flanking sequences of an Alu source stimulate transcription *in vitro* by interacting with sequence-specific transcription factors. *J. Mol. Evol.* 42, 30–36.
- Liu W.M., Maraia R.J., Rubin C.M., Schmid C.W. (1994) Alu transcripts: cytoplasmic localisation and regulation by DNA methylation. *Nucl. Acids Res.* 22, 1087–1095.
- Varshney D., Vavrova-Anderson J., Oler A.J., Cowling V.H., Cairns B.R., White R.J. (2015) SINE transcription by RNA polymerase III is suppressed by histone methylation but not by DNA methylation. *Nat. Commun.* 6, 6569.
- 74. Varshney D., Vavrova-Anderson J., Oler A.J., Cairns B.R., White R.J. (2015) Selective repression of SINE transcription by RNA polymerase III. *Mob. Genet. Elements.* **5**, 86–91.

- 75. Orellana E.A., Siegal E., Gregory R.I. (2022) tRNA dysregulation and disease. *Nat. Rev. Genet.* 23, 651–664.
- White R.J. (2011) Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nat. Rev. Genet.* 12, 459–463.
- 77. Boyer L.A., Latek R.R., Peterson C.L. (2004) The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 158–163.
- Moqtaderi Z., Wang J., Raha D., White R.J., Snyder M., Weng Z., Struhl K. (2010) Genomic binding profiles of functionally distinct RNA polymerase III transcription complexes in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 635–640.
- Azmanov D.N., Siira S.J., Chamova T., Kaprelyan A., Guergueltcheva V., Shearwood A.J., Liu G., Morar B., Rackham O., Bynevelt M., Grudkova M., Kamenov Z., Svechtarov V., Tournev I., Kalaydjieva L., Filipovska A. (2016) Transcriptome-wide effects of a *POLR3A* gene mutation in patients with an unusual phenotype of striatal involvement. *Hum. Mol. Genet.* 25, 4302-4314.
- Lata E., Choquet K., Sagliocco F., Brais B., Bernard G., Teichmann M. (2021) RNA polymerase III subunit mutations in genetic diseases. *Front. Mol. Biosci.* 8, 696438.
- Abdelmohsen K., Panda A.C., Kang M.J., Guo R., Kim J., Grammatikakis I., Yoon J.H., Dudekula D.B., Noh J.H., Yang X., Martindale J.L., Gorospe M. (2014) 7SL RNA represses p53 translation by competing with HuR. *Nucl. Acids Res.* 42, 10099–10111.
- 82. Goodarzi H., Nguyen H.C.B., Zhang S., Dill B.D., Molina H., Tavazoie S.F. (2016) Modulated expression of specific tRNAs drives gene expression and cancer progression. *Cell.* **165**, 1416–1427.
- 83. Clarke C.J., Berg T.J., Birch J., Ennis D., Mitchell L., Cloix C., Campbell A., Sumpton D., Nixon C., Campbell K., Bridgeman V.L., Vermeulen P.B., Foo S., Kostaras E., Jones J.L., Haywood L., Pulleine E., Yin H., Strathdee D., Sansom O., Blyth K., McNeish I., Zanivan S., Reynolds A.R., Norman J.C. (2016) The initiator methionine tRNA drives secretion of type II collagen from stromal fibroblasts to promote tumor growth and angiogenesis. *Curr. Biol.* 26, 755–765.
- Muddashetty R., Khanam T., Kondrashov A., Bundman M., Iacoangeli A., Kremerskothen J., Duning K., Barnekow A., Huttenhofer A., Tiedge H., Brosius J. (2002) Poly(A)-binding protein is associated with neuronal BC1 and BC200 ribonucleoprotein particles. J. Mol. Biol. 321, 433–445.
- Chen X., Zhao Y., Wang D., Lin Y., Hou J., Xu X., Wu J., Zhong L., Zhou Y., Shen J., Zhang W., Cao H., Hong X., Hu T., Zhan Y.Y. (2021) The HN-F4alpha-BC200-FMR1-positive feedback loop promotes growth and metastasis in invasive mucinous lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 81, 5904–5918.
- Wu D.I., Wang T., Ren C., Liu L., Kong D., Jin X., Li X., Zhang G. (2016) Down regulation of BC200

in ovarian cancer contributes to cancer cell proliferation and chemoresistance to carboplatin. *Oncol. Lett.* **11**, 1189–1194.

- Lin Y.H., Wu M.H., Huang Y.H., Yeh C.T., Chi H.C., Tsai C.Y., Chuang W.Y., Yu C.J., Chung I.H., Chen C.Y., Lin K.H. (2018) Thyroid hormone negatively regulates tumorigenesis through suppression of BC200. *Endocr. Relat. Cancer.* 25, 967–979.
- Wu K., Xu K., Liu K., Huang J., Chen J., Zhang J., Zhang N. (2018) Long noncoding RNA BC200 regulates cell growth and invasion in colon cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **99**, 219–225.
- Shin H., Lee J., Kim Y., Jang S., Lee Y., Kim S., Lee Y. (2017) Knockdown of BC200 RNA expression reduces cell migration and invasion by destabilizing mRNA for calcium-binding protein S100A11. *RNA Biol.* 14, 1418–1430.
- 90. Hu T., Lu Y.R. (2015) BCYRN1, a c-MYC-activated long non-coding RNA, regulates cell metastasis of non-small-cell lung cancer. *Cancer Cell Int.* **15**, 36.
- 91. Singh R., Gupta S.C., Peng W.X., Zhou N., Pochampally R., Atfi A., Watabe K., Lu Z., Mo Y.Y. (2016) Regulation of alternative splicing of Bcl-x by BC200 contributes to breast cancer pathogenesis. *Cell Death Dis.* 7, e2262.
- 92. Booy E.P., McRae E.K., Ezzati P., Choi T., Gussakovsky D., McKenna S.A. (2018) Comprehensive analysis of the BC200 ribonucleoprotein reveals a reciprocal regulatory function with CSDE1/UNR. *Nucl. Acids Res.* **46**, 11575–11591.
- Lee K., Kunkeaw N., Jeon S.H., Lee I., Johnson B.H., Kang G.Y., Bang J.Y., Park H.S., Leelayuwat C., Lee Y.S. (2011) Precursor miR-886, a novel noncoding RNA repressed in cancer, associates with PKR and modulates its activity. *RNA*. 17, 1076–1089.
- 94. Lee Y.S., Bao X., Lee H.H., Jang J.J., Saruuldalai E., Park G., Im W.R., Park J.L., Kim S.Y., Shin S., Jeon S.H., Kang S., Lee H.S., Lee J.S., Zhang K., Park E.J., Kim I.H., Lee Y.S. (2021) Nc886, a novel suppressor of the type I interferon response upon pathogen intrusion. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 2003.
- 95. Saruuldalai E., Park J., Kang D., Shin S.P., Im W.R., Lee H.H., Jang J.J., Park J.L., Kim S.Y., Hwang J.A., Kim Y.D., Lee J.H., Park E.J., Lee Y.S., Kim I.H., Lee S.J., Lee Y.S. (2022) A host non-coding RNA, nc886, plays a pro-viral role by promoting virus trafficking to the nucleus. *Mol. Ther. Oncolytics.* 24, 683–694.
- 96. Di Ruocco F., Basso V., Rivoire M., Mehlen P., Ambati J., De Falco S., Tarallo V. (2018) Alu RNA accumulation induces epithelial-to-mesenchymal transition by modulating miR-566 and is associated with cancer progression. *Oncogene.* 37, 627–637.
- 97. Kaneko H., Dridi S., Tarallo V., Gelfand B.D., Fowler B.J., Cho W.G., Kleinman M.E., Ponicsan S.L., Hauswirth W.W., Chiodo V.A., Kariko K., Yoo J.W., Lee D.K., Hadziahmetovic M., Song

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

Y., Misra S., Chaudhuri G., Buaas F.W., Braun R.E., Hinton D.R., Zhang Q., Grossniklaus H.E., Provis J.M., Madigan M.C., Milam A.H., Justice N.L., Albuquerque R.J., Blandford A.D., Bogdanovich S., Hirano Y., Witta J., Fuchs E., Littman D.R., Ambati B.K., Rudin C.M., Chong M.M., Provost P., Kugel J.F., Goodrich J.A., Dunaief J.L., Baffi J.Z., Ambati J. (2011) DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature*. **471**, 325–330.

- 98. Tarallo V., Hirano Y., Gelfand B.D., Dridi S., Kerur N., Kim Y., Cho W.G., Kaneko H., Fowler B.J., Bogdanovich S., Albuquerque R.J., Hauswirth W.W., Chiodo V.A., Kugel J.F., Goodrich J.A., Ponicsan S.L., Chaudhuri G., Murphy M.P., Dunaief J.L., Ambati B.K., Ogura Y., Yoo J.W., Lee D.K., Provost P., Hinton D.R., Nunez G., Baffi J.Z., Kleinman M.E., Ambati J. (2012) DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. *Cell.* 149, 847–859.
- 99. Danzeiser D.A., Urso O., Kunkel G.R. (1993) Functional characterization of elements in a human U6 small nuclear RNA gene distal control region. *Mol. Cell Biol.* **13**, 4670–4678.
- 100. Dieci G., Fiorino G., Castelnuovo M., Teichmann M., Pagano A. (2007) The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends Genet.* 23, 614-622.
- Murphy S., Yoon J.B., Gerster T., Roeder R.G. (1992) Oct-1 and Oct-2 potentiate functional interactions of a transcription factor with the proximal sequence element of small nuclear RNA genes. *Mol. Cell Biol.* 12, 3247–3261.
- 102. Ramsay E.P., Vannini A. (2018) Structural rearrangements of the RNA polymerase III machinery during tRNA transcription initiation. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **1861**, 285–294.
- 103. Mittal V., Ma B., Hernandez N. (1999) SNAP(c): a core promoter factor with a built-in DNA-binding damper that is deactivated by the Oct-1 POU domain. *Genes Dev.* **13**, 1807–1821.
- 104. Mittal V., Hernandez N. (1997) Role for the amino-terminal region of human TBP in U6 snRNA transcription. *Science*. **275**, 1136–1140.
- 105. Ma B., Hernandez N. (2001) A map of protein-protein contacts within the small nuclear RNA-activating protein complex SNAPc. *J. Biol. Chem.* **276**, 5027–5035.
- 106. Mittal V., Cleary M.A., Herr W., Hernandez N. (1996) The Oct-1 POU-specific domain can stimulate small nuclear RNA gene transcription by stabilizing the basal transcription complex SNAPc. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1955–1965.
- 107. Zhao X., Pendergrast P.S., Hernandez N. (2001) A positioned nucleosome on the human U6 promoter allows recruitment of SNAPc by the Oct-1 POU domain. *Mol. Cell.* 7, 539–549.

- Kowalski M.P., Krude T. (2015) Functional roles of non-coding Y RNAs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 66, 20–29.
- 109. Christov C.P., Trivier E., Krude T. (2008) Noncoding human Y RNAs are overexpressed in tumours and required for cell proliferation. *Br. J. Cancer.* **98**, 981–988.
- Tolkach Y., Niehoff E.M., Stahl A.F., Zhao C., Kristiansen G., Muller S.C., Ellinger J. (2018) YRNA expression in prostate cancer patients: diagnostic and prognostic implications. *World J. Urol.* 36, 1073-1078.
- 111. Appaiah H.N., Goswami C.P., Mina L.A., Badve S., Sledge G.W. Jr., Liu Y., Nakshatri H. (2011) Persistent upregulation of U6:SNORD44 small RNA ratio in the serum of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* **13**, R86.
- 112. Gouge J., Satia K., Guthertz N., Widya M., Thompson A.J., Cousin P., Dergai O., Hernandez N., Vannini A. (2015) Redox signaling by the RNA polymerase III TFIIB-related factor Brf2. *Cell.* **163**, 1375–1387.
- 113. Massone S., Vassallo I., Fiorino G., Castelnuovo M., Barbieri F., Borghi R., Tabaton M., Robello M., Gatta E., Russo C., Florio T., Dieci G., Cancedda R., Pagano A. (2011) 17A, a novel non-coding RNA, regulates GABA B alternative splicing and signaling in response to inflammatory stimuli and in Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* **41**, 308–317.
- 114. Massone S., Ciarlo E., Vella S., Nizzari M., Florio T., Russo C., Cancedda R., Pagano A. (2012) NDM29, a RNA polymerase III-dependent non coding RNA, promotes amyloidogenic processing of APP and amyloid beta secretion. *Biochim. Biophys. Acta.* 1823, 1170–1177.

- 115. Ciarlo E., Massone S., Penna I., Nizzari M., Gigoni A., Dieci G., Russo C., Florio T., Cancedda R., Pagano A. (2013) An intronic ncRNA-dependent regulation of SORL1 expression affecting Abeta formation is upregulated in post-mortem Alzheimer's disease brain samples. *Dis. Model. Mech.* 6, 424–433.
- 116. Penna I., Vassallo I., Nizzari M., Russo D., Costa D., Menichini P., Poggi A., Russo C., Dieci G., Florio T., Cancedda R., Pagano A. (2013) A novel snRNA-like transcript affects amyloidogenesis and cell cycle progression through perturbation of Fe65L1 (APBB2) alternative splicing. *Biochim. Biophys. Acta.* 1833, 1511–1526.
- 117. Lopez-Flores I., Garrido-Ramos M.A. (2012) The repetitive DNA content of eukaryotic genomes. *Genome Dyn.* 7, 1–28.
- 118. Bonhoure N., Byrnes A., Moir R.D., Hodroj W., Preitner F., Praz V., Marcelin G., Chua S.C. Jr., Martinez-Lopez N., Singh R., Moullan N., Auwerx J., Willemin G., Shah H., Hartil K., Vaitheesvaran B., Kurland I., Hernandez N., Willis I.M. (2015) Loss of the RNA polymerase III repressor MAF1 confers obesity resistance. *Genes Dev.* 29, 934–947.
- Chiu Y.H., Macmillan J.B., Chen Z.J. (2009) RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell.* 138, 576-591.
- 120. Carter-Timofte M.E., Hansen A.F., Christiansen M., Paludan S.R., Mogensen T.H. (2019) Mutations in RNA polymerase III genes and defective DNA sensing in adults with varicella-zoster virus CNS infection. *Genes Immun.* 20, 214–223.

# REGULATION OF TRANSCRIPTION BY RNA POLYMERASE III PROMOTORS IN NORM AND PATHOLOGY

A. M. Schwartz<sup>1,2</sup>, K. A. Tatosyan<sup>1,3</sup>, D. V. Stasenko<sup>1</sup>, D. A. Kramerov<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia <sup>2</sup>Department of Human Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Haifa, Haifa, 3498838, Israel <sup>3</sup>Department of Biochemistry, Rappaport Faculty of Medicine, Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, 31096

Israel

#### \*e-mail: kramerov@eimb.ru

RNA polymerase III synthesizes a wide range of non-coding RNAs shorter than 400 nucleotides in length. These RNAs are involved in protein synthesis (tRNA, 5S rRNA, and 7SL RNA), maturation and splicing of different types of RNA (RPR, MRP RNA, and U6 snRNA), regulation of transcription (7SK RNA), replication (Y RNA), and intracellular transport (vault RNA). BC200 and BC1 RNA genes are transcribed by RNA polymerase III in neurons only where these RNAs regulate protein synthesis. Mutations in the regulatory elements of the genes transcribed by RNA polymerase III as well as in transcription factors of this RNA polymerase are associated with the development of a number of diseases, primarily oncological and neurological. In this regard, the mechanisms of regulation of the expression of the genes containing various RNA polymerase III promoters were actively studied. This review describes the structural and functional classification of polymerase III promoters, as well as the factors involved in the regulation of promoters of different types. A number of examples demonstrate the role of the described factors in the pathogenesis of human diseases.

**Keywords**: RNA polymerase III, genes, promotors, transcription factors, non-coding RNA, mammals, human pathologies —— обзоры —

УДК 616-006.61;577.2;579.61

# ОРАЛЬНЫЙ МИКРОБИОМ В РАЗВИТИИ РАКА ПОЛОСТИ РТА

© 2024 г. Е. С. Колегова<sup>а, \*</sup>, А. А. Щеголева<sup>а</sup>, Л. А. Кононова<sup>b</sup>, Е. В. Денисов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634009 Россия

<sup>b</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050 Россия

\*e-mail: elenakolegova@oncology.tomsk.ru

Поступила в редакцию 30.08.2023 г. После доработки 23.10.2023 г. Принята к публикации 26.10.2023 г.

Рак полости рта является агрессивным и быстропрогрессирующим заболеванием. В полости рта "обитают" более 700 видов микроорганизмов, которые участвуют в регуляции метаболизма, иммунных функций и здоровья человека. Выделяют три типа механизмов, посредством которых бактерии могут участвовать в канцерогенезе. Во-первых, бактерии вызывают хроническое воспаление, при котором стимулируется выработка цитокинов, в том числе интерлейкинов, интерферонов, фактора некроза опухоли. Во-вторых, бактерии могут прямо взаимодействовать с клетками хозяина, секретируя токсины или связывая мембранные рецепторы. Наконец, развитию опухолей могут способствовать продуцируемые бактериями метаболиты. Показана важность численности и видового состава бактерий для перехода предопухолевых заболеваний полости рта в рак. Изучена взаимосвязь изменений состава микробиома с курением — воспалением в норме, а также при развитии рака полости рта.

**Ключевые слова:** микробиом, рак полости рта, воспаление, курение, иммунитет **DOI**: 10.31857/S0026898424020041, **EDN**: NLORXN

## введение

Рак полости рта (РПР) — одно из самых распространенных злокачественных новообразований органов головы и шеи [1]. Число впервые выявленных случаев данной патологии в России за последние 10 лет увеличилось на 17% [2]. Помимо высокой заболеваемости, РПР характеризуется агрессивностью течения; ежегодно в мире от РПР погибает около 180000 человек, в том числе и лица трудоспособного возраста [1, 2].

Микробиота человека — это эволюционно сложившаяся экологическая система разнообразных микроорганизмов, населяющих открытые полости организма [3]. Микроорганизмы являются важным звеном регуляции метаболизма, иммунной функции и здоровья человека [3, 4]. Считается, что бактерии наиболее сильно влияют на клетки кишечника, кожи и слизистой оболочки [4]. Слизистая оболочка обеспечивает защиту хозяина от вторжения патогенов, а также создает среду для полезных бактерий [5]. Нарушение слизистой оболочки, например при заражении вредоносными бактериями, может способствовать возникновению воспалительной и канцерогенной среды [6]. Бактерии играют важную роль в патогенезе заболеваний человека, в том числе и в канцерогенезе [5]. В настоящее время идет активное изучение влияния патогенных микроорганизмов на клеточную пролиферацию, трансформацию, генетическую нестабильность и микроокружение опухоли [7].

На данный момент описано три типа канцерогенного влияния бактерий на клетки хозяина. Бактерии могут способствовать канцерогенезу как путем прямого взаимодействия с клетками хозяина, так и косвенного – за счет синтеза токсинов и метаболитов, а также влияния на иммунную систему и стимуляцию воспаления [3, 5, 8–10] (рис. 1).

# ПРЯМОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ МИКРОБИОМА НА КЛЕТКИ ХОЗЯИНА

При прямом взаимодействии с клеткой хозяина бактерии секретируют токсины, связываются с мембранными рецепторами и индуцируют различные сигнальные каскады [3, 10]. Например, *Fusobacterium nucleatum* связывается с эпителиальными и эндотелиальными клетками хозяина через молекулу адгезии FadA (*F. nucleatum* adhesin A), тем самым обеспечивая индукцию провоспалительных сигнальных путей, опосредованных

Сокращения: РПР – рак полости рта; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход.



**Рис.** 1. Механизмы воздействия микробиома на клетки хозяина. АФК – активные формы кислорода; BFT – *Bacteroides fragilis* Toxin; CagA – Cytotoxin-associated gene *A*; CDT – Cytolethal Distending Toxin; FadA – *Fusobacterium nucleatum* adhesin A; QSP – Quorum Sensing Peptides; T3SS – Type III Secretion System; T4SS – Type IV Secretion System.

ядерным фактором NF-кВ и IL6, и способствуя инвазии РПР [11, 12]. Кроме того, *F. nucleatum* может индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [13]. Прямое взаимодействие между *F. nucleatum* и Е-кадгерином приводит к повреждению ДНК, пролиферации эпителиальных клеток, приобретению ими стволовости и потере клеточной полярности за счет повышенной экспрессии Е-кадгерина/ β-катенин-индуцированных факторов транскрипции [14, 15]. Еще одна бактерия – *Helicobacter pylori* – вводит в эндотелиальную клетку цитотоксин CagA (Cytotoxin-associated gene A) с помощью системы секреции типа IV (T4SS, Type IV Secretion System) [16]. СаgA связывается с Е-кадгерином и вызывает накопление  $\beta$ -катенина, что, в свою очередь, приводит к трансдифференцировке эпителиальных клеток желудка и развитию предопухолевой кишечной метаплазии [17]. Бактерия *Bacteroides fragilis* секретирует металлопротеиназу BFT (Bacteroides Fragilis Toxin) и вызывает хроническое воспаление и повреждение тканей кишечника, изменяя плотные контакты клеток кишечника за счет расщепления Е-кадгерина и активации сигнальных путей Wnt/β-катенин/NF-кВ [18-20]. Salmonella enteriса с помощью системы секреции типа III (T3SS, Type III Secretion System) переносит в эпителиальные клетки эффекторный белок AvrA, который способствует активации сигнальных путей МАРК. Wnt/β-катенин и JAK/STAT. ЭМП. пролиферации, трансдифференцировке клеток, остановке клеточного цикла и ингибированию апоптоза [21, 22]. Bacillus sp., Enterococcus faecium и Escherichia coli продуцируют пептиды системы Quorum sensing (QSP), которые влияют на клетки эпителия хозяина через факторы роста, способствуют образованию опухолей и метастазированию опухолевых клеток [23]. Так, QSP, синтезированные *Bacillus*, способны индуцировать инвазию, ЭМП и ангиогенез [23, 24].

# КОСВЕННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ МИКРОБИОМА НА КЛЕТКИ ХОЗЯИНА

Бактерии могут инициировать канцерогенез, метаболизируя различные биоактивные молекулы, выделяемые клетками хозяина [3]. Так, бактериальные липополисахариды и ацетат стимулируют ЭМП и ангиогенез, способствуя развитию опухолей [25]. Микроорганизмы метаболизируют такие секретируемые хозяином соединения, как вторичные желчные кислоты (дезоксихолевая и литохолевая кислоты), и способствуют возникновению колоректального рака и гепатоцеллюлярной карциномы [25]. Галловая кислота микробного происхождения индуцирует мутации в гене *ТР53* и, как следствие, возникновение злокачественных опухолей в дистальном отделе кишечника [26].

Еще одним механизмом косвенного воздействия микробиома на клетки хозяина является бактериальная система доставки, состоящая из везикул внешней мембраны преимущественно грамотрицательных бактерий. Эта система позволяет бактериям переносить генетический материал, иммуномодулирующие молекулы, факторы вирулентности и токсины в кровоток хозяина [3, 27–29].

#### Влияние на геном клеток хозяина

Многие бактерии в процессе эволюции приобрели способность повреждать ДНК, индуцируя тем самым генетические изменения и способствуя канцерогенезу [30, 31]. *E. coli, B. fragilis, H. pylori, Enterococcus faecalis* и протеобактерии вызывают двухцепочечные разрывы ДНК, анеуплоидию, остановку клеточного цикла и неправильное клеточное деление [32]. Колибактин и цитолетальный токсин CDT (Cytolethal Distending Toxin) механически повреждают ДНК, тогда как BFT действует косвенно, повышая уровень активных форм кислорода [32, 33]. Разрывы цепей ДНК и нестабильность генома позволяют бактериальной ДНК интегрироваться в геном хозяйской клетки. Бактериальные гены инициируют трансформацию здоровых клеток в опухолевые, стимулируя активность онкогенов и ингибируя гены-супрессоры опухолевого роста [34].

Бактерии могут вносить эпигенетические изменения в геном хозяина. Так, воздействие комменсальной микробиоты приводит к возникновению локальных изменений в метилировании регуляторных элементов ДНК в клетках эпителия кишечника [35]. МикроРНК бактерий проникают в клетки человека и регулируют в них экспрессию генов. Бактерия *F. nucleatum* способствует повышению пролиферации и инвазивности клеток колоректального рака и канцерогенезу через сигнальный путь TLR4/MYD88, что приводит к активации NF-кB и увеличению экспрессии miR21 в клетках слизистой кишечника [36].

Способность микробов как прямо, так и косвенно вызывать повреждение ДНК и нестабильность генома делает микробиом и потенциальным фактором риска онкологических заболеваний, и мишенью для противоопухолевой терапии [37–39].

#### Взаимодействие с иммунной системой

Иммунно-бактериальные взаимодействия происходят на поверхностях слизистых оболочек, в лимфоидных органах и микроокружении опухолей [3]. Многочисленные бактерии индуцируют развитие проопухолевого иммунного ответа [40–42]. Так, *H. pylori* вызывает хроническое воспаление, способствуя секреции IL6, IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  и токсина VacA (Vacuolating cytotoxin A) [43, 44]. Мембранные везикулы, продуцируемые *F. nucleatum*, вызывают хроническое воспаление, стимулируя секрецию IL6, IL8, IL18 и TNF $\alpha$  клетками эпителия толстой кишки [15, 45].

Внутриопухолевые бактерии могут прямо ингибировать противоопухолевый иммунитет, подавляя инфильтрацию цитотоксических иммунных клеток и блокируя их способность убивать опухолевые клетки [40, 46, 47]. Уменьшение количества Т-клеток в опухолевом микроокружении приводит к ослаблению иммунной системы и неспособности нацеливаться на опухоль [3]. Кроме того, комменсальные бактерии рекрутируют большое количество воспалительных клеток, включая ассоциированные с опухолью макрофаги, регуляторные Т-клетки, гранулоциты и супрессорные клетки миелоидного происхождения, что приводит к формированию провоспалительного микроокружения опухоли [41, 48-50].

Колонизация желудка бактерией *H. pylori* вызывает воспалительную реакцию и рекрутирует дендритные клетки, макрофаги, нейтрофилы и лимфоциты на слизистую стенку желудка [44]. Erythrobacter ramosus и B. fragilis, расположенные в подвздошной кишке, способствуют индукции фолликулярных Т-хелперных клеток посредством активации дендритных клеток и высвобождения IL1 и IL12 [51]. Бактерии, попадая на слизистые оболочки, влияют на активность клеток Th17 [52-54], играющих важную роль в противоопухолевом иммунном ответе [55]. Бактерия Porphyromonas gingivalis экспрессирует такие хемокины, как CCL2 и CXCL2, которые рекрутируют миелоидные супрессорные клетки и содействуют прогрессии опухоли [56, 57]. Кроме того, P. gingivalis и F. nucleatum активируют связывание PD-L1 с PD-1, что приводит к ингибированию и апоптозу Т-клеток [56, 58]. F. nucleatum, взаимодействуя с рецептором ТІGІТ иммунных клеток, подавляет активность NK- и T-клеток, создавая провоспалительное микроокружение, которое поддерживает прогрессирование колоректального рака [59]. Кроме того, эта бактерия способствует увеличению популяции CD11b+ миелоидных клеток, опухолеассоциированных нейтрофилов и макрофагов в опухолях различных локализаций [57].

Таким образом, бактерии осуществляют секрецию факторов вирулентности, передачу сигналов, индуцированную физическим связыванием, и рекрутирование иммунных клеток, что в совокупности может способствовать канцерогенезу. Понимание данных механизмов имеет решающее значение для разработки новых методов диагностики и лечения рака [3, 10].

## РОЛЬ МИКРОБИОМА В ВОЗНИКНОВЕНИИ И РАЗВИТИИ РАКА ПОЛОСТИ РТА

В ряде работ описана роль микробиома в развитии заболеваний полости рта, в том числе и РПР [60–62]. К точно установленным факторам риска РПР относятся курение, алкоголь и хроническое воспаление. Эти факторы влияют также на микробиом полости рта, что, в свою очередь, может способствовать возникновению РПР, его прогрессии или, наоборот, регрессии.

#### Микробиом ротовой полости в норме

Расширенная база данных микробиома ротовой полости человека (Human Oral Microbiоте Database) содержит информацию примерно о 772 видах прокариотических микроорганизмов и уступает только микробиоте желудочно-кишечного тракта. Важно подчеркнуть, что в микробиоме человека можно выделить две части – основную и вариабельную. Основной микробиом состоит из преобладающих видов, которые существуют в "здоровых условиях", а вариабельный микробиом развивается в ответ на образ жизни и характер питания, а также зависит от генотипических особенностей индивидов [63–66].

Профилирование 16S рДНК, выделенной из "здоровой" полости рта, выявило шесть типов бактерий: Bacillota (ранее Firmicutes), Actinomycetota (ранее Actinobacteria), Pseudomonadоta (ранее Proteobacteria), Fusobacteriota (ранее Fusobacteria), Bacteroidota (panee Bacteroidetes) и Spirochaetota (ранее Spirochaetes), составляющих 96% от общего количества микроорганизмов [67]. При этом на долю Bacillota приходится максимум – 36.7%, за ним следуют Bacteroidota (17.1%), Pseudomonadota (17.1%), Actinomycetota (11.6%), Spirochaetota (7.9%) и Fusobacteriota (5.2%) [68]. К основным родам бактерий, населяющих здоровую полость рта, относятся грамположительные Abiotrophia, Actinomyces, Bifidobacterium, Corynebacterium, Eubacterium, Lactobacillus, Peptostreptococcus, Propionibacterium, Pseudoramibacter, Rothia, Streptococcus, Stomatococcus, а также грамотрицательные Campylobacter, Capnocytophaga, Desulfobacter, Desulfovibrio, Eikenella, Fusobacterium, Hemophilus, Leptotrichia, Moraxella, Neisseria, Prevotella, Selemonas, Simonsiella, Treponema, Veillonella, Wolinella [63]. Хотя все эти бактерии являются комменсалами, некоторые из них рассматриваются как патогенные. Переход комменсальной микрофлоры в патогенную чаще зависит от количества этих микроорганизмов в составе биопленок полости рта [69].

Различные факторы, такие как пищевые привычки, употребление табака и алкоголя, стресс, гормональный дисбаланс, половое созревание, плохая гигиена полости рта, сахарный диабет и воспаление десен, нарушают структуру местного бактериального сообщества и могут приводить к развитию рака [64, 65].

#### Изменение микробиома при курении

В микробиоме активных курильщиков наблюдается значительное снижение численности Pseudomonadota и обогащение Bacillota и Actinomycetota по сравнению с никогда не курившими индивидами [70]. При этом изменения микробиома, связанные с курением, имеют временный эффект, бывшие курильщики имеют такой же общий состав микробиома полости рта, как и никогда не курившие индивиды [70]. Известно несколько потенциальных механизмов, при помощи которых курение может изменять профиль микробиома: повышение кислотности слюны [71, 72], формирование анаэробных условий [73], влияние на адгезию бактерий к поверхностям слизистых оболочек [74] и нарушение иммунитета хозяина [75].

В настоящее время наблюдается тенденция к использованию электронных сигарет, которые также влияют на микрофлору полости рта: повышается содержание видов *Porphyromonas* и *Veillonella*; значительно изменяется бета-разнообразие, характеризующее сходство/различие видового состава, по сравнению с никогда не курившими или курившими табачные сигареты [76, 77]. Курение электронных сигарет значительно повышает уровень IL-6 и IL-1b в слюне, что делает эпителиальные клетки более восприимчивыми к инфекции [76].

Риск развития РПР, ротоглотки и гортаноглотки у курильщиков в 4–5 раз выше, чем у некурящих. Алкоголь действует синергично с табаком, что приводит к примерно 35-кратному увеличению риска РПР у заядлых курильщиков (>2 пачек в день), употребляющих алкоголь (>4 порций в день) [78].

#### Изменение микробиома при воспалении

Если изменение микробного сообщества при курении носит вторичный характер, то при воспалении, наоборот, изменение микробиома зачастую становится его причиной. К основным инфекциям ротовой полости относятся периодонтит и кариес.

С 1950-х годов микробиоту пародонтального кармана изучали культуральными методами. Исследователи стремились определить виды микроорганизмов, имеющие решающее значение для возникновения и прогрессирования заболевания. Исторически определены микроорганизмы "красного комплекса": *P. gingivalis, Tannerella forsythia* (ранее *Bacteroides forsythus*) и *Treponema denticola* [79]. Эти виды считали наиболее связанными с заболеванием глубоких пародонтальных карманов. Кластер видов с менее строгой ассоциацией с заболеванием пародонта, определенный как "оранжевый комплекс", включает *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp. и *Parvimonas micra* (ранее *Peptostreptococcus micros*) [79].

Особую роль в патогенезе пародонтита отводят *P. gingivalis* – малочисленной анаэробной бактерии полости рта, вызывающей полимикробное воспалительное заболевание и связанные с ним системные состояния [80]. Таким образом, один вид с низкой численностью может

нарушать гомеостаз всего микробиома полости рта, вызывая воспаление. Эта концепция была названа моделью полимикробной синергии и дисбиоза. Согласно этой модели, пародонтит инициируется синергическим и дисбиотическим микробным сообществом, а не избранными патогенами, такими как "красный комплекс". Одним из основных требований к возникновению потенциально патогенного сообшества является способность определенных видов, называемых "краеугольными патогенами", модулировать реакцию хозяина таким образом, чтобы ослабить иммунный надзор и склонить чашу весов от гомеостаза к дисбиозу [81]. С другой стороны, для развития патогенной микрофлоры требуется экспрессия различных молекул, например, соответствующих адгезинов, родственных рецепторов, протеолитических ферментов и провоспалительных поверхностных структур/ лигандов, которые в сочетании действуют как факторы вирулентности сообщества для питательной поддержки провоспалительного микробного сообщества [81].

Все это заставляет задуматься о возможной специфической профилактике пародонтита путем вакцинации либо использования пробиотиков. Показано, что иммунизация человека моноклональными антителами к P. gingivalis временно предотвращает колонизацию данными микроорганизмами [82]. Также установлено, что пародонтит дозозависимым образом увеличивает вероятность образования лейкоплакии в полости рта [83]. Лейкоплакия является наиболее частым предраковым поражением полости рта, распространенность которого в мире колеблется от 1.1 до 3.6% [84]. У пациентов с пародонтитом, даже никогда не куривших, риск заболеть раком в несколько раз выше, чем у здоровых людей [85].

#### Изменение микробиома при раке полости рта

Признанные факторы риска РПР включают употребление табака, алкоголя, орехов бетеля и пожилой возраст. Однако около 15% всех случаев РПР не связаны ни с одним из известных факторов риска [86]. Это привело к предположениям о других возможных сопутствующих факторах, включая микробиом.

Во многих исследованиях проведено сравнение профиля микробиома в опухолевой ткани пациентов с РПР и в нормальной ткани здоровых доноров. Несмотря на большую неоднородность получаемых результатов, удалось выделить ряд микроорганизмов, содержание которых повышается при РПР: *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Capnocytophaga gingivalis*, *T. denticola* [87–89]. Опубликованы единичные исследования, показывающие, что у здоровых лиц по сравнению с больными РПР могут преобладать *S. gordonii* [90], *S. mitis* [91], *Veillonela* [62], *Neisseria* [92], *Lautropia* [62], *Hemophilus parainfluenz ae* [91]. При изучении микробиома у пациентов с лейкоплакией полости рта (факультативный предрак) также был обнаружен специфический микробиомный профиль, в частности, обогащение Bacillota и Actinomycetota [93].

Опубликованы результаты проведенных на мышиной модели экспериментальных исследований, подтверждающих роль, по крайней мере, бактерий *P. gingivalis* и *F. nucleatum* в развитии РПР [94, 95]. Эти исследования имеют схожий дизайн: мышей рандомным образом разделяли на две группы: группу, получающую только канцероген 4NQO (4-нитрохинолин-1-оксид), и группу, в которой помимо канцерогена мышей инфицировали *P. gingivalis* или *P. gingivalis* + *F. nucleatum*. В обоих исследованиях доказано, что эти микроорганизмы способствуют канцерогенезу: у мышей из группы, подвергшейся инфицированию, развилось большее количество опухолей большего объема.

Одной из ключевых характеристик таких экосистем, как микробиом полости рта, является ее биоразнообразие, для оценки которого используют индексы альфа- и бета-разнообразия. Альфа-разнообразие – показатель сложности сообществ, характеризующий видовое богатство и выравненность количественного участия видов в сообществе. Бета-разнообразие характеризует сходство/различие между различными группами. В ряде исследований показано, что на прилежащих к опухоли здоровых участках наблюдается более высокое альфа-разнообразие, чем в опухолевой ткани [96]. Одновременно с этим опубликованы данные, указывающие на более высокое альфа- и бета-разнообразие у больных РПР по сравнению со здоровыми донорами [97, 98].

Микробиомный профиль различается не только у больных с РПР и здоровых, он также динамично изменяется в процессе опухолевой прогрессии. В частности, на уровне рода численность *Fusobacterium* увеличивается, тогда как количество бактерий рода *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Porphyromonas* и *Actinomyces* уменьшается по мере прогрессирования рака [96, 97]. Численность видов *F. periodonticum*, *P. micra*, *S. constellatus*, *H. influenz a* и *Filifactor alocis* постепенно увеличивается по мере прогрессии РПР от первой стадии к четвертой [97]. При этом количество *S. mitis*, *Haemophilus parainfluenz ae* и *Porphyromonas pasteri* снижается при увеличении размера и распространенности РПР [97]. Выявлено значимое увеличение содержания Prevotella, Stomatobaculum, Bifidobacterium, Peptostreptococcaceae, Shuttleworthia и Finegoldia и снижение Tannerella и Fusobacterium у пациентов с регионарными метастазами по сравнению со случаями без метастазов [99].

В настоящий момент существует проблема омоложения РПР. С 1990-х годов постоянно растет заболеваемость РПР у людей моложе 45-50 лет [1, 2, 100]. Было выдвинуто предположение, что у молодых пациентов существует особый бактериальный профиль, который способствует опухолевой прогрессии. Проведен сравнительный анализ микробиома 40 пациентов с РПР, половина из которых моложе 50 лет, другая – старше 60 лет: основными таксонами у молодых пациентов были Betaproteobacteria, Burkholderiales, Ralstonia, Burkholderiaceae и Rhi*zobiales*, в то время как у больных старше 60 лет преобладали Enterobacteriaceae, Enterobacterales, Sphingobacteriia, Sphingobacteriales u Pedobacter [101].

#### выводы

Нарушение равновесия микробиоты полости рта может быть ключевым звеном, через которое комменсальные бактерии способствуют развитию РПР. Результаты проведенных исследований указывают на то, что микробиом изменяется на ранней стадии злокачественной трансформации и значительным образом трансформируется в ходе опухолевой прогрессии (рис. 2). Данные о микробиоме могут быть использованы для разработки новых методов диагностики, прогноза и профилактики РПР, например, путем использования вакцин, противомикробных препаратов или пробиотиков. Перспективным направлением может стать бактериально опосредованная терапия РПР, которая вызывает меньше побочных эффектов по сравнению с конвенциональными методами терапии опухолей. Тем не менее, учитывая вариабельность микробиома полости рта даже при нормальных условиях, следует внимательно отнестись к тому, что результаты подходов к диагностике и прогнозу должны быть воспроизводимыми и повторяемыми.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта Президента РФ № МК-1940.2022.3.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## КОЛЕГОВА и др.



Рис. 2. Изменение состава оральной микробиоты при развитии рака полости рта.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. (2022) Cancer statistics, 2022. *CA: Cancer J. Clin.* 72, 7–33.
- Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году. (2022) Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Шахзадовой А.О. М.: МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.
- 3. Cullin N., Azevedo Antunes C., Straussman R., Stein-Thoeringer C.K., Elinav E. (2021) Microbiome and cancer. *Cancer Cell.* **39**, 1317–1341.
- 4. Yangyanqiu W., Shuwen H. (2022) Bacterial DNA involvement in carcinogenesis. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **12**, 996778.
- Nokhandani N., Poursheikhani A., Alhosseini M.N., Davoodi H. (2021) Bacteria in carcinogenesis and cancer prevention: a review study. *Int. J. Cancer Manag.* 14. doi: 10.5812/ijcm.107956

- 6. Whisner C.M., Athena Aktipis C. (2019) The role of the microbiome in cancer initiation and progression: how microbes and cancer cells utilize excess energy and promote one another's growth. *Curr. Nutr. Rep.* **8**, 42–51.
- Gaines S., Williamson A.J., Hyman N., Kandel J. (2018) How the microbiome is shaping our understanding of cancer biology and its treatment. *Semin. Colon Rectal Surgery*. 29, 12–16.
- 8. Chang A.H., Parsonnet J. (2010) Role of bacteria in oncogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 837–857.
- 9. Contreras A.V., Cocom-Chan B., Hernandez-Montes G., Portillo-Bobadilla T., Resendis-Antonio O. (2016) Host-microbiome interaction and cancer: potential application in precision medicine. *Front. Physiol.* 7, 606.
- 10. Liu J., Zhang Y. (2022) Intratumor microbiome in cancer progression: current developments, challenges and future trends. *Biomark. Res.* **10**, 37.

- Han Y.W., Shi W., Huang G.T., Kinder Haake S., Park N.H., Kuramitsu H., Genco R.J. (2000) Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect. Immun.* 68, 3140-3146.
- 12. Han Y.W., Redline R.W., Li M., Yin L., Hill G.B., McCormick T.S. (2004) *Fusobacterium nucleatum* induces premature and term stillbirths in pregnant mice: implication of oral bacteria in preterm birth. *Infect. Immun.* **72**, 2272–2279.
- Zhang S., Li C., Liu J., Geng F., Shi X., Li Q., Lu Z., Pan Y. (2020) *Fusobacterium nucleatum* promotes epithelial-mesenchymal transiton through regulation of the lncRNA mir4435-2hg/mir-296-5p/Akt2/ Snail signaling pathway. *FEBS J.* 287, 4032–4047.
- Guo P., Tian Z., Kong X., Yang L., Shan X., Dong B., Ding X., Jing X., Jiang C., Jiang N. (2020) FadA promotes DNA damage and progression of *Fusobacterium nucleatum*-induced colorectal cancer through up-regulation of Chk2. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 39, 1–13.
- Rubinstein M.R., Wang X., Liu W., Hao Y., Cai G., Han Y.W. (2013) *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/β-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe.* 14, 195–206.
- Odenbreit S., Püls J., Sedlmaier B., Gerland E., Fischer W., Haas R. (2000) Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*. 287, 1497–1500.
- 17. Murata-Kamiya N., Kurashima Y., Teishikata Y., Yamahashi Y., Saito Y., Higashi H., Aburatani H., Akiyama T., Peek R., Azuma T. (2007) *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the  $\beta$ -catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene.* **26**, 4617–4626.
- Parida S., Wu S., Siddharth S., Wang G., Muniraj N., Nagalingam A., Hum C., Mistriotis P., Hao H., Talbot C.C. Jr., Konstantopoulos K., Gabrielson K.L., Sears C.L., Sharma D. (2021) A procarcinogenic colon microbe promotes breast tumorigenesis and metastatic progression and concomitantly activates Notch and β-catenin axes. *Cancer Discov.* 11, 1138–1157.
- 19. Cheng W.T., Kantilal H.K., Davamani F. (2020) The mechanism of *Bacteroides fragilis* toxin contributes to colon cancer formation. *Malays. J. Med. Sci.* 27, 9.
- Wu S., Morin P.J., Maouyo D., Sears C.L. (2003) Bacteroides fragilis enterotoxin induces c-myc expression and cellular proliferation. Gastroenterology. 124, 392–400.
- Lu R., Bosland M., Xia Y., Zhang Y.-G., Kato I., Sun J. (2017) Presence of *Salmonella avra* in colorectal tumor and its precursor lesions in mouse intestine and human specimens. *Oncotarget.* 8, 55104.
- 22. Wu S., Ye Z., Liu X., Zhao Y., Xia Y., Steiner A., Petrof E.O., Claud E.C., Sun J. (2010) Salmonel-

*la typhimurium* infection increases p53 acetylation in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **298**, G784–G794.

- 23. Wynendaele E., Verbeke F., D'Hondt M., Hendrix A., Van De Wiele C., Burvenich C., Peremans K., De Wever O., Bracke M., De Spiegeleer B. (2015) Crosstalk between the microbiome and cancer cells by *quorum sensing* peptides. *Peptides*. **64**, 40-48.
- 24. De Spiegeleer B., Verbeke F., D'Hondt M., Hendrix A., Van De Wiele C., Burvenich C., Peremans K., De Wever O., Bracke M., Wynendaele E. (2015) The *quorum sensing* peptides PhrG, CSP and EDF promote angiogenesis and invasion of breast cancer cells *in vitro*. *PLoS One*. **10**, e0119471.
- 25. Rossi T., Vergara D., Fanini F., Maffia M., Bravaccini S., Pirini F. (2020) Microbiota-derived metabolites in tumor progression and metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 5786.
- Kadosh E., Snir-Alkalay I., Venkatachalam A., May S., Lasry A., Elyada E., Zinger A., Shaham M., Vaalani G., Mernberger M. (2020) The gut microbiome switches mutant p53 from tumour-suppressive to oncogenic. *Nature*. 586, 133–138.
- Cañas M.-A., Giménez R., Fábrega M.-J., Toloza L., Baldomà L., Badia J. (2016) Outer membrane vesicles from the probiotic *Escherichia coli* nissle 1917 and the commensal ECOR12 enter intestinal epithelial cells via clathrin-dependent endocytosis and elicit differential effects on DNA damage. *PLoS One.* 11, e0160374.
- 28. Chmiela M., Walczak N., Rudnicka K. (2018) *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles involvement in the infection development and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J. Biomed. Sci.* **25**, 1–11.
- 29. Zakharzhevskaya N.B., Tsvetkov V.B., Vanyushkina A.A., Varizhuk A.M., Rakitina D.V., Podgorsky V.V., Vishnyakov I.E., Kharlampieva D.D., Manuvera V.A., Lisitsyn F.V. (2017) Interaction of *Bacteroides fragilis* toxin with outer membrane vesicles reveals new mechanism of its secretion and delivery. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 2.
- 30. Imai S., Ooki T., Murata-Kamiya N., Komura D., Tahmina K., Wu W., Takahashi-Kanemitsu A., Knight C.T., Kunita A., Suzuki N., Del Valle A.A., Tsuboi M., Hata M., Hayakawa Y., Ohnishi N., Ueda K., Fukayama M., Ushiku T., Ishikawa S., Hatakeyama M. (2021) *Helicobacter pylori* CagA elicits BRCAness to induce genome instability that may underlie bacterial gastric carcinogenesis. *Cell Host Microbe.* 29, 941–958. e910.
- Pleguezuelos-Manzano C., Puschhof J., Rosendahl Huber A., van Hoeck A., Wood H.M., Nomburg J., Gurjao C., Manders F., Dalmasso G., Stege P.B., Paganelli F.L., Geurts M.H., Beumer J., Mizutani T., Miao Y., van der Linden R., van der Elst S., Garcia K.C., Top J., Willems R.J.L., Giannakis M., Bonnet R., Quirke P., Meyerson M., Cuppen E., van Boxtel R., Clevers H. (2020) Mutational signature in colorectal cancer caused by genotoxic *pks*<sup>+</sup> *E. coli. Nature.* 580, 269–273.

- Arthur J.C., Gharaibeh R.Z., Mühlbauer M., Perez-Chanona E., Uronis J.M., McCafferty J., Fodor A.A., Jobin C. (2014) Microbial genomic analysis reveals the essential role of inflammation in bacteria-induced colorectal cancer. *Nat. Commun.* 5, 4724.
- Kipanyula M.J., Seke Etet P.F., Vecchio L., Farahna M., Nukenine E.N., Nwabo Kamdje A.H. (2013) Signaling pathways bridging microbial-triggered inflammation and cancer. *Cell. Signal.* 25, 403-416.
- Riley D.R., Sieber K.B., Robinson K.M., White J.R., Ganesan A., Nourbakhsh S., Dunning Hotopp J.C. (2013) Bacteria-human somatic cell lateral gene transfer is enriched in cancer samples. *PLoS Comput. Biol.* 9, e1003107.
- Ansari I., Raddatz G., Gutekunst J., Ridnik M., Cohen D., Abu-Remaileh M., Tuganbaev T., Shapiro H., Pikarsky E., Elinav E., Lyko F., Bergman Y. (2020) The microbiota programs DNA methylation to control intestinal homeostasis and inflammation. *Nat. Microbiol.* 5, 610–619.
- 36. Yang Y., Weng W., Peng J., Hong L., Yang L., Toiyama Y., Gao R., Liu M., Yin M., Pan C., Li H., Guo B., Zhu Q., Wei Q., Moyer M.P., Wang P., Cai S., Goel A., Qin H., Ma Y. (2017) *Fusobacterium nucleatum* increases proliferation of colorectal cancer cells and tumor development in mice by activating Toll-like receptor 4 signaling to nuclear factor-κB, and up-regulating expression of microRNA-21. *Gastroenterology*. **152**, 851–866. e824.
- 37. Fulbright L.E., Ellermann M., Arthur J.C. (2017) The microbiome and the hallmarks of cancer. *PLoS Pathog.* **13**, e1006480.
- 38. Bhatt A.P., Redinbo M.R., Bultman S.J. (2017) The role of the microbiome in cancer development and therapy. *CA: Cancer J. Clin.* **67**, 326–344.
- Hsiao Y.-C., Liu C.-W., Yang Y., Feng J., Zhao H., Lu K. (2023) DNA damage and the gut microbiome: from mechanisms to disease outcomes. *DNA*. 3, 13–32.
- 40. Nejman D., Livyatan I., Fuks G., Gavert N., Zwang Y., Geller L.T., Rotter-Maskowitz A., Weiser R., Mallel G., Gigi E., Meltser A., Douglas G.M., Kamer I., Gopalakrishnan V., Dadosh T., Levin-Zaidman S., Avnet S., Atlan T., Cooper Z.A., Arora R., Cogdill A.P., Khan M.A.W., Ologun G., Bussi Y., Weinberger A., Lotan-Pompan M., Golani O., Perry G., Rokah M., Bahar-Shany K., Rozeman E.A., Blank C.U., Ronai A., Shaoul R., Amit A., Dorfman T., Kremer R., Cohen Z.R., Harnof S., Siegal T., Yehuda-Shnaidman E., Gal-Yam E.N., Shapira H., Baldini N., Langille M.G.I., Ben-Nun A., Kaufman B., Nissan A., Golan T., Dadiani M., Levanon K., Bar J., Yust-Katz S., Barshack I., Peeper D.S., Raz D.J., Segal E., Wargo J.A., Sandbank J., Shental N., Straussman R. (2020) The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. Science. 368, 973-980.
- 41. Jin C., Lagoudas G.K., Zhao C., Bullman S., Bhutkar A., Hu B., Ameh S., Sandel D., Liang X.S.,

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

Mazzilli S., Whary M.T., Meyerson M., Germain R., Blainey P.C., Fox J.G., Jacks T. (2019) Commensal microbiota promote lung cancer development via  $\gamma\delta T$  cells. *Cell.* **176**, 998–1013. e1016.

- 42. Forbes N.S. (2010) Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* **10**, 785–794.
- Baik S.C., Youn H.S., Chung M.H., Lee W.K., Cho M.J., Ko G.H., Park C.K., Kasai H., Rhee K.H. (1996) Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. *Cancer Res.* 56, 1279–1282.
- 44. Bagheri N., Salimzadeh L., Shirzad H. (2018) The role of T helper 1-cell response in *Helicobacter pylo-ri*-infection. *Microb. Pathog.* **123**, 1–8.
- 45. Engevik M.A., Danhof H.A., Ruan W., Engevik A.C., Chang-Graham A.L., Engevik K.A., Shi Z., Zhao Y., Brand C.K., Krystofiak E.S., Venable S., Liu X., Hirschi K.D., Hyser J.M., Spinler J.K., Britton R.A., Versalovic J. (2021) *Fusobacterium nucleatum* secretes outer membrane vesicles and promotes intestinal inflammation. *mBio.* 12(2), e02706-20.
- 46. Parhi L., Alon-Maimon T., Sol A., Nejman D., Shhadeh A., Fainsod-Levi T., Yajuk O., Isaacson B., Abed J., Maalouf N., Nissan A., Sandbank J., Yehuda-Shnaidman E., Ponath F., Vogel J., Mandelboim O., Granot Z., Straussman R., Bachrach G. (2020) Breast cancer colonization by *Fusobacterium nucleatum* accelerates tumor growth and metastatic progression. *Nat. Commun.* 11, 3259.
- Abreu M.T., Peek R.M. Jr. (2014) Gastrointestinal malignancy and the microbiome. *Gastroenterology*. 146, 1534–1546. e1533.
- Pushalkar S., Hundeyin M., Daley D., Zambirinis C.P., Kurz E., Mishra A., Mohan N., Aykut B., Usyk M., Torres L.E., Werba G., Zhang K., Guo Y., Li Q., Akkad N., Lall S., Wadowski B., Gutierrez J., Kochen Rossi J.A., Herzog J.W., Diskin B., Torres-Hernandez A., Leinwand J., Wang W., Taunk P.S., Savadkar S., Janal M., Saxena A., Li X., Cohen D., Sartor R.B., Saxena D., Miller G. (2018) The pancreatic cancer microbiome promotes oncogenesis by induction of innate and adaptive immune suppression. *Cancer Discov.* 8, 403–416.
- 49. Kostic A.D., Chun E., Robertson L., Glickman J.N., Gallini C.A., Michaud M., Clancy T.E., Chung D.C., Lochhead P., Hold G.L., El-Omar E.M., Brenner D., Fuchs C.S., Meyerson M., Garrett W.S. (2013) *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe.* 14, 207-215.
- Campbell C., McKenney P.T., Konstantinovsky D., Isaeva O.I., Schizas M., Verter J., Mai C., Jin W.B., Guo C.J., Violante S., Ramos R.J., Cross J.R., Kadaveru K., Hambor J., Rudensky A.Y. (2020) Bacterial metabolism of bile acids promotes generation of peripheral regulatory T cells. *Nature*. 581, 475-479.
- 51. Roberti M.P., Yonekura S., Duong C.P.M., Picard M., Ferrere G., Tidjani Alou M., Rauber C., Iebba

V., Lehmann C.H.K., Amon L., Dudziak D., Derosa L., Routy B., Flament C., Richard C., Daillère R., Fluckiger A., Van Seuningen I., Chamaillard M., Vincent A., Kourula S., Opolon P., Ly P., Pizzato E., Becharef S., Paillet J., Klein C., Marliot F., Pietrantonio F., Benoist S., Scoazec J.-Y., Dartigues P., Hollebecque A., Malka D., Pagès F., Galon J., Gomperts Boneca I., Lepage P., Ryffel B., Raoult D., Eggermont A., Vanden Berghe T., Ghiringhelli F., Vandenabeele P., Kroemer G., Zitvogel L. (2020) Chemotherapy-induced ileal crypt apoptosis and the ileal microbiome shape immunosurveillance and prognosis of proximal colon cancer. *Nat. Med.* **26**, 919–931.

- 52. Dutzan N., Kajikawa T., Abusleme L., Greenwell-Wild T., Zuazo C.E., Ikeuchi T., Brenchley L., Abe T., Hurabielle C., Martin D., Morell R.J., Freeman A.F., Lazarevic V., Trinchieri G., Diaz P.I., Holland S.M., Belkaid Y., Hajishengallis G., Moutsopoulos N.M. (2018) A dysbiotic microbiome triggers Th17 cells to mediate oral mucosal immunopathology in mice and humans. *Sci. Transl. Med.* 10(463), eaat0797.
- 53. Pandiyan P., Bhaskaran N., Zou M., Schneider E., Jayaraman S., Huehn J. (2019) Microbiome dependent regulation of Tregs and Th17 cells in mucosa. *Front. Immunol.* **10**, 426.
- Zhang C., Xu C., Gao L., Li X., Zhao C. (2021) *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide pro- motes T-hel per17 cell differentiation by upregulat- ing Delta-like ligand 4 expression on CD14<sup>+</sup> mono-cytes. *Peer J.* 9, e11094.
- 55. Marques H.S., de Brito B.B., da Silva F.A.F., Santos M.L.C., de Souza J.C.B., Correia T.M.L., Lopes L.W., Neres N.S.M., Dórea R., Dantas A.C.S., Morbeck L.L.B., Lima I.S., de Almeida A.A., Dias M.R.J., de Melo F.F. (2021) Relationship between Th17 immune response and cancer. *W. J. Clin. Oncol.* **12**, 845–867.
- Guo Z.C., Jumatai S., Jing S.L., Hu L.L., Jia X.Y., Gong Z.C. (2021) Bioinformatics and immunohistochemistry analyses of expression levels and clinical significance of *CXCL2* and *TANs* in an oral squamous cell carcinoma tumor microenvironment of *Prophyromonas gingivalis* infection. *Oncol. Lett.* 21, 189.
- 57. Gholizadeh P., Eslami H., Kafil H.S. (2017) Carcinogenesis mechanisms of *Fusobacterium nucleatum. Biomed. Pharmacother.* **89**, 918–925.
- Gao Y., Bi D., Xie R., Li M., Guo J., Liu H., Guo X., Fang J., Ding T., Zhu H., Cao Y., Xing M., Zheng J., Xu Q., Xu Q., Wei Q., Qin H. (2021) *Fusobacterium nucleatum* enhances the efficacy of PD-L1 blockade in colorectal cancer. *Signal. Transduct. Target Ther.* 6, 398.
- 59. Gur C., Ibrahim Y., Isaacson B., Yamin R., Abed J., Gamliel M., Enk J., Bar-On Y., Stanietsky-Kaynan N., Coppenhagen-Glazer S., Shussman N., Almogy G., Cuapio A., Hofer E., Mevorach D., Tabib A., Ortenberg R., Markel G., Miklić K., Jonjic S., Brennan C.A., Garrett W.S., Bachrach G., Mandel-

boim O. (2015) Binding of the Fap2 protein of *Fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor tigit protects tumors from immune cell attack. *Immunity.* **42**, 344–355.

- 60. Gholizadeh P., Eslami H., Yousefi M., Asgharzadeh M., Aghazadeh M., Kafil H.S. (2016) Role of oral microbiome on oral cancers, a review. *Biomed. Pharmacother.* **84**, 552–558.
- 61. Rajagopala S.V., Vashee S., Oldfield L.M., Suzuki Y., Venter J.C., Telenti A., Nelson K.E. (2017) The human microbiome and cancer. *Cancer Prev. Res.* (Phila). **10**, 226–234.
- 62. Zhao H., Chu M., Huang Z., Yang X., Ran S., Hu B., Zhang C., Liang J. (2017) Variations in oral microbiota associated with oral cancer. *Sci. Rep.* **7**, 11773.
- 63. Deo P.N., Deshmukh R. (2019) Oral microbiome: unveiling the fundamentals. J. Oral. Maxillofac. Pathol. 23, 122–128.
- 64. Kilian M., Chapple I.L., Hannig M., Marsh P.D., Meuric V., Pedersen A.M., Tonetti M.S., Wade W.G., Zaura E. (2016) The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *Br. Dent. J.* 221, 657–666.
- 65. Takeshita T., Kageyama S., Furuta M., Tsuboi H., Takeuchi K., Shibata Y., Shimazaki Y., Akifusa S., Ninomiya T., Kiyohara Y., Yamashita Y. (2016) Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study. *Sci. Rep.* 6, 22164.
- 66. Zaura E., Nicu E.A., Krom B.P., Keijser B.J. (2014) Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 85.
- 67. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M., Knight R., Gordon J.I. (2007) The human microbiome project. *Nature*. **449**, 804–810.
- Dewhirst F.E., Chen T., Izard J., Paster B.J., Tanner A.C., Yu W.H., Lakshmanan A., Wade W.G. (2010) The human oral microbiome. *J. Bacteriol.* 192, 5002–5017.
- 69. Morrison A.G., Sarkar S., Umar S., Lee S.T.M., Thomas S.M. (2023) The contribution of the human oral microbiome to oral disease: a review. *Microorganisms*. **11**(2), 318.
- Wu J., Peters B.A., Dominianni C., Zhang Y., Pei Z., Yang L., Ma Y., Purdue M.P., Jacobs E.J., Gapstur S.M., Li H., Alekseyenko A.V., Hayes R.B., Ahn J. (2016) Cigarette smoking and the oral microbiome in a large study of american adults. *ISME* J. 10, 2435–2446.
- Grover N., Sharma J., Sengupta S., Singh S., Singh N., Kaur H. (2016) Long-term effect of tobacco on unstimulated salivary pH. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 20, 16–19.
- 72. Kanwar A., Sah K., Grover N., Chandra S., Singh R.R. (2013) Long-term effect of tobacco on resting whole mouth salivary flow rate and ph: an institutional based comparative study. *Eur. J. Gen. Dent.* **2**, 296–299.

- 73. Kenney E.B., Saxe S.R., Bowles R.D. (1975) The effect of cigarette smoking on anaerobiosis in the oral cavity. *J. Periodontol.* **46**, 82–85.
- 74. Brook I. (2011) The impact of smoking on oral and nasopharyngeal bacterial flora. *J. Dent. Res.* **90**, 704–710.
- 75. Sopori M. (2002) Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 372–377.
- 76. Pushalkar S., Paul B., Li Q., Yang J., Vasconcelos R., Makwana S., González J.M., Shah S., Xie C., Janal M.N., Queiroz E., Bederoff M., Leinwand J., Solarewicz J., Xu F., Aboseria E., Guo Y., Aguallo D., Gomez C., Kamer A., Shelley D., Aphinyanaphongs Y., Barber C., Gordon T., Corby P., Li X., Saxena D. (2020) Electronic cigarette aerosol modulates the oral microbiome and increases risk of infection. *iScience.* 23, 100884.
- Yang I., Rodriguez J., Young Wright C., Hu Y.J. (2023) Oral microbiome of electronic cigarette users: a cross-sectional exploration. *Oral Dis.* 29, 1875–1884.
- Dal Maso L., Torelli N., Biancotto E., Di Maso M., Gini A., Franchin G., Levi F., La Vecchia C., Serraino D., Polesel J. (2016) Combined effect of tobacco smoking and alcohol drinking in the risk of head and neck cancers: a re-analysis of case-control studies using bi-dimensional spline models. *Eur. J. Epidemiol.* **31**, 385–393.
- Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C., Kent R.L. Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 25, 134–144.
- Hajishengallis G., Liang S., Payne M.A., Hashim A., Jotwani R., Eskan M.A., McIntosh M.L., Alsam A., Kirkwood K.L., Lambris J.D., Darveau R.P., Curtis M.A. (2011) Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe.* 10, 497–506.
- 81. Hajishengallis G., Lamont R.J. (2012) Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol. Oral Microbiol.* 27, 409-419.
- Persson G.R. (2005) Immune responses and vaccination against periodontal infections. J. Clin. Periodontol. 32(Suppl 6), 39–53.
- 83. Meisel P., Holtfreter B., Biffar R., Suemnig W., Kocher T. (2012) Association of periodontitis with the risk of oral leukoplakia. *Oral Oncol.* **48**, 859–863.
- 84. Petersen P.E., Bourgeois D., Ogawa H., Estupinan-Day S., Ndiaye C. (2005) The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull. W. Hlth Organ.* **83**, 661–669.
- Tezal M., Sullivan M.A., Hyland A., Marshall J.R., Stoler D., Reid M.E., Loree T.R., Rigual N.R., Merzianu M., Hauck L., Lillis C., Wactawski-Wende J., Scannapieco F.A. (2009) Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18, 2406–2412.

- 86. Chocolatewala N., Chaturvedi P., Desale R. (2010) The role of bacteria in oral cancer. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* **31**, 126–131.
- 87. Fitzsimonds Z.R., Rodriguez-Hernandez C.J., Bagaitkar J., Lamont R.J. (2020) From beyond the pale to the pale riders: the emerging association of bacteria with oral cancer. *J. Dent. Res.* **99**, 604-612.
- 88. Karpiński T.M. (2019) Role of oral microbiota in cancer development. *Microorganisms*. 7(1), 20.
- Mauceri R., Coppini M., Vacca D., Bertolazzi G., Panzarella V., Di Fede O., Tripodo C., Campisi G. (2022) Salivary microbiota composition in patients with oral squamous cell carcinoma: a systematic review. *Cancers* (Basel). 14(21), 5441.
- Ohshima J., Wang Q., Fitzsimonds Z.R., Miller D.P., Sztukowska M.N., Jung Y.J., Hayashi M., Whiteley M., Lamont R.J. (2019) *Streptococcus gordonii* programs epithelial cells to resist ZEB2 induction by *Porphyromonas gingivalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 116, 8544–8553.
- Al-Hebshi N.N., Nasher A.T., Maryoud M.Y., Homeida H.E., Chen T., Idris A.M., Johnson N.W. (2017) Inflammatory bacteriome featuring *Fusobacterium nucleatum* and *Pseudomonas aeruginosa* identified in association with oral squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* 7, 1834.
- 92. Hayes R.B., Ahn J., Fan X., Peters B.A., Ma Y., Yang L., Agalliu I., Burk R.D., Ganly I., Purdue M.P., Freedman N.D., Gapstur S.M., Pei Z. (2018) Association of oral microbiome with risk for incident head and neck squamous cell cancer. *JAMA Oncol.* 4, 358–365.
- 93. Schmidt B.L., Kuczynski J., Bhattacharya A., Huey B., Corby P.M., Queiroz E.L., Nightingale K., Kerr A.R., DeLacure M.D., Veeramachaneni R., Olshen A.B., Albertson D.G. (2014) Changes in abundance of oral microbiota associated with oral cancer. *PLoS One.* 9, e98741.
- 94. Binder Gallimidi A., Fischman S., Revach B., Bulvik R., Maliutina A., Rubinstein A.M., Nussbaum G., Elkin M. (2015) Periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* promote tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model. *Oncotarget.* 6, 22613–22623.
- 95. Wu J.S., Zheng M., Zhang M., Pang X., Li L., Wang S.S., Yang X., Wu J.B., Tang Y.J., Tang Y.L., Liang X.H. (2018) *Porphyromonas gingivalis* promotes 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis with an alteration of fatty acid metabolism. *Front. Microbiol.* **9**, 2081.
- 96. Shin J.M., Luo T., Kamarajan P., Fenno J.C., Rickard A.H., Kapila Y.L. (2017) Microbial communities associated with primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma – a high *Fusobacterial* and low *Streptococcal* signature. *Sci. Rep.* 7, 9934.
- 97. Yang C.Y., Yeh Y.M., Yu H.Y., Chin C.Y., Hsu C.W., Liu H., Huang P.J., Hu S.N., Liao C.T., Chang K.P., Chang Y.L. (2018) Oral microbiota

community dynamics associated with oral squamous cell carcinoma staging. *Front. Microbiol.* **9**, 862.

- Yang J., He P., Zhou M., Li S., Zhang J., Tao X., Wang A., Wu X. (2022) Variations in oral microbiome and its predictive functions between tumorous and healthy individuals. *J. Med. Microbiol.* 71(8). doi: 10.1099/jmm.0.001568
- 99. Eun Y.G., Lee J.W., Kim S.W., Hyun D.W., Bae J.W., Lee Y.C. (2021) Oral microbiome associated with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* **11**, 23176.
- 100. Tota J.E., Anderson W.F., Coffey C., Califano J., Cozen W., Ferris R.L., St. John M., Cohen E.E., Chaturvedi A.K. (2017) Rising incidence of oral tongue cancer among white men and women in the united states, 1973–2012. *Oral Oncol.* 67, 146–152.
- 101. Zhang Z., Feng Q., Li M., Li Z., Xu Q., Pan X., Chen W. (2022) Age-related cancer-associated microbiota potentially promotes oral squamous cell cancer tumorigenesis by distinct mechanisms. *Front. Microbiol.* 13, 852566.

# ORAL MICROBIOME IN THE DEVELOPMENT OF ORAL CANCER

E. S. Kolegova<sup>1, \*</sup>, A. A. Schegoleva<sup>1</sup>, L. A. Kononova<sup>2</sup>, E. V. Denisov<sup>1</sup>

 <sup>1</sup>Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634009 Russia
 <sup>2</sup> Siberian State Medical University Russia, Tomsk, 634050 Russia \*e-mail: elenakolegova@oncology.tomsk.ru

Oral cancer is an aggressive and rapidly progressive disease. The oral cavity is home to over 700 species of microorganisms which regulate metabolism, immune function and health. There are 3 types of mechanisms by which bacteria may participate in carcinogenesis. First, bacteria cause chronic inflammation, which stimulates the production of cytokines, including interleukins, interferons, and tumor necrosis factor. Second, bacteria can interact directly with host cells by secreting toxins or by binding to membrane receptors. Finally, the production of metabolites by bacteria may also contribute to carcinogenesis. The importance of bacteria level and composition in the transition of oral precancerous lesions to cancer has been demonstrated. The relationship of changes in microbiome composition with smoking, inflammation in healthy individuals, as well as with the development of oral cancer in patients has been studied.

Keywords: microbiome, oral cancer, inflammation, smoking, immunity

# — ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА =

УДК 612.74, 573.7.017.6, 577.29

# НОКАУТ ГЕНОВ *Hsp70* МОДУЛИРУЕТ ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМА В МЫШЦАХ НОГ, СНИЖАЕТ СКОРОСТЬ ЛОКОМОЦИЙ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ Drosophila melanogaster<sup>#</sup>

© 2024 г. И. В. Кукушкина<sup>а, b</sup>, П. А. Махновский<sup>а</sup>, В. Г. Згода<sup>с</sup>, Н. С. Курочкина<sup>а</sup>, Д. В. Попов<sup>а\*</sup>

<sup>а</sup>Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, 123007 Россия <sup>b</sup>Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

<sup>с</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия

\*e-mail: danil-popov@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.08.2023 г. После доработки 05.10.2023 г. Принята к публикации 13.10.2023 г.

Изучено влияние нокаута шести генов семейства *Hsp70* (ортологи генов млекопитающих *Hspa1a*, Hspa1b, Hspa2 и Hspa8) на возрастные изменения экспрессии генов в ногах Drosophila melanogaster, содержащих преимущественно пучки скелетных мышц. С этой целью определен транскриптомный профиль скелетных мышц ног самцов контрольной линии *w*<sup>1118</sup> и линии *Hsp*70<sup>-</sup> на 7-, 23- и 47-е сутки жизни. У мух  $w^{11/8}$  возрастное снижение скорости локомоций в тесте на отрицательный геотаксис (маркер функционального состояния и выносливости) сопровождалось выраженным изменением транскриптомного профиля скелетных мышц ног, носящим консервативный характер. У мух *Hsp70* медианная продолжительность жизни была меньше, а скорость локомоций значительно ниже, чем у контрольных мух; одновременно наблюдались комплексные изменения возрастной динамики транскриптома скелетных мышц. Количественный масс-спектрометрический анализ протеома выявил разнонаправленные изменения в содержании ключевых ферментов метаболизма глюкозы и окисления жиров (гликолиз, пентозофосфатный путь, цикл Кребса, бета-окисление и окислитель-ное фосфорилирование) у 47-суточных мух *Hsp70*<sup>-</sup>относительно *w*<sup>1118</sup>. Такая дисрегуляция может быть связана с компенсаторным увеличением экспрессии других генов, кодирующих шапероны (малые Hsp, Hsp40, 60 и 70), которые регулируют специфичные наборы белков-мишеней. Совокупность полученных нами данных показывает, что нокаут шести генов *Hsp70* несколько уменьшает медианную продолжительность жизни мух, но выраженно снижает скорость их локомоций, что может быть связано с комплексными изменениями транскриптома скелетных мышц ног и с разнонаправленными изменениями в содержании ключевых ферментов энергетического метаболизма.

**Ключевые слова**: скелетная мышца, старение, белки теплового шока, транскриптом, протеом **DOI**: 10.31857/S0026898424020065, **EDN**: NKMIFA

#### ВВЕДЕНИЕ

Увеличение доли пожилых людей, наблюдаемое в развитых странах в последнее десятилетие, делает актуальным изучение механизмов старения. При старении происходит постепенное снижение функциональных и адаптационных возможностей организма и развитие возрастных патологий. Один из интегральных признаков старения — уменьшение массы и функциональных возможностей скелетной мускулатуры – выражается в снижении способности мышц окислять жиры и углеводы, аэробной работоспособности (выносливости) и силы мышц [1, 2]. Эти изменения ведут к нарушению углеводно-жирового обмена, развитию метаболических заболеваний, патологий сердечно-сосудистой системы, саркопении и ряду других нарушений [3–6]. Совокупность этих изменений может быть причиной старческой астении (немощи) и значительного снижения качества жизни, что подчеркивает важность изучения влияния старения (и соответствующих механизмов) на функции скелетных мышц.

<sup>&</sup>lt;sup>#</sup>Дополнительная информация для этой статьи доступна по doi 10.31857/S0026898424020065 для авторизованных пользователей.

Выделяют более 10 молекулярно-клеточных признаков старения, среди которых большое внимание привлекает нарушение клеточного протеостаза [7]. Ключевыми регуляторами протеостаза являются белки теплового шока и, в частности, одно из наиболее консервативных семейств этих белков – Hsp70 (Hspa) [8]. Белки этого семейства выполняют разнообразные функции, такие как de novo фолдинг белков, контроль качества и фолдинг совместно с белками Hsp90 и шаперонинами, участие в мембранном транспорте и регуляции активности белков. сборка белковых комплексов, защита белков от деградации и регуляция их протеолиза, а также предотвращение стресс-индуцируемого образования белковых агрегатов, импорт и фолдинг митохондриальных белков [9, 10]. Наиболее хорошо изучены функции белков, кодируемых генами-паралогами *Hspa1a* (*Hsp72-1*) и *Hspa1b* (*Hsp72-2*). Белок, кодируемый *Hspa1a*, играет важную роль в регенерации скелетных мышц в ответ на различные стимулы, включая сократительную активность [11], а также в регуляции чувствительности к инсулину, биогенеза митохондрий и аэробной работоспособности (выносливости) [12, 13]. Эти процессы значительно нарушаются в скелетных мышцах при старении, поэтому не стала неожиданностью связь *Hspa1a* с возрастзависимым снижением чувствительности к инсулину [14, 15] и мышечной силы [16]. Нужно отметить, что влияние генов семейства Hsp70 (Hspa) на возрастные изменения скелетных мышц изучено явно недостаточно, в частности, отсутствуют данные об их воздействии на транскриптом при старении.

Ключевым подходом к изучению функции генов считается нокаут. Семейство *Hsp70 (Hspa)* состоит более чем из 10 генов, и подавление экспрессии одного из них может компенсировать другие гены этого семейства, что затрудняет интерпретацию результатов таких экспериментов. Поэтому для исследования влияния генов семейства *Hsp70 (Hspa)* на возрастные изменения транскриптома скелетных мышц мы использовали линию Drosophila melanogaster с нокаутом шести генов *Hsp70* (*Hsp70Aa*, *Hsp70Ab*, *Hsp70Ba*, Hsp70Bb, Hsp70Bbb, Hsp70Bc), ортологов генов Hspala, Hspalb, Hspa2 и Hspa8 млекопитающих. Для определения зависящих от возраста и *Hsp70* изменений экспрессии генов мы выделяли РНК и белки из ног мух, состоящих преимущественно из мышечных пучков и хитинового каркаса [17]. Использовали широкозахватные методы РНК-секвенирования и количественный масс-спектрометрический анализ протеома. Кроме того, оценивали влияние нокаута генов *Hsp 70* на скорость локомоций в тесте на отрицательный геотаксис – показатель, характеризующий функциональное состояние и выносливость мух [18], и на продолжительность жизни мух

с обычным и хронически повышенным уровнем двигательной (локомоторной) активности.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линии D. melanogaster и условия их культивирования. Самки D. melanogaster хуже адаптируются к увеличению двигательной активности, чем самцы [19]. Поэтому исследование проводили на самцах линии *w*<sup>1118</sup> (Vienna Drosophila Resource Center, ID 60000) и *Hsp70*<sup>-</sup> (генотип w<sup>1118</sup>: Df(3R)Hsp70A, Df(3R)Hsp70B) (Bloomington Drosophila Stock Center, ID 8841) с нокаутом шести генов этого семейства (*Hsp70Aa*, *Hsp70Ab*, *Hsp-*70Ba, Hsp70Bb, Hsp70Bbb, Hsp70Bc) [20] из 13. Отсутствие экспрессии этих генов подтверждено анализом покрытия их открытой рамки считывания (РНК-секвенирование) (рис. 1а). Мух содержали при 22 °С, влажности 45–55% и 12-часовом цикле свет – темнота, на пищевой среде (5% сахарозы, 10% пекарских дрожжей, 5% манной крупы, 0.7% агара, 0.1% пропионовой кислоты). Мух культивировали при постоянной плотности не менее двух поколений; самцов отбирали в парах диэтилового эфира в течение 36 ч после вылета имаго и помещали по 30 особей в 50 мл полипропиленовые пробирки с вентилируемой крышкой и 5 мл пищевой среды. Корм меняли каждые 3 суток.

Анализ выживаемости. Число мертвых мух подсчитывали каждые 2 суток. Различия в продолжительности жизни в разных группах определяли с помощью инструмента OASIS2 [21] при уровне значимости 0.05 по логарифмическому тесту Мантеля — Кокса (*n* >150 для каждой линии); различия в медианной и максимальной продолжительности жизни (50 и 10% выживших соответственно) — по точному критерию Фишера.

Возрастные изменения скорости локомоций. Локомоции (перемещение вверх по стенке пробирки) инициировали с использованием теста на отрицательный геотаксис [18] и самодельного прибора, который каждые 15 с поворачивал пробирки на 180° вокруг поперечной оси, как описано ранее [22]. Через 5 мин после начала теста записывали видео (в течение 6 мин) для определения положения каждой мухи и скорости ее движения по вертикали (программа FreeClimber [23]).

Возрастные изменения транскриптома и протеома скелетной мышцы. Мух обеих линий анестезировали диэтиловым эфиром на 7, 23 и 47 сутки жизни, конечности отделяли в фосфатно-солевом буфере, а затем помещали в охлажденный буфер RLT ("Qiagen", Германия) для выделения PHK или в буфер для выделения белка (см. ниже). Влияние хронического увеличения локомоторной активности на продолжительность жизни мух. Мух (n = 180 в каждой линии) тренировали в пробирках для культивирования в течение 4 недель (4—32-е сутки жизни). Использовали прибор (см. выше), который ежедневно, начиная с 12 ч, каждые 15 с поворачивал пробирки на 180° вокруг поперечной оси: в первые 2 суток тренировочного периода в течение 30 мин, во вторые 2 суток — 60 мин, далее — 90 мин. Выживаемость мух регистрировали, как описано выше. Контрольных (нетренирующихся) мух (n = 180 каждой линии) содержали в пробирках с ограниченным объемом (высота 1.5 см) согласно [22].

РНК-секвенирование и обработка данных. Ноги 15 мух гомогенизировали в 1.5 мл пробирке с помощью полипропиленового пестика и дрели (200 об./мин, ~ 30 с) в RLT буфере ("Qiagen") с 1%-ным бета-меркаптоэтанолом и инкубировали (55 °C, 10 мин) с протеинкиназой К ("Евроген", Россия). Суммарную РНК выделяли на колонке (Clean RNA Standard, "Евроген"). Концентрацию РНК оценивали с помощью флуориметра (Qubit 4, "Thermo Scientific", США). Целостность РНК определяли с помощью капиллярного электрофореза (TapeStation, "Agilent", Германия) в аликвоте общей РНК (200 мкг) после обработки ДНКазой I ("Thermo Scientific"). Суммарную РНК (500 мкг) использовали для приготовления цепьспецифичной библиотеки с помощью набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Preparation kit ("NEB", США) и секвенировали (75 нуклеотидов, один конец) со средней глубиной 25 млн. прочтений на образец, используя секвенатор NextSeq 550 ("Illumina", США), как описано ранее [24].

Прочтения низкого качества и адаптерные последовательности удаляли (Тітотаtic tool, версия 0.36), прочтения выравнивали по первичной сборке генома BDGP6.94. Подсчитывали уникальные прочтения известных экзонов каждого гена с использованием пакета Rsubread (среда R) и аннотации Ensembl (BDGP6.94). Затем анализировали дифференциально экспрессируемые белоккодирующие гены (метод DESeq2, анализ непарных образцов с поправкой Бенджамини – Хохберга) и удаляли гены с низким уровнем экспрессии (TPM <1) (kallisto v0.46.2). Дифференциально экспрессируемые гены с изменением | экспрессии | >1.25 и  $p_{adi} < 0.05$ .

Количественный масс-спектрометрический протеомный анализ и обработка данных. Ноги 10 мух гомогенизировали, как описано выше, в 140 мкл лизирующего буфера (4% додецилсульфата натрия, 0.1 М Трис и 0.1 М дитиотреитол рН 7.6). Лизат кипятили (95°С, 5 мин), переносили в микропробирку AFA и обрабатывали ультразвуком (средняя мощность 20 Вт, 30 с  $\times$  4) с помощью фокусированного ультразвукового генератора ME220 (все – "Covaris", США). После центрифугирования (5 мин, 30000 g) концентрацию белка в супернатанте измеряли флуориметрическим методом (Qubit 4), затем 100 мкг белка загружали на центрифужный фильтр YM-10 ("Millipore", Ирландия) и гидролизовали с помощью метода FASP, используя ферменты Lys-C и трипсин (Lys-C 1:150, Trypsin Gold 1:100, оба – "Promega", США) в течение ночи при температуре 37°C, как описано ранее [25].

Каждый образец анализировали трижды с помошью системы ВЭЖХ Ultimate 3000 RSLCnano ("Thermo Scientific") и гибридного квадрупольно-орбитального масс-спектрометра Q Exactive HF-X ("Thermo Scientific") с использованием наноэлектроспрея в режиме положительной ионизации ("Thermo Scientific"), как описано ранее [26]. Градиент (140 мин) был сформирован подвижной фазой А (0.1% муравьиной кислоты) и В (80% ацетонитрила, 0.1% муравьиной кислоты) при потоке 0.4 мкл/мин. Йонизирующее напряжение составляло 2.1 кВ. Масс-спектры получены с разрешением 120000 в диапазоне 380-1500 m/z; ионы фрагментов сканировали по массе с разрешением 60000 в диапазоне m/z от 115 до верхнего значения m/z, соответствующего массе зарядового числа иона-предшественника. Все тандемные МС-сканирования проводили на ионах с зарядовым числом от z = 2 + дo z = 4 +. Синхронный отбор родительских ионов позволял одновременно выделить до 40 ионов-фрагментов (МС2). Максимальное время накопления ионов установлено равным 50 мс для родительских ионов и 100 мс для фрагментов. Целевые значения AGC были установлены на  $10^7$  и 2 × 10<sup>5</sup> для ионов-предшественников и фрагментов соответственно.

Определение пептидов, белков и интенсивности репортерных ионов проводили с использованием платформы MaxQuant (1.6.11; Институт биохимии Макса Планка) при стандартных настройках (FDR для пептидов 1%, N-концевое ацетилирование и окисление метионина в качестве переменных модификаций и карбамидометилирование цистеина в качестве фиксированной модификации); для устранения влияния системных факторов небиологических эффектов использовали функции "Isobaric much between runs" и "PSM-level weighted ratio normalization" [27]. После фильтрации (потенциальные контаминанты, обратные пептиды и пептиды, идентифицированные только по сайту) рассчитывали отношение интенсивностей репортерных ионов (*Hsp70<sup>-</sup>/w<sup>1118</sup>*) для каждого белка, идентифицированного по >1 уникальному пептиду, с использованием платформы Perseus (1.6.5; Институт



биохимии Макса Планка). Дифференциально экспрессируемые белки определяли с помощью Т-критерия Уэлча с *q*-значением (*p*-значение, скорректированное по Бенджамини – Хохбергу) < 0.05. Если белковая группа состояла из нескольких белков, то выбирали белок с наибольшей экспрессией соответствующей мРНК.

Статистический анализ. Физиологические данные представлены как медианы и межквартильный разброс. Данные повторных измерений анализировали с использованием двухфакторной (время и генотип) модели со смешанными эффектами с тестом множественных сравнений Сидака (уровень значимости 0.05).

Анализ функционального обогащения биологических процессов и клеточных компонентов выполняли относительно референсного набора генов (белоккодирующие гены с TPM > 1) с помощью DAVID 6.8 ( $p_{adj} < 0.05$  точный тест Фишера с поправкой Бенджамини) с использованием баз данных GENE ONTOLOGY BP/ CC DIRECT и KEGG PATHWAY. Динамику экспрессии генов, относящихся к некоторым обогащенным функциональным группам, оценивали с использованием нормированной экспрессии (*z*-шкала) каждого гена.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

# Влияние нокаута генов Hsp70 на продолжительность жизни D. melanogaster

Медианная продолжительность жизни мух линии  $Hsp70^-$  оказалась на 14% (p = 0.01) меньше, чем у мух контрольной линии  $w^{1118}$ , при этом не выявлено различий в максимальной продолжительности жизни (рис. 16). Снижение продолжительности жизни мух  $Hsp70^-$  отмечено ранее [28], однако подавление экспрессии Hsp70 с помощью РНК-интерференции не повлияло на этот показатель [29].

Увеличение физической активности повышает качество и/или продолжительность жиз-

Рис. 1. Нокаут шести генов семейства Hsp 70 снижает медианную продолжительность жизни D. melanogaster и оказывает выраженное негативное влияние на скорость локомоций в тесте на отрицательный геотаксис. а – Нормированное количество прочтений (РНК-секвенирование), приходящееся на открытую рамку считывания каждого гена. n = 12 пулов (ноги 15 мух) каждой линии. б и *в* – Доля выживших мух с обычным и хронически повышенным уровнем двигательной (локомоторной) активности. Представлено значение р для сравнения кривых, а также для медианной и максимальной продолжительности жизни (доля выживших 50 и 10%); n >150 в каждой линии. ТР – тренировка. г – Возрастные изменения скорости локомоций в тесте на отрицательный геотаксис. Одной и тремя звездочками представлены значения p < 0.05 и < 0.001 соответственно. n =5-6 пулов (10-30 мух в пуле) каждой линии.

ни разных организмов (человека [30, 31], грызунов [32, 33], а также мух [34–38]). Поэтому мы решили проверить, окажет ли нокаут генов *Hsp70* негативное влияние на прирост продолжительности жизни, вызванный физическими нагрузками. В нашей работе повышенная локомоторная активность (4-32-е сутки жизни) привела к увеличению медианной и максимальной продолжительности жизни не только мух линии  $w^{1118}$  (на 26 и 9% соответственно), но и *Hsp70*<sup>-</sup> (на 30 и 15% соответственно) (рис. 1в). Это означает, что увеличение продолжительности жизни, вызванное тренировками, не регулируется Hsp70. По-видимому, нокаут генов Hsp70 вызывает несильный негативный эффект, поскольку он полностью компенсируется влиянием хронически повышенной двигательной активности.

# Нокаут генов Hsp70 снижает скорость локомоций у D. melanogaster

В первые сутки после вылупления у мух наблюдаются выраженные изменения экспрессии генов, размеров и функциональных возможностей скелетных мышц, связанные с ростом и развитием [17], поэтому все исследования проводили, начиная с 7-х суток жизни. Скорость локомоций (перемещение вверх) в тесте на отрицательный геотаксис широко используется для оценки функционального состояния и выносливости мух [18]. Нами обнаружено, что скорость локомоций у молодых самцов  $Hsp70^-$ в 2 раза ниже ( $p_{adj} < 0.001$ ), чем в контрольной линии  $w^{1118}$  (рис. 1*г*). Это согласуется с данными о том, что сверхэкспрессия Hspala в скелетных мышцах мышей приводит к увеличению скорости и времени бега до отказа активности окислительных ферментов и содержания митохондрий в мышцах, а также к максимальной скорости потребления  $O_2$  организмом [12, 13]. У мух  $w^{1118}$  в возрасте 3 нед. наблюдается резкое снижение скорости локомоций, что соответствует данным [35, 39], однако у мух *Hsp70*<sup>-</sup> скорость локомоций не изменяется значимо и остается на очень низком уровне (рис. 1г). Возрастные изменения скорости локомоций у мух w<sup>1118</sup> согласуются с многочисленными изменениями в летательных мышцах старых мух: со снижением плотности митохондрий и нарушением их структуры, с увеличением продукции активных форм кислорода, нарушением структуры мышечных волокон, саркомеров и эндоплазматического ретикулума и с накоплением полиубиквитинированных белковых агрегатов [40 - 42].

В дальнейшем профиль экспрессии генов в мышцах ног *D. melanogaster* изучали на 7- (молодые особи), 23- (до резкого снижения скоро-

сти локомоций контрольных мух) и 47-е сутки (при сопоставимой скорости локомоций) (рис. 1*г*).

# Сравнение возрастных изменений транскриптома в мышцах ног мух w<sup>1118</sup> и млекопитающих

Исследование динамики транскриптомного профиля в мышцах ног показало, что большинство возрастных изменений, наблюдаемых у 23-суточных мух w<sup>1118</sup> относительно молодых, сохранились у 47-суточных мух (рис. 2a, табл. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/2/supp Kukushkina rus.zip), а количество генов. экспрессия которых изменилась к 47-м суткам, увеличилось в 2-3 раза, что говорит о прогрессировании возрастных изменений. В дополнение к этому анализ функционального обогащения показал, что после 23 суток жизни (сопоставление 47 и 23-суточных мух, а также 23 и 7-суточных мух) значительно изменяется выраженность транскриптомных изменений: увеличивается количество генов, входящих в функциональную категорию "иммунный ответ", "фолдинг белков", "цитоскелет" (рис. 26) и "митохондрия" (рис. 2в), снижается обогащение генами категорий "трансляция", "протеолиз/лизосома", "биосинтез кофакторов", "метаболизм углеводов" (рис. 26) и "плазматическая мембрана" (рис. 2в).

Сравнение совокупных изменений у мух разного возраста (47 суток vs. 7) выявило наиболее значимое обогащение генами, экспрессия которых снизилась, а именно генами, кодирующими белки митохондрий (окислительные ферменты и др.), мембранные белки и синаптические белки мотонейронов, ферменты метаболизма глюкозы/гликогена и аминокислот, белки саркомеров и внеклеточного матрикса (рис. 2в). Генами, экспрессия которых повысилась, обогащены функциональные категории, связанные с ядерными белками, протеолизом/протеасомами, фолдингом белков, трансляцией/рибосомами и внеклеточным матриксом (рис. 26). Эти изменения хорошо согласуются с возрастными изменениями транскриптома летательных мышц D. melanogaster (линия B3) [41] и скелетных мышц грызунов и человека [43-46], в которых снижается экспрессия генов, ассоциированных с многочисленными митохондриальными белками (включая рибосомные), регуляторами транскрипции, углеводного, жирового и аминокислотного обмена и с саркомерными белками, а увеличивается экспрессия генов, связанных с воспалительным и иммунным ответом, клеточной адгезией и секрецией. Это свидетельствует о консервативности механизмов регуляции воз-



~

		Гены, число				0	
	¢ž, ″£¤¥,; ¦§ ,¨ ©″; ª© œ¥°¤¤	23 vs.7		47 vs.23		47 vs.7	
œ°УПП;	~°, "^ уве иче`` ой экспре^`ией	18	-02	18	-02	18	-02
	(¬; ® ; ,, GO CC и KEGG PATHWAY)	W 11	lsp	W <sup>11</sup>	lsp	W <sup>11</sup>	lsp
	CYTOSOLIC RIBOSOME	19	F		25	25	F
	RIBOSOME	25			27	23	
TRANSLATION	RIBOSOME	25			25		
	CYTOSOLIC LARGE RIBOSOMAL SUBUNIT	12			15	19	
	CYTOSOLIC SMALL RIBOSOMAL SUBUNIT	9			11		
	SMALL RIBOSOMAL SUBUNIT				6		
	MITOCHONDRIAL SMALL RIBOSOMAL SUBUNIT	9					
	MATURATION OF SSU-RRNA					10	
	90S PRERIBOSOME						7
	U4/U6 X U5 TRI-SNRNP COMPLEX					10	
	CYTOPLASMIC TRANSLATION					29	
EVED & OFLI LUL & D	EXTRACELLULAR REGION	46	48				
EXTRACELLULAR	EXTRACELLULAR SPACE	61		41		91	
REGION	SMOOTH SEPTATE JUNCTION			5			
NUCLEUR	NUCLEOLUS					71	52
NUCLEUS	NUCLEOPLASM					65	
PROTEIN FOLDING	CHAPERONIN-CONTAINING T-COMPLEX			7	8	8	8
	LYSOSOME	22					
	PROTEASOME COMPLEX					20	
DDOTEOLVOIO	PROTEASOME REGULATORY PARTICLE					14	
rk01E0L1515	PROTEASOME REGULATORY PARTICLE, BASE SUBCOMPLEX					9	
	PROTEASOME-MEDIATED UBIQUITIN-DEPENDENT PROTEIN CATABOLIC PROCESS					34	
	PROTEASOME CORE COMPLEX					10	
IMMUNE RESPONSE	TOLL AND IMD SIGNALING PATHWAY		15	18			
CYTOSOL	CYTOSOL					183	
CYTOSKELETON	ARP2/3 PROTEIN COMPLEX			6			
	LAMELLIPODIUM			6			
	MICROVILLUS			5			
	ACTIN CYTOSKELETON			9			
BIOSYNTHESIS OF COFACTORS	BIOSYNTHESIS OF COFACTORS	19					
METABOLIC PATHWAYS METABOLIC PATHWAYS		82					
CARBONHYDRATE	OTHER GLYCAN DEGRADATION	7					
METABOLISM	PENTOSE AND GLUCURONATE INTERCONVERSIONS	10					
$P_{adj} \times 10^{-45} \times 10^{-2} N.S.$							

# КУКУШКИНА и др.

	THE AND LOD AT A STREET		Гены, число					
/<>%0	", ,™ fifl"‰ŁŒ'SY,‰ZY/fl <fi fi<br="">1 &lt;".łœ cнижežžœ£DXł&amp;c łłuef</fi>	23	23 vs.7 47 vs.23 4					
	(" 🖋 🕯 🖓 " Š « GO СС и КЕGG РАТНWАҮ)	W <sup>1118</sup>	Tsp 70	W 1118	Hsp 70	W 1118	Asp 70	
METABOLIC PATHWAYS METABOLIC PATHWAYS		115	156	135	79	266	270	
	OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	30	58	61		78	70	
-	MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEX I	13	22	27		35	27	
	PYRUVATE METABOLISM	9	13	19		15	19	
-	PROTONTRANSPORTING ATP SYNTHASE COMPLEX, CATALYTIC CORE F(1)	5	5	5			5	
	MITOCHONDRION		93	120		168	177	
	MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEX IV MITOCHONDRIAL INNER MEMBRANE		12 29	29		13 50	14	
IITOCHONDRION	MITOCHONDRIAL PROTON-TRANSPORTING ATP SYNTHASE COMPLEX, COUPLING FACTOR F(O)		8	7		9	9	
	MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEX III		7	6		9	9	
	MITOCHONDRIAL PROTON-TRANSPORTING ATP SYNTHASE COMPLEX		5	5		6	6	
	MITOCHONDRIAL MATRIX MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEX II. SUCCINATE DEHYDROGENASE COMPLEX			4				
	MITOCHONDRIAL PYRUVATE DEHYDROGENASE COMPLEX		4	4				
	RESPIRATORY CHAIN		8				8	
	MITOCHONDRIAL MEMBRANE	0					14	
	BASEMENT MEMBRANE PLASMA MEMBRANE	8			70	367	247	
	INTEGRAL COMPONENT OF MEMBRANE	177	157		70	547	410	
LASMA MEMBRANE	INTEGRAL COMPONENT OF PLASMA MEMBRANE				33	164	108	
	MEMBRANE			<u> </u>		324	243	
	ANCHUKED COMPONENT OF MEMBRANE	25	30	25	15	15	12	
ARBONHYDRATF	GLYCOLYSIS/GLUCONEOGENESIS	17	18	14	15	22	40 24	
ETABOLISM	STARCH AND SUCROSE METABOLISM	9	9				13	
	FRUCTOSE AND MANNOSE METABOLISM						9	
	NEURON PROJECTION MEMBRANE				8	24	19	
	SYNAPSE NEURON PROJECTION	27				/0 _49	41	
	POSTSYNAPTIC MEMBRANE					33	50	
	AXON					55		
ERVOUS SYSTEM	PRESYNAPTIC ACTIVE ZONE					18		
ROCESS	SYNAPTIC VESICLE					26		
·	DENDRITE					28		
	TERMINAL BOUTON					19		
	VOLTAGE-GATED POTASSIUM CHANNEL COMPLEX					9		
-	NEUROMUSCULAR JUNCTION					31		
	PHOTOTRANSDUCTION ELV					8 15		
SENSORY PERCEPTION	RHABDOMERE		11			19		
	INAD SIGNALING COMPLEX		5			8		
USCLE CONTRACTION	Z DISC	20	13	14		26	17	
ND CYTOSKELETON	M BAND	11	8	8		12	11	
	TYROSINE METABOLISM	18	10		11	14	13	
	BIOSYNTHESIS OF AMINO ACIDS	14	16	11	12	23	26	
	TRYPTOPHAN METABOLISM			7		9	11	
	2-OXOCARBOXYLIC ACID METABOLISM		7			9	8	
	ARGININE BIOSYNTHESIS					9	10	
MINOACID	VALINE. LEUCINE AND ISOLEUCINE DEGRADATION					11	10	
ETABOLISM	PHENYLALANINE METABOLISM		5		5		7	
	GLYCINE, SERINE AND THREONINE METABOLISM				8		10	
	ALANINE, ASPARTATE AND GLUTAMATE METABOLISM						12	
	HISTIDINE METABOLISM						5	
	PHENYLALANINE, TYROSINE AND TRYPTOPHAN BIOSYNTHESIS						4	
	CYSTEINE AND METHIONINE METABOLISM				7			
	INSECT HORMONE BIOSYNTHESIS		11	<b> </b>		10	9	
	GLYCEROLIPID METABOLISM BUTANOATE METABOLISM						16	
TID METADOLISM	GLYCEROPHOSPHOLIPID METABOLISM				9		18	
+	PROPANOATE METABOLISM						10	
	EXTRACELLULAR REGION	46		49	42		81	
XTRACELLULAR	EXTRACELLULAR SPACE	49		50	37			
REGION	EXTRACELLULAR MATRIX	15		<b> </b>		25		
EGION	EUM-REUEFTUK INTERAUTIUN	5		l		17		
EGION	CELL-CELLJUNCTION			l			1	
EGION	CELL-CELL JUNCTION DRUG METABOLISM-CYTOCHROME P450		12			17		
EGION RUG METABOLISM	CELL-CELL JUNCTION DRUG METABOLISM-CYTOCHROME P450 METABOLISM OF XENOBIOTICS BY CYTOCHROME P450		12 12			17		

# НОКАУТ ГЕНОВ *Hsp70*

**Рис. 2.** Старение вызывает выраженные и прогрессирующие изменения транскриптомного профиля ног (состоящих преимущественно из пучков мышечных волокон) мух  $w^{1118}$ . Нокаут шести генов семейства *Hsp70* модулирует возрастные изменения транскриптома скелетных мышц ног. a – Количество уникальных и общих генов, экспрессия которых у 23- и 47-суточных мух отличается от экспрессии у 7-суточных мух. n = 4 пула (ноги 15 мух) каждой линии.  $\delta$  и e – Анализ функционального обогащения генами, экспрессия которых увеличилась ( $\delta$ ) и снизилась (e). Представлено количество генов в каждой функциональной категории; тепловая карта показывает p-значение.

растных изменений экспрессии генов в скелетной мышце и косвенно говорит об адекватности выбранного нами экспериментального подхода. К возрастным изменениям транскриптома скелетных мышц (ног) мух  $w^{1118}$ , отличным от изменений у млекопитающих, относится увеличение экспрессии различных ядерных белков, регуляторов транскрипции и рибосомных белков, менее существенное повышение экспрессии генов иммунного ответа и секретируемых белков (рис. 26), а также снижение экспрессии генов синаптических белков (рис. 26).

Интересно отметить, что мы обнаружили множество возрастных изменений в экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока: увеличение *Hsp10*, генов *Cct*, кодирующих комплекс, содержащий шаперонин ТСР-1, атипичных *Hsp70* и *Hsp90*, а также разнонаправленные изменения генов малых *Hsp*, *Hsp40*, *Hsp70* (экспрессия 22 и 11 мРНК из 76 экспрессируемых увеличилась и снизилась соответственно; табл. S2, см. Дополнительные материалы), некоторые из них были отмечены ранее в летательных мышцах [47]. При этом нами не найдено возрастных изменений в экспрессии генов Hsp70Aa, Hsp70Ab, Hsp70Ba, Hsp70Bb, Hsp70Bbb, *Hsp70Bc*, что согласуется с данными о посттранскрипционной регуляции увеличения содержания белков Hsp70 в летательных мышцах старых мух [47].

# Нокаут генов Hsp70 модулирует возрастную динамику транскриптома в ногах мух

Изменения транскриптома у мух *Hsp70*<sup>--</sup> (47-суточных vs. 7-суточных) были несколько меньше, чем в контроле (~1000–1500 мРНК vs. ~1500-2000 мРНК соответственно; рис. 2a, табл. S1, см. Дополнительные материалы), при этом отмечено нарушение возрастной динамики экспрессии многих генов. Так, анализ функционального обогащения показал, что изменения экспрессии генов, кодирующих регуляторы трансляции, ферменты биосинтеза кофакторов, углеводного обмена (рис.  $2\delta$ ) и мембранные белки (рис. 2*в*), происходили в начальный период жизни мух линии *w*<sup>1118</sup>, тогда как в линии Hsp 70<sup>-</sup> изменения экспрессии наблюдались с 23-х по 47-е сутки или отсутствовали. Обратная ситуация отмечена в случае генов иммунного ответа, белков цитоскелета (рис.  $2\delta$ ), митохондрий и регуляторов метаболизма лекарственных средств (рис. 2e). Анализ возрастной динамики экспрессии генов, относящихся к этим и некоторым другим функциональным категориям, подтвердил это наблюдение (рис. 3). Кроме того, совокупные возрастные изменения (47 vs. 7 суток) в экспрессии генов, кодирующих регуляторы трансляции, протеолиза (рис. 2d и рис. 3), метаболизма липидов и белки мотонейронов/синапсов, различались между линиями (рис. 2e и рис. 3). Суммарно эти данные показывают, что гены *Hsp70* оказывают комплексное, но относительно небольшое влияние на возрастные изменения экспрессии множества генов в скелетных мышцах ног мух.

# Нокаут генов Hsp70 вызывает разнонаправленные изменения в экспрессии генов ключевых ферментов метаболизма глюкозы и жиров

Для исследования влияния генотипа (*Hsp70*<sup>-</sup> *vs.*  $w^{1118}$ ) на экспрессию генов мы сопоставили транскриптомные и протеомные профили 47-суточных мух (при сопоставимой скорости локомоций; рис. 1г). Масс-спектрометрический анализ позволяет детектировать преимущественно высокопредставленные мышечные белки (белки саркомеров, митохондрий, внеклеточного матрикса и др.) [48, 49], поэтому в нашей работе *Hsp70*-зависимые изменения в низкопредставленных сигнальных/регуляторных белках остались практически неохарактеризованными. В результате анализа в скелетных мышцах ног мух детектировано 724 белка, экспрессия 247 из которых у мух линии Hsp70 увеличилась, а 72 снизилась, причем изменение содержания трети белков коррелировало с изменением уровня соответствующих мРНК (рис. 4*a*, табл. S1, см. Дополнительные материалы). Оказалось, что белками, имеющими разный паттерн регуляции на уровне мРНК, обогащены различные функциональные категории (рис. 4б), что согласуется с наблюдениями для скелетной мышцы человека [50]. Так, белки, содержание которых увеличилось при повышении экспрессии их генов, были ассоциированы с категорией "окислительное фосфорилирование" и включали субъединицы митохондриальных комплексов I, III и V (АТРаза), а также вакуолярной V-АТРазы (рис. 4*б*,*в*). Более 170 белков, содержание которых увеличилось без изменения содержания их мРНК, были ассоциирова-



**Рис. 3**. Нокаут шести генов семейства *Hsp* 70 нарушает возрастную динамику экспрессии генов. Линией представлены величины нормированной экспрессии (*z*-шкала) каждого гена некоторых обогащенных функциональных групп из рис. 26 и в. Приведены названия и номера функциональных категорий; *n* = 4 пула (ноги 15 мух) каждой линии.

ны с категориями "рибосома" и "трансляция" и включали ряд рибосомных белков (рис. 4), в том числе важный регулятор трансляции – рибосомный белок S6 (RpS6). Белками, содержание которых снизилось на фоне снижения экспрессии их генов, обогащены категории "цитозоль", "метаболизм" и "пентозофосфатный путь" (рис. 4*б*). Интересно, что среди белков, снижение содержания которых произошло без изменения экспрессии их генов, оказались че-



**Рис. 4**. Нокаут шести генов семейства *Hsp70* вызывает разнонаправленные изменения в содержании ключевых ферментов метаболизма глюкозы и жиров (гликолиз, пентозофосфатный путь, цикл Кребса, бета-окисление и окислительное фосфорилирование) в мышцах ног 47-суточных мух. a – Изменения содержания мРНК и белка в скелетных мышцах ног мух  $Hsp70^-$  относительно мух  $w^{1118}$ . мРНК n = 4 пула (ноги 15 мух) каждой линии; белок n = 7-8 пулов (ноги 10 мух) для каждой линии.  $\delta$  – Анализ функционального обогащения показал, что белками с разным паттерном регуляции на уровне мРНК обогащены различные функциональные категории. Представлено количество генов в каждой категории; тепловая карта показывает значение p. s – Разнонаправленные изменения содержания белков окислительного фосфорилирования в ногах 47-суточных мух  $Hsp70^-$  и мух  $w^{1118}$  (см. рис. S1, Дополнительные материалы). N.S. – изменение содержания белка не детектировано; N.D. – белок не детектирован.

тыре субъединицы цитохромоксидазного комплекса III и цитохром *с* – терминальные участки электрон-транспортной цепи (рис. 46, в), что говорит о разнонаправленной регуляции субъединиц ферментов дыхательных комплексов. Координированная экспрессия белков дыхательных комплексов важна для нормального окислительного фосфорилирования [51], тогда как нарушение стехиометрии может снизить устойчивость дыхательных комплексов к действию активных форм кислорода [52]. Эти рассуждения согласуются с повышенным содержанием у мух Hsp70<sup>-</sup> ферментов антиоксидантной защиты (каталаза [Cat]; тиоредоксинпероксидаза 1 [Jafrac1]; пероксиредоксин 5 [Prx5]; супероксид-дисмутаза 2 [Sod2]) (табл. S1, см. Дополнительные материалы), что можно рассматривать как компенсаторный ответ на увеличение повреждающего действия/продукции активных форм кислорода. Разнонаправленные изменения обнаружены и в случае таких ключевых путей энергетического метаболизма, как снижение содержания ферментов пентозофосфатного пути (отмечено выше), снижение и увеличение содержания различных ферментов гликолиза, цикла Кребса, транспорта и бета-окисления жирных кислот (рис. S1. см. Дополнительные материалы на сай-Te http://www.molecbio.ru/downloads/2024/2/ supp Kukushkina rus.zip).

Чем могут быть вызваны разнонаправленные изменения содержания ферментов энергетического метаболизма? Интересно, что делеция генов *Hsp70* привела к (компенсаторному) увеличению экспрессии других генов семейства Hsp70 (Hsc70-1 и Hsc70-2) и семейства Hsp40 (CG5504, CG7130, CG7394, CG32640, l(3)80Fg). кодирующих важные регуляторы цикла шаперонов Hsp70, а также генов малых белков теплового шока (CG7409, CG13133, Hsp23, Hsp26, Hsp27 и Hsp67Bc) (всего 13 из 75 экспрессируемых мРНК); при этом снижение экспрессии показано лишь у одного шаперона (Sec63) (табл. S2, см. Дополнительные материалы). Обнаружено также увеличение содержания малых белков теплового шока (CG7409, l(2)efl) и других белков-шаперонов (CG11267, Hsp60A) (всего 4 из 12 детектированных белков; табл. S2, см. Дополнительные материалы) в ногах мух линии *Hsp70*<sup>-</sup> по сравнению с контрольной линией. Нужно отметить, что разные семейства белков теплового шока регулируют специфические наборы белков, что, по-видимому, связано с их физико-химическими свойствами и клеточной локализацией [53, 54]. Белковые продукты нескольких генов с повышенной экспрессией (CG5504, CG7394, CG11267 и Hsp60A) у мух *Hsp* 70<sup>-</sup> локализуются в митохондриях, а малые белки теплового шока участвуют в регуляции морфологии и функции митохондрий [55]. Учитывая важную роль шаперонов в регуляции стабильности, протеолиза и транспорта/митохондриального импорта многих клеточных белков (и большинства митохондриальных белков) [9, 10], можно предположить, что разнонаправленные изменения экспрессии ряда ферментов энергетического метаболизма вызваны разнонаправленным изменением экспрессии шаперонов разных семейств. Интересно, что подобные изменения произошли на фоне увеличения экспрессии рибосомных белков (маркер производительности трансляционного аппарата) у мух *Hsp70*<sup>-</sup> (рис. 3, рис. 46 и рис. S1, см. Дополнительные материалы), что может быть дополнительным фактором, затрудняющим поддержание протеостаза в мышце.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами показано, что возрастное снижение скорости локомоций мух w<sup>1118</sup> – показателя функционального состояния и выносливости – сопровождается выраженными изменениями транскриптомного профиля скелетных мышц ног, носящими консервативный характер. Это дополняет результаты предыдущих работ об использовании этой модели для исследования возрастных изменений скелетной мышцы [40–42].

Делеция шести генов Hsp70 уменьшила медианную продолжительность жизни мух, однако не оказала негативного влияния на прирост продолжительности их жизни, вызванный длительным повышением двигательной активности. Это свидетельствует о контекстспецифичном и небольшом влиянии нокаута генов Hsp70 на продолжительность жизни мух. Напротив, в тесте на отрицательный геотаксис (показатель, характеризующий выносливость) скорость локомоций у мух *Hsp70*<sup>-</sup> была значительно снижена, что происходило на фоне комплексных изменений возрастной динамики транскриптома мышц ног. Количественный протеомный анализ выявил у 47-суточных мух *Hsp70* разнонаправленные изменения в содержании ключевых ферментов метаболизма глюкозы и окисления жиров (гликолиз, пентозофосфатный путь, цикл Кребса, бета-окисление и окислительное фосфорилирование). Такая дисрегуляция может быть связана с компенсаторным увеличением экспрессии генов, кодирующих другие шапероны (этого и других семейств), которые регулируют специфичные для них наборы белков-мишеней.

Таким образом, нокаут шести генов *Hsp70* несколько уменьшает медианную продолжительность жизни мух, но выраженно снижает скорость их локомоций, что может быть связано с комплексными изменениями транскриптома скелетных мышц ног и с разнонаправленными изменениями в содержании ключевых ферментов энергетического метаболизма.

Авторы благодарны Научно-исследовательскому институту биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (Москва) за возможность использования масс-спектрометрического оборудования центра коллективного пользования "Протеом человека".

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 21-15-00405.

В работе соблюдены все принципы ухода и использования животных.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Данные РНК-секвенирования, полученные в этом исследовании, доступны в базе данных NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) под номером GSE239395.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Furrer R., Handschin C. (2023) Drugs, clocks and exercise in ageing: hype and hope, fact and fiction. *J. Physiol.* 601, 2057–2068.
- Karakelides H., Irving B.A., Short K.R., O'Brien P., Nair K.S. (2010) Age, obesity, and sex effects on insulin sensitivity and skeletal muscle mitochondrial function. *Diabetes*. 59, 89–97.
- 3. Cervenka I., Agudelo L.Z., Ruas J.L. (2017) Kynurenines: tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science*. **357**, eaaf9794.
- Demontis F., Piccirillo R., Goldberg A.L., Perrimon N. (2013) The influence of skeletal muscle on systemic aging and lifespan. *Aging Cell.* 12, 943–949.
- Pedersen B.K., Febbraio M.A. (2012) Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* 8, 457–465.
- Pedersen B.K., Saltin B. (2015) Exercise as medicine – evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 25(Suppl 3), 1–72.
- Lopez-Otin C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. (2023) Hallmarks of aging: an expanding universe. *Cell.* 186, 243–278.
- Brocchieri L., Conway de Macario E., Macario A.J. (2008) HSP70 genes in the human genome: conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. BMC Evol. Biol. 8, 19.
- Rosenzweig R., Nillegoda N.B., Mayer M.P., Bukau B. (2019) The Hsp70 chaperone network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 665–680.

- Pfanner N., Warscheid B., Wiedemann N. (2019) Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 267–284.
- 11. Senf S.M. (2013) Skeletal muscle heat shock protein 70: diverse functions and therapeutic potential for wasting disorders. *Front. Physiol.* **4**, 330.
- Henstridge D.C., Bruce C.R., Drew B.G., Tory K., Kolonics A., Estevez E., Chung J., Watson N., Gardner T., Lee-Young R.S., Connor T., Watt M.J., Carpenter K., Hargreaves M., McGee S.L., Hevener A.L., Febbraio M.A. (2014) Activating HSP72 in rodent skeletal muscle increases mitochondrial number and oxidative capacity and decreases insulin resistance. *Diabetes.* 63, 1881–1894.
- Chung J., Nguyen A.K., Henstridge D.C., Holmes A.G., Chan M.H., Mesa J.L., Lancaster G.I., Southgate R.J., Bruce C.R., Duffy S.J., Horvath I., Mestril R., Watt M.J., Hooper P.L., Kingwell B.A., Vigh L., Hevener A., Febbraio M.A. (2008) HSP72 protects against obesity-induced insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 1739–1744.
- Chichester L., Wylie A.T., Craft S., Kavanagh K. (2015) Muscle heat shock protein 70 predicts insulin resistance with aging. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. 70, 155–162.
- Silverstein M.G., Ordanes D., Wylie A.T., Files D.C., Milligan C., Presley T.D., Kavanagh K. (2015) Inducing muscle heat shock protein 70 improves insulin sensitivity and muscular performance in aged mice. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 70, 800–808.
- McArdle A., Dillmann W.H., Mestril R., Faulkner J.A., Jackson M.J. (2004) Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction. *FASEB J.* 18, 355–357.
- 17. Soler C., Daczewska M., Da Ponte J.P., Dastugue B., Jagla K. (2004) Coordinated development of muscles and tendons of the *Drosophila* leg. *Development*. **131**, 6041–6051.
- Sujkowski A., Wessells R. (2018) Using *Drosophila* to understand biochemical and behavioral responses to exercise. *Exerc. Sport. Sci. Rev.* 46, 112–120.
- Sujkowski A., Ramesh D., Brockmann A., Wessells R. (2017) Octopamine drives endurance exercise adaptations in *Drosophila*. *Cell Rep.* 21, 1809–1823.
- Gong W.J., Golic K.G. (2004) Genomic deletions of the *Drosophila melanogaster Hsp70* genes. *Genetics*. 168, 1467–1476.
- Han S.K., Lee D., Lee H., Kim D., Son H.G., Yang J.S., Lee S.V., Kim S. (2016) OASIS 2: online application for survival analysis 2 with features for the analysis of maximal lifespan and healthspan in aging research. *Oncotarget*. 7, 56147–56152.
- Mendez S., Watanabe L., Hill R., Owens M., Moraczewski J., Rowe G.C., Riddle N.C., Reed L.K. (2016) The TreadWheel: a novel apparatus to measure genetic variation in response to gently induced exercise for *Drosophila*. *PLoS One*. 11, e0164706.
- 23. Spierer A.N., Yoon D., Zhu C.T., Rand D.M. (2021) FreeClimber: automated quantification of climb-
ing performance in Drosophila. J. Exp. Biol. 224, jeb229377.

- Popov D.V., Makhnovskii P.A., Shagimardanova E.I., Gazizova G.R., Lysenko E.A., Gusev O.A., Vinogradova O.L. (2019) Contractile activity-specific transcriptome response to acute endurance exercise and training in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 316, e605–e614.
- Wisniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods.* 6, 359–362.
- Popov D.V., Makhnovskii P.A., Zgoda V.G., Gazizova G.R., Vepkhvadze T.F., Lednev E.M., Motanova E.S., Lysenko E.A., Orlov O.I., Tomilovskaya E.S. (2023) Rapid changes in transcriptomic profile and mitochondrial function in human soleus muscle after 3-day dry immersion. *J. Appl. Physiol.* (1985). 134, 1256–1264.
- Yu S.H., Kyriakidou P., Cox J. (2020) Isobaric matching between runs and novel PSM-level normalization in MaxQuant strongly improve reporter ionbased quantification. *J. Proteome Res.* 19, 3945–3954.
- Shilova V.Y., Zatsepina O.G., Garbuz D.G., Funikov S.Y., Zelentsova E.S., Schostak N.G., Kulikov A.M., Evgen'ev M.B. (2018) Heat shock protein 70 from a thermotolerant Diptera species provides higher thermoresistance to *Drosophila* larvae than correspondent endogenous gene. *Insect. Mol. Biol.* 27, 61–72.
- Xiao C., Hull D., Qiu S., Yeung J., Zheng J., Barwell T., Robertson R.M., Seroude L. (2019) Expression of heat shock protein 70 is insufficient to extend *Drosophila melanogaster* longevity. *G3* (Bethesda). 9, 4197–4207.
- Campisi J., Kapahi P., Lithgow G.J., Melov S., Newman J.C., Verdin E. (2019) From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. *Nature*. 571, 183–192.
- Goh J., Wong E., Soh J., Maier A.B., Kennedy B.K. (2023) Targeting the molecular & cellular pillars of human aging with exercise. *FEBS J.* 290, 649–668.
- 32. Bisset E.S., Heinze-Milne S., Grandy S.A., Howlett S.E. (2022) Aerobic exercise attenuates frailty in aging male and female C57Bl/6 mice and effects systemic cytokines differentially by sex. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 77, 41–46.
- Garcia-Valles R., Gomez-Cabrera M.C., Rodriguez-Manas L., Garcia-Garcia F.J., Diaz A., Noguera I., Olaso-Gonzalez G., Vina J. (2013) Life-long spontaneous exercise does not prolong lifespan but improves health span in mice. *Longev. Healthspan.* 2, 14.
- Wen D.T., Zheng L., Ni L., Wang H., Feng Y., Zhang M. (2016) The expression of CG9940 affects the adaptation of cardiac function, mobility, and lifespan to exercise in aging *Drosophila*. *Exp. Gerontol.* 83, 6–14.
- Wen D.T., Wang W.Q., Hou W.Q., Cai S.X., Zhai S.S. (2020) Endurance exercise protects aging *Drosophila* from high-salt diet (HSD)-induced climbing capacity

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

decline and lifespan decrease by enhancing antioxidant capacity. *Biol. Open.* **9**, bio045260.

- Li Q.F., Wang H., Zheng L., Yang F., Li H.Z., Li J.X., Cheng D., Lu K., Liu Y. (2019) Effects of modest hypoxia and exercise on cardiac function, sleep-activity, negative geotaxis behavior of aged female *Drosophila*. *Front Physiol.* **10**, 1610.
- Ebanks B., Wang Y., Katyal G., Sargent C., Ingram T.L., Bowman A., Moisoi N., Chakrabarti L. (2021) Exercising *D. melanogaster* modulates the mitochondrial proteome and physiology. The effect on lifespan depends upon age and sex. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 11606.
- Piazza N., Gosangi B., Devilla S., Arking R., Wessells R. (2009) Exercise-training in young *Drosophila melanogaster* reduces age-related decline in mobility and cardiac performance. *PLoS One.* 4, e5886.
- Sujkowski A., Bazzell B., Carpenter K., Arking R., Wessells R.J. (2015) Endurance exercise and selective breeding for longevity extend *Drosophila* health span by overlapping mechanisms. *Aging* (Albany NY). 7, 535–552.
- Demontis F., Piccirillo R., Goldberg A.L., Perrimon N. (2013) Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from *Drosophila* and mammalian models. *Dis. Model. Mech.* 6, 1339–1352.
- Hunt L.C., Jiao J., Wang Y.D., Finkelstein D., Rao D., Curley M., Robles-Murguia M., Shirinifard A., Pagala V.R., Peng J., Fan Y., Demontis F. (2019) Circadian gene variants and the skeletal muscle circadian clock contribute to the evolutionary divergence in longevity across *Drosophila* populations. *Genome Res.* 29, 1262–1276.
- 42. Chechenova M., Stratton H., Kiani K., Gerberich E., Alekseyenko A., Tamba N., An S., Castillo L., Czajkowski E., Talley C., Bryantsev A. (2023) Quantitative model of aging-related muscle degeneration: a *Drosophila* study. *bioRxiv*. Feb. 21, 2023.02.19.529145 doi: https://doi.org/10.1101/2023.02.19.529145
- Borsch A., Ham D.J., Mittal N., Tintignac L.A., Migliavacca E., Feige J.N., Ruegg M.A., Zavolan M. (2021) Molecular and phenotypic analysis of rodent models reveals conserved and species-specific modulators of human sarcopenia. *Commun. Biol.* 4, 194.
- Lagerwaard B., Nieuwenhuizen A.G., Bunschoten A., de Boer V.C.J., Keijer J. (2021) Matrisome, innervation and oxidative metabolism affected in older compared with younger males with similar physical activity. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle.* 12, 1214–1231.
- 45. Su J., Ekman C., Oskolkov N., Lahti L., Strom K., Brazma A., Groop L., Rung J., Hansson O. (2015) A novel atlas of gene expression in human skeletal muscle reveals molecular changes associated with aging. *Skelet. Muscle.* 5, 35.
- 46. Hunt L.C., Graca F.A., Pagala V., Wang Y.D., Li Y., Yuan Z.F., Fan Y., Labelle M., Peng J., Demontis F. (2021) Integrated genomic and proteomic analyses identify stimulus-dependent molecular changes associated with distinct modes of skeletal muscle atrophy. *Cell Rep.* 37, 109971.

- 47. Wheeler J.C., Bieschke E.T., Tower J. (1995) Muscle-specific expression of *Drosophila hsp70* in response to aging and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**, 10408–10412.
- Попов Д.В., Виноградова О.Л., Згода В.Г. (2019) Подготовка образцов скелетной мышцы человека для протеомных исследований с использованием изобарической метки iTRAQ. *Молекуляр. биология*. 53, 685–691.
- 49. Deshmukh A.S., Murgia M., Nagaraj N., Treebak J.T., Cox J., Mann M. (2015) Deep proteomics of mouse skeletal muscle enables quantitation of protein isoforms, metabolic pathways, and transcription factors. *Mol. Cell Proteomics.* **14**, 841–853.
- Makhnovskii P.A., Zgoda V.G., Bokov R.O., Shagimardanova E.I., Gazizova G.R., Gusev O.A., Lysenko E.A., Kolpakov F.A., Vinogradova O.L., Popov D.V. (2020). Regulation of proteins in human skeletal muscle: the role of transcription. *Sci. Rep.* 10, 3514.
- Rudler D.L., Hughes L.A., Viola H.M., Hool L.C., Rackham O., Filipovska A. (2021) Fidelity and coordination of mitochondrial protein synthesis in health and disease. *J. Physiol.* **599**, 3449–3462.

- 52. Khalimonchuk O., Bird A., Winge D.R. (2007) Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* **282**, 17442–17449.
- 53. Mymrikov E.V., Daake M., Richter B., Haslbeck M., Buchner J. (2017) The chaperone activity and substrate spectrum of human small heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **292**, 672–684.
- 54. Bo Zheng N., Ruan L., Kline J.T., Omkar S., Sikora J., Texeira Torres M., Wang Y., Takakuwa J.E., Huguet R., Klemm C., Segarra V.A., Winters M.J., Pryciak P.M., Thorpe P.H., Tatebayashi K., Li R., Fornelli L., Truman A.W. (2022) Comprehensive characterization of the Hsp70 interactome reveals novel client proteins and interactions mediated by posttranslational modifications. *PLoS Biol.* 20, e3001839.
- 55. Adriaenssens E., Asselbergh B., Rivera-Mejias P., Bervoets S., Vendredy L., De Winter V., Spaas K., de Rycke R., van Isterdael G., Impens F., Langer T., Timmerman V. (2023) Small heat shock proteins operate as molecular chaperones in the mitochondrial intermembrane space. *Nat. Cell Biol.* 25, 467–480.

# Knockout of *Hsp70* Genes Modulates Age-Related Transcriptomic Changes in Leg Muscles, Reduces Locomotion Speed and Lifespan of *Drosophila melanogaster*

I. V. Kukushkina<sup>1,2</sup>, P. A. Makhnovskii<sup>1</sup>, V. G. Zgoda<sup>3</sup>, N. S. Kurochkina<sup>1</sup>, D. V. Popov<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123007 Russia <sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia <sup>3</sup>Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121 Russia \*e-mail: danil-popoy@vandex.ru

The study investigated the effect of knockout of six Hsp70 genes (orthologues of the mammalian genes Hspa1a, Hspa1b, Hspa2 and Hspa8) on age-related changes in gene expression in the legs of *Drosophila melanogaster*, which contain predominantly skeletal muscle bundles. For this, the leg transcriptomic profile was examined in males of the  $w^{1118}$  control line and the  $Hsp70^-$  line on the 7th, 23rd and 47th days of life. In  $w^{1118}$  flies, an age-related decrease in the locomotion (climbing) speed (a marker of functional state and endurance) was accompanied by a pronounced change in the transcriptomic profile of the leg skeletal muscles, which is conservative in nature. In  $Hsp70^-$  flies, the median lifespan was shorter and the locomotion speed was significantly lower compare to the control; at the same time, complex changes in the age-related dynamics of the skeletal muscle transcriptome were observed. Mass spectrometry-based quantitative proteomic showed that 47-day-old  $Hsp70^-$  flies, compared with  $w^{1118}$ , demonstrated multidirectional changes in the content of key enzymes of glucose metabolism and fat oxidation (glycolysis, pentose phosphate pathway, Krebs cycle, beta-oxidation and oxidative phosphorylation). Such dysregulation may be associated with a compensatory increase in the expression of other genes encoding chaperones (small Hsp, Hsp40, 60, and 70), which regulate specific sets of target proteins. Taken together, our data show that knockout of six Hsp70 genes slightly reduces the median lifespan of flies, but significantly reduces the locomotion speed, which may be associated with complex changes in the transcriptome of the leg skeletal muscles and with multidirectional changes in the content of key enzymes of a flies, but significantly reduces the locomotion speed, which may be associated with complex changes in the transcriptome of the leg skeletal muscles and with multidirectional changes in the content of key enzymes of energy metabolism.

Keywords: skeletal muscle, aging, heat shock proteins, transcriptome, proteome

### — ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА —

УДК 577.29

# ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК ТР53TG1, LINC00342, MALAT1, H19 И MEG3 ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ТИПА 2

© 2024 г. О. В. Кочетова<sup>а, \*</sup>, Д. Ш. Авзалетдинова<sup>b</sup>, Г. Ф. Корытина<sup>a</sup>

<sup>а</sup>Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа, 450035 Россия <sup>b</sup>Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, 450000 Россия

\*e-mail: olga\_mk78@mail.ru Поступила в редакцию 12.05.2023 г. После доработки 17.10.2023 г. Принята к публикации 20.10.2023 г.

Рост заболеваемости сахарным диабетом привел к увеличению числа пациентов с хроническими осложнениями, которые рассматривают как основные причины инвалидизации при этом заболевании. Длинные некодирующие РНК (днРНК) играют важную роль в регуляции экспрессии генов и участвуют в формировании различных патологических процессов. Нами проведен анализ экспрессии генов днРНК ТР53ТG1, LINC00342, MALAT1, H19, MEG3 у пациентов с сахарным диабетом типа 2 (СД2) с разным клинико-метаболическим статусом, а также с риском развития такого осложнения, как лиабетическая ретинопатия. В исследовании принял участие 121 человек: 51 пациент с СД2 и 70 условно здоровых индивидов. Выявлено снижение уровня днРНК ТР53ТG1 и LINC00342 у пациентов с СД2 и повышение уровня MALAT1 и MEG3 на уровне тенденции. Уровень днРНК Н19 у пациентов с ретинопатией был выше, чем у пациентов без этого осложнения. Обнаружено снижение уровней днРНК ТР53ТG1 и LINC00342 и повышение уровня MALAT1 у пациентов с ретинопатией по сравнению с контролем. Выявлена положительная корреляция между уровнями днРНК Н19 и триглицеридов, в то время как уровни днРНК LINC00342 и TP53TG1 положительно коррелировали с показателями гликемического контроля (количество HbA1с и уровень глюкозы натощак). Уровень днРНК МАLAT1 отрицательно коррелирует с уровнем липопротеинов высокой плотности и положительно - с уровнем липопротеинов низкой плотности. Снижение уровня экспрессии TP53TG1 и LINC00342 и повышение уровня MALAT1 при СД2, а также ассоциация с показателями гликемического контроля указывают на участие этих днРНК в развитии СД2 и диабетической ретинопатии. Данные днРНК можно, по-видимому, рассматривать в качестве потенциальных ранних диагностических маркеров СД2.

**Ключевые слова:** сахарный диабет типа 2, днРНК, MALAT1, MEG3, H19, LINC00342 **DOI:** 10.31857/S0026898424020075, **EDN:** NJLNDC

#### введение

Сахарный диабет типа 2 (СД2) – многофакторное заболевание, обусловленное комбинированным взаимодействием генетических, эпигенетических и внешнесредовых факторов [1].

Недавние исследования выявили изменение экспрессии длинных некодирующих РНК (днРНК), к которым относятся некодирующие РНК, состоящие более чем из 200 нуклеотидов, при многих патологических состояниях человека [2, 3]. Известно, что днРНК могут влиять на транскрипцию, взаимодействуя с белками, ремоделирующими хроматин, а также модулируя связывание факторов транскрипции с сайтами-мишенями [4]. Некоторые днРНК могут влиять на альтернативный сплайсинг белоккодирующих генов или регулировать стабильность белка в ядре [5]. ДнРНК способны регулировать экспрессию генов на посттрансляционном уровне: взаимодействуя с комплементарными участками микроРНК и мРНК генов-мишеней, они контролируют устойчивость мРНК или влияют на белок-белковые взаимодействия [6].

Исследования последних лет подтверждают существование связи между нарушением регуляции днРНК и формированием опухолевых, сердечно-сосудистых, воспалительных и метаболических заболеваний [7, 8]. Однако роль днРНК в развитии патологических состояний человека и молекулярные механизмы их действия остаются недостаточно изученными. В нашей работе оценена предиктивная значимость дифференциальной экспрессии ряда днРНК в формировании СД2 и диабетической ретинопатии. С этой целью определена экспрессия генов следующих днРНК: TP53TG1 (TP53 Target 1), LINC00342 (long intergenic non-protein coding RNA 342), MALAT1 (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1), H19 (H19 imprinted maternally expressed transcript) и MEG3 (maternally expressed 3).

днРНК ТР53ТG1 влияет на альтернативный сплайсинг мРНК, пролиферацию клеток и апоптоз, а также является частью сигнального пути ТР53. Повышенная экспрессия гена *ТР53ТG1* при онкологических заболеваниях приводит к ингибированию клеточной пролиферации и усиливает апоптоз. Установлено, что экспрессия гена *TP53TG1* зависит от уровня глюкозы - при сниженном содержании глюкозы экспрессия этого гена значительно возрастает. Согласно данным базы KEGG, днРНК ТР53TG1 принимает участие в ингибировании гена инсулиноподобного фактора pocta (IGF, Insulin-like growth factor), ключевого для метаболизма глюкозы [9]. Продукт гена *TP53TG1* участвует в метилировании m6A, что важно для формирования метаболических расстройств [10].

Продукт гена LINC00342 участвует в процессах гликолиза, при этом как чрезмерная экспрессия, так и отсутствие LINC00342 приводят к перепрограммированию метаболизма глюкозы в макрофагах и развитию инсулинорезистентности (ИР) [11, 12]. днРНК LINC00342 регулирует экспрессию гена деметилазы FTO. ключевого фермента, участвующего в деметилировании m<sup>6</sup>A в PHK и модификации эукариотических мРНК. Как известно, этот процесс играет важную роль в регуляции дифференцировки преадипоцитов в адипоциты, что способствует липогенезу и отложению жировой ткани и обуславливает развитие таких заболеваний, как ожирение, сахарный диабет и метаболический синдром [13, 14].

днРНК МАLAT1 активно изучается при СД2. Повышение уровня днРНК МALAT1 в сыворотке больных СД2 [3] способствует прогрессированию таких осложнений СД2, как нейропатия, ретинопатия, нефропатия и сердечно-сосудистые заболевания [15, 16]. днРНК MALAT1 участвует в регуляции сигнальных путей PI3K/Akt, MAPK/ERK и Wnt/ $\beta$  [15]. Нокдаун гена *MALAT1* ослабляет апоптоз эндотелиальных клеток, индуцированный высоким содержанием глюкозы [17]. Ген *MALAT1* играет важную роль в регуляции чувствительности к инсулину, а ингибирование экспрессии гена днРНК MALAT1 рассматривается как потенциальная терапевтическая мишень при СД2. Однако данные, полученные в разных работах, противоречивы. Например, показано как увеличение, так и снижение экспрессии гена *MALAT1* у пациентов с СД2 с осложнениями [3, 18].

Импринтированный ген *H19* экспрессируется только с материнской хромосомы, он играет важную роль в эмбриогенезе и связан с развитием генетических расстройств. Изучение экспрессии днРНК H19 показало, что уровень экспрессии гена *H19* тесно связан с развитием СД2 и его осложнений [19]. Установлено снижение уровня экспрессии гена *H19* в мышцах при СД2, а также его влияние на гены-мишени днРНК H19, такие как ген рецептора инсулина и липопротеинлипазы. Снижение уровня экспрессии гена *H19* приводит к развитию ИР [20].

*MEG3* — это ген, импринтированный по материнской линии. Выявлено, что ген *MEG3* ассоциирован с развитием ИР печени, у пациентов с СД2 повышен уровень экспрессии этого гена [21]. Zhu X. и соавт. [22] показали, что нокдаун гена *MEG3* усиливает экспрессию гена микроР-НК 214 и ингибирует экспрессию ее гена-мишени *ATF4* (активирующий фактор транскрипции 4), что, в свою очередь, подавляет экспрессию гена *FOXO1* и ряда других генов, кодирующих ферменты глюконеогенеза. Уровень ИР снижается при подавлении глюконеогенеза [22].

Таким образом, исследования последних лет показывают, что днРНК, участвующие в регуляции гомеостаза глюкозы, способствуют прогрессированию СД2 [23]. Однако на сегодняшний день не найдены биомаркеры, связанные с ранним выявлением или прогрессированием СД2. В этой связи назрела необходимость изучения биомаркеров для диагностики и выявления заболевания на ранней стадии. Цель настоящего исследования состояла в изучении экспрессии генов днРНК ТР53TG1, LINC00342, MALAT1, H19, MEG3 у пациентов с СД2, ассоциации уровней этих днРНК с количественными метаболическими параметрами, характеризующими СД2, а также с риском развития диабетической ретинопатии.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Нами проведено обследование 121 человека – 51 пациента с СД2 и 70 условно здоровых индивидов (контрольная группа). Средняя продолжительность СД2 составила 10.0 ± 7.11 лет. Описание групп представлено в табл. 1. Использовали следующие критерии включения в группу СД2: верифицированный диагноз СД2, установленный согласно критериям ВОЗ (1999– 2013 гг.) и алгоритмам диагностики, принятым в Российской Федерации от 2022 г. [24], отсутствие родства между пациентами. Критерии включения в контрольную группу: отсутствие клинических и лабораторных признаков нарушений углеводного обмена, отсутствие хронических эндокринологических заболеваний в анамнезе. Критериями исключения из группы контроля были: возраст < 35 лет, гипергликемия, тяжелые хронические заболевания. Пациенты находились на стационарном лечении в Городской клинической больнице №21 г. Уфы.

Параметр	Контроль n=70	СД2 n=51	р
Возраст, лет, среднее ± Std.Dv	51.60 ± 10.31	59.88± 10.11	0.036
Мужчины, <i>n</i> (%)	26 (37.15)	17 (33.34)	0.213
Женщины, <i>n</i> (%)	44 (62.85)	34 (66.66)	
Индекс массы тела (ИМТ, кг/м <sup>2</sup> ), среднее $\pm$ SD	25.44 ± 2.97	$31.92 \pm 5.82$	< 0.0001
Лечение:			
Метформин	-	38 (74.51)	—
Другие препараты		13 (24.49)	
Ожирение, <i>n</i> (%)	-	37 (72.54)	_
Длительность СД2, медиана [Q1;Q3]	-	10.00 [3; 15]	—
Артериальная гипертензия, n (%)	-	41 (80.40)	—
Сердечно сосудистые заболевания, <i>n</i> (%)	-	4 (7.84)	—
Диабетическая нефропатия, <i>n</i> (%)	-	48 (94.11)	—
Диабетическая нейропатия, <i>n</i> (%)	-	47(92.15)	—
Диабетическая ретинопатия, <i>n</i> (%)	-	22 (43.13)	—
HbA <sub>1C</sub> (%), медиана [Q1;Q3]	4.89 [3.8; 5.90]	9.30 [7.30; 14.10]	< 0.0001
Глюкоза натощак (ммоль/л), медиана [Q1;Q3]	4.82 [3.20; 5.90]	9.60 [6.95; 12.55]	< 0.0001
Общий холестерин (ммоль/л), медиана [Q1;Q3]	4.79 [3.30; 6.50]	4.94 [4.34; 5.57]	0.0007
ЛПНП (ммоль/л), медиана [Q1;Q3]	2.71 [0.78; 3.99]	2.98 [1.81; 3.85]	< 0.006
ЛПВП (ммоль/л), медиана [Q1;Q3]	1.11 [0.87; 1.43]	1.13 [0.71; 1.17]	0.080
Триглицериды (ммоль/л), медиана [Q1;Q3]	1.33 [1.10; 2.07]	2.34 [1.75; 3.49]	0.029

В анализе использовали образцы цельной крови. Мононуклеарные клетки (моноциты и лимфоциты) выделяли из цельной крови в градиенте плотности фиколла. Суммарную РНК выделяли из мононуклеарных клеток (лимфоцитов и моноцитов) периферической крови с использованием peaktuba TRIzol reagent и протокола фирмы "Invitrogen" США или аналога ExtractR-NA ("Евроген", Россия). Для анализа экспрессии были выбраны гены следующих днРНК -TP53TG1 (ID:11257), LINC00342 (ID:150759). H19 (ID:283120), MALAT1 (ID:378938), MEG3 (ID:55384). Качество и количество РНК-матрицы (в нг/мкл) оценивали спектрофотометрически (NanoDrop 1000, "ThermoScientific", США) по поглощению при длине волны 260 нм. Качество РНК определяли по соотношению А<sub>260</sub>/ A<sub>280</sub>. Целостность РНК оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле. Синтез кДНК проводили с использованием набора MMLV RT kit ("Евроген") и гексамерных рандомных праймеров. Экспрессию генов днРНК анализировали на приборе StepOnePlus ("Applied Biosystems", США). ПЦР проводили в 96-луночных планшетах. Реакционные смеси объемом 25 мкл содержали специфические праймеры (представлены в табл. 2), флуоресцентный зонд фирмы "ДНК-Синтез" (Россия) и реагенты

для ПЦР qPCRmix-HS HighROX ("Евроген"). Дизайн и синтез праймеров осуществлен ООО "ДНК-Синтез" (Россия). В качестве эндогенного контроля использован ген домашнего хозяйства (В2М). В качестве референсного образца использовали образцы контрольной группы, ПЦР для каждого образца повторяли трижды. В каждую реакцию включали отрицательный контроль, не содержащий кДНК. Для удаления геномной ДНК РНК обрабатывали ДНКазой I ("Thermo Fisher Scientific") согласно инструкции производителя.

Методы статистического анализа данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ SPSS Statistics 22 (США), GraphPad Prism version 8.0.1 (Graph-Pad Software Inc, США). Относительный уровень экспрессии оценивали с помощью метода  $\Delta\Delta Ct$ [25]. Рассчитывали значение  $E^{-\Delta\Delta Ct}$ , (E = 2.0). Результаты нормировали по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства и соответствующих генов согласно следующей схеме  $\Delta Ct = Ct$  (целевой ген) – Ct (ген домашнего хозяйства). По оси ординат отложен уровень относительной экспрессии ( $E^{-\Delta Ct}$ ). Различия в уровне относительной экспрессии между группой больных и в контроле рассчитывали с помощью пара-

днРНК	Праймер
TP53TG1	F:5'-GGCTCTTTCCTTTAATCTTCGG-3' R:5'-GAATTGTTACCAGGGTTACTCAGAC-3' FAM-TGCCCAACTCAGGTTTAACCACCA-BHQ1
H19	F:5'-GAATCGGCTCTGGAAGGTGA-3' R:5'-GCTGCTGTTCCGATGGTG-3' FAM-CCAGACCTCATCAGCCCAACATC-BHQ1
LINC00342	F:5'-TTTCATCTGAAGCAGCAGAGTG-3' R:5'-CAGTTGTGGTGATCTTTGTTCCTG-3' FAM-CAGAGTCAGGTCACCAACCAGTGTGGA-BHQ1
MALAT1	F:5'-GAACACAAGAAGTGCTTTAAGAGGC-3' R:5'-GCGAGGCGTATTTATAGACGG-3' FAM-AGGTGATCGAATTCCGGTGATGC-BHQ1
MEG3	F:5'-GCCCATCTACACCTCACGAG-3' R:5'-CCTCTTCATCCTTTGCCATCC-3' FAM-CCCACCAACATACAAAGCAGCCACT-BHQ1

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности использованных праймеров

метрического *t*-критерия Стьюдента (T-test), для использования параметрических статистических тестов окончательные результаты экспрессии генов преобразовали в логарифмические значения. Взаимосвязь между экспрессией днРНК и клиническими параметрами оценивали с помощью корреляционного теста Пирсона. Величины  $p \leq 0.05$  считали статистически значимыми. Для учета множественных сравнений использовали поправку  $p_{FDR}$  (https://www.sdmproject.com/utilities/?show=FDR).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами не выявлено значимых различий в уровнях экспрессии генов днРНК ТР53ТG1, LINC00342, MALAT1, H19 и MEG3 в группах женщин и мужчин (p = 0.81, p = 0.18, p = 0.75, p = 0.25, p = 0.27). Сравнение общей группы пациентов с контрольной группой показало, что уровень днРНК ТР53ТG1 у пациентов был снижен в 1.7 раза (p = 0.016,  $p_{FDR} = 0.033$ ), уровень днРНК LINC00342 — в 2 раза (p = 0.021,  $p_{FDR} = 0.033$ ). Уровень днРНК Н19 был одинаковым в обеих группах — у пациентов и здоровых индивидов (p = 0.20), а уровень днРНК MALAT1 в группе пациентов был повышен в 3.5 раза (p = 0.0001,  $p_{FDR} = 0.0005$ ). Уровень днРНК MEG3 в группе пациентов был повышен, однако различия не достигали уровня статистической значимости (p = 0.05,  $p_{FDR} = 0.062$ ) (рис. 1).

Оценивали также связь между уровнем днРНК и диабетической ретинопатией, поскольку другие осложнения, такие как артериальная гипертензия, диабетическая нефропатия и нейропатия присутствовали почти у всех пациентов (сравнивали группы пациентов с осложнением и без, а также пациентов с осложнениями и контрольную группу). При сравнении пациентов с ретинопатией и без ретинопатии статистически значимые различия были выявлены только для днРНК Н19, уровень которой у пациентов с ретинопатией был в 2.9 раза выше  $(p = 0.04, p_{FDR} = 0.05)$ . У пациентов с диабетической ретинопатией уровень днРНК ТР53ТG1 был в 1.4 раза ниже, чем у лиц контрольной группы  $(p = 0.04, p_{FDR} = 0.05)$ , уровень днРНК LINC00342 был снижен в 2 раза  $(p = 0.04, p_{FDR} = 0.05)$ , а уровень днРНК MALAT1 повышен в 5 раз  $(p = 0.0001, p_{FDR} = 0.0005)$ . В группе больных без диабетической ретинопатии уровень экспрессии гена *MEG3* был в 2 раза выше, чем в группе пациентов с диабетической ретинопатией  $(p = 0.05, p_{FDR} = 0.05)$ . Однако эти различия были на уровне тенденции.

Далее мы сравнили уровни экспрессии генов днРНК у пациентов, принимающих метформин или получающих другие препараты, и не выявили статистически значимых различий (рис. 1). Для генов днРНК ТР53TG1, LINC00342, MALAT1, H19 и MEG3 уровни значимости (*p*) составили: 0.36, 0.98, 0.22, 0.23, 0.75 соответственно.

Анализ ассоциации днРНК между собой и с количественными метаболическими параметрами выявил положительную ассоциацию между уровнями H19 и триглицеридов (r = 0.865, p = 0.0001), уровнем LINC00342 с уровнем глюкозы натощак (r = 0.439, p = 0.002). Уровни днРНК ТР53ТG1 и LINC00342 были положительно ассоциированы с уровнем HbA1c (r = 0.334, p = 0.02 и r = 0.332, p = 0.021 соответственно). Уровень днРНК MALAT1 отрицательно ассоциирован с уровнем ЛПВП (r = -0.672, p = 0.012) и положительно с уровнем ЛПНП (r = 0.336, p = 0.017), в то время как уровень днРНК LINC00342 положительно ассоциирован с уровнем днРНК TP53TG1 (r = 0.497, р = 0.0001) (табл. 3).



**Рис. 1.** Сравнение уровней экспрессии генов *TP53TG1*, *LINC00342*, *H19*, *MALAT1* и *MEG3* у пациентов с СД2, в контрольной группе, у пациентов с диабетической ретинопатией и в контроле, а также в зависимости от проводимого лечения. Величины относительной экспрессии (2<sup>-ΔCt</sup>) представлены в виде значений среднего ± SEM. М – пациенты, принимающие метформин, БМ – пациенты, принимающие другие препараты, РП – пациенты с диабетической ретинопатией.

Параметр	TP53TG1	LINC00342	MALAT1	H19	MEG3
Общий холестерин, ммоль/л	0.096	0.193	0.219	-0.049	0.151
Триглицериды, мкмоль/л	-0.003	0.274	0.143	$0.865^{**}$	0.348
ЛПВП, ммоль/л	-0.219	-0.332	$-0.672^{*}$	0.125	-0.153
ЛПНП, ммоль/л	0.170	-0.002	0.336*	-0.314	-0.104
Глюкоза натощак, ммоль/л	0.232	0.439**	0.088	-0.040	0.045
HbA1c, %	0.335*	0.332*	0.092	-0.080	0.048
TP53TG1	1	0.497**	0.085	0.078	0.042
LINC00342	0.497**	1	0.063	0.158	0.001
MALAT1	0.085	0.063	1	-0.045	0.141
H19	0.078	0.158	-0.045	1	0.045
MEG3	0.042	0.001	0.141	0.045	1

Таблица 3. Коэффициенты корреляции уровней днРНК и метаболических параметров

\*Уровень значимости менее -0.05.

\*Уровень значимости менее -0.01.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами обнаружено снижение уровня экспрессии генов *TP53TG1* и *LINC00342*, кодирующих днРНК, у пациентов СД2, в то время как уровень экспрессии генов *MALAT1* и *MEG3* у пациентов был выше, чем в контрольной группе. Среди пациентов с диабетической ретинопатией также выявлено снижение уровней экспрессии генов *TP53TG1* и *LINC00342* по сравнению с контролем, повышение экспрессии гена *MALAT1*, а также обнаружена тенденция к увеличению экспрессии гена *MEG3* у пациентов без ретинопатии по сравнению с пациентами с ретинопатией.

Изучение уровня экспрессии генов LINC00342 и ТР53ТG1 у пациентов с СД2 проведено впервые, тогда как повышение уровней экспрессии генов MALAT1 и MEG3 в крови пациентов с СД2 подтверждено и другими авторами [3, 26]. Вместе с тем, описанное несоответствие между результатами анализа экспрессии днРНК, например H19 и MALAT1, у пациентов с СД2 [27], по-видимому, можно объяснить различиями в изучаемых тканях, наличием или отсутствием осложнений у испытуемых, а также проводимым лечением, "стажем" СД2 и уровнем гликемии. Также описана обратная взаимосвязь между уровнями экспрессии днРНК, полученной из клеток крови и других тканей [28]. Отмечено, что днРНК, выделяемая из периферической крови, отражает метаболический статус испытуемых, поэтому кровь является валидным источником для проведения ранней диагностики СД2 и его осложнений [29].

Гены в сети коэкспрессии с геном *LINC00342* относятся к путям, связанным с апоптозом

и воспалительной реакцией. Ранее методом анализа обогащения по функциональной принадлежности показано влияние днРНК LINC00342 на экспрессию генов PTEN и TP53 [30]. Выключение гена LINC00342 приводило к усилению экспрессии генов PTEN и TP53 в клетках немелкоклеточного рака легкого [31], тогда как повышение уровня экспрессии гена LINC00342 в крови ассоциировано с расчетной скоростью клубочковой фильтрации при хронической почечной недостаточности [30]. Показано, что повышение экспрессии гена LINC00342 при злокачественных новообразованиях приводит к угнетению апоптоза в опухолевых клетках [31]. Установлено, что уровень экспрессии гена LINC00342 выше у пациентов с лиабетической нефропатией [13]. Снижение уровня экспрессии гена LINC00342 считается одним из ключевых маркеров риска острого инфаркта миокарда [32]. днРНК LINC00342 регулирует экспрессию генов FTO и METTL3, ключевых участников процессов метилирования. Аномальные изменения метилирования m6A, деметилаз и метилтранфераз влияют на работу β-клеток, обуславливают развитие гипергликемии и прогрессирование СД2 [33]. Нами установлена положительная корреляция между уровнями днРНК LINC00342 глюкозы и HbAc1, что позволяет предположить существование связи между уровнем экспрессии гена LINC00342 и тяжестью заболевания. Несоответствие между уровнями экспрессии может отражать различия в степени экспрессии днРНК в разных тканях, а также свидетельствовать о воздействии внешних факторов, например. проводимого лечения или особенностей питания.

Продукт гена *TP53TG1* участвует в регуляции метаболизма глюкозы, взаимодействуя с про-

дуктами генов *FOXK1*, *GCK*. Снижение уровня экспрессии гена *TP53TG1* отмечено при раке желудка [34]. Показано, что экспрессия гена *TP53TG1* регулируется глюкозой: повышается при низком уровне глюкозы и снижается при ее высоком уровне [35]. Более того, предполагается, что уровень глюкозы обуславливает экспрессию гена *TP53TG1* и свойства этого гена как защитные, так и канцерогенные [35]. Возможно, разнообразные эффекты аберрантной экспрессии TP53TG1 на патогенез СД2 обусловлены действием различных механизмов, в том числе влиянием на такие сигнальные пути, как пути WNT/ $\beta$ -катенина и PI3K/AKT.

Участие днРНК Н19 в регуляции метаболических заболеваний было показано еще в 2014 году [36]. Установлено, что ингибирование экспрессии гена *H19* малой интерферирующей РНК в гепатоцитах мыши приводило к повышению уровня глюкозы в крови. В клетках HepG2 ингибирование гена Н19 нарушало передачу сигналов инсулина, опосредованную повышенной ядерной локализацией регулятора транскрипции FOXO1 [37]. Установлено, что снижение уровня днРНК Н19 позволяет фактору Р53 (продукт гена *ТР53*) связываться с промотором гена FOXO1, что приводит к усилению продукции гликогена в печени. Повышение уровня днРНК Н19 у пациентов, напротив, приводит к усилению глюкогенеза [38]. Нами выявлена положительная корреляция Н19 и уровня триглицеридов, что совпадает с данными Liu J. и соавт. [39]. Показано, что повышенную экспрессию гена *H19* можно рассматривать как характерное молекулярное изменение при жировой болезни печени, а днРНК Н19 способствует стеатозу гепатоцитов, секреции триглицеридов [39].

Обнаружено значимое повышение уровня экспрессии гена *MALAT1* у пациентов с СД2, причем как с ретинопатией, так и без этого осложнения. Повышение уровня днРНК MALAT1 в сетчатке глаза пациентов с диабетической рети нопатией было установлено ранее. Оказалось, что ген *MALAT1* активируется в сетчатке в условиях высокого уровня глюкозы, в то время как нокдаун гена *MALAT1* ослабляет проявления ретинопатии у крыс [40]. Выявлено как снижение уровня днРНК MALAT1 в крови пациентов с СД2 и метаболическим синдромом, так и его повышение [3]. Сверхэкспрессия гена *MALAT1* служит важным маркером дисфункции и пролиферации эндотелиальных клеток и микрососудистых осложнений СД2 [3]. Считается, что повышенный уровень MALAT1 способствует увеличению уровня цитокинов и воспалению, что делает MALAT1 одной из ключевых молекул, регулирующих воспаление при СД2 [41]. Существование обратной корреляции между уровнями днРНК MALAT1 и липопротеинов низкой плотности подтверждается данными, свидетельствующими о том, что выключение гена *MALAT1* усиливает индукцию липопротеинов низкой плотности [42].

Обнаружена тенденция к увеличению уровня днРНК МЕG3 среди пациентов с СД2 по сравнению с контролем и у пациентов без ретинопатии по сравнению с пациентами, имеющими это осложнение, однако различия не достигали уровня статистической значимости. Ранее сообщалось, что уровень MEG3 повышен в сыворотке крови, в мононуклеарах крови, а также в ткани почки пациентов с СД2 [43]. Установлено также, что повышенная экспрессия гена *MEG3* у пациентов способствует развитию ИР, тогда как снижение уровня днРНК MEG3 вызывает диабетическую дисфункцию микрососудов в сетчатке и приводит к диабетической ретинопатии [44].

Как показано ранее, метформин (один из основных препаратов при лечении СД2) может влиять на дифференциальную экспрессию генов днРНК, как это показано для генов днРНК Н19 и MALAT1 [38, 45]. В нашем исследовании наблюдалась лишь тенденция к снижению уровня днРНК MALAT1 и H19 у пациентов, принимающих метформин. Эта тенденция соответствует данным [31], а отсутствие статистически значимых различий может быть результатом использования разных доз препарата.

днРНК LINC00342, TP53TG1, MALAT1, H19 и MEG3 являются мультифункциональными, они воздействуют на патогенез СД2 посредством различных механизмов. Несоответствия между уровнями экспрессии днРНК у пациентов с СД2 в работах разных авторов могут быть обусловлены выбором ткани, использованной для анализа. Можно предположить, что особенности экспрессии генов днРНК определяются клеточным окружением. Наличие противоречий в результатах анализа уровней экспрессии генов днРНК предполагает проведение дальнейших более глубоких исследований.

Результаты определения дифференциальной экспрессии генов *TP53TG1*, *LINC00342* и *MALAT1*, а также корреляция между уровнями днРНК и показателями гликемического контроля свидетельствуют об их участии в формировании СД2 и диабетической ретинопатии и могут рассматриваться в качестве ранних диагностических маркеров СД2 и его осложнений.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант №22-25-00010).

Все процедуры, выполненные в исследовании, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям. Исследование одобрено на заседании экспертного совета по биомедицинской этике Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН, протокол №8 от 14.03.2012. Все испытуемые подписывали информированное добровольное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Fuchsberger C., Flannick J., Teslovich T.M., Maha-1. jan A., Agarwala V., Gaulton K.J., Ma C., Fontanillas P., Moutsianas L., McCarthy D.J., Rivas M.A., Perry J.R.B., Sim X., Blackwell T.W., Robertson N.R., Rayner N.W., Cingolani P., Locke A.E., Tajes J.F., Highland H.M., Dupuis J., Chines P.S., Lindgren C.M., Hartl C., Jackson A.U., Chen H., Huyghe J.R., van de Bunt M., Pearson R.D., Kumar A., Müller-Nurasyid M., Grarup N., Stringham H.M., Gamazon E.R., Lee J., Chen Y., Scott R.A., Below J.E., Chen P., Huang J., Go M.J., Stitzel M.L., Pasko D., Parker S.C.J., Varga T.V., Green T., Beer N.L., Day-Williams A.G., Ferreira T., Fingerlin T., Horikoshi M., Hu C., Huh I., Ikram M.K., Kim B.J., Kim Y., Kim Y.J., Kwon M.S., Lee J., Lee S., Lin K.H., Maxwell T.J., Nagai Y., Wang X., Welch R.P., Yoon J., Zhang W., Barzilai N., Voi-ght B.F., Han B.G., Jenkinson C.P., Kuulasmaa T., Kuusisto J., Manning A., Ng M.C.Y., Palmer N.D., Balkau B., Stančáková A., Abboud H.E., Boeing H., Giedraitis V., Prabhakaran D., Gottesman O., Scott J., Carey J., Kwan P., Grant G., Smith J.D., Neale B.M., Purcell S., Butterworth A.S., How-son J.M.M., Lee H.M., Lu Y., Kwak S.H., Zhao W., Danesh J., Lam V.K.L., Park K.S., Saleheen D., So W.Y., Tam C.H.T., Afzal U., Aguilar D., Arya R., Aung T., Chan E., Navarro C., Cheng C.Y., Palli D., Correa A., Curran J.E., Rybin D., Farook V.S., Fowler S.P., Freedman B.I., Griswold M., Hale D.E., Hicks P.J., Khor C.C., Kumar S., Lehne B., Thuillier D., Lim W.Y., Liu J., van der Schouw Y.T., Loh M., Musani S.K., Puppala S., Scott W.R., Yengo L., Tan S.T., Taylor H.A. Jr., Thameem F., Wilson G. Sr., Wong T.Y., Njølstad P.R., Levy J.C., Mangino M., Bonnycastle L.L., Schwarzmayr T., Fadista J., Surdulescu G.L., Herder C., Groves C.J., Wieland T., Bork-Jensen J., Brandslund I., Christensen C., Koistinen H.A., Doney A.S.F., Kinnunen L., Esko T., Farmer A.J., Hakaste L., Hodgkiss D., Kravic J., Lyssenko V., Hollensted M., Jørgensen M.E., Jørgensen T., Ladenvall C., Justesen J.M., Käräjämäki A., Kriebel J., Rathmann W., Lannfelt L., Lauritzen T., Narisu N., Linneberg A., Melander O., Milani L., Neville M., Orho-Melander M., Qi L., Qi Q., Roden M., Rolandsson O., Swift A., Rosengren A.H.,

Stirrups K., Wood A.R., Mihailov E., Blancher C., Carneiro M.O., Maguire J., Poplin R., Shakir K., Fennell T., DePristo M., de Angelis M.H., Deloukas P., Gjesing A.P., Jun G., Nilsson P., Murphy J., Onofrio R., Thorand B., Hansen T., Meisinger C., Hu F.B., Isomaa B., Karpe F., Liang L., Peters A., Huth C., O'Rahilly S.P., Palmer C.N.A., Pedersen O., Rauramaa R., Tuomilehto J., Salomaa V., Watanabe R.M., Syvänen A.C., Bergman R.N., Bharadwaj D., Bottinger E.P., Cho Y.S., Chandak G.R., Chan J.C.N., Chia K.S., Daly M.J., Ebrahim S.B., Langenberg C., Elliott P., Jablonski K.A., Leh-man D.M., Jia W., Ma R.C.W., Pollin T.I., Sandhu M., Tandon N., Froguel P., Barroso I., Teo Y.Y., Zeggini E., Loos R.J.F., Small K.S., Ried J.S., DeFronzo R.A., Grallert H., Glaser B., Metspalu A., Wareham N.J., Walker M., Banks E., Gieger C., Ingelsson E., Im H.K., Illig T., Franks P.W., Buck G., Trakalo J., Buck D., Prokopenko I., Mägi R., Lind L., Farjoun Y., Owen K.R., Gloyn A.L., Strauch K., Tuomi T., Kooner J.S., Lee J.Y., Park T., Donnelly P., Morris A.D., Hattersley A.T., Bowden D.W., Collins F.S., Atzmon G., Chambers J.C., Spector T.D., Laakso M., Strom T.M., Bell G.I., Blangero J., Duggirala R., Tai E.S., McVean G., Hanis C.L., Wilson J.G., Seielstad M., Frayling T.M., Meigs J.B., Cox N.J., Sladek R., Lander E.S., Gabriel S., Burtt N.P., Mohlke K.L., Meitinger T., Groop L., Abecasis G., Florez J.C., Scott L.J., Morris A.P., Kang H.M., Boehnke M., Altshuler D., McCarthy M.I. (2016) The genetic architecture of type 2 diabetes. Nature. 536(7614), 41-47.

- 2. Li R., Zhu H., Luo Y. (2016) Understanding the functions of long non-coding RNAs through their higher-order structures. *Int. J. Mol. Sci.* **17**(5), 702.
- 3. Alfaifi M., Ali Beg M.M., Alshahrani M.Y., Ahmad I., Alkhathami A.G., Joshi P.C., Alshehri O.M., Alamri A.M., Verma A.K. (2021) Circulating long non-coding RNAs NKILA, NEAT1, MALAT1, and MIAT expression and their association in type 2 *diabetes mellitus. BMJ Open Diabetes Res. Care.* 9(1), e001821.
- López-Noriega L., Rutter G.A. (2021) Long non-coding RNAs as key modulators of pancreatic β-cell mass and function. *Front. Endocrinol.* (Lausanne). 11, 610213.
- Xiong L., Gong Y., Wu L., Li J., He W., Zhu X., Xiao H. (2020) LncRNA-MALAT1 is involved in lipotoxicity-induced β-cell dysfunction and the therapeutic effect of exendin-4 via Ptbp1. *Endocrinology*. 161(7), bqaa065. 10.1210/endocr/bqaa065
- Noh J.H., Kim K.M., McClusky W.G., Abdelmohsen K., Gorospe M. (2018) Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 9(3), e1471. 10.1002/wrna.147
- Новикова Л.Б., Гареев И.Ф., Раскуражев А.А., Бейлерли О.А., Минибаева Г.М. (2020) Роль длинных некодирующих РНК в ишемическом инсульте. Анналы Клин. Экспер. Неврологии. 14(1), 70-77.

- Sohrabifar N., Ghaderian S., Alipour P.S., Ghaedi H., Jafari H. (2022) Variation in the expression level of MALAT1, MIAT and XIST lncRNAs in coronary artery disease patients with and without type 2 diabetes mellitus. Arch. Physiol. Biochem. 128(5), 1308-1315.
- Lu Q., Guo P., Liu A., Ares I., Martínez-Larrañaga M.R., Wang X., Anadón A., Martínez M.A. (2021) The role of long noncoding RNA in lipid, cholesterol, and glucose metabolism and treatment of obesity syndrome. *Med. Res. Rev.* 41(3), 1751–1774.
- Chen X., Gao Y., Li D., Cao Y., Hao B. (2017) LncRNA-TP53TG1 participated in the stress response under glucose deprivation in glioma. *J. Cell Biochem*. 118(12), 4897–4904.
- Li T., Tong H., Zhu J., Qin Z., Yin S., Sun Y., Liu X., He W. (2022) Identification of a three-glycolysis-related lncRNA signature correlated with prognosis and metastasis in clear cell renal cell carcinoma. *Front. Med.* (Lausanne). 8, 777507.
- Russo S., Kwiatkowski M., Govorukhina N., Bischoff R., Melgert B.N. (2021) Meta-inflammation and metabolic reprogramming of macrophages in diabetes and obesity: the importance of metabolites. *Front. Immunol.* 12, 74615.
- Li C., Su F., Liang Z., Zhang L., Liu F., Fan W., Li Z. (2022) Macrophage M1 regulatory diabetic nephropathy is mediated by m6A methylation modification of lncRNA expression. *Mol. Immunol.* 144, 16-25.
- Yang Z., Yu G.L., Zhu X., Peng T.H., Lv Y.C. (2022) Critical roles of FTO-mediated mRNA m6A demethylation in regulating adipogenesis and lipid metabolism: implications in lipid metabolic disorders. *Genes Diseases.* 9(1), 51–61.
- Braga E.A., Fridman M.V., Moscovtsev A.A., Filippova E.A., Dmitriev A.A., Kushlinskii N.E. (2020) LncRNAs in ovarian cancer progression, metastasis, and main pathways: ceRNA and alternative mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 21(22), 8855.
- 16. Cremer S., Michalik K.M., Fischer A., Pfisterer L., Jaé N., Winter C., Boon R.A., Muhly-Reinholz M., John D., Uchida S., Weber C., Poller W., Günther S., Braun T., Li D.Y., Maegdefessel L., Perisic Matic L., Hedin U., Soehnlein O., Zeiher A., Dimmeler S. (2019) Hematopoietic deficiency of the long noncoding RNA MALAT1 promotes atherosclerosis and plaque inflammation. *Circulation*. **139**(10), 1320–1334.
- Che F., Han Y., Fu J., Wang N., Jia Y., Wang K., Ge J. (2021) LncRNA MALAT1 induced by hyperglycemia promotes microvascular endothelial cell apoptosis through activation of the miR-7641/TPR axis to exacerbate neurologic damage caused by cerebral small vessel disease. *Ann. Transl. Med.* 9(24), 1762.
- Milluzzo A., Maugeri A., Barchitta M., Sciacca L., Agodi A. (2021) Epigenetic mechanisms in type 2 diabetes retinopathy: a systematic review. *Int. J. Mol. Sci.* 22(19), 10502.

- Wang S., Duan J., Liao J., Wang Y., Xiao X., Li L., Liu Y., Gu H., Yang P., Fu D., Du J., Li X., Shao M. (2022) LncRNA H19 inhibits ER stress induced apoptosis and improves diabetic cardiomyopathy by regulating PI3K/AKT/mTOR axis. *Aging* (Albany NY). 14(16), 6809–6828.
- Kumar A., Datta M. (2022) H19 inhibition increases HDAC6 and regulates IRS1 levels and insulin signaling in the skeletal muscle during diabetes. *Mol. Med.* 28(1), 81.
- Yang W., Lyu Y., Xiang R., Yang J. (2022) Long noncoding RNAs in the pathogenesis of insulin resistance. *Int. J. Mol. Sci.* 23(24), 16054.
- Zhu X., Wu Y.B., Zhou J., Kang D.M. (2016) Upregulation of lncRNA MEG3 promotes hepatic insulin resistance via increasing FoxO1 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469(2), 319–325.
- Unnikrishnan R., Pradeepa R., Joshi S.R., Mohan V. (2017) Type 2 diabetes: demystifying the global epidemic. *Diabetes*. 66(6), 1432–1442.
- 24. Дедов И.И., Шестакова М.В., Майоров А.Ю., Мокрышева Н.Г., Викулова О.К., Галстян Г.Р., Шестакова Е.А. (2022) Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Под ред. Дедова И.И., Шестаковой М.В., Майорова А.Ю. 10-й выпуск. Сахарный диабет. 24(1S), 1-148.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. *Methods*. 25(4), 402–408.
- 26. Alrefai A.A., Khader H.F., Elbasuony H.A., Elzorkany K.M., Saleh A.A. (2023) Evaluation of the expression levels of lncRNAs H19 and MEG3 in patients with type 2 *diabetes mellitus*. *Mol. Biol. Rep.* 50(7), 6075–6085. doi: 10.1007/s11033-023-08569-0
- 27. Taheri M., Eghtedarian R., Ghafouri-Fard S., Omrani M.D. (2023) Non-coding RNAs and type 2 *diabetes mellitus. Arch. Physiol. Biochem.* **129**(2), 526–535.
- Huang Y., Zhou Z., Zhang J., Hao Z., He Y., Wu Z., Song Y., Yuan K., Zheng S., Zhao Q., Li T., Wang B. (2021) lncRNA MALAT1 participates in metformin inhibiting the proliferation of breast cancer cell. *J. Cell Mol. Med.* 25(15), 7135–7145.
- 29. Tang H., Zhao L., Li M., Li T., Hao Y. (2019) Investigation of LINC00342 as a poor prognostic biomarker for human patients with non-small cell lung cancer. *J. Cell. Biochem.* **120**(4), 5055–5061.
- Liu C., Xu Y., Wu X., Zou Q. (2019) Clinical significance of linc00342 expression in the peripheral blood lymphocytes of patients with chronic kidney disease. *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.* 12, 251–256.
- 31. Yao Z.X., Tu J.H., Liu Y.L., Xue X.F., Qin L. (2023) Long non-coding RNA LINC00342 promotes the proliferation, invasion, and migration of primary hepatocellular carcinoma cells by regulating the expression of miRNA-19a-3p, miRNA-545-5p, and miRNA-203a-3p. *Biochem. Genet.* doi: 10.1007/ s10528-023-10420-x

- Shen L.S., Hu X.F., Chen T., Shen G.L., Cheng D. (2019) Integrated network analysis to explore the key mRNAs and lncRNAs in acute myocardial infarction. *Math. Biosci. Eng.* 16(6), 6426–6437.
- Zhang W., Zhang S., Dong C., Guo S., Jia W., Jiang Y., Wang C., Zhou M., Gong Y.A. (2022) Bibliometric analysis of RNA methylation in *diabetes mellitus* and its complications from 2002 to 2022. *Front. Endocrinol.* (Lausanne). 13, 997034.
- Chen X., Gao Y., Li D., Cao Y., Hao B. (2017) LncRNA-TP53TG1 participated in the stress response under glucose deprivation in glioma. *J. Cell Biochem*. 118(12), 4897–4904.
- 35. Fang D., Ou X., Sun K., Zhou X., Li Y., Shi P., Zhao Z., He Y., Peng J., Xu J. (2022) m6A modification-mediated lncRNA TP53TG1 inhibits gastric cancer progression by regulating CIP2A stability. *Cancer Sci.* 113(12), 4135–4150.
- Kornfeld J.W., Brüning J.C. (2014) Regulation of metabolism by long, non-coding RNAs. *Front. Genet.* 5, 57.
- Goyal N., Sivadas A., Shamsudheen K.V., Jayarajan R., Verma A., Sivasubbu S., Scaria V., Datta M. (2017) RNA sequencing of db/db mice liver identifies lncRNA H19 as a key regulator of gluconeogenesis and hepatic glucose output. *Sci. Rep.* 7(1), 8312.
- Parvar S.N., Mirzaei A., Zare A., Doustimotlagh A.H., Nikooei S., Arya A., Alipoor B. (2023) Effect of metformin on the long non-coding RNA expression levels in type 2 diabetes: an *in vitro* and clinical trial study. *Pharmacol. Rep.* 75(1), 189–198.

- Liu J., Tang T., Wang G.D., Liu B. (2019) LncRNA-H19 promotes hepatic lipogenesis by directly regulating miR-130a/PPARγ axis in non-alcoholic fatty liver disease. *Biosci. Rep.* 39(7), BSR20181722
- 40. Leung A., Natarajan R. (2018) Long noncoding RNAs in diabetes and diabetic complications. *Antioxid. Redox Signal.* **29**(11), 1064–1073.
- 41. Gordon A.D., Biswas S., Feng B., Chakrabarti S. (2018) MALAT1: a regulator of inflammatory cytokines in diabetic complications. *Endocrinol. Diabetes Metab.* 1(2), e00010.
- 42. Li S., Sun Y., Zhong L., Xiao Z., Yang M., Chen M., Wang C., Xie X., Chen X. (2018) The suppression of ox-LDL-induced inflammatory cytokine release and apoptosis of HCAECs by long non-coding RNA-MALAT1 via regulating microRNA-155/SOCS1 pathway. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 28(11), 1175–1187.
- 43. Heydari N., Sharifi R., Nourbakhsh M., Golpour P., Nourbakhsh M. (2023) Long non-coding RNAs TUG1 and MEG3 in patients with type 2 diabetes and their association with endoplasmic reticulum stress markers. *J. Endocrinol. Invest.* **46**(7), 1441–1448.
- 44. Qiu G.Z., Tian W., Fu H.T., Li C.P., Liu B. (2016) Long noncoding RNA-MEG3 is involved in *diabetes mellitus*-related microvascular dysfunction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **471**(1), 135–141.
- 45. Xia C., Liang S., He Z., Zhu X., Chen R., Chen J. (2018) Metformin, a first-line drug for type 2 *diabetes mellitus*, disrupts the MALAT1/miR-142-3p sponge to decrease invasion and migration in cervical cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* **830**, 59–67.

## THE EXPRESSION OF LONG NON-CODING RNAs TP53TG1, LINC00342, MALAT1, H19 and MEG3 IN TYPE 2 *Diabetes mellitus*

O. V. Kochetova<sup>1</sup>, D. Sh. Avzaletdinova<sup>2</sup>, G. F. Korytina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia <sup>2</sup>Bashkir State Medical University, Ufa, 450098 Russia

\*e-mail: olga\_mk78@mail.ru

Type 2 diabetes is a complex and multifactorial metabolic disorder. The frequency of type 2 diabetes has dramatically increased worldwide. Long non-coding RNAs play a regulatory role in pathological processes of type 2 diabetes. The aim of the study was to analyze lncRNA TP53TG1, LINC00342, MALAT1, H19, MEG3 in patients with type 2 diabetes and metabolic parameters, as well as the risk of diabetic retinopathy. Participants included 51 patients with diabetes and 70 healthy individuals. The expression of *TP53TG1* and *LINC00342* genes was significantly decreased in the patients with diabetes compared to healthy individuals. *MALAT1* gene expression was higher in diabetes patient. *H19* gene was increased in the patients with diabetic retinopathy compare patients without retinopathy. TP53TG1, LINC00342 and MEG3 expression was decreased in the patients with diabetic retinopathy and MALAT1 expression was increased. H19 is positively correlated with triglyceride levels, TP53TG1 and LINC00342 are positively correlated with HbA1c levels and fasting glucose levels. MALAT1 is negatively correlated with HDL levels and positively correlated with LDL levels. A decrease in the expression level of TP53TG1 and LINC00342 and an increase in the level of MALAT1 in diabetes, as well as an association with glycemic control, indicate the role of the studied non-coding RNAs in the development of type 2 *diabetes mellitus* and retinopathy and can be considered as candidates for early diagnosis of type 2 diabetes.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus, lncRNA, MALAT1, MEG3, H19, LINC00342

— ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА =

УДК 577.27

# АЛЛЕЛЬ rs2564978(T), АССОЦИИРОВАННЫЙ С ТЯЖЕЛЫМ ТЕЧЕНИЕМ ГРИППА А, НАРУШАЕТ САЙТ СВЯЗЫВАНИЯ ФАКТОРА МИЕЛОИДНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ PU.1 И СНИЖАЕТ АКТИВНОСТЬ ПРОМОТОРА ГЕНА *CD55/DAF* В МАКРОФАГАХ

© 2024 г. А. Н. Уварова<sup>а,\*</sup>, Е. А. Ткаченко<sup>b,c</sup>, Е. М. Стасевич<sup>a</sup>, Э. А. Богомолова<sup>b,d</sup>, Э. А. Жеремян<sup>b,c</sup>, Д. В. Купраш<sup>a,c,d</sup>, К. В. Корнеев<sup>a,e</sup>

<sup>а</sup>Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

<sup>b</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

<sup>с</sup>Биологический факультет Московского государственного университета

им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

<sup>d</sup> Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия <sup>e</sup> Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской

Федерации, Москва, 125167 Россия \*e-mail: uvarowww@gmail.com Поступила в редакцию 27.09.2023 г. После доработки 23.10.2023 г. Принята к публикации 23.10.2023 г.

Ингибитор системы комплемента CD55/DAF экспрессируется на многих типах клеток. Нарушения экспрессии CD55 ассоциированы с повышенной тяжестью инфекции, вызванной вирусом гриппа типа A, а также с сосудистыми осложнениями на фоне патологий, связанных с избыточной активацией системы комплемента. С использованием люциферазной репортерной системы нами проведен функциональный анализ однонуклеотидного полиморфизма rs2564978, расположенного в промоторе гена *CD55*, минорный T-аллель которого ассоциирован с тяжелым течением гриппа A(H1N1) pdm09. Показано снижение активности промотора гена *CD55* в присутствии минорного варианта rs2564978(T) в клеточной модели макрофагов человека — активированных клетках линии U937. С использованием биоинформатических ресурсов определен потенциальный транскрипционный фактор PU.1, который может аллель-специфически связываться с промотором *CD55* в области, содержащей rs2564978. Участие PU.1 в модуляции активности промотора *CD55* верифицировано путем генетического нокдауна PU.1 с помощью малых интерферирующих PHK и с использованием специфически активации моноцитов.

Ключевые слова: CD55/DAF, SNP, PU.1/SPI1, система комплемента DOI: 10.31857/S0026898424020089, EDN: NIRUNT

#### введение

Мембранный белок CD55, также известный как DAF (decay accelerating factor, фактор ускорения распада комплемента), является ингибитором системы комплемента, широко представленным на иммунных клетках, а также на клетках стромы, эпителия и эндотелия [1]. Ген *CD55* располагается на хромосоме 1 и имеет 23 охарактеризованных транскрипта, 10 из которых белоккодирующие по данным Ensembl [2]. Согласно FANTOM5 hg38 human promoterome (https://fantom.gsc.riken.jp/zenbu/) основной старт транскрипции располагается в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) первого

Сокращения: DAF – decay accelerating factor (фактор ускорения распада комплемента); SNP – single-nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм); ChIP-Seq – Chromatin Immunoprecipitation-sequencing (иммунопреципитация хроматина); ЛПС – липополисахарид; PMA – phorbol-12-myristate 13-acetate (форбол-12-миристат-13-ацетат); PBS – phosphate-buffered saline (фосфатно-солевой буфер); siPHK – small interfering RNA (малые интерферирующие PHK); 5'-HTO – 5'-нетранслируемая область; ТФ – транскрипционный фактор.

экзона, общего для всех белоккодирующих изоформ [3]. CD55 обнаруживается в растворимой форме, но наиболее он представлен в мембранной форме, содержащей С-концевой гликозилфосфатидилинозитольный якорь [4]. CD55 защищает собственные клетки от системы комплемента с помощью дестабилизации конвертаз СЗ и С5 [5]. Система комплемента, являющаяся частью врожденной иммунной системы, состоит из каскада протеолитических взаимодействий, которые приводят к непосредственному уничтожению патогена/инфицированной клетки. а также к рекрутированию иммунных клеток, участвующих в реакции воспаления [6]. CD55, экспрессирующийся на моноцитах, также может участвовать в адаптивных иммунных реакциях, подавляя активность Т-клеток за счет взаимодействия с молекулой адгезии CD97 на их поверхности [7].

Врожденные нарушения экспрессии CD55 ассоциированы с развитием аутоиммунных заболеваний [8, 9]. CHAPLE-синдрома (включает в себя гиперактивацию комплемента, ангиопатический тромбоз, энтеропатию с потерей белка) [10], пароксизмальной ночной гемоглобинурией [11]. Снижение экспрессии CD55 и последующая активация системы комплемента ассоциированы с микрососудистыми осложнениями на фоне сахарного диабета типа 2 [12, 13]. У пациентов с ишемической болезнью сердца наблюдалась более низкая экспрессия CD55 на поверхности моноцитов, чем у здоровых индивидов [14]. При многих онкологических заболеваниях (колоректальный рак, рак желудка, рак яичников, лейкоз и др.) уровень экспрессии CD55, наоборот, повышается, что приводит к снижению комплементзависимой противоопухолевой цитотоксичности [1]. CD55 может способствовать прогрессии энтеровирусных инфекций, поскольку он является клеточным рецептором для ряда энтеровирусов [15]. Вирус иммунодефицита человека типа 1 (HIV-1), Т-лимфотропный вирус человека типа 1 (HTLV-1), цитомегаловирус человека (HCMV) и некоторые другие вирусы могут включать в свои вирионы CD55 для уклонения от системы комплемента [16]. Показано также участие CD55 в проникновении в эритроциты малярийного плазмодия, однако при церебральной малярии, в развитии которой система комплемента играет важную роль, CD55, видимо, выполняет защитную функцию [17]. В целом из-за сложных взаимодействий компонентов системы комплемента с ее регуляторами, патогенами и эффекторными клетками при инфекциях тяжесть заболевания и смертность могут быть связаны как с избыточной, так и с недостаточной активацией системы комплемента. Так, при инфицировании вирусом гриппа типа А матриксный белок М1 блокирует взаимодействие между IgG и C1qA, тем

самым ингибируя классический путь активации комплемента [18]; при этом дисрегуляция CD55 увеличивает тяжесть гриппозной инфекции, вызванной вирусом гриппа А, вследствие гиперактивации системы комплемента и повреждения клеток хозяина [19]. Аналогичная ситуация наблюдается при инфицировании SARS-CoV-2: избыточная активация системы комплемента сопровождается компенсаторным повышением уровня CD55 на моноцитах [20].

В промоторной области гена *CD55* располагается однонуклеотидный полиморфизм (SNP) rs2564978(C>T), минорный Т-аллель которого ассоциирован с тяжелой формой гриппа A(H1N1)pdm09 [21-23]. Кроме того, известно, что уровень мРНК CD55 в моноцитах инфицированных пациентов с генотипом rs2564978(TT) значительно снижен по сравнению с носителями С-аллеля [21]. При этом в репортерных тестах при наличии мажорного С-аллеля rs2564978 наблюдалось снижение активности промотора CD55 в клетках рака легкого, а в популяционных исследованиях найдена ассоциация этого варианта с повышенным риском возникновения немелкоклеточного рака легкого, рака пищевода, а также с энтеровирусным везикулярным стоматитом [24-26].

В представленной работе нами показана rs2564978-зависимая регуляция активности промотора *CD55* в клеточной модели макрофагов человека, а также выявлен потенциальный фактор транскрипции ( $T\Phi$ ), который в этих клетках может аллель-специфически связываться с областью, содержащей rs2564978.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биоинформатическое определение границ промоторной области и поиск транскрипционного фактора, аллель-специфически связывающегося в области SNP. Область промотора CD55 уточняли при помоши данных ENCODE [27]. Roadmap [28] и ChromHMM [29], визуализированных в геномном браузере UCSC Genome Browser (http://genome.ucsc.edu/), на основании эпигенетических признаков регуляторных областей: пиков ацетилирования Lys27 гистона H3 (H3K27Ac), моно- и триметилирования Lys4 гистона H3 (H3K4me1, H3K4me3), а также данных о чувствительности к ДНКазе I и наличию сайтов посадки ТФ. Для поиска потенциальных ТФ, аллель-специфически связывающихся с областью вокруг rs2564978, использовали биоинформатический ресурс ADASTRA (Allelic Dosage-corrected Allele-Specific human Transcription factor binding sites) [30] и параметры: FDR threshold = 0.05; ES threshold = 0. Этот ресурс содержит обширные данные об аллель-специфическом связывании Т $\Phi$  с полиморфизмами в разных типах клеток, базирующиеся на данных о предсказании мотива Т $\Phi$  (HOCOMO-CO v11, SPRy-SARUS) и аллель-специфичных ChIP-Seq.

Клонирование репортерных конструкций. Активность промотора CD55, содержащего альтернативные варианты rs2564978, оценивали с использованием двойного люциферазного теста. Для этого промоторную последовательность CD55 (chr1:207320724-207321763: GRCh38/hg38. без учета инсерции rs28371582(TAGTTACTTC-СССТССТТССС)) амплифицировали с геномной ДНК ("Promega", США) при помощи ПЦР с использованием специфических праймеров, содержащих сайты рестрикции HindIII и Ncol (промотор-CD55-HindIII-Fw TTAAGCTTAC-GTGATTCTAATGTGTGGGCCA; промотор-CD55-NcoI-Rev TTTTCCATGGCGCGCGG-GTTAGAACAA). Затем промоторную область CD55 клонировали по соответствующим сайтам рестрикции перед репортерным геном люциферазы Firefly в вектор pGL3-basic ("Promega"). Минорный Т-аллель rs2564978 в последовательность промотора вводили с использованием ПЦР-направленного мутагенеза с перекрывающимися праймерами (промотор-CD55-overlaprs2564978-T-Fw TGTGTTATTCAACCTGTTTC-СССА; промотор-CD55-overlap-rs2564978-C-Rev GGTTGAATAACACAGTAGGGAGT) с помощью метода, описанного ранее [31]. Плазмиды выделяли с помощью набора Plasmid Midiprep ("Евроген", Россия) и верифицировали секвенированием по Сэнгеру (ЦКП "Геном", Россия).

Культивирование клеток, трансфекция и люциферазный тест. Моноциты U937 культивировали в среде RPMI 1640 ("ПанЭко", Россия) с добавлением 10% FBS ("Corning", США), 2 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все – "ПанЭко"), 1% раствора заменимых аминокислот и 10 мМ HEPES (все - "Gibco", США). Клетки активировали, добавляя в культуральную среду форбол-12-миристат-13-ацетат (PMA; "Sigma-Aldrich", США) в концентрации 1 мкг/мл и/или липополисахарид (ЛПС; E. coli O111:B4, L2630, "Sigma-Aldrich") в концентрации 100 нг/мл за 24 ч до трансфекции плазмидами, в качестве контроля активации добавляли фосфатно-солевой буфер (PBS). Клетки трансфицировали с использованием системы для электропорации Neon Transfection System ("Thermo Scientific", США). На одну точку брали 2.5 млн клеток, добавляли к ним 5 мкг тестируемых плазмид в сочетании с 0.5 мкг контрольного вектора pRL-CMV ("Promega"), экспрессирующего люциферазу Renilla под сильным CMV-промотором. Клетки подвергали электропорации с параметрами: один импульс напряжением 1400 В и длительностью 30 мс. Через 24 ч после трансфекции клетки лизировали с использованием набора Dual-Luciferase Reporter Assay System ("Promega") и измеряли сигнал от люцифераз *Firefly* и *Renilla* на люминометре 20/20n ("Turner BioSystems", США) согласно протоколу производителя.

Генетический нокдаун SPI1 (PU.1), измерение экспрессии генов. Экспрессию гена SPI1 (PU.1) в клетках U937 подавляли методом PHK-интерференции с использованием малых интерферирующих РНК (siPHK), комплементарных кодирующим участкам генов. Для нокдауна SPI1 и в качестве контрольных scramble PHK использовали ранее опубликованные последовательности пар siPHK [32], синтезированные фирмой "ДНК-синтез" (Россия) (табл. 1). Для получения дуплекса siPHK эквимолярные количества смысловых и антисмысловых олигонуклеотидов смешивали в буфере (10 мМ Трис, 20 мМ NaCl pH 8.0), нагревали раствор до 98 °C и медленно охлаждали до комнатной температуры. В первый день клетки U937 электропорировали дуплексами siPHK в количестве 500 пмоль на 2.5 млн клеток. Через 24 ч клетки U937 активировали PMA+ЛПС. На третий день клетки подвергали электропорации экспериментальными конструкциями и добавляли еще 300 пмоль того же дуплекса siPHK. На 4-й день измеряли активность люциферазы с помощью двойного люциферазного теста, а также отбирали часть клеток для выделения тотальной РНК и дальнейшего измерения экспрессии генов. Тотальную РНК выделяли с использованием реактива ExtractRNA ("Евроген", Россия) в соответствии с протоколом производителя. Обратную транскрипцию осуществляли с использованием праймеров олиго $(dT)_{18}$  и набора реактивов MMLV RT kit ("Евроген") в соответствии с протоколом производителя. Количество полученной кДНК измеряли на приборе Real-time CFX96 Touch ("Bio-Rad", США) с использованием готовой смеси qPCRmix-HS SYBR ("Евроген") и специфических праймеров (табл. 1) по протоколу производителя.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (версия 9.0.0. для Windows, GraphPad Software, США; www.graphpad.com). Для определения степени статистической значимости использовали непарный *t*-критерий Стьюдента. Данные получены не менее чем в трех независимых экспериментах и представлены как среднее значение  $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Значимое различие идентифицировали при P < 0.05. Таблица 1. Олигонуклеотиды, используемые для проведения генетического нокдауна и измерения экспрессии мРНК

Нуклеотидные последовательности siPHK				
PU.1-sense	GUCCGUAUGUAAAUCAGAUdTdT			
PU.1-antisense	AUCUGAUUUACAUACGGACdTdT			
scrambled-sense	GGAUGAACUUACGAUUCUAdTdT			
scrambled-antisense	UAGAAUCGUAAGUUCAUCCdTdT			
Праймеры для количественной ПЦР в реальном времени				
PU.1-Fw	GCGTGCAAAATGGAAGGGTTT			
PU.1-Rev	GGTATCGAGGACGTGCATCT			
ACTB-Fw	ACTGGGACGACATGGAGAAA			
ACTB-Rev	GGCGTACAGGGATAGCACAG			
CD55-Fw	TGCTCTCCAATCATGGTGAA			
CD55-Rev	CAGCACCACCACAAATTGAC			

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Активность промотора гена CD55 снижается в присутствии минорного аллеля rs2564978(T) в клеточной модели макрофагов человека по сравнению с промотором, содержащим С-аллель

Известно, что моноциты/макрофаги человека играют важную роль в противовирусном иммунном ответе [33], а уровень мРНК CD55 в моноцитах пациентов с генотипом rs2564978(TT), инфицированных вирусом, значительно снижен по сравнению с носителями С-аллеля [21]. Кроме того, согласно данным FANTOM5 (hg38, https:// fantom.gsc.riken.jp/zenbu/), среди иммунных клеток *CD55* наиболее высоко экспрессируется в CD14<sup>+</sup> моноцитах. Поэтому мы решили изучить влияние альтернативных аллелей rs2564978 на активность промотора *CD55* в клеточной линии U937 (модель моноцитов человека).

Мы выбрали область промотора СD55 (chr1:207320724-207321763; GRCh38/hg38), включающую полиморфизм rs2564978, опираясь на эпигенетические маркеры активного хроматина в CD14<sup>+</sup> моноцитах (высокие уровни молификации гистонов H3K4me3 и H3K27ac, сайты гиперчувствительности к ДНКазе I и кластеры сайтов связывания  $T\Phi$ ), а также на ранее опубликованные данные [21] (рис. 1). Геномный фрагмент, выбранный в качестве промотора для дальнейшего анализа, имеет общую длину около 1 т. п. н. и кодирует всю 5'-HTO CD55.

Затем мы клонировали в вектор pGL3-basic выбранную последовательность промотора *CD55* с альтернативными вариантами полиморфизма rs2564978 (рис. 2*a*) и трансфицировали полученными репортерными конструкциями неактивированные (после добавления PBS) и стимулированные РМА или РМА+ЛПС клетки U937. Известно, что активация РМА стимулирует дифференцировку моноцитов U937 в макрофагоподобные клетки с М0-подобным фенотипом, тогда как стимуляция клеток РМА совместно с ЛПС поляризует их в М1подобный фенотип [34, 35]. Экспрессия репортерного гена под контролем промотора CD55 сушественно возрастала в клетках U937 после



Рис. 1. Схематическое изображение расположения гs2564978 в промоторе гена CD55, визуализированное с помощью UCSC Genome Browser (GRCh38/hg38). Синим обозначена область промотора гена CD55. Красной вертикальной линией обозначено местонахождение однонуклеотидного полиморфизма rs2564978. Гистограммы показывают ной линией обозначено местонахождение однонуюлестидного полиморфизма тоготрим. Потограмма полодина поморфизма подотрити понормима понормима понормима подотрити понормима понормим Какаа понорми понорми понорми понормима п Какаа понормима понорми понормима понорми понормима п ров (ChIP-seq ENCODE). ChromHMM характеризует активность хроматина в нескольких субпопуляциях CD14 моноцитов (по данным Roadmap): красным и оранжевым обозначены промотороподобные, желтым – энхансероподобные области.

их активации (рис.  $2\delta$ ), наблюдалась также тенденция к повышению экспрессии эндогенной мРНК CD55 (рис.  $2\epsilon$ ). В нестимулированных моноцитах отсутствовала статистически значимая разница в активности промоторов, содержащих альтернативные аллели полиморфизма rs2564978, тогда как после стимуляции промотор, несущий минорный rs2564978(T) аллель, оказался менее активным по сравнению с промотором, содержащим мажорный С-аллель (рис.  $2\delta$ ).

### Транскрипционный фактор PU.1 (SPI1) участвует в аллель-зависимом влиянии полиморфизма rs2564978 на активность промотора CD55 в клеточной модели макрофагов

Разница в активности регуляторных элементов, содержащих альтернативные варианты SNP, может быть связана с аллель-зависимым связыванием конкретного ТФ в области SNP [36, 37]. Для поиска потенциального ТФ, аллель-специфически связывающегося с областью вокруг rs2564978, мы использовали биоинформатический ресурс ADASTRA, основанный на метаанализе данных ChIP-Seq [30]. Согласно ADASTRA, для CD14<sup>+</sup> моноцитов предсказано более эффективное связывание ТФ PU.1 с областью промотора *CD55*, содержащей мажорный rs2564978(C) аллель, но не минорный T-вариант (рис. 3*a*). PU.1 кодируется геном *SPI1* и является основным регулятором дифференцировки клеток миелоидного ряда [38]. Мы проанализировали изменение уровня транскрипции *SPI1* в зависимости от активации моноцитов U937. Наибольший уровень экспрессии эндогенной мPHK SPI1 наблюдается при "поляризации" моноцитов U937 в макрофагоподобные клетки (рис. 3*6*), что согласуется с результатами репортерного анализа (рис. 2*6*).

Для подтверждения участия PU.1 в аллель-зависимой регуляции активности промотора *CD55* проведен siPHK-опосредованный генетический нокдаун *SPI1* в активированных клетках U937 — эффективность подавления транскрипции *SPI1* превышала 90% (рис. 3*в*). Интересно, что при подавлении экспрессии PU.1 в активированных моноцитах нивелировалась разница в активности промоторов *CD55*, содержащих альтернативные аллели rs2564978 (рис. 3*г*), однако не наблюдалось статистиче-



**Рис. 2.** Активность промотора гена *CD55* снижается в присутствии минорного rs2564978(T) аллеля в клеточной модели макрофагов. a - Cхема люциферазной репортерной конструкции pGL3-basic, содержащей промотор гена *CD55* с альтернативными аллелями rs2564978.  $\delta - C$ тимуляция моноцитов U937 с помощью PMA или PMA+ЛПС увеличивает аллель-зависимую разницу в активности промотора *CD55*. Экспрессия репортерной люциферазы была нормализована по экспрессии люциферазы внутреннего контроля (*Renilla*). e - Oтносительный уровень эксперсии мPHK CD55 в неактивированных U937 (PBS) и после стимуляции PMA или PMA+ЛПС. На графиках представлены результаты трех экспериментов в виде средних значений  $\pm$  SEM. \*P < 0.05 - различие между вариантами rs2564978(C) и rs2564978(T), ##P < 0.0001 - различие между нестимулированными (PBS) и активированными клетками (непарный *t*-критерий Стьюдента).

ски значимого снижения экспрессии эндогенной мРНК CD55 (рис. 3 $\partial$ ). Полученные данные свидетельствуют о потенциальном участии TФ PU.1 в аллель-специфическом влиянии rs2564978 на активность промотора *CD55*, обусловленным менее эффективным связыванием PU.1 с областью вокруг rs2564978(T).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время благодаря полногеномным исследованиям (Genome-Wide Association Studies, GWAS) охарактеризовано множество ассоциаций SNP с различными заболеваниями, при этом примерно 95% клинически значимых SNP локализованы в некодирующих регуляторных областях генома [39]. Такое распределение может быть связано с изменением характеристик регуляторных областей, окружающих SNP, с последующим влиянием на экспрессию генов, т. е. SNP играют роль eQTL (Expression Quantitative Trait Loci, локус количественного признака экспрессии) патогенетически важных генов [40]. В представленной работе использованы генетические конструкции, содержащие промотор *CD55* с инсерцией rs28371582(ins) размером 21 п. н., расположенной на 68 п. н. проксимальнее rs2564978. По данным LDpair Tool [41] в глобальной популяции rs2564978 и rs28371582 (также известные как rs3841376 или rs150046210) находятся в неравновесном сцеплении (linkage disequilibrium, LD), причем генотип rs2564978(C) преимущественно встречается вместе с rs28371582(ins), а генотип rs2564978(T) - с делецией rs28371582(del); исключением является африканская популяция.



**Рис. 3.** Генетический нокдаун PU.1 (*SPI1*) в активированных моноцитах U937 снижает активность промотора *CD55*, содержащего мажорный гs2564978(C) аллель. a - Logo-диаграмма сайта связывания PU.1 (*SPI1*) из базы данных HOCOMOCO v11 и наложенные на нее последовательности промотора*CD55*, содержащие разные аллели rs2564978 (выделены цветом). Над последовательностями обозначены значения*P* $-value мотивов, которые характеризуют предсказанную специфичность связывания PU.1 для альтернативных аллелей. <math>\delta -$  Относительный уровень экспрессии мPHK SPI1 в неактивированных U937 (PBS), в стимулированных PMA или PMA+ЛПС моноцитах U937. \*P < 0.05 - различие между уровнем экспрессии мPHK SPI1 в PMA+ЛПС стимулированных моноцитах U937 и в неактивированных U937 (непарный *t*-критерий Стьюдента). e - Относительный уровень экспрессии мPHK SPI1 в клетках U937 при нокдауне *SPI1*. \*P < 0.05 (непарный *t*-критерий Стьюдента). e - Относительный уровень экспрессии мPHK SPI1 в клетках U937 при нокдауне *SPI1*. \*P < 0.05 (непарный *t*-критерий Стьюдента). e - Относительный уровень экспрессии мPHK SPI1 в клетках U937 при нокдауне *SPI1*. \*P < 0.05 (непарный *t*-критерий Стьюдента). e - Относительный уровень экспрессии мPHK SPI1 в клетках U937 при нокдауне *SPI1*. \*P < 0.05 (непарный *t*-критерий Стьюдента). e - Относительный уровень экспрессии мPHK SPI1 в активированных клетках линии U937. Нормирование по активности люциферазы внутреннего кондауне *SPI1* в активированных клетках линии U937. Нормирование по активности люциферазы внутреннего контроля. Контролем служили немодифицированные клетки (контроль) и трансфицированные неспецифической siPHK (siRNA-scr). \*P < 0.05 - различие между rs2564978(С) и rs2564978(С) вариантами (непарный *t*-критерий Стьюдента). \*P < 0.05 - различие между вариантом rs2564978(С) при нокдауне *SPI1*, контролем и siRNA-scr. d - Относительный уровень экспрессии мPHK CD55 при нокдауне *SPI1*. Представлены средние значения ± SEM, вычисленные по результатам трех экспериментов.

Кроме того, в азиатской популяции распространены сочетания rs2564978(C)/rs28371582(ins) и rs2564978(T)/rs28371582(del). Показано, что генотип rs2564978(T)/rs28371582(del) связан с более низкой активностью промотора CD55 по сравнению с генотипом rs2564978( $\hat{C}$ )/ rs28371582(ins) в клетках бронхиального эпителия (BEAS-2B) [21]. Результаты определения непосредственного влияния полиморфизма rs2564978 на активность промотора гена CD55 в активированных моноцитах свидетельствуют в пользу того, что снижение активности промотора *CD55* в присутствии минорного rs2564978 Т-аллеля, ассоциированного с тяжелой формой гриппа A(H1N1)pdm09, в клетках данного типа может происходить за счет нарушения связывания PU.1 с областью, содержащей rs2564978.

Вирус гриппа вызывает сезонные респираторные инфекции во многом благодаря быстрому распространению воздушно-капельным путем, а также присоединению вторичных бактериальных инфекций и суперинфекций [19, 43]. При инфицировании вирусом гриппа на клетках экспонируются вирусные белки гемагглютинин и нейраминидаза – мощная сиалидаза, расщепляющая сиаловую кислоту в составе CD55. В результате нарушается ингибирование конвертазы СЗ и происходит гиперактивания системы комплемента. Более того, присутствие гемагглютинина на клеточной мембране и распознавание десиалилированных поверхностных белков с помощью паттерираспознающих рецепторов может приводить к усиленной активации иммунного ответа и чрезмерному воспалению, способствуя повреждению тканей и ухулшая исхол заболевания [6]. Таким образом, снижение количества ингибитора системы комплемента CD55 на поверхности макрофагов является возможным объяснением ассоциации rs2564978(T) с тяжелой формой гриппа А, причем ТФ PU.1 представляется молекулярным медиатором этого процесса (рис. 4).

Интересно, что мажорный аллель rs2564978(C) ассоциирован с повышенной восприимчивостью к везикулярному стоматиту, вызываемому энтеровирусом, а также с более высоким риском



**Рис. 4.** Гипотетическая схема аллель-специфического влияния rs2564978 на развитие патологических осложнений, связанных с гиперактивацией системы комплемента (изображение сделано с помощью BioRender.com).

возникновения немелкоклеточного рака легкого и рака пищевода [25, 26]. По данным репортерного анализа в клеточных моделях рака легкого (A549, NCI-H2030, и NCI-H23) активность промотора *CD55*, содержащего rs2564978(T), была выше, чем у промотора, несущего rs2564978(C) [24], тогда как в клетках здорового эпителия легкого (BEAS-2B) отсутствовали достоверные различия в активности промотора *CD55*, содержащего альтернативные аллели rs2564978 [21]. Исхоля из этого, можно предположить, что механизмы влияния rs2564978 на экспрессию CD55 являются тканеспецифичными. Согласно нашим данным, в миелоидных клетках основным регулятором может выступать PU.1, но в эпителиальных клетках с противоположным эффектом полиморфизма за аллель-зависимое влияние rs2564978 на активность промотора может отвечать другой ТФ. Например, по данным ADASTRA, в эпителии пищевода с областью вокруг rs2564978(T) в промоторе *CD55* лучше связывается многофункциональный TФ CTCF, который может определять аллель-зависимый эффект в клетках этого типа, поскольку PU.1 экспрессируется в эпителиальных клетках на низком уровне (согласно FANTOM5 hg38 human promoterome).

Также стоит отметить, что гиперактивация системы комплемента способствует повреждению клеток эндотелия сосудов, которое считается причиной более тяжелого течения вирусных заболеваний (грипп, COVID-19) [44], а также сердечно-сосудистых осложнений при других патологиях. Так, низкий уровень экспрессии CD55 встречается у пациентов с сахарным диабетом типа 2, нефропатией, ретинопатией [46]. Мы предполагаем, что в генетическую предрасположенность к избыточной активации системы комплемента, являющейся причиной широкого спектра микрососудистых осложнений, может вносить вклад rs2564978(T)-зависимое снижение экспрессии CD55 на моноцитах и макрофагах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00987).

Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Dho S.H., Lim J.C., Kim L.K. (2018) Beyond the role of CD55 as a complement component. *Immune Netw.* **18**(1), e11.
- 2. Cunningham F., Allen J.E., Allen J., Alvarez-Jarreta J., Amode M.R., Armean I.M., Austine-Orim-

oloye O., Azov A.G., Barnes I., Bennett R., Berry A., Bhai J., Bignell A., Billis K., Boddu S., Brooks L., Charkhchi M., Cummins C., Da Rin Fioretto L., Davidson C., Dodiya K., Donaldson S., El Houdaigui B., El Naboulsi T., Fatima R., Giron C.G., Genez T., Martinez J.G., Guijarro-Clarke C., Gymer A., Hardy M., Hollis Z., Hourlier T., Hunt T., Juettemann T., Kaikala V., Kay M., Lavidas I., Le T., Lemos D., Marugán J.C., Mohanan S., Mushtaq A., Naven M., Ogeh D.N., Parker A., Parton A., Perry M., Pilizota I., Prosovetskaia I., Sakthivel M.P., Salam A.I.A., Schmitt B.M., Schuilenburg H., Sheppard D., Perez-Silva J.G., Stark W., Steed E., Sutinen K., Sukumaran R., Sumathipala D., Suner M.M., Szpak M., Thormann A., Tricomi F.F., Urbina-Gómez D., Veidenberg A., Walsh T.A., Walts B., Willhoft N., Winterbottom A., Wass E., Chakiachvili M., Flint B., Frankish A., Giorgetti S., Haggerty L., Hunt S.E., Iisley G.R., Loveland J.E., Martin F.J., Moore B., Mudge J.M., Muffato M., Perry E., Ruffier M., Tate J., Thybert D., Trevanion S.J., Dyer S., Har-rison P.W., Howe K.L., Yates A.D., Zerbino D.R., Flicek P. (2022) Ensembl 2022. Nucl. Acids Res. 50(D1), D988.

3. Forrest A.R.R., Kawaji H., Rehli M., Baillie J.K., De Hoon M.J.L., Haberle V., Lassmann T., Kulakovskiy I.V., Lizio M., Itoh M., Andersson R., Mungall C.J., Meehan T.F., Schmeier S., Bertin N., Jørgensen M., Dimont E., Arner E., Schmidl C., Schaefer U., Medvedeva Y.A., Plessy C., Vitezic M., Severin J., Semple C.A., Ishizu Y., Young R.S., Francescatto M., Altschuler I.A., Albanese D., Altschule G.M., Arakawa T., Archer J.A.C., Arner P., Babina M., Rennie S., Balwierz P.J., Beckhouse A.G., Pradhan-Bhatt S., Blake J.A., Blumenthal A., Bodega B., Bonetti A., Briggs J., Brombacher F., Burroughs A.M., Califano A., Cannistraci C.V., Carbajo D., Chen Y., Chierici M., Ciani Y., Clevers H.C., Dalla E., Davis C.A., Detmar M., Diehl A.D., Dohi T., Drabløs F., Edge A.S.B., Edinger M., Ekwall K., Endoh M., Enomoto H., Fagiolini M., Fairbairn L., Fang H., Farach-Carson M.C., Faulkner G.J., Favorov A.V., Fisher M.E., Frith M.C., Fujita R., Fukuda S., Furlanello C., Furuno M., Furusawa J.I., Geijtenbeek T.B., Gibson A.P., Gingeras T., Goldowitz D., Gough J., Guhl S., Guler R., Gustincich S., Ha T.J., Hamaguchi M., Hara M., Harbers M., Harshbarger J., Hasegawa A., Hasegawa Y., Hashimoto T., Herlyn M., Hitchens K.J., Sui S.J.H., Hofmann O.M., Hoof I., Hori F., Huminiecki L., Iida K., Ikawa T., Jankovic B.R., Jia H., Joshi A., Jurman G., Kaczkowski B., Kai C., Kaida K., Kaiho A., Kajiyama K., Kanamori-Katayama M., Kasianov A.S., Kasukawa T., Katayama S., Kato S., Kawaguchi S., Kawamoto H., Kawamura Y.I., Kawashima T., Kempfle J.S., Kenna T.J., Kere J., Khachigian L.M., Kitamura T., Klinken S.P., Knox A.J., Kojima M., Kojima S., Kondo N., Koseki H., Koyasu S., Krampitz S., Kubosaki A., Kwon A.T., Laros J.F.J., Lee W., Lennartsson A., Li K., Lilje B., Lipovich L., Mackay-sim A., Manabe R.I., Mar J.C., Marchand B., Mathelier A., Mejhert N., Meynert A., Mizuno Y., De Morais D.A.L., Morikawa H., Morimoto M., Moro K., Motakis E., Motohashi H., Mummery C.L., Murata

M., Nagao-Sato S., Nakachi Y., Nakahara F., Nakamura T., Nakamura Y., Nakazato K., Van Nimwegen E., Ninomiya N., Nishiyori H., Noma S., Nozaki T., Ogishima S., Ohkura N., Ohmiya H., Ohno H., Ohshima M., Okada-Hatakeyama M., Okazaki Y., Orlando V., Ovchinnikov D.A., Pain A., Passier R., Patrikakis M., Persson H., Piazza S., Prendergast J.G.D., Rackham O.J.L., Ramilowski J.A., Rashid M., Ravasi T., Rizzu P., Roncador M., Roy S., Rye M.B., Saijyo E., Sajantila A., Saka A., Sakaguchi S., Sakai M., Sato H., Satoh H., Savvi S., Saxena A., Schneider C., Schultes E.A., Schulze-Tanzil G.G., Schwegmann A., Sengstag T., Sheng G., Shimoji H., Shimoni Y., Shin J.W., Simon C., Sugiyama D., Sugiyama T., Suzuki M., Suzuki N., Swoboda R.K., 'T Hoen P.A.C., Tagami M., Tagami N.T., Takai J., Tanaka H., Tatsukawa H., Tatum Z., Thompson M., Toyoda H., Toyoda T., Valen E., Van De Wetering M., Van Den Berg L.M., Verardo R., Vijayan D., Vorontsov I.E., Wasserman W.W., Watanabe S., Wells C.A., Winteringham L.N., Wolvetang E., Wood E.J., Yamaguchi Y., Yamamoto M., Yoneda M., Yonekura Y., Yoshida S., Zabierowski S.E., Zhang P.G., Zhao X., Zucchelli S., Summers K.M., Suzuki H., Daub C.O., Kawai J., Heutink P., Hide W., Freeman T.C., Lenhard B., Bajic L.V.B., Taylor M.S., Makeev V.J., Sandelin A., Hume D.A., Carninci P., Hayashizaki Y. (2014) A promoter-level mammalian expression atlas. Nature. 507(7493), 462-470.

- 4. Vainer E.D., Meir K., Furman M., Semenenko I., Konikoff F., Vainer G.W. (2013) Characterization of novel CD55 isoforms expression in normal and neoplastic tissues. *Tissue Antigens*. **82**(1), 26–34.
- Geller A., Yan J. (2019) The role of membrane bound complement regulatory proteins in tumor development and cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* 10, 1074.
- Santos N.B., Vaz Da Silva Z.E., Gomes C., Reis C.A., Amorim M.J. (2021) Complement decay-accelerating factor is a modulator of influenza A virus lung immunopathology. *PLoS Pathog.* 17(7), e1009381.
- Abbott R.J.M., Spendlove I., Roversi P., Fitzgibbon H., Knott V., Teriete P., McDonnell J.M., Handford P.A., Lea S.M. (2007) Structural and functional characterization of a novel T cell receptor co-regulatory protein complex, CD97-CD55. *J. Biol. Chem.* 282(30), 22023–22032.
- Hamann J., Wishaupt J.O., Van Lier R.A.W., Smeets T.J.M., Breedveld F.C., Tak P.P. (1999) Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 42(4), 650–658.
- Miwa T., Maldonado M.A., Zhou L., Yamada K., Gilkeson G.S., Eisenberg R.A., Song W.C. (2007) Decay-accelerating factor ameliorates systemic autoimmune disease in MRL/Ipr mice via both complement-dependent and -independent mechanisms. *Am. J. Pathol.* **170**(4), 1258–1266.
- Ozen A., Comrie W.A., Ardy R.C., Domínguez Conde C., Dalgic B., Beser Ö.F., Morawski A.R., Karakoc-Aydiner E., Tutar E., Baris S., Ozcay F.,

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

Serwas N.K., Zhang Y., Matthews H.F., Pittaluga S., Folio L.R., Unlusoy Aksu A., McElwee J.J., Krolo A., Kiykim A., Baris Z., Gulsan M., Ogulur I., Snapper S.B., Houwen R.H.J., Leavis H.L., Ertem D., Kain R., Sari S., Erkan T., Su H.C., Boztug K., Lenardo M.J. (2017) CD55 deficiency, early-onset protein-losing enteropathy, and thrombosis. *N. Engl. J. Med.* **377**(1), 52–61.

- 11. Brodsky R.A. (2008) Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Rev.* **22**(2), 65–74.
- Ma X.W., Chang Z.W., Qin M.Z., Sun Y., Huang H.L., He Y. (2009) Decreased expression of complement regulatory proteins, CD55 and CD59, on peripheral blood leucocytes in patients with type 2 diabetes and macrovascular diseases. *Chin. Med. J.* 122(18), 2123–2128.
- 13. Zhang J., Gerhardinger C., Lorenzi M. (2002) Early complement activation and decreased levels of glyco-sylphosphatidylinositol-anchored complement inhibitors in human and experimental diabetic retinopathy. *Diabetes.* **51**(12), 3499–3504.
- Mishra N., Mohata M., Narang R., Lakshmy R., Hazarika A., Pandey R.M., Das N., Luthra K. (2019) Altered expression of complement regulatory proteins CD35, CD46, CD55, and CD59 on leukocyte subsets in individuals suffering from coronary artery disease. *Front. Immunol.* 10, 2072.
- Bergelson J.M., Chan M., Solomon K.R., St. John N.F., Lin H., Finberg R.W. (1994) Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91(13), 6245–6248.
- 16. Stoermer K.A., Morrison T.E. (2011) Complement and viral pathogenesis. *Virol. J.* **411**(2), 362–373.
- Biryukov S., Stoute J.A. (2014) Complement activation in malaria: friend or foe? *Trends Mol. Med.* 20(5), 293–301.
- Zhang J., Li G., Liu X., Wang Z., Liu W., Ye X. (2009) Influenza A virus M1 blocks the classical complement pathway through interacting with C1qA. *J. Gen. Virol.* 90(Pt. 11), 2751–2758.
- 19. Nogales A., Dediego M.L. (2019) Host single nucleotide polymorphisms modulating influenza a virus disease in humans. *Pathogens*. **8**(4), 168.
- Lage S.L., Rocco J.M., Laidlaw E., Rupert A., Galindo F., Kellogg A., Kumar P., Poon R., Wortmann G.W., Lisco A., Manion M., Sereti I. (2022) Activation of complement components on circulating blood monocytes from COVID-19 patients. *Front. Immunol.* 13, 815833.
- Zhou J., To K.K.W., Dong H., Cheng Z.S., Lau C.C.Y., Poon V.K.M., Fan Y.H., Song Y.Q., Tse H., Chan K.H., Zheng B.J., Zhao G.P., Yuen K.Y. (2012) A functional variation in CD55 increases the severity of 2009 pandemic H1N1 influenza a virus infection. J. Infect. Dis. 206(4), 495–503.
- 22. Chatzopoulou F., Gioula G., Kioumis I., Chatzidimitriou D., Exindari M. (2019) Identification of com-

plement-related host genetic risk factors associated with influenza A(H1N1)pdm09 outcome: challenges ahead. *Med. Microbiol. Immunol.* **208**(5), 631–640.

- 23. Lee N., Cao B., Ke C., Lu H., Hu Y., Tam C.H.T., Ma R.C.W., Guan D., Zhu Z., Li H., Lin M., Wong R.Y.K., Yung I.M.H., Hung T.-N., Kwok K., Horby P., Hui D.S.C., Chan M.C.W., Chan P.K.S. (2017) Single-nucleotide polymorphisms of IFITM3, TLR3, CD55, and TLR4 and risk for severe outcomes in patients with influenza A (H7N9) and (H1N1) pdm09 in China: a multicentre cohort study. *Lancet.* **390**, S1.
- Zhang Y., Zhang Z., Cao L., Lin J., Yang Z., Zhang X. (2017) A common CD55 rs2564978 variant is associated with the susceptibility of non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 8(4), 6216–6221.
- 25. Wu H.J., Gao H., Xie Y.N., Zhang Y.Y., Yang Z.B., Zhang X.M. (2018) A promoter polymorphism of CD55 effect on the risk of esophageal cancer. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi* [*Chinese J. Preventive Med.*]. 52(8), 822–826.
- 26. Li M., Li Y.P., Deng H.L., Wang M.Q., Wang W.J., Wang J., Wu F.P., Dang S.S. (2020) Association of gene polymorphisms of CD55 with susceptibility to and severity of hand, foot, and mouth disease caused by enterovirus 71 in the Han Chinese population. J. Med. Virol. 92(12), 3119–3124.
- 27. Dunham I., Kundaje A., Aldred S.F., Collins P.J., Davis C.A., Doyle F., Epstein C.B., Frietze S., Harrow J., Kaul R., Khatun J., Lajoie B.R., Landt S.G., Lee B.K., Pauli F., Rosenbloom K.R., Sabo P., Safi A., Sanyal A., Shoresh N., Simon J.M., Song L., Trinklein N.D., Altshuler R.C., Birney E., Brown J.B., Cheng C., Djebali S., Dong X., Ernst J., Furey T.S., Gerstein M., Giardine B., Greven M., Hardison R.C., Harris R.S., Herrero J., Hoffman M.M., Iyer S., Kellis M., Kheradpour P., Lassmann T., Li Q., Lin X., Marinov G.K., Merkel A., Mortazavi A., Parker S.C.J., Reddy T.E., Rozowsky J., Schlesinger F., Thurman R.E., Wang J., Ward L.D., Whitfield T.W., Wilder S.P., Wu W., Xi H.S., Yip K.Y., Zhuang J., Bernstein B.E., Green E.D., Gunter C., Snyder M., Pazin M.J., Lowdon R.F., Dillon L.A.L., Adams L.B., Kelly C.J., Zhang J., Wexler J.R., Good P.J., Feingold E.A., Crawford G.E., Dekker J., Elnitski L., Farnham P.J., Giddings M.C., Gingeras T.R., Guigó R., Hubbard T.J., Kent W.J., Lieb J.D., Margulies E.H., Myers R.M., Stamatoyannopoulos J.A., Tenenbaum S.A., Weng Z., White K.P., Wold B., Yu Y., Wrobel J., Risk B.A., Gunawardena H.P., Kuiper H.C., Maier C.W., Xie L., Chen X., Mikkelsen T.S., Gillespie S., Goren A., Ram O., Zhang X., Wang L., Issner R., Coyne M.J., Durham T., Ku M., Truong T., Eaton M.L., Dobin A., Tanzer A., Lagarde J., Lin W., Xue C., Williams B.A., Zaleski C., Röder M., Kokocinski F., Abdelhamid R.F., Alioto T., Antoshechkin I., Baer M.T., Batut P., Bell I., Bell K., Chakrabortty S., Chrast J., Curado J., Derrien T., Drenkow J., Dumais E., Dumais J., Duttagupta R., Fastuca M., Fejes-Toth K., Ferreira P., Foissac S., Fullwood M.J., Gao H., Gonzalez D., Gordon A., Howald C., Jha S., Johnson R., Kapranov P., King B.,

Kingswood C., Li G., Luo O.J., Park E., Preall J.B., Presaud K., Ribeca P., Robyr D., Ruan X., Sammeth M., Sandhu K.S., Schaeffer L., See L.H., Shahab A., Skancke J., Suzuki A.M., Takahashi H., Tilgner H., Trout D., Walters N., Wang H., Hayashizaki Y., Reymond A., Antonarakis S.E., Hannon G.J., Ruan Y., Carninci P., Sloan C.A., Learned K., Malladi V.S., Wong M.C., Barber G.P., Cline M.S., Dreszer T.R., Heitner S.G., Karolchik D., Kirkup V.M., Meyer L.R., Long J.C., Maddren M., Raney B.J., Grasfeder L.L., Giresi P.G., Battenhouse A., Sheffield N.C., Showers K.A., London D., Bhinge A.A., Shestak C., Schaner M.R., Kim S.K., Zhang Z.Z., Mieczkowski P.A., Mieczkowska J.O., Liu Z., McDaniell R.M., Ni Y., Rashid N.U., Kim M.J., Adar S., Zhang Z., Wang T., Winter D., Keefe D., Iyer V.R., Zheng M., Wang P., Gertz J., Vielmetter J., Partridge E.C., Varlev K.E., Gasper C., Bansal A., Pepke S., Jain P., Amrhein H., Bowling K.M., Anaya M., Cross M.K., Muratet M.A., Newberry K.M., McCue K., Nesmith A.S., Fisher-Aylor K.I., Pusey B., DeSalvo G., Parker S.L., Balasubramanian S., Davis N.S., Meadows S.K., Eggleston T., Newberry J.S., Levy S.E., Absher D.M., Wong W.H., Blow M.J., Visel A., Pennachio L.A., Petrykowska H.M., Abyzov A., Aken B., Barrell D., Barson G., Berry A., Bignell A., Boychenko V., Bussotti G., Davidson C., Despacio-Reyes G., Diekhans M., Ezkurdia I., Frankish A., Gilbert J., Gonzalez J.M., Griffiths E., Harte R., Hendrix D.A., Hunt T., Jungreis I., Kay M., Khurana E., Leng J., Lin M.F., Loveland J., Lu Z., Manthravadi D., Mariotti M., Mudge J., Mukherjee G., Notredame C., Pei B., Rodriguez J.M., Saunders G., Sboner A., Searle S., Sisu C., Snow C., Steward C., Tapanari E., Tress M.L., Van Baren M.J., Washietl S., Wilming L., Zadissa A., Zhang Z., Brent M., Haussler D., Valencia A., Addleman N., Alexander R.P., Auerbach R.K., Balasubramanian S., Bettinger K., Bhardwaj N., Boyle A.P., Cao A.R., Cayting P., Charos A., Cheng Y., Eastman C., Euskirchen G., Fleming J.D., Grubert F., Habegger L., Hariharan M., Harmanci A., Iyengar S., Jin V.X., Karczewski K.J., Kasowski M., Lacroute P., Lam H., Lamarre-Vincent N., Lian J., Lindahl-Allen M., Min R., Miotto B., Monahan H., Moqtaderi Z., Mu X.J., O'Geen H., Ouyang Z., Patacsil D., Raha D., Ramirez L., Reed B., Shi M., Slifer T., Witt H., Wu L., Xu X., Yan K.K., Yang X., Struhl K., Weissman S.M., Penalva L.O., Karmakar S., Bhanvadia R.R., Choudhury A., Domanus M., Ma L., Moran J., Victorsen A., Auer T., Centanin L., Eichenlaub M., Gruhl F., Heermann S., Hoeckendorf B., Inoue D., Kellner T., Kirchmaier S., Mueller C., Reinhardt R., Schertel L., Schneider S., Sinn R., Wittbrodt B., Wittbrodt J., Jain G., Balasundaram G., Bates D.L., Byron R., Canfield T.K., Diegel M.J., Dunn D., Ebersol A.K., Frum T., Garg K., Gist E., Hansen R.S., Boatman L., Haugen E., Humbert R., Johnson A.K., Johnson E.M., Kutyavin T.V., Lee K., Lotakis D., Maurano M.T., Neph S.J., Neri F.V., Nguyen E.D., Qu H., Reynolds A.P., Roach V., Rynes E., Sanchez M.E., Sandstrom R.S., Shafer A.O., Stergachis A.B., Thomas S., Vernot B., Vierstra J., Vong S., Wang H., Weaver M.A., Yan Y.,

Zhang M., Akey J.M., Bender M., Dorschner M.O., Groudine M., MacCoss M.J., Navas P., Stamatoyannopoulos G., Beal K., Brazma A., Flicek P., Johnson N., Lukk M., Luscombe N.M., Sobral D., Vaquerizas J.M., Batzoglou S., Sidow A., Hussami N., Kyriazopoulou-Panagiotopoulou S., Libbrecht M.W., Schaub M.A., Miller W., Bickel P.J., Banfai B., Boley N.P., Huang H., Li J.J., Noble W.S., Bilmes J.A., Buske O.J., Sahu A.D., Kharchenko P.V., Park P.J., Baker D., Taylor J., Lochovsky L. (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. **489**(7414), 57–74.

- 28. Kundaje A., Meuleman W., Ernst J., Bilenky M., Yen A., Heravi-Moussavi A., Kheradpour P., Zhang Z., Wang J., Ziller M.J., Amin V., Whitaker J.W., Schultz M.D., Ward L.D., Sarkar A., Quon G., Sandstrom R.S., Eaton M.L., Wu Y.-C., Pfenning A.R., Wang X., Claussnitzer M., Liu Y., Coarfa C., Harris R.A., Shoresh N., Epstein C.B., Gjoneska E., Leung D., Xie W., Hawkins R.D., Lister R., Hong C., Gascard P., Mungall A.J., Moore R., Chuah E., Tam A., Canfield T.K., Hansen R.S., Kaul R., Sabo P.J., Bansal M.S., Carles A., Dixon J.R., Farh K.-H., Feizi S., Karlic R., Kim A.-R., Kulkarni A., Li D., Lowdon R., Elliott G., Mercer T.R., Neph S.J., Onuchic V., Polak P., Rajagopal N., Ray P., Sallari R.C., Siebenthall K.T., Sinnott-Armstrong N.A., Stevens M., Thurman R.E., Wu J., Zhang B., Zhou X., Beaudet A.E., Boyer L.A., De Jager P.L., Farnham P.J., Fisher S.J., Haussler D., Jones S.J.M., Li W., Marra M.A., McManus M.T., Sunyaev S., Thomson J.A., Tlsty T.D., Tsai L.-H., Wang W., Waterland R.A., Zhang M.Q., Chadwick L.H., Bernstein B.E., Costello J.F., Ecker J.R., Hirst M., Meissner A., Milosavljevic A., Ren B., Stamatovannopoulos J.A., Wang T., Kellis M. (2015) Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. Nature. 518(7539), 317-330.
- 29. Ernst J., Kellis M. (2017) Chromatin-state discovery and genome annotation with ChromHMM. *Nat. Protoc.* **12**(12), 2478–2492.
- Abramov S., Boytsov A., Bykova D., Penzar D.D., Yevshin I., Kolmykov S.K., Fridman M.V., Favorov A.V., Vorontsov I.E., Baulin E., Kolpakov F., Makeev V.J., Kulakovskiy I.V. (2021) Landscape of allele-specific transcription factor binding in the human genome. *Nat. Commun.* 12(1), 2751.
- Ustiugova A.S., Korneev K.V., Kuprash D.V., Afanasyeva M.A. (2019) Functional SNPs in the human autoimmunity-associated locus 17q12-21. *Genes*. 10(2), 77.
- Schotte R., Nagasawa M., Weijer K., Spits H., Blom B. (2004) The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *J. Exp. Med.* 200(11), 1503–1509.
- 33. Roberts N.J. (2020) Diverse and unexpected roles of human monocytes/macrophages in the immune response to influenza virus. *Viruses.* **12**(4), 379.
- Nascimento C.R., Rodrigues Fernandes N.A., Gonzalez Maldonado L.A., Rossa Junior C. (2022) Comparison of monocytic cell lines U937 and THP-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

1 as macrophage models for in vitro studies. *Biochem. Biophys. Rep.* **32**, 101383.

- Wang N., Liang H., Zen K. (2014) Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Front. Immunol.* 5, 614.
- Uvarova A.N., Stasevich E.M., Ustiugova A.S., Mitkin N.A., Zheremyan E.A., Sheetikov S.A., Zornikova K.V., Bogolyubova A.V., Rubtsov M.A., Kulakovskiy I.V., Kuprash D.V., Korneev K.V., Schwartz A.M. (2023) rs71327024 associated with COVID-19 hospitalization reduces CXCR6 promoter activity in human CD4+ T cells via disruption of c-Myb binding. *Int. J. Mol. Sci.* 24(18), 13790.
- 37. Korneev K.V., Sviriaeva E.N., Mitkin N.A., Gorbacheva A.M., Uvarova A.N., Ustiugova A.S., Polanovsky O.L., Kulakovskiy I.V., Afanasyeva M.A., Schwartz A.M., Kuprash D.V. (2020) Minor C allele of the SNP rs7873784 associated with rheumatoid arthritis and type-2 diabetes mellitus binds PU.1 and enhances TLR4 expression. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1866(3), 165626.
- Fisher R.C., Scott E.W. (1998) Role of PU.1 in hematopoiesis. *Stem Cells.* 16 (1), 25–37.
- Orozco G., Schoenfelder S., Walker N., Eyre S., Fraser P. (2022) 3D genome organization links non-coding disease-associated variants to genes. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 995388.
- Johnston A.D., Simões-Pires C.A., Thompson T.V., Suzuki M., Greally J.M. (2019) Functional genetic variants can mediate their regulatory effects through alteration of transcription factor binding. *Nat. Commun.* **10**(1), 3472.
- 41. Lin S.H., Thakur R., Machiela M.J. (2021) LDexpress: an online tool for integrating population-specific linkage disequilibrium patterns with tissue-specific expression data. *BMC Bioinform.* **22**(1), 608.
- 42. Kawai T., Takeshita S., Imoto Y., Matsumoto Y., Sakashita M., Suzuki D., Shibasaki M., Tamari M., Hirota T., Arinami T., Fujieda S., Noguchi E. (2009) Associations between decay-accelerating factor polymorphisms and allergic respiratory diseases. *Clin. Exp. Allergy.* **39**(10), 1508–1514.
- 43. Свиряева Е.Н., Корнеев К.В., Друцкая М.С., Купраш Д.В. (2016) Механизмы перестройки иммунного ответа при вирусно-бактериальных коинфекциях дыхательных путей (обзор). Биохимия. 81(11), 1593-1603.
- 44. Perico L., Benigni A., Casiraghi F., Ng L.F.P., Renia L., Remuzzi G. (2021) Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat. Rev. Nephrol.* **17**(1), 46-64.
- 45. Latreille E., Lee W.L. (2021) Interactions of influenza and sars-cov-2 with the lung endothelium: Similarities, differences, and implications for therapy. *Viruses*. **13**(2), 161.
- 46. Aydin Ozgur B., Coskunpinar E., Bilgic Gazioglu S., Yilmaz A., Musteri Oltulu Y., Cakmakoglu B., Deniz G., Gurol A.O., Yilmaz M.T. (2020) Effects of complement regulators and chemokine receptors in type 2 diabetes. *Immunol. Invest.* 50(5), 478–491.

АЛЛЕЛЬ rs2564978(T)

# rs2564978(T) ALLELE ASSOCIATED WITH SEVERE INFLUENZA A DISRUPTS BINDING SITE FOR MYELOID DIFFERENTIATION FACTOR PU.1 AND REDUCES *CD55/DAF* GENE PROMOTER ACTIVITY IN MACROPHAGES

A. N. Uvarova<sup>1,\*</sup>, E. A. Tkachenko<sup>2,3</sup>, E. M. Stasevich<sup>1</sup>, E. A. Bogomolova<sup>2,4</sup>, E. A. Zheremyan<sup>2,3</sup>, D. V. Kuprash<sup>1,3,4</sup>, K. V. Korneev<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute

of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

<sup>2</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

<sup>3</sup>Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

<sup>4</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Department of Molecular and Biological Physics, Moscow, 141701 Russia

<sup>5</sup>National Research Center for Hematology, Moscow, 125167 Russia

\*e-mail: uvarowww@gmail.com

An inhibitor of the complement system CD55/DAF is expressed on many cell types. Dysregulation of CD55 expression is associated with increased disease severity during influenza A infection, as well as with vascular complications in pathologies involving excessive activation of the complement system. Using a luciferase reporter system, we performed functional analysis of the single nucleotide polymorphism rs2564978 located in the promoter of the *CD55* gene in human pro-monocytic cell line U937. We have shown a decreased activity in activated U937 cells of the *CD55* gene promoter carrying minor rs2564978(T) allele associated with the severe course of influenza A(H1N1)pdm09. Using bioinformatic resources, we determined that transcription factor PU.1 can potentially bind to the CD55 promoter region containing rs2564978 in an allele-specific manner. The involvement of PU.1 in modulating CD55 promoter activity was determined by genetic knockdown of PU.1 using small interfering RNAs under specific monocyte activation conditions.

Keywords: CD55/DAF, complement system, SNP, PU.1/SPI1

## = ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА =

УДК 57.022

## ИЗМЕНЕНИЯ В ГЕНОМЕ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

# © 2024 г. В. А. Терновой<sup>а</sup>, Е. П. Пономарева<sup>а, \*</sup>, Е. В. Протопопова<sup>а</sup>, Н. Л. Тупота<sup>а</sup>, Т. П. Микрюкова<sup>а, †</sup>, В. Б. Локтев<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, 630559 Россия

> \*e-mail: ponomareva\_ep@vector.nsc.ru, ponomareva-eugenia2014@yandex.ru Поступила в редакцию 18.05.2023 г.

После доработки 19.10.2023 г. Принята к публикации 29.10.2023 г.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) штамм C11-13 (GenBank Acc. No. OQ565596) сибирского генотипа ранее был изолирован из мозга умершего пациента. Варианты ВКЭ С11-13, полученные на 3 и 8 пассажах на клетках SPEV, использовали для проведения серии пассажей через мозг белых мышей. На всех этапах, используя технологию высокопроизводительного секвенирования, анализировали полногеномные последовательности вируса. В результате анализа выявлена 41 точечная нуклеотилная замена и 12 аминокислотных замен, которые преимущественно были локализованы в генах неструктурных белков NS3 и NS5 BKЭ (GenBank Acc. No. MF043953, OP902894, OP902895). После трех пассажей через мозг мышей идентифицированы реверсивные нуклеотидные и аминокислотные замены, характерные для изолята вируса С11-13, выделенного от человека, но замещенные при последующих 8 пассажах на линии клеток SPEV. Также произошло увеличение длины 3'-нетранслируемой области (3'-НТО) вирусного генома на 306 нуклеотидов. В последовательности 3'-НТО, содержащей элементы Y3 и Y2, обнаружены несовершенные L- и R-повторы, которые могут участвовать в ингибировании активности клеточной PHKазы XRN1 и тем самым в формировании субгеномных флавивирусных РНК (sfRNA). Для полученных вариантов ВКЭ зарегистрирован высокий уровень репродукции как на культуре клеток, так и в мозге белых мышей. Изменения генома ВКЭ, выявленные в ходе последовательных пассажей, скорее всего, обусловлены значительной генетической изменчивостью вируса, что обеспечивает его эффективную репродукцию в различных видах хозяев и широкое распространение в разных климатических зонах.

**Ключевые слова**: вирус клещевого энцефалита, вирусный геном, З'-нетранслируемая область, нуклеотидные замены, адаптационные замены, реверсивные мутации, культура клеток, мыши **DOI**: 10.31857/S0026898424020093, **EDN**: NILAFS

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) – возбудитель одноименного заболевания, которое часто приводит к тяжелым поражениям центральной нервной системы, включая летальные исходы [1, 2]. ВКЭ эндемичен во многих регионах Северной Евразии, а в последнее время наблюдается его появление в новых географических регионах, что связано, по всей вероятности, с изменением ареалов иксодовых клещей – переносчиков ВКЭ [3–5].

Вирус клещевого энцефалита (Orthoflavivirus encephalitidis) относится к семейству Flaviviridae, род Orthoflavivirus (https://ictv.global/taxonomy)

[2]. Этот род включает относительно просто устроенные РНК-содержащие сферические оболочечные вирусы размером 40-60 нм. Геном ВКЭ представлен одноцепочечной (+)РНК длиной 9 200-11 500 нуклеотидов. Геномная РНК кодирует один полипротеин, который подвергается процессингу вирусными и клеточными протеазами с образованием трех структурных и семи неструктурных вирусных белков. Геномная флавивирусная РНК фланкирована 5'- и 3'нетранслируемыми областями (НТО), принципиально важными для инициации вирусной репликации и формирования репликативного комплекса с участием вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы [6, 7]. Принято считать, что 5'- и 3'-НТО определяют скорость репликации вируса, полярность РНК, инкапсидацию генома и устойчивость к РНКазам [8-11].

Сокращения: 3'-НТО – 3'-нетранслируемая область; ВКЭ – вирус клещевого энцефалита; ОТР – открытая рамка считывания.

ВКЭ подразделяется на три основных генотипа: европейский, дальневосточный и сибирский [12]. Недавно высказано предложение о выделении гималайского и байкальских генотипов ВКЭ [4, 13–15]. Уровень гомологии для различных генотипов ВКЭ составляет 82–85% для полногеномных нуклеотидных последовательностей и 92–96% для аминокислотных [16, 17]. Генетические различия изолятов ВКЭ существенны даже в рамках одного генотипа вируса. Так, высокопатогенный для человека штамм Глубинное/2004 дальневосточного генотипа отличается от прототипных штаммов 205 и Софьин 53–57 аминокислотными заменами [16].

Высокая генетическая изменчивость ВКЭ позволяет высказать гипотезу о том, что генетический потенциал ВКЭ позволяет ему существенно изменяться и адаптироваться к новым типам клеток и видам хозяев. Это обеспечивает ВКЭ возможность легко интродуцироваться в новые биотопы. Так, ВКЭ обнаружен более чем у 40 видов диких птиц в Томске и его пригородах [18–20].

Нами исследована генетическая вариабельность (изменчивость) высокопатогенного для человека штамма C11-13 сибирского генотипа ВКЭ в процессе его адаптации к культивированию в лабораторных условиях.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вирусный препарат. Штамм С11-13 ВКЭ сибирского генотипа, выделенный в 2013 году из мозговой суспензии человека, умершего от клещевого энцефалита в Мошковском районе Новосибирской области, описан ранее [21]. Все эксперименты с вирусным материалом проводили с соблюдением правил биобезопасности, регламентированных в СанПиН 3.3686-21.

Клеточная линия. Культура клеток SPEV была получена из банка клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и поддерживалась на среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS; "Gibco", США) и 80 мкг/мл сульфата гентамицина. Лабораторные животные. В работе использовали 2–3-дневных сосунков беспородных мышей обоего пола массой 2–3 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Все процедуры с животными проводили в соответствии с действующими документами: «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (https://docs.cntd.ru/ document/456016716) и «Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных» [22].

Проведение серийных пассажей ВКЭ. Аутбредным мышам интрацеребрально вводили 10 мкл вирусной суспензии, полученной после 3 и 8 пассажей ВКЭ С11-13 на культуре клеток SPEV [21]. Для последующих пассажей использовали 10%-ную мозговую суспензию, полученную от мышей на 3–4 сутки после заражения, в 50 мМ боратном буфере (рН 9.0), содержащем 150 мМ хлористого натрия. Исследованные в работе варианты ВКЭ представлены в табл. 1.

Выделение и титрование ВКЭ. Вируссодержащий образец наносили на монослой культуры клеток SPEV и оставляли на 1 ч при комнатной температуре, после чего вносили среду DMEM, содержащую 2% FBS и 80 мкг/мл сульфата гентамицина. Затем инкубировали при 37 °C в течение 7 сут. Образцы, содержащие ВКЭ, титровали на клеточной культуре SPEV, используя 96-луночные культуральные микропланшеты. Концентрацию вируса оценивали по тканевому цитопатическому действию (ТЦПД<sub>50</sub>/мл) на клетках SPEV и методом иммуноферментного анализа. Вирус хранили аликвотами при –40 °C. Биологический титр вируса рассчитывали по Керберу [23].

Иммуноферментный анализ. ВКЭ в культуральной среде определяли методом иммуноферментного анализа на 96-луночных планшетах ("Nunk", Дания), сенсибилизированных мышиными моноклональными анти-ВКЭ-антителами 10H10 ("Вектор", Россия), как описано ранее [24]. Связавшийся с планшетом вирус детектировали с использованием меченных биотином мышиных моноклональных анти-ВКЭ-антител

Название штамма ВКЭ	История	Источник	GenBank Acc. No.
C11-13_1p	1 пассаж на клетках SPEV	Эта работа	OQ565596
C11-13_3p	3 пассажа на клетках SPEV	Описано ранее [21]	KP644245
C11-13_8p	8 пассажей на клетках SPEV	Эта работа	MF043953
C11-13_3/3m	С11-13_3 → 3 пассажа на мышах	Эта работа	OP902894
C11-13_8/3m	С11-13_8 → 3 пассажа на мышах	Эта работа	OP902895

Таблица 1. Исследованные варианты ВКЭ С11-13

EB1 ("Вектор") и стрептавидин-пероксидазного конъюгата ("ICN", США).

Выделение РНК и ПЦР с обратной транскрипцией. Суммарную нуклеиновую кислоту выделяли из вируссодержащего материала с использованием набора реагентов ExtractRNA ("Евроген", Россия); для построения первой цепи ДНК использовали набор MMLV RT kit ("Евроген") по инструкциям производителя. Для проведения ПЦР использовали набор Био-Мастер LR HS-ПЦР ("BioLabMix", Россия) и олигонуклеотидные праймеры, специфичные к РНК ВКЭ, описанные ранее [6, 16, 24]. ПЦР проводили на амплификаторе T100 ("Bio-Rad Laboratories", США) в следующем режиме: 5 мин при 94 °C, 40 циклов [10 с при 94 °C, 20 с при 58 °C, 30 с при 72 °C], 7 мин при 72 °C.

Определение нуклеотидных последовательностей по Сэнгеру и с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования (NGS). Секвенирование ДНК-фрагментов выполняли по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI 3130×1 ("Hitachi", Япония). Полногеномную нуклеотидную последовательность определяли с использованием технологии NGS. Для синтеза первой цепи кДНК использовали модуль NEBNext® Ultra Directional, для синтеза второй цепи - NEBNext Ultra Directional RNA Second Strand Synthesis Module ("NEB", CIIIA). Подготовленные ДНК-библиотеки анализировали на приборе MiSeq ("Illumina", Великобритания). Для удаления адаптеров и повторного чтения использовали SAMtools (версия 0.1.18; https://www.htslib.org/download). Протяженные последовательности были собраны de novo с помощью ассемблера MIRA (версия 4.9.6; https:// linux-packages.com/ubuntu-impish-indri/package/ mira-assembler). Обработку результатов проводили с использованием специализированных программных пакетов MEGA 7/10 ("PSU", США) и Lasergen 7 ("Invitrogen", США).

Для поиска несовершенных повторов в вирусных геномах использовали диагональ матрицы локального сходства нуклеотидной последовательности Unipro UGENE:v45.1 (https://ugene. net/ru/download-all.html).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Генетический анализ вариантов штамма C11-13 ВКЭ после пассажей in vitro — in vivo

Ранее был получен набор вариантов ВКЭ после нескольких последовательных пассажей штамма С11-13 ВКЭ на культурах перевиваемых клеток SPEV, НЕК293, Neuro-2a [21]. Первые аминокислотные замены были обнаружены в не-

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

структурных вирусных белках после трех пассажей. После восьми пассажей количество аминокислотных замен уже не изменялось. Варианты ВКЭ при пассажах на клетках SPEV накопили 9 аминокислотных замен, на культуре клеток HEK293 – 14; наименьшее число было обнаружено на клетках Neuro-2a – всего 4 замены.

В проведенном нами исследовании штамм С11-13 ВКЭ после 3 и 8 пассажей на клетках SPEV трижды пассировали через мозг аутбредных белых мышей с последующим полногеномным секвенированием полученных изолятов: С11-13 3/3m и С11-13 8/3m соответственно (табл. 2). В последовательности вирусного генома идентифицирована 41 нуклеотидная замена, ассоциированная с адаптацией ВКЭ к клеткам SPEV с последующими пассажами через мозг мыши. Большинство нуклеотидных замен было в генах, кодирующих неструктурные белки вируса. Только 9 были картированы в генах белков капсида (С) и оболочки (Е). Наибольшее число замен (14) обнаружено в гене неструктурного белка NS5 при значении 0.12 для соотношения несинонимичных/синонимичных нуклеотидных замен (dN/dS). В генах неструктурных белков обнаружено 32 нуклеотидные замены, из которых 9 приводили к изменению кодируемой аминокислоты. Максимальное число аминокислотных замен идентифицировано в белках NS3 и NS5: 4 и 2 соответственно. Высокое значение dN/dS, равное 2.0, обнаружено в белке NS1, а минимальное (0.12) - в NS5. Соотношение dN/dS имело тенденцию к снижению при пассажах ВКЭ через мозг белых мышей в сравнении с культурами клеток.

Интересно отметить, что после трех пассажей вируса через мозг мышей у вариантов C11-13\_3/3m и C11-13\_8/3m обнаружено 7 реверсивных аминокислотных замен. Эти замены характерны для изолята вируса C11-13, выделенного от человека, но были замещены при последующих пассажах вируса (8 пассажей) на клетках SPEV. При адаптации от клеток SPEV к новому хозяину – мышам произошли замещения в белках: E (Q367R), NS1 (N1067D), NS2b (R1488Q), NS3 (D1511N и F1906S) и NS5 (M2561K и S2925F).

Следует заметить, что в гене белка NS5 обнаружены реверсивные нуклеотидные замены: два блока по три синонимичных и две несинонимичные, — а также 5 новых. Кроме того, обнаружены мутации в белках Е (D347N и H699Q) и NS3 (T1890S).

Репликативная активность всех полученных вариантов ВКЭ (C11-13\_3p, C11-13\_8p, C11-13\_3/3m и C11-13\_8/3m) по сравнению с исходным изолятом (C11-13\_1p) существенно увели-

## ИЗМЕНЕНИЯ В ГЕНОМЕ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

285

Таблица 2. Нуклеотидные и аминокислотные замены в геноме штамма С11-13, адаптированного к клетка	М
SPEV, выявленные после дополнительных пассажей через мозг аутбредных белых мышей	

Ген ВКЭ	Нуклеотидные/ аминокислотные замены (Nt/AA) <sup>a</sup>	C11-13_1p	C11-13_8p	C11-13_3/3m	C11-13_8/3m	dN/dS <sup>b</sup>
с	Nt240-AA80/K	А	А	G	G	0/1
е	Nt1039-AA347/D→N	G	G	G	А	3/5 (0.6)
	Nt1100-AA367/Q→R	А	G	А	А	
	Nt1704-AA568/V	А	А	G	G	
	Nt1740-AA580/K	А	G	А	А	
	Nt1743-AA581/G	С	Т	С	С	
	Nt1932-AA644/I	Т	Т	С	Т	
	Nt2097-AA699/H→Q	С	С	С	G	
	Nt2379-AA793/E	А	А	G	G	
ns1	Nt3199-AA1067/N→D	А	G	Α	Α	2/1 (2)
	Nt3498-AA1166/G	Т	А	А	А	
	Nt3502-AA1168/L→V	С	G	G	G	
ns2a	Nt3810-AA1270/F	С	Т	Т	Т	0/3
	Nt4044-AA1348/F	С	Т	С	С	. '
	Nt4090-AA1364/L	С	Т	Т	Т	
ns2b	Nt4350-AA1450/E	G	G	G	А	1/1 (1)
	Nt4463-AA1488/R→Q	G	А	G	G	
ns3	Nt4863-AA1621/D	G	A	G	G	4/6 (0.67)
	Nt4531-AA1511/D→N	G	А	G	G	
	Nt4629-AA1543/H	Т	Т	С	Т	
	Nt4635-AA1545/T	Α	А	G	G	
	Nt5235-AA1745/H→Q	Т	Α	А	А	
	Nt5634-AA1878/I	Т	Т	С	С	
	Nt5658-AA1886/E	G	G	G	Α	
	Nt5668-AA1890/T→S	Α	Α	А	Т	
	Nt5697-AA1899/F	С	Т	С	С	
	Nt5717-AA1906/F→S	Т	Т	С	С	
ns5	Nt7685-AA2562/M→K	Т	А	Т	Т	2/12 (0.12)
	Nt8562-AA2854/A	С	Т	С	С	
	Nt8586-AA2862/G	A	G	A	A	
	Nt8628-AA2876/O	G	A	G	G	
	Nt8774-AA2925/S→F	C	Т	C	C	
	Nt9003-AA3001/L	C	C	T	T	
	Nt9060-AA3020/E	A	A	G	G	
	Nt9126-AA3042/F	C	C	C	T	
	Nt9456-AA3152/L	G	A	A	A	
	Nt9514-AA3172/V	G	G	A	A	
	Nt9540-AA3180/R	A	A	A	G	
	Nt9744-AA3248/G	G	Δ	G	G	
	Nt9750- 4 4 3 2 50 / A	C	T	C	C	
	Nt10170_443290/K	Δ	G	Δ	Δ	
		<i>A</i>	0	18	20	
	ИЗОЛЯТУ			10	20	

<sup>а</sup>Темно-серым фоном выделены несинонимичные нуклеотидные замены и соответствующие им варианты ВКЭ с аминокислотными заменами; светло-серым фоном выделены синонимичные нуклеотидные замены.

<sup>b</sup>Отношение несинонимичных/синонимичных нуклеотидных замен, в скобках – частное от деления.

чивалась после серийных пассажей на культуре клеток и через мозг животных. Так, после третьего пассажа штамма C11-13 на клетках SPEV (C11-13\_3p) с появлением первых аминокислотных замен в NS3 (H1745Q) и NS5 (S2925F), титр вируса увеличился на 2 порядка: с  $10^6$  до  $10^8$  ТЦПД<sub>50</sub>/мл [21]. После восьмого пассажа вируса на клетках SPEV (C11-13\_8p) и для всех вариантов вируса в 10%-ном гомогенате мозга мышей после третьего пассажа на 7 сутки после заражения (C11-13\_3/3m и C11-13\_8/3m) титр вируса составил  $10^8$  ТЦПД<sub>50</sub>/мл.

### Размер генома и 3'-НТО в исследованных вариантах ВКЭ

При адаптации ВКЭ С11-13 к культивированию в лабораторных условиях обнаружено увеличение длины 3'-НТО (табл. 3). Ранее показано [7], что длина вариабельного участка 3'-НТО генома штамма С11-13, выделенного из мозга человека (С11-13\_1р), составляет 107 н. Нами показано, что после 8 пассажей на клетках SPEV (С11-13\_8) этот район увеличился на 37 н., а при пассажах на мышах – на 306 н. относительно клинического изолята. Важно заметить, что консервативный участок 3'-НТО имел протяженность 320 н. во всех полученных вариантах вируса.

Вариабельность длины 3'-НТО ВКЭ описана для ряда лабораторных штаммов, относящихся к разным генотипам ВКЭ, и она достигала максимального размера в 767 нуклеотидов для европейского генотипа (штамм Neudoerfl) [25]. На рис. 1 приведено выравнивание 3'-НТО генома ВКЭ относительно штамма Neudoerfl. Увеличение размеров 3'-НТО произошло за счет встраивания идентичных фрагментов в последовательности LRS4 и LRS3 – в область энхансера вариабельного участка. В геноме флавивирусов энхансер располагается между стоп-кодоном и промотором и охватывает как консервативный, так и вариабельный участки 3'-НТО. По всей вероятности, наблюдаемая инсерция приводит к восстановлению шпилек SL10–SL14, что повы - шает структурированность этой области. Схожая организации этого региона 3'-НТО также обнаружена у ВКЭ штамма РТ-122 сибирского генотипа ВКЭ, изолированного из печени садовой камышовки (*Acrocephalus dumetorum*) и секвенированного нами ранее (GenBank Acc. No. KM019545).

И хотя функция энхансера может быть некритичной для жизнеспособности вируса в экспериментальных условиях, она может играть важную роль в естественной среде и в процессе адаптации вируса к новым хозяевам.

# Обнаружение и картирование несовершенных повторов в 3'-НТО

В 3'-НТО геномной РНК ВКЭ, в районе энхансера, идентифицированы две нуклеотидные последовательности длиной 60 н. с гомологией 57 % (рис. 2). Эти несовершенные повторы обнаружены с помощью программы диагонали матрицы локального сходства нуклеотидной последовательности (Unipro UGENE:v45.1) В результате были найдены несовершенные повторы длиной 60 нуклеотидов с гомологией 57 %. Аналогические повторы с гомологией 52-57 % были найдены и для других вирусов (рис. 3). По осям Х и У расположена нуклеотидная последовательность, для которой проводили поиск несовершенных повторов. В частности, на рис. 2 использована прототипная последовательность штамма Glubinnoe/2004.

Важно заметить, что наличие аналогичных несовершенных повторов в 3'-НТО геномной РНК обнаружено нами для флавивирусов Повассан, Западного Нила, Кунджин, Денге серотипов 1 и 2, желтой лихорадки и омской геморрагической лихорадки, а также для вируса леса Семлики, относящегося к альфавирусам. Выровненные последовательности указанной области геномов этих вирусов приведены на рис. 3.

III TONAL DK'A	Degwon Followe H	Длина З'-НТО, н.			
	газмер генома, н.	вариабельный участок	консервативный участок	весь регион	
C11-13_1p	10 801	107	320	427	
C11-13_3p <sup>a</sup>	10 838	144	320	464	
C11-13_8	10 838	144	320	464	
C11-13_3/3m	11 107	413	320	733	
C11-13_8/3m	11 107	413	320	733	

Таблица 3. Размер геномной РНК и 3'-НТО в исследованных вариантах штамма С11-13 ВКЭ

<sup>а</sup>Описано ранее [21].

## ИЗМЕНЕНИЯ В ГЕНОМЕ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА



**Рис. 1.** Схема организации 3'-НТО ВКЭ. В качестве прототипов сравнения взяты: европейский генотип ВКЭ (1, 2), сибирский генотип (3–6) и дальневосточный генотип (7, 8, 15, 16). Под номерами 11 и 12 обозначены варианты штамма ВКЭ С11-13, полученные на нормальных клетках эмбриональных почек человека (НЕК293) и нейронов мыши (Neuro-2a) соответственно (GenBank Acc. No. MF043954, MF043955 соответственно). Пунктиром обозначены делеции в 3'-НТО; L и R – несовершенные повторы геномной РНК ВКЭ (длина 60 н., идентичность 57 % относительно штамма Glubinnoe/2004 (DQ862460)); SL1–SL15 – структуры stem-loop ("петля-на-стебле") в НТО; LRS1–LRS6 – длинные повторяющися последовательности (long repeat sequences); rLRS – район протяженных повторяющихся последовательности (long stable hairpin). Цветовая схема – общепринятая в программе MEGA 7/10 ("PSU", США) для нуклеотидов аденин (А), тимин (Т), цитозин (С) и гуанин (G): зеленый, красный, красный, коль методой и фиолетовый соответственно.

Факт наличия таких повторов в районе энхансера 3'-НТО, по-видимому, не случаен. Именно на этом участке нами зарегистрировано изменение длины геномной РНК и 3'-НТО для различных вариантов штамма С11-13 ВКЭ после последовательных пассажей на культуре клеток и через мозг белых мышей.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Некоторые РНК-содержащие вирусы эффективно преодолевают видовой барьер, что обусловлено более высокой изменчивостью РНК-генома в сравнении с геномами ДНК-содержащих вирусов [26, 27]. Высокая частота возникновения мутаций у РНК-содержащих вирусов считается "отправной точкой", которая облегчает репродукцию вируса в новом типе клеток или новом виде хозяина, то есть это структурная основа для их высокой трансмиссивности и широкого диапазона хозяев [28-30]. Многие флавивирусы, в том числе ВКЭ, распространены на обширных территориях и размножаются в различных видах беспозвоночных (комары и клещи) и позвоночных организмов [31]. Природные и климатические условия в природных очагах вирусных инфекций также могут существенно отличаться. Флавивирусы активно циркулируют в различных климатических зонах – от приполярных до экваториальных. Это значит, что они реплицируются в широком температурном интервале [18, 19]. Генетическая гетерогенность между генотипами ВКЭ составляет не менее 18%. В пересчете на полный геном ВКЭ это 2000–2200 нуклеотидов. Принято считать, что именно высокая генетическая изменчивость ВКЭ обеспечивает его циркуляцию в различных природных биотопах Северной Евразии и адаптацию к новым видам беспозвоночных и теплокровных хозяев при сохранении патогенного потенциала для человека [1].

В проведенном исследовании мы оценили генетическую вариабельность сибирского генотипа ВКЭ на примере высокопатогенного изолята С11-13 в процессе пассажей изолята из мозга погибшего человека на культуре клеток и через мозг аутбредных белых мышей. Для определения первичной структуры вирусного генома использовали технологию высокопроизводительного полногеномного секвенирования, что позволило проследить появление адаптационных мутаций в динамике.

Нуклеотидные замены появились в генах структурных и неструктурных белков ВКЭ уже через 3-8 пассажей вируса в культуре клеток SPEV и через 3 пассажа в мозге белых мышей. Это значит, что полевой (клинический) изолят ВКЭ быстро и эффективно адаптируется к новому хозяину; при этом большинство замен произошло в генах неструктурных белков и в кодируемых ими белках. Из идентифицированной нами 41 адаптационной мутации в геноме ВКЭ к генам структурных белков относилось только девять. Максимальное число нуклеотидных замен обнаружено в генах ns3 и ns5. Аналогичная картина наблюдалась по мутациям в аминокислотных последовательностях: три замены в структурном белке Е и девять в неструктурных белках.

Ранее показано, что структурные белки флавивирусов – важные факторы вирулентности [31–33]. Считали, что белок Е играет ключевую роль в вирулентности ВКЭ [34]. Так, в ряде работ сообщалось, что изменения в структуре этого белка влияют на нейровирулентность и нейроинвазивность переносимых клещами флавивирусов [31, 35–37]. Некоторые из этих



**Рис. 2.** Картирование несовершенных повторов в вариабельном участке 3'-НТО геномной РНК ВКЭ (прототипный штамм Glubinnoe/2004 (GenBank Acc. No. DQ862460)). Выполнено с помощью программы Unipro UGENE:v45.1 при длине сравниваемых последовательностей 60 нуклеотидов.

Вирус клещевого энцефалита, штамм Glubinnoe/2004 (DQ862460); x = 10473, y = 10610
CGACGGGGAAATGGTCGCACCCGACGCACCATCCATGAAGAAACGCTTCGTGAGACCCCCC
CGACGGG**AATGGTCG**CCCGACG*A****C******AAAC**T**G*GA**CCC**C
CGACGGGATAAT GGTC GATCC CGACGTAGGG CACT CTGTCAAACT TTGT GAGAC CCCCT GC
Вирус Повассан, штамм Partizansk/2006 (EU543649); x = 10062, y = 10141
GA CAACA GAAGA CATG CTGCG CATCT GGAAC AAAG TCTGG ATTTT GGAC AACCC TCACATG
GA**AC*G*AGACA*****CG*ATCTG**A*AAA**C*GGAT*T*G*A****CCTCAC*TG
GATGAGTGGAGAGACATCCCCTATCTGCCAAAAACACAGGACCTGGTATGTTCCTCACTTG
Внрус Западного Нила, штамм Vol-4 (AF317203); x = 10496, y = 10650
GT AGACG GTGCT GCCT GCGAC TCAAC CCCAG GAGG ACTGG GTGAA CAAAG CCGC GAAGT GATCCATGT AAGCC CT
G**GA**GTGC*G*CTGCGA*****CCCCAGGAGGACTGGGT*AACAAAG*C********CC******GCCCT
GCGGAGAGTGCAGTCT GCGAT AGTGCCCCAG GAGGACTGGGTTAACAAAGGCAAACCAACGCCCCACGCGGCCCT
Внрус Денге 1 серотнпа, нзолят NC 001475.2 (ON10 <u>3302); x = 10441, y = 10526</u>
CACGGTG TAGCA GACT AGCGG TTAGA GGAGA CCCC TCCCA TGACA CAAC GCAGCAGCGG GGCC CGAGCA
C*C**TG*A**AGACTAG*GGTTAGAGGAGACCCC*CCCA**A*A*AAC*****A**G**GC**G**CA C
TCCTTGCAAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCCGCAAATAAAAAACAGCATATTGACGCTGGGAGA
Вирус Денге 2 серотипа, изолят THSTI-TRC-DE NV2-12 (OP809583); x = 10461, y = 10548
GCATGGCGTAGT GGACTAGCGGTTAGAGGAGACCCCTCCCTTACAAATCGCAGCAACAATGGGGGCCCCAAGG
G**T**C*****GGACTAG*GGTTAGAGGAGACCCC*C****ACAAA***CAGCA******G*****AA*G
GT CTCAC TGGAA GGAC TAGAG GTTAG AGGA GACCC CCCAA AAAAAAAAAA
Вирус леса Семлики, штамм Smithburt (МТ 121983); x = 11252, y = 11426
ACTACTT GAACA GAAA ACTGGAAAAACA GAAA AAGT TAGGG TAGGCAATG TTAGT ATATT ATACCTCTA TTATAA
A*TA*T**A*CA** <del>AAA</del> ***G <del>AAA</del> *AGAAAAAGTTAGGGTAGGCAATG**A*T****TA*****A*T**AA
AT TAATA TAGCA AGAA AACCG AAAAT AGAAA AAGT TAGGG TAGGC AATG GCATT GATAT AGCA AGAAA ATTGA A
Вирус японского энцефалита, штамм Beijing-1 (JE VBEICG); x = 10484, y = 10635
GATACTG GGTAGACGG TGCTG CCTGC GCCTC AGTC CCAGG AGGAC TGGG TTAAC AAATC TGAC AACGG AAAGT G
G***C********GG***TGC***C*C*CAG*CCCAGGAGGACTGGGTTA*CAAA*C*G***A******G
<u>GTGCCACTCCGCTGGGGAGTGCGGCCTGCGCAGCCCCAG</u> GAGGACTGGGTTACCAAAGCCGTTGAGCCCCCACG
Внрус желтой лихорадки, штамм SP14/BRA/2018 (MZ604876); x = 9276, y = 9512
GGAAATCTTGAACTACATGAGCCCACACCATAGGAAGTTGGCGCTGGCTG
G*A*A*C*TCA*C*AC*TGA*****CA*C*A*A*A*G*TGGCGG*GGC*G*AT GG**AT
GAACACCATCACCAACCTGAAGGTTCAACTGATTAGGATGGCGGAGGCAGAGAT GGTGAT
Внрус омской геморрагической лихорадки, штамм Br-354/11661 (OL689388); x = 10380, y = 10493
ACAGACA GCCAT AGAG CAAAA CCCGG AGGGC TCTT TAAAC ATTGT CCGG AAATG AAAAA CCAAA ACAA
A*A**C****AT*GAGC**AACC*GGA*GGCTC***AAA*AT**TCC*GAAA*G***AA***A**CAA
AAAAGCCAGAAT TGAG CTTAA CCTGGAAGGC TCACAAAAT ATATT CCAGAAAAG CTGAAAACAGTCAA
Вирус Кунджин, изолят CH16514C (КХ394389); x = 10496, y = 10650
TGAGTAGACGGT GCTGCCTGCGACTCAACCCCAGGAGGACTGGGT GAACAAAGCTGCGAAGTGATCCATGTAAGCCCT
T**G**GA**GTGC*G*CTGCGAC****CCCCAGGAGGACTGGGTGAACAAAG**G*******TCC*****GCCCT
TCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGACAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTGAACAAAGGCGAATCAACGTCCCACGCGGCCCT

**Рис. 3.** Несовершенные повторы, выявленные для флави- и альфавирусов на вариабельном участке 3'-НТО геномной РНК. Х и У – координаты нуклеотидной последовательности, приведенной на диагонали матрицы в программе Unipro UGENE:v45.1 Уровень гомологии по данным Unipro UGENE:v45.1 несовершенных повторов составлял 52–57 %.

исследований были выполнены с использованием фрагментарного секвенирования генома. Немного позднее, в экспериментах с использованием обратной генетики и полногеномных последовательностей А. Румянцев (А. Rumyantsev) и соавт. [38] обнаружили, что вирулентность штаммов Sofjin-HO и Oshima 5-10 ВКЭ не ассоциирована со структурными белками, а тесно связана с генами неструктурных белков и их 3'-НТО. Полученные нами результаты с использованием высокопроизводительного полногеномного секвенирования вполне согласуются с этими данными и гипотезой о важной роли неструктурных белков в адаптации ВКЭ к новому типу клеток и новым хозяевам. Интересно, что после трех пассажей через мозг мышей в вариантах C11-13\_3/3m и C11-13\_8/3m выявлено 7 реверсивных аминокислотных замен, то есть "возвращающих" адаптированные к клеткам SPEV варианты (C11-13\_3 и C11-13\_8) к исходному изоляту из мозга человека. В прошедших пассажи через мозг мышей вариантах ВКЭ в гене *ns5* обнаружено 6 синонимичных и 2 несинонимичных нуклеотидных замен реверсного характера и 5 новых мутаций.

Нами выявлено значительное удлинение вариабельного участка 3'-НТО ВКЭ при пассажах через мозг белых мышей варианта, предварительно адаптированного к клеткам SPEV. Увеличение длины составило 306 н. для вариантов С11-13\_3/3т и С11-13\_8/3т. Ранее, в процессе серийных пассажей ВКЭ на клетках SPEV, Neuro-2A, HEK293, тоже были обнаружены короткие вставки в вариабельном районе 3'-НТО, хотя их длина была в интервале 22–37 н. [7, 21]. Известно, что 3'-НТО флавивирусов высокоструктурирована и содержит такие структуры, как петля-на-стебле, шпильки, гантелеобразные и У-образные элементы [25, 30]. Как известно, 5'- и 3'-НТО обеспечивают взаимодействие геномной вирусной РНК с РНК-зависимой РНК-полимеразой, тем самым инициируя синтез новой вирусной РНК. Консервативный район 3'-НТО может быть ответственен за определение хозяйской специфичности флавивирусов. Недавно показано, что 3'-НТО является источником по меньшей мере двух видов некодирующих РНК, которые влияют на репликацию и/или патогенез флавивирусов: субгеномная флавивирусная PHK (sfRNA) и микроPHK (KUN-miR-1), - в формировании которых участвует экзорибонуклеаза-1 (XRN1) [39-46]. XRN1 узнает уникальную трехспиральную

кольцеобразную структуру, которая складывается из Y-структур 5'-НТО и "псевдоузла" на 3'-НТО, и образует из нее sfRNA. sfRNA противодействует реакциям врожденного иммунитета (ингибируя индукцию интерферонов), снижает активность XRN1 и Dicer и взаимодействует непосредственно с вирусным репликативным комплексом, регулируя его активность [47–50]. Структурные элементы 3'-НТО также могут блокировать активность XRN1. Предполагается, что sfRNA останавливает деградацию вирусной геномной РНК на расстоянии примерно 525 нуклеотидов от конца 3'-HTO. Это предотвращает полную деградацию вирусной геномной РНК и приводит к накоплению sfRNAs в инфицированных клетках [43, 51]. Элементы ҮЗ и Ү2 3'-НТО расположены соответственно в конце вариабельного и начале консервативного участка. Они, по всей вероятности, обеспечивают формирование sfRNA1 и sfRNA2 соответствен-HO.

Обнаруженные нами в области энхансера геномной РНК ВКЭ несовершенные нукле-



**Рис. 4**. Механизм расщепления вирусной РНК экзорибонуклеазой XRN1 с формированием sfRNA ВКЭ. На рисунке подчеркиванием отмечены несовершенные L- и R-повторы, которые имеют гомологию 52–57 % и образуют правую часть петель Y3 и Y2 соответственно. SP, NSP – структурные и неструктурные белки флавивирусов соответственно.

отидные повторы L и R, вероятно, участвуют в регулировании активности клеточной XRN1 через элементы Y2 и Y3 (рис. 4). Увеличение длины 3'-НТО может быть критически важно для репликации вирусного генома при адаптации ВКЭ к лабораторным условиям культивирования, что в конечном счете обеспечивает возможность эффективной репродукции ВКЭ в различных типах клеток и при пассажах через мозг мыши.

Таким образом, обнаруженные нами изменения в геноме ВКЭ, прошедшем пассажи в клеточной культуре и через мозг мышей, относятся к точечным заменам нуклеотидов, локализованным преимущественно в генах неструктурных белков и иногда приводящим к мутациям в аминокислотном составе кодируемых ими полипротеинов. При пассажах через мозг мыши наблюдалась реверсия основной части замен к исходному штамму ВКЭ, выделенному из мозга человека. Кроме того, выявлено значительное увеличение длины вариабельной части 3'-HTO и высказано предположение, что это связано с ингибированием активности клеточной XRN1, участвующей в формировании sfRNA1 и sfRNA2. По всей вероятности, обнаруженные адаптационные мутации обеспечивают высокий уровень репродукции инфекционного ВКЭ как на культуре клеток, так и в мозге белых мышей.

Подобные множественные геномные изменения ВКЭ могут играть важную роль в обеспечении выживания ВКЭ в постоянно меняющихся природных условиях и при адаптации вируса к новым видам хозяев.

Авторы выражают искреннюю благодарность к. ф.-м. н. Швалову Александру Николаевичу за обсуждение результатов и помощь в обработке данных при метагеномном секвенировании.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания 9/21 и 7/21 Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора.

Все процедуры с животными проводили в соответствии с действующими документами: «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (https:// docs.cntd.ru/document/456016716) и «Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных» (Washington, 1996), а также в соответствии с протоколом, утвержденным комиссией по биоэтике № 1 при Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии "Вектор" Роспотребнадзора (протокол № 1-04.2021 от 30 апреля 2021 г.).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Charrel R.N., Attoui H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V., Gould E.A., Gritsun T.S., Heinz F.X., Labuda M., Lashkevich V.A., Loktev V., Lundkvist A., Lvov D.V., Mandl C.W., Niedrig M., Papa A., Petrov V.S., Plyusnin A., Randolph S., Süss J., Zlobin V.I., de Lamballerie X. (2014) Tickborne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 10(12), 1040–1055. https:// doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01022.x
- Ruzek D.Z., Avšič Županc T., Borde J., Chrdle A., Eyer L., Karganova G., Kholodilov I., Knap N., Kozlovskaya L., Matveev A., Miller A.D., Osolodkin D.I., Överby A.K., Tikunova N., Tkachev S., Zajkowska J. (2019) Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res.* 164, 23–51. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.014
- Khasnatinov M.A., Ustanikova K., Frolova T.V., Pogodina V.V., Bochkova N.G., Levina L.S., Slovak M., Kazimirova M., Labuda M., Klempa B., Eleckova E., Gould E.A., Gritsun T.S. (2009) Nonhemagglutinating flaviviruses: molecular mechanisms for the emergence of new strains via adaptation to European ticks. *PLoS One.* 4, e7295. https://doi. org/10.1371/journal.pone.0007295
- Deviatkin A.A., Kholodilov I.S., Vakulenko Y.A., Karganova G.G., Lukashev A.N. (2020) Tick-borne encephalitis virus: an emerging ancient zoonosis? *Viruses.* 12, 247. https://doi.org/10.3390/v12020247
- Wang S.S., Liu J.Y., Wang B.Y., Wang W.J., Cui X.M., Jiang J.F., Sun Y., Guo W.B., Pan Y.S., Zhou Y.H., Lin Z.T., Jiang B.G., Zhao L., Cao W.C. (2023) Geographical distribution of *Ixodes persulcatus* and associated pathogens: analysis of integrated data from a China field survey and global published data. *One Health.* 16, 100508. https://doi.org/10.1016/j. onehlt.2023.100508
- Chausov E.V., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Kononova J.V., Konovalova S.N., Pershikova N.L., Loktev V.B., Romanenko V.N., Ivanova N.V., Bolshakova N.P., Moskvitina N.S. (2010) Variability of the tick-borne encephalitis virus genome in the 5' noncoding region derived from ticks *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pavlovskyi* in Western Siberia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 365–375. https://doi.org/10.1089/ vbz.2009.0064
- Ternovoi V.A., Gladysheva A.V., Ponomareva E.P., Mikryukova T.P., Protopopova E.V., Shvalov A.N., Konovalova S.N., Chausov E.V., Loktev V.B. (2019) Variability in the 3' untranslated regions of the genomes of the different tick-borne encephalitis virus subtypes. *Virus Genes.* 55, 448-457. https://doi. org/10.1007/s11262-019-01672-0
- Gritsun T.S., Gould E.A. (2006a) The 3' unrtanslated region of tick-borne flaviviruses originated by the duplication of long repeat sequences within the open reading frame. *Virology*. **354**, 217–223. https://doi. org/10.1016/j.virol.2006.03.052

- Gritsun T.S., Gould E.A. (2006b) Direct repeats in the 3' untranslated regions of mosquito-borne flaviviruses: possible implications for virus transmission. *J. Gen. Virol.* 87(Pt. 11), 3297–3305. https://doi.org/10.1099/ vir.0.82235-0
- Gritsun T.S., Gould E.A. (2007b) Origin and evolution of flavivirus 5' UTRs and panhandles: trans-terminal duplications? *Virology*. 366, 8-15. https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.04.011
- Alvarez D.E., Filomatori C.V., Gamarnik A.V. (2008) Functional analysis of dengue virus cyclization sequences located at the 5' and 3' UTRs. *Virology*. 375, 223-235.
- Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. (1999) Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. J. Gen. Virol. 80(Pt. 1), 179–185. https://doi. org/10.1099/0022-1317-80-1-179
- Demina T.V., Dzhioev Y.P., Verkhozina M.M., Kozlova I.V., Tkachev S.E., Plyusnin A., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Zlobin V.I. (2010) Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes. *J. Med. Virol.* 82, 965– 976. https://doi.org/10.1002/jmv
- Kozlova I.V., Demina T.V., Tkachev S.E., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Verkhozina M.M., Karan L.S., Dzhioev Y.P., Paramonov A.I., Suntsova O.V., Savinova Y.S., Chernoivanova O.O., Ruzek D., Tikunova N.V., Zlobin V.I. (2018) Characteristics of the Baikal subtype of tick-borne encephalitis virus circulating in Eastern Siberia. *Acta Biomedica Scientifica*. 3(4), 53–60. https://doi. org/10.29413/ABS.2018-3.4.9
- Dai X., Shang G., Lu S., Yang J., Xu J. (2018) A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg. Microbes Infect.* 7, 74. https://doi.org/10.1038/ s41426-018-0081-6
- Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Chausov E.V., Novikov D.V., Leonova G.N., Netesov S.V., Loktev V.B. (2007) Novel variant of tickborne encephalitis virus, Russia. *Emer. Infect. Dis.* 13, 1574–1578. https://doi.org/10.3201/eid1310.070158
- 17. Чаусов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Тупота Н.Л., Москвитина Н.С., Романенко В.Н., Иванова Н.В., Большакова Н.П., Леонова Г.Н., Локтев В.Б. (2011) Молекулярно-генетический анализ полного генома вируса клещевого энцефалита сибирского субтипа на примере современного изолята Коларово-2008. Проблемы особо опасных инфекций. 4(110), 44-48. https://doi. org/10.21055/0370-1069-2011-4(110)-44-48
- Mikryukova T.P., Moskvitina N.S., Kononova Y.V., Korobitsyn I.G., Kartashov M.Y., Tyutenkov O.Y., Protopopova E.V., Romanenko V.N., Chausov E.V., Gashkov S.I., Konovalova S.N., Moskvitin S.S., Tupota N.L., Sementsova A.O., Ternovoi V.A., Loktev V.B. (2014) Surveillance of tick-borne encephalitis virus in wild birds and ticks in Tomsk

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

city and its suburbs (Western Siberia). *Ticks Tick Borne Dis.* **5**(2), 145–151. https://doi.org/10.1016/j. ttbdis.2013.10.004

- Микрюкова Т.П., Чаусов Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Протопопова Е.В., Карташов М.Ю., Терновой В.А., Глушкова Л.И., Корабельников И.В., Егорова Ю.И., Локтев В.Б. (2014) Генетическое разнообразие вируса клещевого энцефалита в клещах Ixodes persulcatus в северо-восточном регионе европейской части России. Паразитология. 48(2), 131-149.
- Korobitsyn I.G., Moskvitina N.S., Tyutenkov O.Y., Gashkov S.I., Kononova Y.V., Moskvitin S.S., Romanenko V.N., Mikryukova T.P., Protopopova E.V., Kartashov M.Y., Chausov E.V., Konovalova S.N., Tupota N.L., Sementsova A.O., Ternovoi V.A., Loktev V.B. (2021) Detection of tick-borne pathogens in wild birds and their ticks in Western Siberia and high level of their mismatch. *Folia Parasitol.* (Praha). **68**, 2021–2024. https://doi.org/10.14411/fp.2021.024
- Ponomareva E.P., Ternovoi V.A., Mikryukova T.P., Protopopova E.V., Gladysheva A.V., Shvalov A.N., Konovalova S.N., Chausov E.V., Loktev V.B. (2017) Adaptation of tick-borne encephalitis virus from human brain to different cell cultures induces multiple genomic substitutions. *Arch. Virol.* 162, 3151–3156. https://doi.org/10.1007/s00705-017-3442-x
- National Research Council. (1996) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, DC: National Academies Press. https://doi. org/10.17226/5140
- 23. Сюрин В.Н. (1970) Практическая вирусология. Москва: Колос, 352 с.
- 24. Kuno G., Gubler D.J., Santiago de Weil N.S. (1985) Antigen capture ELISA for the identification of dengue viruses. J. Virol. Methods. 12(1-2), 93-103. https://doi.org/10.1016/0166-0934(85)90011-4
- Ternovoi V.A., Kurzhukov G.P., Sokolov Y.V., Ivanov G.Y., Ivanisenko V.A., Loktev A.V., Ryder R.W., Netesov S.V., Loktev V.B. (2003) Tickborne encephalitis with hemorrhagic syndrome, Novosibirsk region, Russia, 1999. *Emer. Infect. Dis.* 9, 743–746. https://doi.org/10.3201/eid0906.030007
- 26. Ternovoi V.A., Gladysheva A.V., Ponomareva E.P., Mikryukova T.P., Protopopova E.V., Shvalov A.N., Konovalova S.N., Chausov E.V., Loktev V.B. (2019) Variability in the 3' untranslated regions of the genomes of the different tick-borne encephalitis virus subtypes. *Virus Genes.* 55, 448–457. https://doi. org/10.1007/s11262-019-01672-0
- 27. Davies T.J., Pedersen A.B. (2008) Phylogeny and geography predict pathogen community similarity in wild primates and humans. *Proc. Biol. Sci.* **275**, 1695–1701. https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0284
- 28. Woolhouse M.E.J., Haydon D.T., Antia R. (2005) Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends Ecol. Evol.* **20**, 238–244. https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.02.009
- 29. Loverdo C., Lloyd-Smith J.O. (2013) Evolutionary invasion and escape in the presence of deleterious

mutations. *PloS One*. **8**, e61879. https://doi. org/10.1371/journal.pone.0068179

- Sanjuan R., Nebot M.R., Chirico N., Mansky L.M., Belshaw R. (2010) Viral mutation rates. *J. Virol.* 84, 9733–9748. https://doi.org/10.1128/JVI.00694-10
- Lalic J., Cuevas J.M., Elena S.F. (2011) Effect of host species on the distribution of mutational fitness effects for an RNA virus. *PLoS Genet.* 7, e1002378. https:// doi.org/10.1371/journal.pgen.1002378
- Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Shevtsova A.S., Romanova L.Iu., Rogova Y.V., Dzhivanian T.I., Lyapustin V.N., Pivanova G.P., Gmyl A.P., Palyulin V.A., Karganova G.G. (2010) GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 398, 262–272. https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.12.012
- 33. Kopecky J., Grubhoffer L., Kovar V., Jindrak L., Vokurkova D. (1999) A putative host cell receptor for tick-borne encephalitis virus identified by anti-idiotypic antibodies and virus affinoblotting. *Intervirology*. 42, 9–16. https://doi. org/10.1159/000024954
- 34. Navarro-Sanchez E., Altmeyer R., Amara A., Schwartz O., Fieschi F., Virelizier J.L., Arenzana-Seisdedos F., Despres P. (2003) Dendritic-cellspecific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 4, 723–728. https://doi.org/10.1038/sj.embor. embor866
- Mandl C.W. (2005) Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res.* 111, 161–174. https://doi.org/10.1016/j. virusres.2005.04.007
- Goto A., Hayasaka D., Yoshii K., Mizutani T., Kariwa H., Takashima I. (2003) A BHK-21 cell culture-adapted tick-borne encephalitis virus mutant is attenuated for neuroinvasiveness. *Vaccine*. 21, 4043–4051. https://doi.org/10.1016/s0264-410x(03)00269-x
- 37. Mandl C.W., Kroschewski H., Allison S.L., Kofler R., Holzmann H., Meixner T., Heinz F.X. (2001) Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation *in vivo. J. Virol.* 75, 5627–5637. https:// doi.org/10.1128/JVI.75.12.5627-5637.2001
- Rumyantsev A.A., Murphy B.R., Pletnev A.G. (2006) A tick-borne Langat virus mutant that is temperature sensitive and host range restricted in neuroblastoma cells and lacks neuroinvasiveness for immunodeficient mice. J. Virol. 80, 1427–1439. https://doi.org/10.1128/JVI.80.3.1427-1439.2006
- Sakai M., Yoshii K., Sunden Y., Yokozawa K., Hirano M., Kariwa Y. (2014) Variable region of the 3'UTR is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model. J. Gen. Virol. 95, 823–835. https://doi. org/10.1099/vir.0.060046-0
- 40. Roby J.A., Pijlman G.P., Wilusz J., Khromykh A.A. (2014) Noncoding subgenomic flavivirus RNA:

multiple functions in West Nile virus pathogenesis and modulation of host responses. *Viruses.* **6**, 404–427. https://doi.org/10.3390/v6020404

- 41. Bidet K., Garcia-Blanco M.A. (2014) Flaviviral RNAs: weapons and targets in the war between virus and host. *Biochem. J.* **462**, 215–230. https://doi. org/10.1042/BJ20140456
- Hussain M., Asgari S. (2014) MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA. 111, 2746–2751. https://doi.org/10.1073/ pnas.1320123111
- 43. Hussain M., Torres S., Schnettler E., Funk A., Grundhoff A., Pijlman G.P., Khromykh A.A., Asgari S. (2012) West Nile virus encodes a microRNAlike small RNA in the 3'untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells. *Nucleic Acids Res.* 40, 2210–2223. https://doi.org/10.1093/nar/gkr848
- 44. Pijlman G.P., Funk A., Kondratieva N., Leung J., Torres S., van der Aa L., Liu W.J., Palmenberg A.C., Shi P.-Y., Hall R.A., Khromykh A.A. (2008) A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe.* 4, 579–591. https://doi.org/10.1016/ j.chom.2008.10.007
- 45. Chapman E.G., Costantino D.A., Rabe J.L., Moon S.L., Wilusz J., Nix J.C., Kieft J.S. (2014) The structural basis of pathogenic subgenomic flavivirus RNA (sfRNA) production. *Science*. **344**, 307–310. https://doi.org/10.1126/science.1250897
- Chapman E.G., Moon S.L., Wilusz J., Kieft J.S. (2014) RNA structures that resist degradation by Xrn1 produce a pathogenic Dengue virus RNA. *Elife.* 3, e01892. https://doi.org/10.7554/eLife.01892
- 47. Funk A., Truong K., Nagasaki T., Torres S., Floden N., Balmori Melian E., Edmonds J., Dong H., Shi P.Y., Khromykh A.A. (2010) RNA structures required for production of subgenomic flavivirus RNA. J. Virol. 84, 11407–11417. https://doi. org/10.1128/JVI.01159-10
- Chang R.Y., Hsu T.W., Chen Y.L., Liu S.F., Tsai Y.J., Lin Y.T., Chen Y.S., Fan Y.H. (2013) Japanese encephalitis virus non-coding RNA inhibits activation of interferon by blocking nuclear translocation of interferon regulatory factor 3. *Vet. Microbiol.* 166, 11–21. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.026
- Schuessler A., Funk A., Lazear H.M., Cooper D.A., Torres S., Daffis S., Jha B.K., Kumagai Y., Takeuchi O., Hertzog P., Silverman R., Akira S., Barton D.J., Diamond M.S., Khromykh A.A. (2012) West Nile virus noncoding subgenomic RNA contributes to viral evasion of the type I interferon-mediated antiviral response. *J. Virol.* 86, 5708–5718. https://doi.org/10.1128/ JVI.00207-12
- 50. Moon S.L., Anderson J.R., Kumagai Y., Wilusz C.J., Akira S., Khromykh A.A., Wilusz J. (2012) A noncoding RNA produced by arthropod-borne flaviviruses inhibits the cellular exoribonuclease XRN1 and alters host mRNA stability. *RNA*. 18, 2029–2040. https://doi.org/10.1261/rna.034330.112
- 51. Fan Y.H., Nadar M., Chen C.C., Weng C.C., Lin Y.T., Chang R.Y. (2011) Small non-coding RNA modulates Japanese encephalitis virus replication and translation in trans. *Virol. J.* 8, 492. https://doi. org/10.1186/1743-422X-8-492
- 52. Kieft J.S., Rabe J.L., Chapman E.G. (2015) New hypotheses derived from the structure of a flaviviral Xrn1-resistant RNA: conservation, folding, and host adaptation. *RNA Biol.* **12**, 1169–1177. https://doi.org /10.1080/15476286.2015.1094599

## Changes in the Genome of Tick-Borne Encephalitis Virus during Cultivation

V. A. Ternovoi<sup>1</sup>, E. P. Ponomareva<sup>1, \*</sup>, E. V. Protopopova<sup>1</sup>, N. L. Tupota<sup>1</sup>, T. P. Mikryukova<sup>1, †</sup>, V. B. Loktev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Virology for Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia \*e-mail: ponomareva\_ep@vector.nsc.ru, ponomareva-eugenia2014@yandex.ru

The tick-borne encephalitis virus (TBEV) of the Siberian genotype was previously isolated from the brain of a deceased person. TBEV variants obtained at passages 3 and 8 on SPEV cells were inoculated into the brains of white mice for subsequent passages. Full-genome sequences of all virus variants were analyzed by high-throughput sequencing. The analysis showed the presence of 41 point nucleotide substitutions, which were mainly localized in the genes of non-structural proteins NS3 and NS5 of TBEV. In the deduced virus protein sequences, 12 amino acid substitutions were identified. After three passages through mouse brains, reverse nucleotide and amino acid substitutions were detected. Most of them were mapped in the NS5 protein gene, where 5 new nucleotide substitutions also appeared. At the same time, there was an increase in the length of the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the viral genome by 306 nucleotides. The Y3 and Y2 3'-UTR elements were found to contain imperfect L and R repeats, which probably associated with inhibition of the activity of cellular XRN1 RNase and thus involved in the formation of sfRNA1 and sfRNA2. For all TBEV variants, high levels of infectious virus were detected both in cell culture and in the brain of white mice. The revealed changes in the genome that occur during successive passages of TBEV are most likely due to the significant genetic variability of the virus, which ensures its efficient reproduction in different hosts and active circulation in nature.

**Keywords:** tick-borne encephalitis virus, viral genome, 3'-UTR, nucleotide substitutions, adaptation, reverse mutation, cell culture, mouse

#### — МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ =

УДК 577.21 + 578.23

## **"БИПОЛЯРНОЕ" ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРА ВАСКУЛОГЕННОЙ** МИМИКРИИ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ МЕЛАНОМЫ

# © 2024 г. Н. А. Чуриков<sup>*a*</sup>, \*, А. А. Вартанян<sup>*b*</sup>, Е. С. Клушевская<sup>*a*</sup>, И. Р. Алембеков<sup>*a*</sup>, А. Н. Кретова<sup>*a*</sup>, В. Р. Чечеткин<sup>*a*</sup>, Г. И. Кравацкая<sup>*a*</sup>, В. С. Косоруков<sup>*b*</sup>,

Ю. В. Кравацкий<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия <sup>b</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 115478 Россия \*e-mail: tchurikov@eimb.ru

Поступила в редакцию 01.09.2023 г. После доработки 17.10.2023 г. Принята к публикации 17.10.2023 г.

Внешние воздействия влияют на характер экспрессии генов с помощью разных, еще недостаточно изученных, механизмов. Мы использовали метод PHK-сек для изучения изменений в экспрессии генов в клетках меланомы, способных формировать васкулярные каналы, имитирующие кровоснабжение эмбриона (васкулогенная мимикрия), которые подвергаются обратному развитию вскоре после воздействия ингибитора васкулогенной мимикрии. С помощью анализа дифференциальной экспрессии генов обнаружено, что под воздействием ингибитора значительно усиливается экспрессия 50 генов, которые контролируют клеточный цикл и формирование цитоскелета. Одновременно 50 генов, регулирующих разные клеточные процессы, подвергаются значительной репрессии. Оказалось, что гены, экспрессия которых усиливается, регулируются одновременно в разной комбинации большим набором факторов транскрипции. В то же время репрессируемые гены одновременно регулируются другим набором факторов транскрипции. Таким образом, препарат вызывает изменения экспрессии больших групп генов, обусловленные одновременным воздействием множества факторов транскрипции. Полученные нами результаты указывают на то, что репрессия васкулогенной мимикрии в клетках меланомы сопровождается сайленсингом или активацией больших групп генов, вызванными действием множества факторов транскрипции.

**Ключевые слова:** координированная экспрессия генов, меланома, Матригель, ингибитор LCS1269, PHK-сек, факторы транскрипции, *ACER2*, *TCAF2*, *KIF18A*, *NAV3*, *FGF13*, *NCKAP5* **DOI:** 10.31857/S0026898424020116, **EDN:** NIAKKQ

Механизмы регуляции экспрессии генов изучают не одно десятилетие, однако многое остается непонятным, особенно это относится к механизмам, которые обеспечивают координированную экспрессию генов. Предполагается, что совместная регуляция таких генов обусловлена тем, что они располагаются рядом, в одних и тех же хромосомных доменах [1, 2]. С другой

стороны, обеспечить одновременный сайленсинг многих генов, расположенных в разных хромосомах, можно с помощью молекул микроРНК (miPHK) или малых интерферирующих РНК (siPHK) [3-5]. Наряду с кровеносными сосудами, выстланными эндотелием, в опухолях представлены и высокоструктурированные васкулярные каналы, образованные опухолевыми клетками. В данной работе мы попытались выяснить, экспрессия каких генов изменяется в клетках высокоагрессивной меланомы, которые теряют способность к васкулогенной мимикрии под воздействием ингибитора LCS1269 [6, 7], и как эти гены регулируются. Васкулогенная мимикрия - это способность некоторых опухолевых клеток формировать ложные сосуды, не содержащие эндотелиальных клеток. Посредством васкулогенной мимикрии в опухоли

Сокращения: РНК-сек – глубокое секвенирование РНК; LCS1269 – ингибитор васкулогенной мимикрии; ММ – эксперименты с клетками меланомы, растущими на Матригеле; ММІ – эксперименты с клетками меланомы, растущими на Матригеле в присутствии ингибитора; ФТ – фактор транскрипции; FC – кратные изменения экспрессии (Fold Changes); GO.ID – идентификатор Онтологии Генов.

образуется сеть лакун, которые обеспечивают кровоснабжение опухолевых клеток и способствуют тем самым их выживанию [8].

Оказалось, что в присутствии ингибитора LCS1269 одновременно усиливается экспрессия 102 генов, тогда как 122 гена повергаются репрессии. При этом экспрессия 50 генов каждой группы резко изменяется. Проведен анализ этих групп генов в базах онтологии генов, а также данных об их регуляции разными факторами транскрипции (ФТ). Наши данные свидетельствуют о том, что под воздействием ингибитора васкулогенной мимикрии в клетках меланомы происходит активация ФТ и изменяется экспрессия определенных групп генов. При этом до 10 разных ФТ могут регулировать экспрессию конкретного гена, а изменения экспрессии происходят в течение короткого промежутка времени.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток меланомы. Клетки меланомы MelZ [6, 9] получены в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Клетки исходно растили на пластике в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота ("HyClone", США), 2 мМ глутамина, 0.1% гентамицина, в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (37 °C, влажность 95 и 5% CO<sub>2</sub>) до 70-75% слияния (10 млн клеток). Затем клетки переносили на чашки с Матригелем ("BD Bioscience", США) в той же среде, содержащей ингибитор васкулогенной мимикрии в нетоксической концентра-ции (LCS1269, 10<sup>-6</sup> М), в которой он не влияет на пролиферацию клеток, или без ингибитора. Цитотоксичность ингибитора изучали с помощью ММТ-теста, как описано ранее [6]. Рост клеток продолжался в течение 20 ч, затем из них выделяли препараты тотальной РНК.

Эксперименты РНК-сек. Проводили по два независимых эксперимента – с клетками, растущими без ингибитора или с ингибитором. Препараты РНК получали после лизиса клеток с помощью реагента Trisol ("Invitrogen", США). Качество препаратов контролировали с помощью биоанализатора Agilent. Библиотеки кДНК готовили с помощью наборов реактивов TruSeq Stranded RNA. Глубокое секвенирование двух биологических реплик проводили на приборе HiSeq1500 ("Illumina", США). Экспрессию генов анализировали с помощью пакета Deseq2 R. Консистентность реплик оценивали с помощью пакета deep Tools [10]. Коэффициенты Пирсона и Спирмана для наборов данных MM (r = 0.99,  $\rho = 0.69$ ) и MMI (r = 0.99,  $\rho = 0.67$ ) свидетельствуют о высокой воспроизводимости независимо полученных данных. Результаты PHK-сек помещены в базы данных (номера доступа для MM – GSE221872; для MMI – GSE221873).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Большие группы генов резко изменили уровень экспрессии в клетках меланомы в ответ на добавление ингибитора

Оказалось, что инкубация клеток в течение 20 ч с ингибитором приводит к повышению экспрессии 102 и снижению экспрессии 122 генов (при log2FG > 1.5, т. е. более чем в 2.83 раза). На рис. 1 приведено по 50 генов каждой группы с максимально изменившейся активностью. Цветная шкала приведена в широком диапазоне log2FC – от +5.5 до -5.0. Ген ТМРО-АS1, экспрессия которого максимально усилилась, кодирует длинную некодирующую РНК, он вовлечен в пролиферацию клеток опухолей разного типа и является онкогеном [11]. Экспрессия генов ACER2 и TCAF2 снизилась примерно в 32 раза (log2FC около 5). Ген *TCAF2* вовлечен в позитивную регуляцию миграции клеток [12]. Эти данные позволяют предположить, что под действием ингибитора активируется пролиферация клеток и подавляется их миграция. Чтобы выяснить, в какие биологические процессы вовлечены гены, экспрессия которых изменилась, провели поиск в базах данных онтологии генов и выбрали по 50 генов с максимально изменившейся экспрессией.

#### Анализ генов с измененной экспрессией в базах данных онтологии генов

Биологические процессы, с которыми связаны гены меланомы, экспрессия которых изменилась в присутствии ингибитора LCS1269, мы анализировали с использованием ресурca Profiler (https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost). В табл. 1 приведены результаты для 10 терминов онтологии генов, наиболее высоко ассоциированных с данными генами. Видно, что гены, экспрессия которых усилилась, ассоциированы с клеточным циклом и организацией цитоскелета. Гены KIF18A, DLGAP5, KIF20A, PLK1, NAV3, FGF13 вовлечены в связывание с микротрубочками, а гены KIF18A, NAV3, FGF13, *NCKAP5* – в деполимеризацию микротрубочек. Гены BUB1B, KIF18A, DLGAP5, STAG1, CCNE2, KIF20A, RBL1, XRCC2, TICRR, PLK1, DTL, E2F2, *CDC25A*, *МҮВ* контролируют клеточный цикл.

## "БИПОЛЯРНОЕ" ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРА

GO.ID	Функция/Процесс	Padj	Ген		
Молекулярная функция					
GO:0008017	Microtubule binding	0.006829558415930034	KIF18A, DLGAP5, KIF20A, PLK1, NAV3, FGF13		
GO:0015631	Tubulin binding	0.04453959825226614	KIF18A, DLGAP5, KIF20A, PLK1, NAV3, FGF13		
Биологический процесс					
GO:0000278	Mitotic cell cycle	0.000002927752876054714	BUB1B, KIF18A, DLGAP5, STAG1, CCNE2, KIF20A, RBL1, XRCC2, TICRR, PLK1, DTL, E2F2, CDC25A, MYB		
GO:1903047	Mitotic cell cycle process	0.00004046701434758872	BUB1B, KIF18A, DLGAP5, STAG1, CCNE2, KIF20A, RBL1, TICRR, PLK1, DTL, E2F2, CDC25A		
GO:0022402	Cell cycle process	0.00018900471515918558	BUB1B, KIF18A, DLGAP5, STAG1, CCNE2, KIF20A, RBL1, XRCC2, TICRR, PLK1, DTL, E2F2, CDC25A, WDR76		
GO:0044770	Cell cycle phase transition	0.00022746298342911283	BUB1B, DLGAP5, CCNE2, RBL1, TICRR, PLK1, DTL, E2F2, CDC25A, WDR76		
GO:0007049	Cell cycle	0.00035945882615939285	BUB1B, KIF18A, DLGAP5, STAG1, CCNE2, KIF20A, RBL1, XRCC2, TICRR, PLK1, DTL, E2F2, CDC25A, MYB, WDR76, UHRF1		
GO:0044772	Mitotic cell cycle phase transition	0.00045847139273843743	BUB1B, DLGAP5, CCNE2, RBL1, TICRR, PLK1, DTL, E2F2, CDC25A		
GO:0006270	DNA replication initiation	0.001981323810320336	CCNE2, MCM10, TICRR, PRIM1		
GO:0006260	DNA replication	0.0027829515300584542	CCNE2, MCM10, TICRR, DTL, PRIM1, POLE2, FAM111B		
GO:1901987	Regulation of cell cycle phase transition	0.004055801393608912	BUB1B, DLGAP5, RBL1, TICRR, PLK1, DTL, CDC25A, WDR76		
GO:0007019	Microtubule depolymerization	0.005597736302291347	KIF18A, NAV3, FGF13, NCKAP5		

**Таблица 1**. Молекулярные функции и биологические процессы, в которые вовлечены 50 генов, значительно усиливших экспрессию под действием ингибитора\*

\*Показаны только 10 процессов, максимально ассоциированных с 50 генами.

**Таблица 2.** Биологические процессы, в которые вовлечены 50 генов, экспрессия которых значительно снизилась под действием ингибитора\*

GO.ID	Биологический процесс	Padj	Ген
GO:0043549	Regulation of kinase activity	0.0009631712673035452	MRNIP, EPHB3, RGS2, SOCS1, EPHA2, SERTAD1, GADD45A, CCNG2, SESN2, CDKN1A
GO:0048523	Negative regulation of cellular process	0.001747679364398328	MRNIP, PTGER4, TRIM22, RGS2, SOCS1, ENC1, CAMSAP3, KANK3, EPHA2, BBC3, SERTAD1, GADD45A, SESN1, VASN, ARC, PRDM1, SESN2, TENT5C, TP53INP1, BTG2, CDKN1A, ACER2, TCAF2
GO:0065009	Regulation of molecular function	0.001885574647728961	MRNIP, TRIM22, EPHB3, RGS2, SOCS1, EPHA2, BBC3, XIRP1, SERTAD1, GADD45A, CCNG2, EDA2R, ARC, SESN2, CDKN1A, ACER2, TCAF2
GO:0051338	Regulation of transferase activity	0.004627641665897807	MRNIP, EPHB3, RGS2, SOCS1, EPHA2, SERTAD1, GADD45A, CCNG2, SESN2, CDKN1A
GO:0048518	Positive regulation of biological process	0.02112371270600905	KDM3A, MRNIP, PTGER4, TRIM22, EPHB3, RGS2, SOCS1, ENC1, EPHA2, TNFSF9, BBC3, SERTAD1, GADD45A, SESN1, EDA2R, ARC, PRDM1, SESN2, ACTA2, TENT5C, TP53INP1, BTG2, CDKN1A, ACER2, TCAF2
GO:0009893	Positive regulation of metabolic process	0.024747078153625094	KDM3A, MRNIP, PTGER4, TRIM22, EPHB3, SOCS1, EPHA2, BBC3, SERTAD1, GADD45A, SESN1, PRDM1, SESN2, ACTA2, TENT5C, TP53INP1, BTG2, CDKN1A, ACER2
GO:0045859	Regulation of protein kinase activity	0.02510375699053	MRNIP, RGS2, SOCS1, SERTAD1, GADD45A, CCNG2, SESN2, CDKN1A
GO:0072331	Signal transduction by p53 class mediator	0.03283706367174577	BBC3, EDA2R, SESN2, CDKN1A, ACER2
GO:0042770	Signal transduction in response to DNA damage	0.04725086282309963	MRNIP, GADD45A, SESN2, CDKN1A, ACER2
GO:0033554	Cellular response to stress	0.04960437746562762	MRNIP, PTGER4, EPHA2, BBC3, GADD45A, SESN1, VASN, EDA2R, SESN2, TP53INP1, BTG2, CDKN1A, ACER2

\*Приведены только 10 процессов, максимально ассоциированных с 50 генами.

Представленные на рис. 1 гены, активность которых снизилась под действием ингибитора, связаны с положительной или отрицательной регуляцией ряда клеточных процессов (табл. 2). Приведенные в табл. 2 гены связаны с передачей клеточных сигналов медиаторами P53 (*BBC3, EDA2R, SESN2, CDKN1A, ACER2*), передачей сигналов о повреждениях ДНК (*MRNIP, GADD45A, SESN2, CDKN1A, ACER2*) и с клеточным ответом на стресс (*MRNIP, PTGER4, EPHA2, BBC3, GADD45A, SESN1, VASN, EDA2R, SESN2, TP53INP1, BTG2, CDKN1A, ACER2*).

В результате аналогичного анализа всех генов, экспрессия которых усилилась (102 гена) или снизилась (122 гена), сделан вывод, что под действием ингибитора усиливается моторная активность микротрубочек и миграция клеток меланомы. В то же время в этих клетках подавляется активность генов, которые регулируют пролиферацию и передают сигналы о клеточных стрессах.

Мы предположили, что одновременная активация или репрессия этих двух групп генов может быть связана с их корегуляцией, т. е. одна группа ФТ может одновременно усиливать экспрессию больших групп генов. Аналогично другая группа ФТ может одновременно ослаблять экспрессию больших групп генов.

## Совместная регуляция генов многочисленными факторами транскрипции

Регулируются ли гены, активность которых резко изменилась в присутствии ингибитора, одновременно разными ФТ? Чтобы проверить такую возможность, мы провели поиск 50 генов, транскрипция которых усилилась, в базе данных Enrichr (https://maayanlab.cloud/Enrichr/ enrich) для поиска ФТ, одновременно регулирующих эти гены (Enrichr Submissions TF-Gene Coocurrence). На рис. 2*а* приведены результаты этого поиска. Оказалось, что действительно многие гены, транскрипция которых значительно усилилась в ответ на добавление ингибитора, регулируются одновременно 10 и более  $\Phi T$ . В табл. 3 приведены только 10 ФТ и регулируемые ими гены. Видно, что в базе данных представлены всего 299 генов, которые регулируются таким образом. Среди рассмотренных 50 генов около 40 регулируются одновременно каждым из этих 10 ФТ.

в log2FC. 50 генам, экспрессия которых усилилась, соответствует критерий logFC > 1.71 (т. е., их экспрессия повысилась более чем в 3.27 раза). 50 генам, экспрессия которых снизилась, соответствует критерий log2FC < 1.89 (т. е. экспрессия снизилась более чем в 3.7 раза).



298



**Рис. 1.** Тепловая карта изменений экспрессии генов в клетках меланомы под действием ингибитора васкулогенной мимикрии. Отобрано по 50 генов, экспрессия которых максимально изменилась (повысилась либо снизилась) под действием ингибитора. Приведена цветная шкала изменений экспрессии

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024



**Рис. 2.** Гены, экспрессия которых изменилась под воздействием ингибитора (Input Genes), регулируются одновременно многими ФТ (Enriched Terms). a – Гены, экспрессия которых усилилась.  $\delta$  – Гены, экспрессия которых снизилась. Результаты получены с помощью базы данных Enrichr (https://maayanlab.cloud/Enrichr/enrich) для поиска ФТ, одновременно регулирующих гены (Enrichr Submissions TF-Gene Coocurrence).

Ангиогенезу в меланомах способствует экспрессия гена *DEPDC1B*, кодирующего ФТ (табл. 3), нокдаун этого гена подавляет пролиферацию клеток меланомы и вызывает их апоптоз [13, 14], а также ФТ MYBL2 – важный регулятор пролиферации клеток [15]. Кроме того, в табл. 3 указаны гены ФТ E2F7 и E2F8, которые действуют синергично и важны для супрессии рака кожи [16]. Интересно, что экспрессия генов некоторых ФТ (ZNF367, E2F1 и DEPDC1) возрастает под воздействием ингибитора васкулогенной мимикрии. Эти гены приведены не только в колонке ФТ, но и среди групп генов, активируемых под воздействием ингибитора васкулогенной мимикрии.

Анализ регуляции 50 генов со сниженной экспрессией показал, что примерно 20–30 из них в разных комбинациях регулируются 10 другими ФТ (табл. 4). Таким образом, ингибитор, подавляя образование ложных сосудов клетками меланомы, существенно изменяет характер экспрессии этих 50 генов с помощью множества ФТ.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что ингибитор васкулогенной мимикрии вызывает изменения в экспрессии более чем 200 генов в клетках меланомы. Экспрессия 100 из них довольно значительно усиливается или снижается (рис. 1). Предполагалось, что ингибитор LCS1269 вызывает повреждения ДНК и арест G2/М перехода клеточного цикла, тем самым восстанавливая чувствительность клеток меланомы к ДНК-повреждающим агентам [6, 7, 9].

В настоящее время мы не можем выявить ключевые гены, ответственные за эффект ингибитора, однако нами идентифицированы 100 генов, экспрессия которых резко изменяется под действием ингибитора. Эти гены играют важную роль в клеточном цикле, пролиферации клеток, формировании цитоскелета, миграции клеток, а также выполняют другие функции в клетках. Обнаружено, что кодируемый геном *DEPDC1B* ФТ, вовлеченный в миграцию клеток и запуск Wnt-сигнального пути, регулирует 42 гена, значительно усиливших экспрессию под действием ингибитора (табл. 3).

Как показано ранее, васкулогенная мимикрия связана с ремоделированием цитоскелета и требует целостности сети микротрубочек [17]. Значительное усиление активности генов *KIF18A*, *NAV3*, *FGF13*, *NCKAP5* (табл. 1), которые вовлечены в деполимеризацию микротрубочек, свидетельствует о нарушениях цитоскелета, вызываемых ингибитором. Кроме того, ингибитор вызывает резкое подавление экспрессии генов *TCAF2* и *ACER2*, связанных с позитивной

## ЧУРИКОВ и др.

Таблица 3.	. Факторы транскрипции	(ФТ), одновременно	регулирующие груг	пы генов, активи	руемых после
добавлени	я ингибитора				

Фактор транскрип- ции	Доля	Padj	Ген
DEPDC1B	42/299	3.580485614936991E-47	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;M YB;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATA D5;XRCC2;ARHGEF39;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM1 11B;CCNA2;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2; DEPDC1;KIF20A;MCM6;DTL
E2F7	41/299	3.821023448908531E-46	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;M YB;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATA D5;XRCC2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2 ;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;K IF20A;MCM6;DTL
E2F8	41/299	3.821023448908531E-46	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;M YB;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATA D5;XRCC2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2 ;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;K IF20A;MCM6;DTL
MYBL2	41/299	3.821023448908531E-46	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;M YB;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATA D5;XRCC2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2 ;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;K IF20A;MCM6;DTL
RAD51	41/299	3.821023448908531E-46	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;M YB;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATA D5;XRCC2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2 ;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;K IF20A;MCM6;DTL
DEPDC1	40/299	9.750383314399901E-45	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;P CLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATAD5;X RCC2;ARHGEF39;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B; CCNA2;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;KIF 20A;MCM6;DTL
E2F1	40/299	9.750383314399901E-45	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;M YB;PCLAF;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATAD5;X RCC2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2;MM S22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;KIF20 A;MCM6;DTL
WDHD1	40/299	9.750383314399901E-45	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;P CLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATAD5; XRCC2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2;M MS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;KIF 20A;MCM6;DTL
ZNF367	40/299	9.750383314399901E-45	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;M YB;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;ATAD5;XRC C2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCNA2;MMS2 2L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;RBL1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;KIF20A; MCM6;DTL
ZNF519	40/299	9.750383314399901E-45	UHRF1;PRIM1;CDCA7;KIF14;BUB1B;MCM10;LMNB1;AURKA;CDC20;M YB;PCLAF;E2F1;E2F2;CLSPN;ZNF367;DLGAP5;PLK4;GINS1;GINS2;AT AD5;XRCC2;PLK1;KIF23;CDC6;WDR76;CDC25A;TICRR;FAM111B;CCN A2;MMS22L;ASPM;NEIL3;KIF18A;WEE1;CCNE2;POLE2;DEPDC1;KIF2 0A;MCM6;DTL

Примечание. Представлены 10 ФТ. Доля – число генов, ассоциированных с данным ФТ, в выборке из 299 генов. Результаты анализа базы данных Enrichr (https://maayanlab.cloud/Enrichr/enrich) для поиска ФТ, одновременно регулирующих гены (Enrichr Submissions TF-Gene Coocurrence).

## "БИПОЛЯРНОЕ" ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРА

## **Таблица 4**. Факторы транскрипции (ФТ), одновременно регулирующие группы генов, экспрессия которых снизилась после добавления ингибитора

Фактор транскрипции	Доля	Padj	Ген
ZNF79	31/299	2.3420335820357761E-26	PTGER4;CSRNP1;BTG2;CDKN1A;NOTCH1;PRDM1;PPM1D;B BC3;RGS2;SERTAD1;SESN1;SESN2;ENC1;TP53INP1;FDXR;I ER5;TRIM22;POLH;GADD45A;GDF15;SLC30A1;KLF4;PGF;PN RC1;ACER2;ACTA2;MDM2;PLXNB2;TNFSF9;EPHA2;HBEGF
ZNF821	26/299	6.532976510709839E-20	CSRNP1;BTG2;CDKN1A;SLC2A3;PRDM1;IFIT2;BBC3;FAM11 7A;RGS2;SESN1;SESN2;ENC1;TP53INP1;BMF;GADD45A;SM OX;GDF15;ARRDC3;KLF4;PGF;SBK1;BCL6;CCNG2;FSCN1;P LXNB2;HBEGF
ZNF425	24/299	1.5281770047316118E-17	BTG2;CDKN1A;GADD45A;GDF15;ARRDC3;SLC2A3;PRDM1;K LF4;PGF;PNRC1;IFIT2;RND1;BBC3;IQCN;RGS2;BCL6;SERT AD1;SESN1;CCNG2;SESN2;ENC1;TP53INP1;BMF;HBEGF
NR4A3	23/299	1.9800969612121248E-16	PTGER4;CSRNP1;BTG2;CDKN1A;GADD45A;GDF15;ARRDC3; SLC2A3;PRDM1;KLF4;CLU;IFIT2;ACTA2;RGS2;ARC;SOCS1;B CL6;CRISPLD2;ENC1;FSCN1;IER5;EPHA2;HBEGF
MAFF	22/299	2.156404175382678E-15	PTGER4;CSRNP1;BTG2;CDKN1A;GADD45A;GDF15;ARRDC3; SLC2A3;PRDM1;KLF4;CLU;PGF;PNRC1;IFIT2;RGS2;ARC;BC L6;SERTAD1;ENC1;IER5;EPHA2;HBEGF
SNAI1	22/299	2.156404175382678E-15	<i>CSRNP1;BTG2;CDKN1A;NOTCH1;GADD45A;GDF15;SLC2A3;</i> <i>PRDM1;KLF4;PGF;RND1;ACTA2;RGS2;SOCS1;BCL6;SERTAD</i> <i>1;CRISPLD2;ENC1;FSCN1;IER5;EPHA2;HBEGF</i>
ATF3	21/299	1.4250083219969755E-14	PTGER4;CSRNP1;BTG2;CDKN1A;GADD45A;GDF15;ARRDC3; SLC2A3;PRDM1;KLF4;CLU;IFIT2;ACTA2;RGS2;ARC;BCL6;SE RTAD1;SESN2;IER5;EPHA2;HBEGF
FOSB	21/299	1.4250083219969755E-14	PTGER4;CSRNP1;BTG2;CDKN1A;GADD45A;GDF15;ARRDC3; SLC2A3;KLF4;CLU;IFIT2;ACTA2;RGS2;ARC;BCL6;SERTAD1; CRISPLD2;ENC1;IER5;EPHA2;HBEGF
JDP2	21/299	1.4250083219969755E-14	PTGER4;CSRNP1;BTG2;CDKN1A;NOTCH1;GADD45A;GDF15; SLC2A3;PRDM1;KLF4;CLU;IFIT2;RGS2;BCL6;CRISPLD2;SES N2;ENC1;FSCN1;IER5;EPHA2;HBEGF
MXD1	21/299	1.4250083219969755E-14	<i>CSRNP1;BTG2;CDKN1A;GADD45A;SMOX;GDF15;ARRDC3;SL C2A3;PRDM1;KLF4;PNRC1;IFIT2;HELZ2;RGS2;SOCS1;BCL6</i> <i>;SERTAD1;CCNG2;SESN2;IER5;HBEGF</i>

Примечание. Представлены 10 ФТ. Указано число генов, ассоциированных с данным ФТ, в выборке из 299 генов, депонированных в базе данных (Доля). Результаты получены с помощью базы данных Enrichr (https://maayanlab.cloud/ Enrichr/enrich) для поиска ФТ, одновременно регулирующих гены (Enrichr Submissions TF-Gene Coocurrence).

регуляцией миграции клеток и пролиферации (рис. 1). Известно, что миграция клеток связана с малигнизацией и метастазированием [18]. Следовательно, активация генов KIF18A, NAV3, FGF13, NCKAP5, нарушающих целостность цитоскелета, и одновременная репрессия генов TCAF2 и ACER2, которые теперь не могут усиливать миграцию и пролиферацию, способны потенцировать эффект подавления васкулогенной мимикрии ингибитором (рис. 3). В настоящее время мы планируем использовать искусственное выключение активности генов *TCAF2* и *ACER2*, чтобы ослабить малигнизацию клеток меланомы за счет подавления миграции и метастазирования. Указанные гены могут быть мишенями для онкотерапии.



**Рис. 3.** Схема, показывающая, как добавление ингибитора нарушает баланс генной экспрессии и как это сказывается на фенотипе клеток меланомы. a – Баланс экспрессии генов до добавления ингибитора. Клетки веретеновидной формы на Матригеле формируют сосудоподобные структуры.  $\delta$  – Нарушение баланса экспрессии генов вызывает изменение поведения клеток (нарушается образование сосудоподобных структур) и их формы (клетки более округлые).

Ранее обнаружили, что ингибитор LCS1269 повреждает ДНК [6, 7, 9]. Нами показано, что ингибитор подавляет активность генов, которые связаны с передачей сигналов медиаторами Р53 и сигналов о повреждениях ДНК (табл. 2), делая клетки меланомы более чувствительными к ДНК-повреждающим агентам. Таким образом, наши данные согласуются с ранее определенными свойствами ингибитора.

Другой важный аспект данной работы состоит в обнаружении механизма координированной экспрессии генов с помощью одновременной регуляции десятков генов наборами из десятков ФТ. Интересно, что при этом одни наборы ФТ вызывают активацию одних групп генов, тогда как другие в это же время вызывают репрессию других групп генов (табл. 3, табл. 4, рис. 3). Такая биполярная регуляция способна вызывать резкие изменения в экспрессии генов. Недавно мы обнаружили, что наборы таких генов-мишеней ФТ далеко не случайно перекрываются с генами, которые образуют контакты с ядрышками (данные будут опубликованы отдельно).

Одновременная экспрессия больших перекрывающихся наборов генов (коэкспрессия) это недавно обнаруженный механизм регуляции генной активности. Во всех изученных клетках человека (ткани или культуры клеток) найдены гены, которые коэкспрессируются в разных комбинациях [19]. В клетках линии К562, например, в разных комбинациях коэкспрессируются 177 наборов генов [20]. Удобной клеточной моделью для анализа механизмов регуляции экспрессии генов, включая роль трехмерных структур хромосом в изменениях экспрессии генов, является также меланома.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00035) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2021-1060).

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kosak S.T., Scalzo D., Alworth S.V., Li F., Palmer S., Enver T., Lee J.S., Groudine M. (2007) Coordinate gene regulation during hematopoiesis is related to genomic organization. *PLoS Biol.* 5(11), e309. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050309
- 2. Tchurikov N.A., Fedoseeva D.M., Sosin D.V., Snezhkina A.V., Melnikova N.V., Kudryavtseva A.V.,

Kravatsky Y.V., Kretova O.V. (2015) Hot spots of DNA double-strand breaks and genomic contacts of human rDNA units are involved in epigenetic regulation. *J. Mol. Cell. Biol.* **7**, 366–382. doi: 10.1093/jmcb/mju038

- 3. Xu P., Wu Q., Yu J., Rao Y., Kou Z., Fang G., Shi X., Liu W., Han H. (2020) A systematic way to infer the regulation relations of miRNAs on target genes and critical miRNAs in cancers. *Front. Genet.* **11**, 278. doi: 10.3389/fgene.2020.00278
- Tchurikov N.A., Kretova O.V. (2007) Suffix-specific RNAi leads to silencing of F element in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. 2(5), e476. doi: 10.1371/ journal.pone.0000476
- Bartel D.P. (2018) Metazoan microRNAs. *Cell.* 173, 20–51. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006
- Vartanian A., Baryshnikova M., Burova O., Afanasyeva D., Misyurin V., Belyavsky A., Shprakh Z. (2017) Inhibitor of vasculogenic mimicry restores sensitivity of resistant melanoma cells to DNA-damaging agents. *Melanoma Res.* 27, 8–16. doi: 10.1097/CMR.00000000000308
- Kalitin N.N., Ektova L.V., Kostritsa N.S., Sivirinova A.S., Kostarev A.V., Smirnova G.B., Borisova Y.A., Golubeva I.S., Ermolaeva E.V., Vergun M.A., Babaeva M.A., Lushnikova A.A., Karamysheva A.F. (2022) A novel glycosylated indolocarbazole derivative LCS1269 effectively inhibits growth of human cancer cells *in vitro* and *in vivo* through driving of both apoptosis and senescence by inducing of DNA damage and modulating of AKT/mTOR/S6K and ERK pathways. *Chem. Biol. Interact.* 364, 10056. doi: 10.1016/j. cbi.2022.110056
- Maniotis A.J., Folberg R., Hess A., Seftor E.A., Gardner L.M., Pe'er J., Trent J.M., Meltzer P.S., Hendrix M.J. (1999) Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. *Am. J. Pathol.* 155(3), 739–752. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65173-5
- Вартанян А., Хоченкова Ю., Кособокова Е., Барышникова М., Косоруков В. (2021) СД437 снижает метастатический потенциал клеток меланомы. Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 62(4), 333–340.
- Ramirez F., Ryan D.P., Gruning B., Bhardwaj V., Kilpert F., Richter A.S., Heyne S., Dundar F., Manke T. (2016) deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucl. Acids Res.* 44, W160–165.
- 11. Cui H., Zhao J. (2020) LncRNA TMPO-AS1 serves as a ceRNA to promote osteosarcoma tumorigenesis by regulating miR-199a-5p/WNT7B axis. *J. Cell Biochem.* **121**, 2284–2293. doi:10.1002/jcb.2945110
- Gkika D., Lemonnier L., Shapovalov G., Gordienko D., Poux C., Bernardini M., Bokhobza A., Bidaux G., Degerny C., Verreman K., Guarmit B., Ben-

ahmed M., de Launoit Y., Bindels R.J., Fiorio Pla A., Prevarskaya N. (2015) TRP channel-associated factors are a novel protein family that regulates TRPM8 trafficking and activity. *J. Cell Biol.* **208**, 89–107. https://doi:10.1083/jcb.201402076

- Hu F., Fong K.O., Cheung M.P.L., Liu J.A., Liang R., Li T.W., Sharma R., Ip P.P., Yang X., Cheung M. (2022) DEPDC1B promotes melanoma angiogenesis and metastasis through sequestration of ubiquitin ligase CDC16 to stabilize secreted SCUBE3. *Adv. Sci.* 9, 2105226. https://doi.org/10.1002/advs.202105226
- 14. Xu Y., Sun W., Zheng B., Liu X., Luo Z., Kong Y., Xu M., Chen Y. (2019) DEPDC1B knockdown inhibits the development of malignant melanoma through suppressing cell proliferation and inducing cell apoptosis. *Exp. Cell. Res.* **379**(1), 48–54. doi: 10.1016/j. yexcr.2019.03.021
- Musa J., Aynaud M.M., Mirabeau O., Delattre O., Grünewald T.G. (2017) MYBL2 (B-Myb): a central regulator of cell proliferation, cell survival and differentiation involved in tumorigenesis. *Cell Death Dis.* 8, e2895 (2017). https://doi.org/10.1038/cddis.2017.244
- Thurlings I., Martínez-López L., Westendorp B., Hien B.T., Martínez-López L.M., Zijp M., Thurlings I., Thomas R.E., Schulte-Merker S., Bakker W.J., de Bruin A. (2017) Synergistic functions of E2F7 and E2F8 are critical to suppress stress-induced skin cancer. *Oncogene.* 36, 829–839. https:// doi.org/10.1038/onc.2016.251
- Vartanian A., Stepanova E., Grigorieva I., Solomko E., Belkin V., Baryshnikov A., Lichinitser M. (2011) Melanoma vasculogenic mimicry capillary-like structure formation depends on integrin and calcium signaling. *Microcirculation*. 18, 390–399. doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00102.x
- Bera K., Kiepas A., Godet I., Li Y., Mehta P., Ifemembi B., Paul C.D., Sen A., Serra S.A., Stoletov K., Tao J., Shatkin G., Lee S.J., Zhang Y., Boen A., Mistriotis P., Gilkes D.M., Lewis J.D., Fan C.M., Feinberg A.P., Valverde M.A., Sun S.X., Konstantopoulos K. (2022) Extracellular fluid viscosity enhances cell migration and cancer dissemination. *Nature*. 611, 365–373. https://doi.org/10.1038/s41586-022-05394-6
- Lachmann A., Torre D., Keenan A.B., Jagodnik K.M., Lee H.J., Wang L., Silverstein M.C., Ma'ayan A. (2018) Massive mining of publicly available RNA-seq data from human and mouse. *Nat. Commun.* 9, 1366.
- Tchurikov N.A., Klushevskaya E.S., Alembekov I.R., Kretova A.N., Chechetkin V.R., Kravatskaya G.I., Kravatsky Y.V. (2023) Induction of the erythroid differentiation of K562 Cells is coupled with changes in the inter-chromosomal contacts of rDNA clusters. *Int. J. Mol. Sci.* 24(12), 9842. https://doi.org/10.3390/ ijms24129842

#### 304

#### ЧУРИКОВ и др.

## Big groups of Human Genes are Simultaneously Regulated by Multiple Transcription Factors

N. A. Tchurikov<sup>1, \*</sup>, A. A. Vartanian<sup>2</sup>, E. S. Klushevskaya<sup>1</sup>, I. R. Alembekov<sup>1</sup>, A. N. Kretova<sup>1</sup>, V. R. Chechetkin<sup>1</sup>, G. I. Kravatskaya<sup>1</sup>, V. S. Kosorukov<sup>2</sup>, Yu. V. Kravatsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia <sup>2</sup>Department of Experimental Diagnosis and Therapy of Tumors, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, Moscow, 115478 Russia

\*e-mail: tchurikov@eimb.ru

Multiple exogenous or endogenous factors alter gene expression patterns by different mechanisms that yet are poorly understood. We used RNA-Seq analysis in order to study changes in gene expression in melanoma cells capable to vasculogenic mimicry upon action of inhibitor of vasculogenic mimicry. Here, we describe that the drug induces a strong upregulation of 50 genes controlling cell cycle and microtubule cytoskeleton coupled with a strong downregulation of 50 genes controlling different cellular metabolic processes. We found that both groups of genes are simultaneously regulated by multiple sets of transcription factors. We conclude, that one way for coordinated regulation of big groups of genes is the regulation simultaneously by multiple transcription factors.

Keywords: coordinated expression, melanoma, Matrigel, LCS1269 inhibitor, RNA-Seq, transcription factors, ACER2, TCAF2, KIF18A, NAV3, FGF13, NCKAP5

#### — МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ —

УДК 577.12

## МЕТОД ИНДУЦИРУЕМОГО НОКДАУНА СУЩЕСТВЕННЫХ ДЛЯ РАЗВИТИЯ ГЕНОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК OSC Drosophila melanogaster

© 2024 г. С. В. Марфина<sup>а, b</sup>, Е. А. Михалева<sup>а</sup>, Н. В. Акуленко<sup>а, \*</sup>, С. С. Рязанский<sup>а, \*\*</sup>

<sup>а</sup> Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт", Москва, 123182 Россия <sup>b</sup> Российский химико-технологический университет им Д.И. Менделеева, Москва 125047 Россия

\*e-mail: n.akulenko11@gmail.com \*\*e-mail: s.ryazansky@gmail.com Поступила в редакцию 10.11.2023 г. После доработки 10.11.2023 г. Принята к публикации 21.11.2023 г.

Предложен основанный на PHK-интерференции метод индуцируемого нокдауна генов, существенных для поддержания гомеостаза, в культуре клеток. В подходе используется встроенная в геном с помощью CRISPR-Cas9-мутагенеза конструкция, в которой экспрессия предшественника siPHK находится под контролем индуцируемого ионами меди металлотионеинового промотора. Эндогенный источник siPHK позволяет осуществить нокдаун в культурах клеток, которые имеют низкую эффективность трансфекции экзогенными siPHK. Эффективность подхода продемонстрирована на культуре соматических клеток яичников дрозофилы на двух генах, которые необходимы для оогенеза: *Cul3*, кодирующего компонент убиквитин-лигазного комплекса со множественными функциями в протеостазе, и *cut*, кодирующего фактор транскрипции, участвующий в регуляции дифференцировки фолликулярных клеток яичников.

**Ключевые слова:** нокдаун, siPHK, CRISPR-Cas9, дрозофила, OSC **DOI:** 10.31857/S0026898424020137, **EDN:** NDBKYZ

#### введение

Генетические технологии подавления экспрессии генов разделяют на методы нокаута, при которых в рамку считывания или регуляторные области вносятся мутации, и нокдауна, снижающие количество образуемой мРНК при сохранении последовательности гена. Среди методов нокаута CRISPR-Cas9 выделяется сравнительной простотой и эффективностью, заслуженно позволивших ему стать универсальным инструментом редактирования генома [1, 2]. В этом методе нуклеаза Cas9 в комплексе с "направляющей" РНК (single guide RNA, sgPHK) связывается с участком генома, комплементарным sgPHK, и вносит в него двухцепочечный разрыв. При его восстановлении клеточной

305

системой негомологичного соединения концов в месте разрыва образуются микроделеции или инсерции. В ходе репарации по механизму гомологичной рекомбинации при наличии экзогенной донорной матрицы ДНК с плечами, гомологичными последовательностям вокруг места разрыва, эта матрица может встроиться в место разрыва. Оба способа позволяют отредактировать последовательности гена, полностью останавливая его экспрессию.

Основным подходом при нокдауне является использование классической РНК-интерференции (РНКи) [3]. При РНКи мРНК расщепляется нуклеазой Argonaute (Ago), которая распознает мРНК-мишень благодаря ассоциированной с Ago короткой интерферирующей РНК (small interfering RNA, siPHK), комплементарной мРНК. В культуре клеток РНКи осуществляется трансфекцией siPHK или длинного двухцепочечного РНК-предшественника (дцРНК), который клеточным аппаратом процессинга нарезается до siPHK. Используется также трансфекция плазмид, кодирующих дву- или одноцепочечные, имеющие шпилечную вторичную структу-

Сокращения: shPHK – короткие шпилечные PHK; siPHK – короткие интерферирующие PHK; OSC – соматические клетки яичников дрозофилы; CRL – мультибелковый убиквитин-лигазный комплекс (Cullin-RING-ligase).

ру (short hairpin RNA, shPHK), предшественники siPHK. Использование последовательности определенных пре-миРНК в качестве шаблона для дизайна вторичной структуры shPHK позволяет значительно ускорить их процессинг до siPHK [4]. В другом подходе нокдауна применяется лишенный нуклеазной активности dCas9 (dead Cas9), но сохраняющий способность связывать sgPHK и комплементарный ей участок генома. Белки dCas9, слитые с ингибирующими доменами факторов транскрипции, в комплексе с sgPHK, комплементарной промоторной области, позволяют ингибировать транскрипцию генов [5]. Разрабатываются встраиваемые в геном кассеты с геном *dCas9* под индуцируемым промотором [6]. Все чаше применяют и другие методы нокдауна с использованием, например, белка Cas13a [7].

Методы нокаута с помощью CRISPR-Cas9 и ноклачна с помошью РНКи не лишены недостатков. Так, CRISPR-Cas9-мутагенез в общем случае мало применим для редактирования полиплоидных геномов, часто встречающихся в клеточных культурах [8, 9]. Кроме того, в результате адаптивной эволюции в редактированном геноме со временем могут накапливаться компенсаторные мутации, затрудняющие анализ фенотипа [10]. В ряде случаев стоит задача подавить активность гена на небольшой срок, что невозможно осуществить необратимым нокаутом. Наконец, нокаут существенных для жизнеспособности генов, представляющих особый интерес, приводит к возникновению гетерозиготных по мутации клеточных культур и лишь к незначительному снижению экспрессии изучаемого гена [10]. Основная проблема использования РНКи связана с неэффективной трансфекцией дцРНК, которая может быть очень низкой для ряда клеточных культур [11], включая и культуру OSC соматических клеток яичников дрозофилы.

С целью преодоления неэффективности трансфекции мы разработали метод индуцированного нокдауна генов в культуре клеток OSC дрозофилы на основе кассеты, в которой экспрессия РНК-предшественника siPHK, способной сворачиваться в пре-миРНК-подобную шпилечную структуру, находится под контролем индуцируемого промотора гена металлотионеина. Кассета интегрируется в определенное место генома с помошью CRISPR-Cas9-мутагенеза. Экспрессия shPHK и подавление целевого гена запускаются добавлением в среду ионов меди. Предлагаемый подход позволяет осуществлять нокдаун критически необходимых для жизнедеятельности генов в культурах клеток, которые имеют низкую эффективность трансфекции.

Эффективность предлагаемого метода показана на гене Cul3, кодирующем компонент убиквитин-лигазного мультибелкового комплекса CRL (cullin-RING-ligase complex). Комплексы CRL регулируют множество молекулярных процессов, включая клеточное деление, передачу сигналов, транскрипцию, метаболизм, протеостаз, дифференцировку и развитие [12]. Эффективность метода продемонстрирована также на примере гена *cut*, кодирующего фактор транскрипции, необходимый на разных стадиях дифференцировки соматических фолликулярных клеток в оогенезе дрозофилы [13, 14]. Предложенный метод является альтернативой индуцируемому нокдауну с помощью dCas9 или Cas13. Значимость ланной работы опрелеляется непрекращающейся актуальностью исследований общебиологических закономерностей развития на модельном объекте – дрозофиле, а также возможностью использовать предлагаемый подход на культурах клеток других видов, включая человека.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культура клеток. Линия соматических клеток яичников дрозофилы OSC[Cas9+] с геномной встройкой плазмиды pAc-sgRNA-Cas9 (Addgene, #49330) [15] была получена нами ранее на основе культуры клеток OSC (любезно предоставлена М. Сиоми, Университет Токио, Япония) [16]. Линию OSC[Cas9+] поддерживали при 25 °C в среде Shields and Sang M3 ("Sigma-Aldrich", США, #S3652) с 10% феталь-ной бычьей сыворотки (FBS, "Gibco", США, #10270106), 10%-ным экстрактом мух, 10 мкг/ мл инсулина ("Sigma-Aldrich", США, #19278), 0.6 мг/мл L-глутатиона ("Sigma-Aldrich", США, #G6013), 50 ед/мл пенициллина, 50 г/мл стрептомицина и 1 мкг/мл пуромицина. Экстракт мух получали гомогенизированием 1 г 3-7-дневных мух в 7 мл среды МЗ. Гомогенат центрифугировали 15 мин при 1500 g; надосадочную жидкость нагревали (10 мин при 60 °С) и очищали центрифугированием при 1500 g в течение 1.5 ч при 4 °С; супернатант еще раз центрифугировали при 4000 g в течение 15 мин при 4 °C. Трансфекцию плазмид проводили с помощью Fu-GENE-HD ("Promega", США, #E2311) согласно инструкции производителя. Отбор клеток с интегрированной в геном кассетой с геном устойчивости к гигромицину или бластицидину проводили на среде в присутствии 200 мкг/ мл гигромицина ("Calbiochem", США, #400050) или 10 мкг/мл бластицидина ("Applichem", Германия, #А3784). Экспрессию MT-shRNA-bsd индуцировали, добавляя в среду раствор CuSO<sub>4</sub> до конечной концентрации 0.5-2 мМ; уровень экспрессии измеряли через 3 дня после индукции.

Нокаут генов *Cul3* и *EloB* в культуре клеток OSC. Выбор последовательностей sgPHK для внесения двухцепочечного разрыва в гены *Cul3* и *EloB* проводили с помощью программы "TargetFinder" [17]. Синтезированные олигонуклеотиды (sgR-NA<sup>Cul3</sup>: 5'-CTTCGATAAAACACAGCGTTGATAT и 5'-AAACATATCAACGCTGTGTTTTATC; sgR-NA<sup>EloB</sup>: 5'-CTTCGTCAGGACAACGATGTCAT GG и 5'-AAACCCATGACATCGTTGTCCTGAC) отжигали, фосфорилировали по 5'-концу и клонировали в вектор pU6-BbsI-chiRNA ("Addgene", США, #45946) [17], предварительно линеаризованному по сайтам BbsI. Нокаут генов с помощью Cas9 в линии OSC[Cas9+] проводили согласно [18]. В качестве донорной ДНК использовали ПЦР-фрагмент с последовательностью гена hyg под собственным промотором, полученный с плазмиды pMH4 ("Addgene", США, #52529) [19] с помощью праймеров: hyg\_ Cul3: 5'-СТТСТТТТТААБСААСТАСТБТАТТТ ATGCCTTCCCCTTCGAATAGGAACCGCCTAT АТ<u>GGATCTTCCGGATGGCTCGAG</u>и 5'-GAG CTGGGTGCATCTTTATCCTTTTCACTTTCAA CTGCCTTGCGGCCATAAAACACAGCGGAAG **TTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTCC** ATAT; hyg EloB: 5'-ATCGCAGGCATACTAAAG GTGCAGCCCGTGGACCAGCGGTTATACAAT-CAGGACAACGATGGATCTTCCGGATGGCTC-GAG и 5'-CTGCGCCTTGGCCGTGGACACCG TCACGCCGTAGTCCTGCAACGTGCTGTCGT CCTCCATGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTA **ТАGGAACTTCCATAT**. На 5'-конце праймеров находится участок, комплементарный 60 нуклеотидам последовательностей гена ниже или выше места внесения двухцепочечного разрыва, а 3'-конец (подчеркнуто) комплементарен последовательности вектора рМН4. Смесью ПЦР-фрагмента и плазмиды pU6/sgPHK трансфицировали клетки OSC[Cas9+], как описано выше.

Конструирование вектора pAc-MT-shRNAbsd. Донорная плазмида для гомологичной репарации вносимых Cas9 двухцепочечных разрывов сконструирована на основе различных векторов. Сначала на основе pWalium20 получили кассету MT-shRNA-bsd, содержащую последовательности shPHK под промотором MT и ген устойчивости к антибиотику бластицидину bsd. Для этого олигонуклеотиды, кодирующие shPHK (*Cul3*: 5'-ctagcagtTACGATCATGGATGAGTTTAAtagttata ttcaagcataTTAAACTCATCCATGATCGTAgcg и 5'aattcgcTACGATCATGGATGAGTTTAAtatgcttgaa tataactaTTAAACTCATCCATGATCGTAactg; *cut*: 5'-ctagcagtAAGGAAGTGAACACACTCAAAtagtt atattcaagcataTTTGAGTGTGTGTTCACTTCCTTgcg

и 5'-aattcgcAAGGAAGTGAACACACTCAAAtatg cttgaatataactaTTTGAGTGTGTGTTCACTTCCTTac tg; участки, из которых вырезается siPHK, показаны прописными буквами) отжигали и клонировали в вектор pWalium20 ("DGRC", США, #1472) [4, 20], линеаризованный по сайтам Есо-RI и NheI, в результате чего получали плазмиду pWalium20-shRNA. В качестве источника последовательностей шпилечных структур использовали базу данных FlyRNAi проекта "The Transgenic RNAi Project at Harvard Medical School" [20]. Замена гена mini-white на ген bsd производилась клонированием по Гибсону (NEBuilder Ні кіt, NEB, США) двух фрагментов ДНК: pWalium20-shRNA, линеаризованной по сайтам HindIII для вырезания *mini-white*; ПЦР-фрагмента с геном bsd, полученного синтезом с использованием праймеров 5'-CTCGAGATCGATG АТАТСААААТАААСАТАТGCTGTTGG и 5'-CG AATTGGGTACAAGCTCCATATGTTAGAAACA ААТТТАТ и плазмиды pMH4 ("Addgene", США, #52529) [19] в качестве матрицы. Полученная плазмида называлась pWalium20-shRNA-bsd. Последовательность большей части промотора 10×UAS-hsp70 заменили на промотор МТ клонированием по Гибсону двух фрагментов: pWalium20-shRNA-bsd, линеаризованной по сайтам BgIII и BamHI для вырезания 5×UAS-hsp70; ПЦР-фрагмента с последовательностью МТ, полученного с праймеров 5'-GGATGTTTTCTA GAACACCTTTAGTTGCACTGAGATGAT и 5'-ATACGAAGTTATGGATCCGTTGCAGGACAG-GATGT, и плазмиды pMT-OsTIR1-P2A-H2B-AID-EYFP (любезно предоставлена К. Ленером, Университет Цюриха, Швейцария) в качестве матрицы. В процессе конструирования итоговой донорной плазмиды pAc-MT-shRNA-bsd из вектора pAc-sgRNA-Cas9 предварительно по сайтам SacI был вырезан фрагмент с частью гена *Cas9*, а потом в него клонированием по Гибсону вставили кассету MT-shRNA-bsd. Для этого использовали pAc-sgRNA-Cas9-SacI, линеаризованную по сайту SmaI, и ПЦР-фрагмент с кассетой, полученный с праймерами 5'-CGACGTCCCCCG GGAATTAACCCTCACTAAAGG и 5'-CGAGG GTGCGTACGGCATATGTTAGAAACAAATTT ATTT, и плазмиды pWalium20-MT-shRNA-bsd в качестве матрицы. Полученную плазмиду рАс-MT-shRNA-bsd можно использовать в качестве вектора для клонирования других последовательностей shPHK по сайтам EcoRI и XbaI. С целью конструирования плазмиды для экспрессии sePHK<sup>puro</sup> к *puro* синтезированные олигонуклеотиды (5'-CTTCGGCGAGGGTGCGTACGGCCC и 5'-AAACGGGCCGTACGCACCCTCGCC) отжигали, фосфорилировали по 5'-концу и клонировали в вектор pU6-BbsI-chiRNA ("Addgene", США, #45946), предварительно линеаризованный по сайтам BbsI. Все полученные плазмиды

проверяли секвенированием по Сэнгеру. Смесью плазмид pU6/sgPHK<sup>puro</sup> и pAc-MT-shRNAbsd трансфицировали клетки OSC[Cas9+], как описано выше.

Измерение уровня экспрессии генов с помощью **qRT-ПЦР.** Около 1.5 мкг тотальной РНК, выделенной из 10<sup>6</sup> клеток с помощью реактива Extract RNA ("Евроген", Россия), подвергали обработке ДНКазой I ("Ambion", США). кДНК получена с использованием обратной транскриптазы Mint ("Евроген", Россия) и смеси случайных гексамеров в качестве праймеров. Количественный ПЦР-анализ в реальном времени полученной кДНК проводили на ПЦР-амплификаторе DT-96 ("ДНК-технология", Россия) с праймерами к Cul3 (5'-CTTCGATAAAACACAGCGTTGATAT и 5'-GCGTGAAGCCTTTGACATTTTC), EloB: (5'-AAACCCATGACATCGTTGTCCTGAC и 5'-GAGCTGAAGCGAATGATTGAG), cut (5'-CTTCGTTGTTCGGCGAGTCCGTGCT 5'-CCAGGAACATCTTCATGCGAATG) И и rp49 (5'-ATGACCATCCGCCCAGCATAĆ и 5'-GCTTAGCATATCGATCCGACTGG). Изменение уровня относительной экспрессии генов *Cul3*, *EloB* и *cut* к *rp49* рассчитывали как 2<sup>-ΔΔCt</sup> по сравнению с их относительной экспрессией в исходных клетках OSC[Cas9<sup>+</sup>].

Определение встройки трансгена в геноме с помощью ПЦР. Геномную ДНК из 10<sup>6</sup> клеток OSC[*Cul3-KO*] или OSC[*EloB-KO*] выделяли фенол-хлороформным методом и использовали для ПЦР с HotTaq-полимеразой ("Евроген", Россия) со следующими праймерами: 5'-GCGTGAAGCCTTTGACATTTTC (праймер



#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Неэффективность нокаута Cul3 в культуре клеток OSC

В рамках работы, направленной на изучение функций генов *Cul3* и *EloB*, которые кодируют компоненты мультибелкового убиквитин-лигазного комплекса CRL, участвующего в регуляции многочисленных клеточных процессов [12], мы провели нокаут этих генов в культуре соматических клеток яичников OSC[Cas9+] с конститутивной экспрессией Cas9. При проведении нокаута кассету с геном устойчивости к гигромицину hyg внедрили в кодирующую часть генов Cul3 и EloB в OSC (рис. 1*a*). Отбор клеток со вставленной в геном кассетой проводили на среде с гигромицином. Анализ количества транскриптов в полученных культурах методом qRT-ПЦР показал, что нокаут генов приводит к падению уровня их экспрессии, но в случае *Cul3-КО* количество транскриптов снижается только в 2 раза, тогда как в *EloB-KO* – в 10 раз (рис. 16). Можно предположить, что линия *Cul3*-KO, в отличие от линии *EloB-KO*, гетерозиготна по мутантному гену. Однако ПЦР-анализ геномов показал, что интактные аллели дикого типа



**Рис. 1.** Результаты нокаута генов *Cul3* и *EloB* в OSC. Изменение уровня экспрессии генов *Cul3* и *EloB* в нокаутных клетках относительно исходной линии OSC[Cas9+] (a). Уровень экспрессии, измеренный методом qRT-ПЦР, нормировали на экспрессию *rp49*. Показаны средние значения измерений по двум биологическим повторностям с тремя техническими повторностями в каждом; погрешности измерения показаны стандартной ошибкой среднего. Статистическую значимость различий оценивали по методу Уилкоксона. ПЦР-анализ генома клеток *Cul3-KO* (б) и *EloB-KO* (в) показан а схема расположения использованных праймеров к последовательности генов, размер ампликонов и рузльтат ПЦР (электрофорез в агарозном геле).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

сохранились в обеих линиях (рис. 16, в). Поэтому вероятно, что более высокая степень подавления экспрессии *EloB* по сравнению с *Cul3* при нокауте объясняется либо тем, что в линии *EloB*-*KO* гетерозиготна лишь небольшая доля клеток, либо *EloB*-*KO* является доминантной мутацией.

Культура OSC в основном представлена диплоидными клетками, но встречаются и полиплоидные клетки [21]. Чтобы осуществить нокаут всех копий генов в диплоидном геноме, можно использовать вместо одной две кассеты, содержащие гены устойчивости к разным антибиотикам [22]; при этом в каждую хромосому попадает только одна из кассет. Последующая селекция на устойчивость к двум антибиотикам позволяет отобрать клетки, геном которых содержит обе кассеты с разными генами устойчивости на разных хромосомах. Для полиплоидных клеточных культур разработан подход с использованием интегрированной в геном кассеты с закодированной одной или несколькими sgPHK к интересующему гену [23]. В этом случае, Cas9, загруженная постоянно экспрессирующейся sgPHK, будет вносить двухцепочечные разрывы в одну из копий генома до тех пор, пока там присутствует исходная копия гена.

Гетерозиготность линии *Cul3-KO*, вероятно, объясняется важностью Cul3 для обеспечения жизнедеятельности клетки, что делает невозможным селекцию гомозиготных клеток. Даже использование двух кассет с разными антибиотиками, интегрируемых в разные аллели [22]. или кассет с постоянной экспрессией sgPHK [23] не позволит достичь полного нокаута жизненно важных генов, или такая линия будет нестабильной. В этих случаях для инактивации генов лучше применять нокдаун с использованием dCas9 или РНКи. Однако с такими культурами, как OSC дрозофилы, не удается добиться ощутимого подавления экспрессии с помощью классического способа РНКи путем трансфекции дцРНК. В связи с этим нами разработан метод нокдауна, запускаемый со встроенной в геном shPHK, находящейся под контролем индуцибельного промотора. Встройка кассеты с закодированной shRNA в геном осуществляется методом CRISPR-Cas9.

#### Конструирование вектора для индуцированного нокдауна генов

Мы сконструировали кассету, кодирующую заданную shPHK под контролем индуцируемого металлотионеинового промотора, на основе вектора pWalium20, которая была разработана для внедрения в геном и экспрессии shPHK в определенных тканях дрозофилы [20]. Закодированная в векторе shPHK создана на основе последовательности пре-miR-1, предшественника микроРНК дрозофилы miR-1 со шпилькоподобной вторичной структурой. Экспрессия этой РНК находится под контролем минимального промотора *hsp70* и регуляторного элемента *UAS*. Последовательность UAS-hsp70-shPHK в векторе pWalium20 фланкирована инсуляторами, что позволяет проводить эффективную экспрессию shPHK с трансгена в разных участках генома независимо от локального уровня гетерохроматинизации.

Схема получения кассеты представлена на рис. 2a. В векторе pWalium20 ген *mini-white*, первоначально необходимый для исследований *in vivo* и отбора трансгенных особей по цвету глаз, был заменен на ген устойчивости к антибиотику бластицидину (bsd) для отбора клеток с нужной вставкой на селективной среде. Промотор UAS-hsp70 заменен на металлотионеиновый промотор МТ, индуцируемый ионами Cu<sup>2+</sup>. Для интеграции полученной кассеты MT-shRNA-bsd в геном с использованием CRISPR-Cas9-мутагенеза необходимо выбрать место встройки, а также сконструировать донорную плазмиду, в которой кассета окружена плечами, гомологичными участкам вблизи сайта ее встройки по механизму гомологичной репарации двухцепочечного разрыва ДНК. В качестве места встройки был выбран ген устойчивости к антибиотику пуромицину puro, который находится в составе ранее встроенной плазмиды pAc-sgRNA-Cas9 с конститутивно экспрессирующимся Cas9 в OSC (линия клеток OSC[Cas9+]). Таким образом, pAc-sgRNA-Cas9, встроенная в геном OSC, служит одновременно источником Cas9, а также платформой для встройки кассеты с shPHK. Донорная плазмида pAc-MT-shRNA-bsd получена с использованием pAc-sgRNA-Cas9, в ген puro которой клонирована фланкированная инсуляторами кассета MT-shPHK-bsd. Конструкция MT-shRNA-bsd в донорной плазмиде окружена плечами, необходимыми для гомологичной рекомбинации с геном риго в геноме. Последовательность sgPHK к гену puro (sgPHK<sup>puro</sup>) была клонирована в вектор pU6-BbsI-chiRNA.

В нашем методе индуцируемого нокдауна нуклеаза Cas9, заряженная sgPHK<sup>риго</sup> к гену *риго*, вносит в него двухцепочечный разрыв, который далее репарируется по механизму гомологичной рекомбинации с использованием донорной плазмиды pAc-MT-shRNA-bsd в качестве матрицы (рис.  $2\delta$ ). Это приводит к интеграции в *риго* кассеты MT-shRNA-bsd. Экспрессия shRNA и, следовательно, нокдаун целевого гена запускается добавлением ионов Cu<sup>2+</sup> в среду. В плазмиде pAc-MT-shRNA-bsd одну шпилечную последовательность можно заменить на любую другую, т. е. использовать ее как вектор.



**Рис. 2.** Схема конструирования донорной плазмиды pAc-MT-shRNA-bsd, содержащей кассету MT-shRNA-bsd с индуцируемой shPHK (*a*). Подробное описание представлено в тексте и разделе Экспериментальная часть. *puro\_R* и *puro\_L* – фрагменты гена *puro* в pAc-MT-shRNA-bsd, которые будут служить плечами для гомологичной рекомбинации. Кассета MT-shRNA-bsd из донорной плазмиды внедряется в предварительно встроенный в геном трансген pAc-sgRNA-Cas9 (показана его часть с генами *puro u Cas9*) с помощью Cas9 и активируется добавлением ионов меди (*б*). Экспрессирующиеся shPHK процессируются до siPHK, которые в комплексе с белком Ago2 дрозофилы связываются с комплементарной мPHK и вызывают е е расщепление по механизму PHKи.

#### Индуцируемый нокдаун генов Cul3 и cut

Эффективность метода индуцированного нокдауна проверена на гене *Cul3*. Мы клонировали последовательность, кодирующую shPHK к транскрипту *Cul3*, в вектор pAc-MT-shRNAbsd. Эту плазмиду, а также плазмиду с последовательностью sgPHK<sup>puro</sup> с помощью трансфекции вводили в клетки линии OSC[Cas9+].



**Рис. 3.** Изменение уровня экспрессии генов *Cul3* (*a*) и *cut* (*b*) при добавлении ионов меди в концентрации 0.5, 1 и 2 мМ к линиям клеток, в геном которых внедрены кассеты с соответствующими shPHK, по сравнению с экспрессией в OSC[Cas9+]. Уровень экспрессии, измеренный методом qRT-ПЦР, нормировали на экспрессию *rp49*. Показаны средние значения измерений по двум-трем биологическим повторностям с тремя техническими повторностями в каждом; погрешности измерения показаны стандартной ошибкой среднего. Статистическую значимость различий оценивали по методу Уилкоксона; пs – различия средних статистически недостоверны.

Последующий отбор клонов на селективной среде с бластицидином позволил получить поликлональную, устойчивую к бластицидину культуру клеток, содержащую в геноме встройку кассеты MT-shCul3-bsd. Измерение методом qRT-ПЦР уровня экспрессии *Cul3* в клетках со вставкой MT-shCul3-bsd показало, что даже без добавления в среду Cu<sup>2+</sup> он достоверно ниже по сравнению с исходными клетками OS-C[Cas9+] (рис. 3*a*). По-видимому, это обусловлено присутствием в самой среде ионов Cu<sup>2+</sup> в количестве, достаточном для запуска экспрессии shCul3. Активацию экспрессии shCul3 и подавление экспрессии *Cul3* индуцировали добавлением ионов Cu<sup>2+</sup>. С целью определения максимального уровня подавления концентрацию  $Cu^{2+}$  варьировали от 0.5 до 2 мМ (2 мМ это концентрация, при которой клетки OSC еще сохраняют жизнеспособность). Уже в присутствии 0.5 мМ Cu<sup>2+</sup> наблюдалось снижение уровня экспрессии *Cul3* в 3-4 раза относительно клеток без индукции и в 5-6 раз относительно экспрессии в OSC[Cas9+] (рис. 3a). Увеличение концентрации  $Cu^{2+}$  до 2 мМ не приводило к дальнейшему более значительному снижению экспрессии Cul3. Аналогичный эксперимент по индуцированному нокдауну, проведенный с геном транскрипционного фактора cut, также показал снижение количества его транскриптов. Таким образом, метод индуцированного нокдауна позволяет подавить экспрессию генов: в случае *Cul3* эффективность была выше (в 5-6 раз), чем при частичном нокауте Cul3-*КО* (в 2-3 раза).

Отметим, что преимущество предлагаемого метода индуцированного нокдауна состоит в потенциальной возможности проведения обратимого, временного подавления генов. Для восстановления экспрессии достаточно сменить среду с избытком ионов меди на обычную, а также определить промежуток времени, достаточный для снижения количества наработанной shPHK. Предложенную систему с эндогенным источником siPHK можно использовать в широком диапазоне культур клеток с низкой восприимчивостью к трансфекции экзогенными дцРНК. В перспективе культуру клеток со встроенной кассетой можно поддерживать в лаборатории и использовать для проведения экспериментов продолжительное время. Наконец, важная особенность нашего подхода состоит в использовании одного и того же участка генома для встройки кассеты с закодированными шпильками - в нашем случае это ген риго в составе предварительно встроенного трансгена. Это позволяет корректно сравнивать эффективность подавления одного и того же гена разными последовательностями shPHK, а также эффективность подавления разных генов.

Работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00519).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas Systems. *Science*. 339, 819–823.
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 339, 823–826.
- Mohr S., Smith J., Shamu C., Neumüller R., Perrimon N. (2014) RNAi screening comes of age: improved techniques and complementary approaches. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 15, 591–600.
- Ni J.-Q., Zhou R., Czech B., Liu L.P., Holderbaum L., Yang-Zhou D., Shim H.S., Tao R., Handler D., Karpowicz P., Binari R., Booker M., Brennecke J., Perkins L.A., Hannon G.J., Perrimon N. (2011) A genome-scale shRNA resource for transgenic RNAi in *Drosophila*. *Nat. Methods*. 8, 405–407.
- Gilbert L.A., Larson M.H., Morsut L., Liu Z., Brar G.A., Torres S.E., Stern-Ginossar N., Brandman O., Whitehead E.H., Doudna J.A., Lim W.A., Weissman J.S., Qi L.S. (2013) CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell.* 154, 442–451.
- Xu X., Qi L.S. (2019) A CRISPR-dCas toolbox for genetic engineering and synthetic biology. J. Mol. Biol. 431, 34–47.
- Kordyś M., Sen R., Warkocki Z. (2022) Applications of the versatile CRISPR-Cas13 RNA targeting system. WIREs RNA. 13, e1694.
- Scharf I., Bierbaumer L., Huber H., Wittmann P., Haider C., Pirker C., Berger W., Mikulits W. (2018) Dynamics of CRISPR/Cas9-mediated genomic editing of the AXL locus in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol. Lett.* 15, 2441–2450.
- Boettcher M., McManus M.T. (2015) Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol. Cell.* 58, 575–585.
- Housden B.E., Muhar M., Gemberling M., Gersbach C.A., Stainier D.Y.R., Seydoux G., Mohr S.E., Zuber J., Perrimon N. (2017) Loss-of-function genetic tools for animal models: cross-species and cross-platform differences. *Nat. Rev. Genet.* 18, 24–40.
- Chong Z.X., Yeap S.K., Ho W.Y. (2021) Transfection types, methods and strategies: a technical review. *Peer J.* 9, e11165.
- Harper J.W., Schulman B.A. (2021) Cullin-RING ubiquitin ligase regulatory circuits: a quarter century beyond the F-box hypothesis. *Annu. Rev. Biochem.* 90, 403-429.
- 13. Sun J., Deng W.-M. (2005) Notch-dependent downregulation of the homeodomain gene cut is required

for the mitotic cycle/endocycle switch and cell differentiation in *Drosophila* follicle cells. *Development*. **132**, 4299–4308.

- Knapp E.M., Li W., Sun J. (2019) Downregulation of homeodomain protein Cut is essential for *Drosophila* follicle maturation and ovulation. *Development*. 146, dev179002.
- Bassett A.R., Tibbit C., Ponting C.P., Liu J.-L. (2014) Mutagenesis and homologous recombination in *Dro-sophila* cell lines using CRISPR/Cas9. *Biol. Open.* 3, 42–49.
- Niki Y., Yamaguchi T., Mahowald A.P. (2006) Establishment of stable cell lines of Drosophila germ-line stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 16325– 16330.
- Gratz S.J., Ukken F.P., Rubinstein C.D., Thiede G., Donohue L.K., Cummings A.M., O'Connor-Giles K.M. (2014) Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics*. **196**, 961–971.
- Kunzelmann S., Böttcher R., Schmidts I., Förstemann K. (2016) A comprehensive toolbox for genome editing in cultured *Drosophila melanogaster* cells. *G3*: *Genes, Genomes, Genetics.* 6, 1777–1785.
- Böttcher R., Hollmann M., Merk K., Nitschko V., Obermaier C., Philippou-Massier J., Wieland I., Gaul U., Förstemann K. (2014) Efficient chromosomal gene modification with CRISPR/cas9 and PCRbased homologous recombination donors in cultured *Drosophila* cells. *Nucl. Acids Res.* 42, e89–e89.
- Perkins L.A., Holderbaum L., Tao R., Hu Y., Sopko R., McCall K., Yang-Zhou D., Flockhart I., Binari R., Shim H.S., Miller A., Housden A., Foos M., Randkelv S., Kelley C., Namgyal P., Villalta C., Liu L.P., Jiang X., Huan-Huan Q., Wang X., Fujiyama A., Toyoda A., Ayers K., Blum A., Czech B., Neumuller R., Yan D., Cavallaro A., Hibbard K., Hall D., Cooley L., Hannon G.J., Lehmann R., Parks A., Mohr S.E., Ueda R., Kondo S., Ni J.Q., Perrimon N. (2015) The transgenic RNAi project at Harvard medical school: resources and validation. *Genetics.* 201, 843–852.
- Sytnikova Y.A., Rahman R., Chirn G.-W., Clark J.P., Lau N.C. (2014) Transposable element dynamics and PIWI regulation impacts lncRNA and gene expression diversity in *Drosophila* ovarian cell cultures. *Genome Res.* 24, 1977–1990.
- Stoyko D., O T., Hernandez A., Konstantinidou P., Meng Q., Haase A.D. (2022) CRISPR-Cas9 genome editing and rapid selection of cell pools. *Curr. Protoc.* 2, e624.
- 23. Xia B., Amador G., Viswanatha R., Zirin J., Mohr S.E., Perrimon N. (2020) CRISPR-based engineering of gene knockout cells by homology-directed insertion in polyploid *Drosophila* S2R+ cells. *Nat. Protoc.* 15, 3478–3498.

## METHOD OF INDUCIBLE KNOCKDOWN OF ESSENTIAL GENES IN OSC CELL CULTURE OF Drosophila melanogaster

S. V. Marfina<sup>1,2</sup>, E. A. Mikhaleva<sup>1</sup>, N. V. Akulenko<sup>1,\*</sup>, S. S. Ryazansky<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup> National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia <sup>2</sup> Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow, 125047 Russia \*e-mail: n.akulenko11@gmail.com

\*\*e-mail: s.ryazansky@gmail.com

In the paper, we propose an RNA interference-based method of inducible knockdown of genes essential for cell viability. The method arranges a genetic cassette in which an inducible metallothionein promoter controls the expression of siRNA precursor. The cassette is inserted into the genomic pre-integrated transgene by CRIPSR-Cas9. The expression of siRNA precursor and following silencing of the gene of interest is activated by the supplementation of the medium with copper ions. This technique with the production of endogenous siRNAs allows the gene knockdown in cell cultures that are refractory to conventional transfection strategies of exogenous siRNA. The efficiency of the developed method was demonstrated in the cell culture of *Drosophila* ovarian somatic cells for two genes that are essential for oogenesis: *Cul3*, encoding a component of the multiprotein ubiquitin-ligase complex with versatile functions in proteostasis, and *cut*, encoding a transcription factor regulating the differentiation of the ovarian somatic cells.

Keywords: knockdown, siRNA, shRNA, CRISPR-Cas9, Drosophila, OSC

### СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.353

## СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ АГРЕГАТОВ СКЕЛЕТНОМЫШЕЧНОГО ТИТИНА

© 2024 г. Л. Г. Бобылёва<sup>a</sup>, Т. А. Урюпина<sup>a</sup>, Н. В. Пеньков<sup>b</sup>, М. А. Тимченко<sup>a</sup>, А. Д. Уланова<sup>a</sup>, А. Г. Габдулхаков<sup>c</sup>, И. М. Вихлянцев<sup>a, \*</sup>, А. Г. Бобылёв<sup>a, \*\*</sup>

<sup>а</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,

Пущино, Московская обл., 142290 Россия

<sup>b</sup>Институт биофизики клетки Российской академии наук, Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", Пущино, Московская обл.,

142290 Россия

<sup>с</sup>Институт белка Российской академии наук, Пущино, Московская обл., 142290 Россия \*e-mail: ivanvikhlvantsev@gmail.com

> \*\**e-mail: bobylev1982@gmail.com* Поступила в редакцию 03.08.2023 г. После доработки 22.09.2023 г. Принята к публикации 28.09.2023 г.

Титин – мультидоменный белок поперечно-полосатых и гладких мышц позвоночных, состоит из повторяющихся иммуноглобулин-подобных (Ig) и фибронектин-подобных (FnIII) доменов, представляющих собой в-сэндвичи с преобладающей в-структурой, а также содержит неупорядоченные участки. Методами атомно-силовой микроскопии (АСМ), рентгеновской дифракции и инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (ИК-Фурье) нами изучена морфология и структура агрегатов титина скелетных мышц кролика. полученных в двух разных растворах: 0.15 М глицин-КОН рН 7.0 и 200 мМ КСІ, 10 мМ имидазол рН, 7.0. По данным АСМ скелетномышечный титин формировал в этих двух растворах аморфные агрегаты разной морфологии. Аморфные агрегаты титина, сформированные в растворе, содержащем глицин, состояли из гораздо более крупных частиц, чем агрегаты, сформированные в растворе, содержащем КСІ. Последние, по данным АСМ, имели вид структуры, напоминающей "губку", тогда как аморфные "глицин-агрегаты" титина формировали "ветвящиеся" структуры. Методом спектрофлуориметрии выявлена способность "глицин-агрегатов" титина связываться с красителем тиофлавином T, а методом рентгеновской дифракции в них обнаружен один из элементов амилоидной кросс-β-структуры – рефлекс ~4.6 Å. Эти данные показывают, что "глицин-агрегаты" титина являются амилоидными или амилоидоподобными. Аналогичные структурные особенности у "КСІ-агрегатов" титина не выявлены; эти агрегаты не обладали способностью связываться с тиофлавином Т, что свидетельствует об их неамилоидной природе. Методом ИК-Фурье-спектроскопии обнаружены различия во вторичной структуре двух типов агрегатов титина. Полученные данные выявляют особенности структурных изменений при формировании межмолекулярных связей между молекулами гигантского белка титина в процессе его агрегации и расширяют представления о процессе амилоидной агрегации белков.

**Ключевые слова:** мышечные белки, титин, агрегация, амилоиды, атомно-силовая микроскопия, инфракрасная спектроскопия

DOI: 10.31857/S0026898424020143, EDN: MYWWYU

#### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что формирование пространственной структуры играет важную роль в выполнении белками своих функций и, следовательно, в жизни клетки [1, 2]. Однако по некоторым причинам, еще не до конца выясненным, нативная структура белков или пептидов начинает изменяться, что приводит к неправильному их сворачиванию и дальнейшей агрегации. Накопление агрегированных форм белков в ор-

Сокращения: ТТ – тиофлавин Т; АСМ – атомно-силовая микроскопия; ИК-Фурье – Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье.

ганах и тканях человека и животных приводит к нарушению функционирования клеток с последующей их гибелью и развитием патологических изменений в организме. Заболевания, при которых в тканях накапливаются агрегированные формы белков – амилоидные агрегаты, называются амилоидозами [3, 4]. К наиболее известным амилоидозам относятся болезни Альцгеймера и Паркинсона, сахарный диабет типа 2. прионные заболевания, системные амилоидозы и др. [5–7]. Для амилоидных агрегатов характерно формирование четвертичной кросс-β-структуры [8, 9], благодаря которой амилоиды имеют высокую прочность, приобретают устойчивость к воздействию различных химических растворителей и к протеолитическому расшеплению. Методов лечения амилоидозов на сегодняшний день не существует. Это связано в первую очередь с отсутствием полного понимания процесса амилоидной агрегации на уровне структуры белковых агрегатов.

Представления о процессе амилоидной агрегации расширяют открытие функциональных амилоидов, в число которых входят амилоидные агрегаты белков курлина (curli, *Escherichia coli*), тафи (tafi, Salmonella spp.), чаплина (chaplin, Streptomyces coelicolor) [10–13]. Амилоиды этих белков участвуют в процессах адгезии клеток, в формировании биопленок; амилоиды чаплина связаны с образованием воздушных гиф и рассеиванием спор [13]. Функциональные амилоиды обнаружены и у эукариотических организмов. С использованием морского моллюска Aplysia (seaslug) показано, что прионная форма белка CPEB (cytoplasmic polyadenylation element-binding protein) участвует в процессах хранения памяти с помощью механизмов, приводящих к долговременным синаптическим изменениям [14]. Функциональные амилоиды обнаружены и в организме млекопитающих. Показано, что белок Mα (компонент Pmel17) человека формирует в меланосомах амилоидные агрегаты, служащие каркасом для связывания с меланином и защищающие клетки от УФ-излучения, повреждающего ДНК [15, 16].

Таким образом, амилоидные агрегаты подразделяются на патологические и функциональные, эти два типа агрегатов имеют структурные различия. Предполагается, что амилоидные белки агрегируют по-разному.

Объектом нашего исследования является гигантский мышечный белок титин (тайтин/коннектин), открытый в конце 70-х гг. прошлого века [17, 18]. К настоящему времени показано, что в результате альтернативного сплайсинга мРНК гена титина (*ttn*) в поперечно-полосатых мышцах млекопитающих образуются изоформы этого белка, имеющие разную длину и молекулярную массу ~700–3900 кДа [19–21]. В гладких мышцах позвоночных обнаружены изоформы титина с молекулярной массой 500–2000 кДа [20, 22]. Благодаря своей уникальной структуре и положению в саркомере титин играет особенно важную роль в формировании упругоэластичных свойств миофиламентов, действуя как молекулярная пружина, и, наряду с коллагеном, является основной детерминантой пассивной упругой силы в мышечных клетках [23–26].

Исследования, проведенные нами ранее на препаратах титина (м. м. 500 и 1500 кДа), изолированного из гладких мышц, выявили его способность формировать олигомеры и крупные амилоидные агрегаты in vitro [27-29]. Более низкомолекулярная изоформа титина (500 кДа) обладает способностью формировать разные типы агрегатов в растворах: 0.15 М глицин-КОН, рН 7.0 и 200 мМ КСІ, 10 мМ имидазол, рН 7.0. Агрегаты гладкомышечного титина, сформированные в указанных растворах, имеют разную морфологию и способность связываться с красителем тиофлавином Т (TT) [28]. При этом методом рентгеновской дифракции у обоих типов агрегатов гладкомышечного титина обнаружены рефлексы ~10 и ~4.8 Å, что указывает на наличие четвертичной кросс-β-структуры, свойственной амилоидным фибриллам.

В данной работе методами атомно-силовой микроскопии (ACM), рентгеновской дифракции и инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (ИК-Фурье) изучена морфология и структура агрегатов титина скелетных мышц кролика, полученных в двух разных растворах. Молекулярная масса скелетномышечного титина составила ~2000 кДа. Данная работа является логическим продолжением наших сравнительных исследований агрегационных свойств как более низкомолекулярных, так и более высокомолекулярных изоформ титина.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение титина из скелетных мышц кролика. Титин выделяли из скелетных мышц задних конечностей кролика согласно [30] и очищали методом гель-фильтрации на колонке с носителем Sepharose-CL2B. Концентрацию титина определяли спектрофотометрически (спектрофотометр SPECORD UV VIS), используя значение коэффициента экстинкции ( $E_{280}^{1}$  мг/мл), равное 1.37 [31].

Гель-электрофорез в денатурирующих условиях и Вестерн-блотинг титина. Гель-электрофорез титина в денатурирующих условиях (ДСН-ЭФ) проводили согласно [32] и [33] с незначительной нашей модификацией. В частности, мы использовали разделяющий гель, содержащий 6.5–7% полиакриламида, приготовленный по методике, описанной в [33]. Гели окрашивали Coomassie Brilliant Blue G-250 и R-250, смешанными в соотношении 1:1. Молекулярную массу титина определяли с использованием программного обеспечения TotalLab v1.11. В качестве маркеров молекулярных масс использовали актин (42 кДа), тяжелые цепи миозина (205 кДа), небулин (770 кДа) и T2-фрагменты титина (~2000 кДа).

Вестерн-блотинг титина проводили согласно [34] с нашими модификациями. В частности, белки переносили из геля на PVDF-мембраны в течение 48 ч. Для определения титина с помощью Вестерн-блот-анализа использовали моноклональные антитела AB5 к участку молекулы титина, расположенному около М-линии саркомера, любезно предоставленные John Trinick, а также 9D10 антитела к PEVK-фрагменту молекулы белка (Висконсин, США). В качестве вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, использовали антитела к IgG мыши ("Sigma", США).

Условия образования агрегатов титина скелетных мышц. Очищенный титин в колоночном буфере (0.6 M KCl, 30 мМ  $KH_2PO_4$ , 1 мМ DTT, 0.1 M NaN<sub>3</sub>, pH 7.0) использовали для образования агрегатов. Агрегаты скелетномышечного титина (с концентрацией 0.2–0.4 мг/мл) формировали диализом в течение 24 ч при 4 °С против растворов, содержащих 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0 и 200 мМ KCl, 10 мМ имидазол, pH 7.0.

Атомно-силовая микроскопия (ACM). Все образцы выдерживали на слюде в течение 5 мин, затем промывали водой (2 раза по 30 с), сушили и анализировали структуру полученных комплексов методом ACM Integra-Vita ("NT-MDT", Россия) с использованием кантилеверов NSG03 с радиусом скругления кончика 10 нм и резонансной частотой 47–150 кГц. Измерения проводили в полуконтактном (постукивающем) режиме. Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения Nova ("NT-MDT").

Флуориметрический анализ с использованием красителя тиофлавина Т. Амилоидную природу агрегатов скелетномышечного титина оценивали по интенсивности флуоресценции ТТ при весовом соотношении (w/w) ТТ/титин, равном 1 : 5. Флуоресценцию измеряли при  $\lambda ex = 440$  нм и  $\lambda em = 488$  нм на спектрофлуориметре CaryEclipse ("Varian", США).

Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье. Измерения проводили на ИК-Фурье-спектрометре Nicolet 6700 производства компании "ThermoScientific" (США), оснащенном приставкой Smart Proteus с Пельтье-контролируемым кюветодержателем в режиме пропускания в кювете из кристаллического фторида кальция с оптическим путем 10 мкм, используя детектор DTGS (сканирование в диапазоне волновых чисел от 650 до 4000 см<sup>-1</sup> с разрешением 1 см<sup>-1</sup>, усреднение по 256 спектрам). Прибор откалиброван в соответствии с инструкциями компании-производителя.

ИК-спектры растворов препаратов титина в соответствующем буфере и спектры самого буфера измеряли при 23°С. Концентрация белка составила 36-42 мг/мл. Белок был сконцентрирован путем разведения лиофилизированного образца в наименьшем количестве буферного раствора. После агрегации образцы центрифугировали и использовали осадок, разведенный в 30-50 мкл. Для каждого измерения рассчитывали оптический путь кюветы из CaF<sub>2</sub>, исходя из величины оптической плотности образца на 3404 см<sup>-1</sup>, используя величину поглощения воды при оптическом пути 1 мкм, равную 0.533 AU, с поправкой на концентрацию белка в пробе [35]. Оптический путь кюветы составлял  $(10 \pm 0.1)$  мкм. ИК-спектр препарата белка измеряли не менее 8 раз, чередуя с измерением спектра буфера. Из каждого спектра белка вычитали спектр буфера, учитывая разницу величины оптического пути в измерениях. Каждый разностный спектр анализировали в диапазоне волновых чисел 1725-1481 см<sup>-1</sup> на предмет содержания элементов вторичной структуры в белке, следуя принципам, описанным в работе [36]. Результаты определения содержания элементов вторичной структуры в белке усредняли. Приведены стандартные отклонения величин содержания элементов вторичной структуры в белке. Во время измерений добивались стандартизированного снижения содержания паров воды и  $CO_2$  в спектрометре путем его продувки, используя FT-IR Purge Gas Generator 74-5041 ("Parker Hannifin Corp.", CША).

Рентгеновская дифракция. Агрегаты титина для рентгеноструктурного анализа, полученные после 24-часовой инкубации при 4 °С в соответствующих растворах, подвергали лиофилизации. Лиофилизированные агрегаты титина растворяли в минимальном объеме деионизированной воды (Milli-Q) до концентрации > 10 мг/мл. Капли препаратов белка помещали между концами покрытых воском стеклянных капилляров (диаметром около 1 мм), разделенных примерно на 1.5 мм, для дальнейшего высушивания на воздухе. Это необходимо для выравнивания фибрилл в том случае, если они присутствуют в образце. Буферные растворы (контроль) помещали в специальные стеклянные капилляры "для рентгеновской дифракции". Дифракционные изображения получены с использованием генератора Microstar X-ray с оптикой HELIOX, оснащенного CCD-детектором Platinum135 (X8 Proteumsystem, "Bruker AXS", Германия). Использовали Си Ка-излучение с  $\lambda = 1.54$  Å (1 Å = 0.1 нм). Образцы располагали под прямым углом к рентгеновскому лучу с использованием четырехосного каппа-гониометра.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### ДСН-электрофорез и Вестерн-блотинг титина скелетных мышц кролика

На рис. 1*а* представлены результаты ДСН-ЭФ в 7%-ном полиакриламидном геле, приготовленном по методу [33], препаратов очищенного скелетномышечного титина (две правые дорожки), а также экстракта белков *m. soleus* в качестве контроля (левая дорожка). Препараты титина содержали около 10% низкомолекулярной примеси, т. е. чистота выделенного белка составила ~90%. На рис. 16 представлена картина Вестерн-блотинга титина после ДСН-ЭФ в 2.2%-ном укрепленном агарозой полиакриламидном геле, согласно [32]. Видно, что препараты скелетномышечного титина соответствуют по молекулярной массе Т2-фрагменту этого белка. Методом Вестерн-блотинга с использованием моноклональных антител АВ5 к участку молекулы титина, расположенному около М-линии саркомера (рис. 16), и 9D10 к PEVK-фрагменту титина, расположенному в I-зоне саркомера (рис. 1*в*, правая дорожка), подтверждено, что выделенный белок является титином.



**Рис. 1.** ДСН-гель-электрофорез и Вестерн-блотинг титина скелетных мышц кролика. a - ДСН-ЭФ препарата очищенного титина (две правые дорожки). Левая дорожка – *m. soleus* кролика (контроль). Электрофорез проведен в 7%-ном полиакриламидном геле. Указаны полосы актина, тяжелых цепей миозина (ТЦМ), небулина и титина.  $\delta$  – Вестерн-блотинг титина с использованием моноклональных антител AB5. Электрофорез проведен в 2.2%-ном полиакриламидном геле, укрепленном агарозой. Левая дорожка – *m. soleus* кролика (контроль). Две правые дорожки – очищенные препараты титина. a - ДСН-ЭФ в 7%-ном полиакриламидном геле препарата очищенного титина (дорожка слева) и Вестерн-блотинг титина с использованием моноклональных антител 9D10 (дорожка справа). T1 – полноразмерные молекулы титина, расположенные в саркомере от М-линии до Z-диска. T2 – фрагменты титина-1, расположенные в А-диске саркомера вдоль миозиновых нитей.

#### АСМ агрегатов скелетномышечного титина

Как показано ранее методом ACM, гладкомышечный титин способен формировать аморфные агрегаты [28]. С помощью ACM нами обнаружено, что в растворе, содержащем 200 мМ KCl, 10 мМ имидазол, рН 7.0, титин скелетных мышц кролика формирует структуры, напоминающие губку. Нити этих агрегатов имели в основном высоту 4–5 нм (рис. 26). По данным ACM в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, рН 7.0, агрегаты скелетномышечного титина выглядели как ветвящиеся цепочки, состоящие из сферических агрегатов диаметром около 100–200 нм и высотой 20–60 нм (рис. 2*a*).



**Рис. 2.** Атомно-силовая микроскопия агрегатов титина. a – Атомно-силовая микроскопия агрегатов титина в растворе 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0; квадраты 50 и 10 мкм<sup>2</sup>.  $\delta$  – Атомно-силовая микроскопия агрегатов титина в растворе 200 мМ КСl, 10 мМ имидазол, pH 7.0; квадраты 10 и 4.5 мкм<sup>2</sup>. Время формирования агрегатов при 4 °C – 24 ч.

#### Исследование связывания агрегатов скелетномышечного титина с красителем тиофлавином Т

В ходе эксперимента мы измеряли интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии агрегатов титина, сформированных после 24 ч агрегации в растворах, содержащих КСІ или глицин (рис. 3*a*). Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии агрегатов титина, сформированных в растворе, содержащем КСІ, не возрастала и была даже ниже по сравнению с интенсивностью в присутствии молекулярной формы титина (рис. 3*a*). Интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии агрегатов титина, сформированных в растворе, содержащем глицин, была значительно выше, чем в присутствии молекулярной формы титина (рис. 3*a*). Связывание ТТ с "глицин-агрегатами" титина подтверждает их амилоидную природу.

#### ИК-Фурье-спектроскопия агрегатов скелетномышечного титина

Вторичную структуру двух типов агрегатов скелетномышечного титина мы изучали с помощью ИК-Фурье-спектроскопии. На рис. Зб представлены данные ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье, полученные при 20 °С. Экспериментальные данные анализировали, следуя принципам, описанным в работе [36].

Из полученных данных видно, что образцы титина содержат большой процент неупорядоченной структуры, и в процессе агрегации количество неупорядоченности растет (табл. 1). Отдельно стоит указать, что в агрегатах титина, сформированных в растворе, содержащем KCl, отсутствуют α-спиральные участки и увеличен процент β-складок по сравнению с неагрегированной формой белка (табл. 1).



**Рис. 3.** *а* – Интенсивность флуоресценции TT в присутствии титина и агрегатов этого белка, сформированных в течение 24 ч в растворах, содержащих 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0 (4, фиолетовый цвет) и 200 мМ КСl, 10 мМ имидазол, pH 7.0 (2, зеленый цвет). Красный цвет (3) – интенсивность флуоресценции TT в присутствии молекулярной формы титина;  $\delta$  – ИК-Фурье-спектры титина и его агрегатов при 20 °C. Концентрация белка 36–42 мг/мл. Неагрегированный скелетномышечный титин (1, черный цвет). Агрегаты скелетномышечного титина, сформированные в растворе 200 мМ КСl, 10 мМ имидазол, pH 7.0 (2, красный цвет). Агрегаты скелетномышечного титина, сформированные в растворе 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0 (3, зеленый цвет).

Таблица 1. Содержание вторичных структур в образцах титина и его aгрегатах\*

Образец	α-Спираль, %	β-Участок, %	Неупорядоченная структура, %
Титин	$32\pm2.0$	$14 \pm 1.0$	$54 \pm 2.0$
Агрегаты титина (0.15 М глицин-КОН)	$14 \pm 1.0$	$6 \pm 1.0$	$80 \pm 3.0$
Агрегаты титина (200 мМ KCl)	0	$32 \pm 1.5$	$68 \pm 2.0$

\*Представлены результаты двух экспериментов. ИК-спектр препаратов белка измеряли не менее 8 раз, чередуя с измерением спектра буфера.

Молекулярный титин имеет спектр поглощения с широкой полосой амида I' с максимумом при ~1637 см<sup>-1</sup> (рис. 3*б*, кривая черного цвета). Агрегаты титина, сформированные в КСІ-содержащем растворе, имеют спектр полосы амида I' с двумя пиками одинаковой интенсивности (одинаковыми по амплитуде) с максимумами при ~1619 и ~1670 см<sup>-1</sup> соответственно (рис. 3*б*, кривая красного цвета). Агрегаты титина, сформированные в глицинсодержащем растворе, напротив, имеют спектр с более узкой полосой амида I' с максимумом при 1663 см<sup>-1</sup> (рис. 3*б*, кривая зеленого цвета) и дополнительный низкоинтенсивный пик (слабый по амплитуде пик) при 1627 см<sup>-1</sup>.

## Исследование агрегатов скелетномышечного титина методом рентгеновской дифракции

С помощью метода дифракции рентгеновских лучей в агрегатах титина, сформированных в растворе, содержащем глицин, выявили следующие значения рефлексов: 5.9; **4.6**; 4.3; 3.8; 3.6; 3.1; 3.04; 2.97; 2.8; 2.6; 2.53; 2.43 Å (рис. 4*a*); в агрегатах белка, сформированных в растворе, содержащем KCl, выявлены следующие значения рефлексов: 18.5; **12.5**; 4.1; 3.7; 2.9; 2.48 Å (рис. 4*б*). Ярко выраженный рефлекс 4.6 Å у агрегатов титина, сформированных в глицинсодержащем растворе, характеризует расстояние между полипептидными цепями в кросс- $\beta$ -структуре амилоидных белков [37–40].



**Рис. 4.** Рентгеновская дифракция агрегатов титина скелетных мышц кролика после 24 ч агрегации. a — Картина рентгеновской дифракции аморфных агрегатов титина, сформированных в растворе, содержащем 0.15 М глицин-КОН, pH 7.0. Обнаружены следующие рефлексы: 5.9; **4.6**; 4.3; 3.8; 3.6; 3.1; 3.04; 2.97; 2.8; 2.6; 2.53; 2.43 Å. Рефлекс ~4.6 Å относится к элементу кросс- $\beta$ -структуры и характеризует расстояние между полипептидными цепями;  $\delta$  — Картина рентгеновской дифракции аморфных агрегатов титина, сформированных в растворе, содержащем 200 мМ КСl, 10 мМ имидазол, pH 7.0. Обнаружены следующие рефлексы: **18.5**; **12.5**; 4.1; 3.7; 2.9; 2.48 Å.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Молекулярная масса очищенного скелетномышечного титина составила ~2000 кДа, что соответствует так называемому T2-фрагменту титина — основной части молекулы, взаимодействующей в А-зоне саркомера с миозиновыми нитями. При этом молекулярная масса части молекул титина, по всей вероятности, была больше, поскольку молекулы содержат PEVK-участок титина (рис. 1*в*, окраска антителами 9D10), расположенный в I-зоне саркомера. Таким образом, на данный момент это самый большой белок, обладающий способностью формировать амилоидоподобные агрегаты.

При подборе условий агрегации скелетномышечного титина мы руководствовались более ранними данными, полученными нами для гладкомышечного титина [28]. В частности, обнаружено, что в растворах 0.15 М глицин-КОН, рН 7.0 и 200 мМ КСІ, 10 мМ имидазол, рН 7.0 две изоформы гладкомышечного титина (500 и ~1500 кДа) формируют аморфные агрегаты разной морфологии. Агрегаты подобной морфологии формирует в этих растворах и титин скелетных мышц кролика (рис. 2).

Обсуждая полученные результаты, следует обратить внимание на то, что ветвящиеся структуры, подобные "глицин-агрегатам" скелетномышечного, а также гладкомышечного титина, найдены у белка Pmel17, который формирует функциональные амилоиды [41]. Изучая полиморфизм домена RPT белка Pmel17, обнаружили возможность двух разных путей

агрегации данного домена, которые демонстрируют полиморфизм при кислых значениях рН. В диапазоне значений рН 4.5-6 агрегация RPT-домена протекает по типичному механизму, зависящему от зародышеобразования, что приводит к образованию высокоупорядоченных богатых β-складчатостью изогнутых нитевидных фибрилл. При этом при pH < 4.5 агрегация происходит посредством быстрого процесса полимеризации, независимого от зародышеобразования, который дает дендритные агрегаты, имеющие более низкую степень внутренней упаковки. Эти дендритные наноструктуры могут быть преобразованы в более стабильные фибриллы путем изменения рН. Поразительное морфологическое сходство агрегатов RPTдомена функционального амилоидного белка Pmel17 и титина указывает на возможные сходные механизмы укладки их молекул.

Однако титин, в отличие от Pmel17, формирует различные агрегаты не в зависимости от изменения pH среды, а в зависимости от ионной силы раствора. При этом главные особенности двух типов агрегатов скелетномышечного и гладкомышечного титина, сформированных в разных растворах, заключаются в наличии или отсутствии у них амилоидных свойств. Так, изучение связывания агрегатов и гладкомышечного [28], и скелетномышечного (рис. 3*a*) титина с красителем TT показало, что с TT связываются только агрегаты, сформированные при более низкой ионной силе в растворе, содержащем глицин, но не "KCl-агрегаты". Из этого следует, что агрегаты титина, сформированные в раство-

ре с глицином, являются амилоидными, в отличие от агрегатов второго типа. Этот вывод подтверждается результатами проведенного нами изучения структуры двух типов агрегатов титина методом рентгеновской дифракции. Известно, что амилоидные белки имеют специфическую кросс-В-структуру, дифракционная картина которой, полученная методом рентгеновской дифракции, характеризуется наличием двух рефлексов: ~10-12 и ~4.6-4.8 Å [37, 40]. Рефлекс ~10 Å указывает на расстояние между β-листами, а рефлекс  $\sim 4.6 \text{ Å} -$ на расстояние между полипептидными цепями в кросс-β-структуре. Ярко выраженный "амилоидный" рефлекс 4.6 Å наблюдается у агрегатов скелетномышечного титина, сформированных в растворе, содержащем глицин, а не KCl (рис. 4). Второй "амилоидный" рефлекс отсутствует. Подобные результаты получены ранее для амилоидных фибрилл некоторых форм  $\alpha$ -синуклеина, у которых методом рентгеновской дифракции также обнаружен только олин рефлекс (4.6 Å) [42]. Таким образом, учитывая данные по связыванию "глицин-агрегатов" скелетномышечного титина с ТТ, а также данные рентгеновской дифракции, можно заключить, что эти агрегаты титина являются амилоидными или амилоидоподобными. Отсутствие у этих агрегатов рефлекса 10 Å, характеризующего расстояние между В-листами, может указывать на большое содержание неструктурированных участков, что и обнаружено в наших экспериментах методом ИК-Фурье-спектроскопии (табл. 1).

У агрегатов титина, сформированных в растворе, содержащем KCl, присутствовали рефлексы 12.5 и 18.5 Å (рис. 4*б*). Природа этих рефлексов не ясна. Отсутствуют публикации, подтверждающие, что подобные рефлексы указывают на амилоидную природу фибрилл/агрегатов белка. Этот факт и то, что "KCl-агрегаты" титина не связывают TT, указывают на их неамилоидную природу.

Для обоих агрегатов скелетномышечного титина получены и другие рефлексы, помимо описанных. В частности, 2.4; 2.9; 3.1; 3.7; 3.8; 4.3; 4.6 Å (рис. 4*a*), обнаруженные ранее у агрегатов гладкомышечного титина, сформированных в растворе, содержащем глицин [28], и рефлексы 3.7; 2.5 Å (рис. 4*b*) у агрегатов титина, сформированных в растворе, содержащем КСІ [28]. Часть рефлексов, не относящихся к кросс- $\beta$ -структуре, мы постарались идентифицировать и описали ранее [43].

Необходимо отдельно обсудить данные, полученные с помощью ИК-Фурье-спектроскопии. Амилоидные фибриллы и нативные бел-

ки с конформацией β-листа имеют максимумы в пределах двух характерных, хотя и частично перекрывающихся, спектральных областей [44]. Диапазон спектра, характерный непосредственно для амилоидных фибрилл, находится в пределах от 1611 до 1630 см<sup>-1</sup>, тогда как нативные белки со структурой β-листа имеют пики амида I' в пределах между 1630 и 1643 см<sup>-1</sup>. Кроме того, существуют также различия в форме полосы амида I', поскольку нативные белки со структурой β-листа имеют более широкие максимумы [44]. В нашем случае скелетномышечный титин в неагрегированной форме имеет спектр поглощения с широкой полосой амида І' и с максимумом при ~1637 см<sup>-1</sup>, что характеризует его как нативный белок со структурой β-листа (рис. 36. черная кривая). Фибриллы титина. сформированные в растворе, содержащем КСІ, дают спектр полосы амида І' с двумя пиками одинаковой интенсивности: 1619 и 1670 см<sup>-1</sup> (рис. 36, красная кривая). Пик с максимумом ~1619 см<sup>-1</sup> относится к "амилоидным", однако по форме он очень широкий. Учитывая данные рентгеновской дифракции, не выявившие "амилоидные" рефлексы у "КСІ-агрегатов" титина, а также отсутствие связывания этих агрегатов с ТТ, можно предположить, что наличие максимума ~1619 см<sup>-1</sup> может указывать на межмолекулярную водородную связь при отсутствии амилоидной структуры. Подобные структурные изменения могут быть следствием мисфолдинга, известного для отдельных доменов титина [45].

Фибриллы титина, сформированные в растворе, содержащем глицин, помимо основного пика с максимумом 1663 см<sup>-1</sup>, имеют явно выраженный низкоинтенсивный пик (слабый по амплитуде) на 1627 см<sup>-1</sup> (рис. 36, зеленая кривая). Этот пик соответствует характеристикам амилоидных агрегатов, при этом он не является основным, поэтому можно предположить, что амилоидную структуру в "глицин-агрегатах" титина имеют лишь отдельные участки его молекул при формировании соответствующих межмолекулярных связей. И количество таких участков незначительно.

Таким образом, совокупность полученных нами разными методами данных может указывать на то, что амилоидные агрегаты титина, сформированные в растворе, содержащем глицин, относятся к амилоидоподобным. Полученные данные об агрегации скелетного титина расширяют наши знания о процессе амилоидной агрегации белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (№ 22-24-00805). Для выполнения работы использовали оборудование Регионального Пущинского центра коллективного пользования "Структурно-функциональные исследования биосистем" Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (https://www.ckp-rf.ru/catalog/ ckp/3037/), базовую установку спектрофотометрии ИБК РАН, Федерального исследовательского центра "Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук" (http://www.ckp-rf.ru/ckp/670266/).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tsytlonok M., Craig P.O., Sivertsson E., Serquera D., Perrett S., Best R.B., Wolynes P.G., Itzhaki L.S. (2013) Complex energy landscape of a giant repeat protein. *Structure*. 21(11), 1954–1965. doi: 10.1016/j. str.2013.08.028
- Tian P., Best R.B. (2016) Best structural determinants of misfolding in multidomain proteins. *PLoS Comput. Biol.* 12(5), e1004933. doi: 10.1371/journal. pcbi.1004933
- Dobson C.M. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature*. 426(6968), 884–890. doi: 10.1038/nature02261
- Rousseau F., Schymkowitz J., Itzhaki L.S. (2012) Implications of 3D domain swapping for protein folding, misfolding and function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 747, 137–152. doi: 10.1007/978-1-4614-3229-6\_9
- Knowles T.P., Vendruscolo M., Dobson C.M. (2014) The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15(6), 384–396. doi: 10.1038/nrm3810
- Dobson C.M. (2004) Experimental investigation of protein folding and misfolding. *Methods*. 34(1), 4–14. doi: 10.1016/j.ymeth.2004.03.002
- Buxbaum J.N., Linke R.P. (2000) A molecular history of the amyloidosis. *J. Mol. Biol.* 421(2–3), 142–159. doi: 10.1016/j.jmb.2012.01.024
- Sunde M., Serpell L.C., Bartlam M., Fraser P.E., Pepys M.B., Blake C.C. (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. J. Mol. Biol. 273(3), 729–739. doi: 10.1006/ jmbi.1997.1348
- Nelson R., Eisenberg D. (2006) Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16(2), 260–265. doi: 10.1016/j.sbi.2006.03.007
- Olsen A., Jonsson A., Normark S. (1989) Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*. **338**, 652–655.doi: 10.1038/338652a0
- 11. Rçmling U., Bian Z., Hammar M., Sierralta W.D., Normark S. (1998) Curli fibers are highly conserved

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to open structure and regulation. *J. Bacteriol.* **180**, 722–731. doi: 10.1128/JB.180.3.722-731.1998

- Otzen D., Nielsen P.H. (2008) We find them here, we find them there: functional bacterial amyloid. *Cell Mol. Life Sci.* 65(6), 910–927. doi: 10.1007/s00018-007-7404-4
- Claessen D., Rink R., de Jong W., Siebring J., de Vreughd P., Boersma F.G.H., Dijkhuizen L., Wçsten H.A.B. (2003) A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev.* 17, 1714–1726. doi: 10.1101/ gad.264303
- Si K., Lindquist S.L., Kandel E.R. (2003) A neuronal isoform of the aplysia CPEB has prion-like properties. *Cell.* 115, 879–891. doi: 10.1016/s0092-8674(03)01020-1
- Fowler D.M., Koulov A.V., Alory-Jost C., Marks M.S., Balch W.E., Kelly J.W. (2006) Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol.* 4, 1–8. doi: 10.1371/journal.pbio.0040006
- Berson J.F., Theos A.C., Harper D.C., Tenza D., Raposo G., Marks M.S. (2003) Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J. Cell. Biol.* 161, 521–533.
- Wang K., McClure J., Tu A. (1979) Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**(8), 3698–3702. doi: 10.1073/ pnas.76.8.3698
- Maruyama K., Kimura S., Ohashi K., Kuwano Y. (1981) Connectin, an elastic protein of muscle. Identification of "titin" with connectin. *J. Biochem.* 89(3), 701–709. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem. a133249
- Guo W., Bharmal S.J., Esbona K., Greaser M.L. (2010) Titin diversity-alternative splicing gone wild. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 753675. doi: 10.1155/2010/753675
- Kim K., Keller T.C. 3rd. (2002) Smitin, a novel smooth muscle titin-like protein, interacts with myosin filaments *in vivo* and *in vitro*. J. Cell. Biol. 156, 101–111. doi: 10.1083/jcb.200107037
- Greaser M.L., Warren C.M., Esbona K., Guo W., Duan Y., Parrish A.M., Krzesinski P.R., Norman H.S., Dunning S., Fitzsimons D.P., Moss R.L. (2008) Mutation that dramatically alters rat titin isoform expression and cardiomyocyte passive tension. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44(6), 983–991. doi: 10.1016/j. yjmcc.2008.02.272
- Labeit S., Lahmers S., Burkart C., Fong C., McNabb M., Witt S., Witt C., Labeit D., Granzier H. (2006) Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. *J. Mol. Biol.* 362(4), 664–681. doi: 10.1016/j.jmb.2006.07.077
- 23. Granzier H.L., Irving T.C. (1995) Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen,

titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys. J.* **68**(3), 1027–1044. doi:10.1016/s0006-3495(95)80278-x

- Linke W. (2008) Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardio*vasc. Res. 77(4), 637–648. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.03.029
- Tskhovrebova L., Trinick J. (2010) Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere. J. Biomed. Biotechnol. 2010, 612482. doi: 10.1155/2010/612482
- Gautel M. (2011b) The sarcomeric cytoskeleton: who picks up the strain? *Curr. Opin. Cell Biol.* 23(1), 39– 46. doi:10.1016/j.ceb.2010.12.001
- Bobylev A.G., Galzitskaya O.V., Fadeev R.S., Bobyleva L.G., Yurshenas D.A., Molochkov N.V., Dovidchenko N.V., Selivanova O.M., Penkov N.V., Podlubnaya Z.A., Vikhlyantsev I.M. (2016) Smooth muscle titin forms *in vitro* amyloid aggregates. *Biosci. Rep.* 36(3), e00334. doi: 10.1042/BSR20160066
- Yakupova E.I., Vikhlyantsev I.M., Bobyleva L.G., Penkov N.V., Timchenko A.A., Timchenko M.A., Enin G.A., Khutzian S.S., Selivanova O.M., Bobylev A.G. (2018) Different amyloid aggregation of smooth muscles titin *in vitro. J. Biomol. Struct. Dyn.* 36(9), 2237–2248. doi: 10.1080/07391102.2017.1348988
- Bobylev A.G., Fadeev R.S., Bobyleva L.G., Kobyakova M.I., Shlyapnikov Y.M., Popov D.V., Vikhlyantsev I.M. (2021) Amyloid aggregates of smooth-muscle titin impair cell adhesion. *Int. J. Mol. Sci.* 22(9), 4579. doi: 10.3390/ijms22094579
- Soteriou A., Gamage M., Trinick J. (1993) A survey of interactions made by the giant protein titin. J. Cell Sci. 104(Pt 1), 119–123. doi: 10.1242/jcs.104.1.119
- Trinick J., Knight P., Whiting A. (1984) Purification and properties of native titin. J. Mol. Biol. 180(2), 331–356. doi: 10.1016/s0022-2836(84)80007-8
- Vikhlyantsev I.M., Podlubnaya Z.A. (2017) Nuances of electrophoresis study of titin/connectin. *Biophys. Rev.* 9(3), 189–199. doi: 10.1007/s12551-017-0266-6
- Fritz J.D., Swartz D.R., Greaser M.L. (1989) Factors affecting polyacrilamide gel electrophoresis and electroblotting of high-molecular-weight myofibrillar proteins. *Analyt. Biochem.* 180(2), 205–210. doi: 10.1016/0003-2697(89)90116-4
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1989) Immunoblotting in the clinical laboratory. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 27(8), 495–501.

- 35. Venyaminov S., Prendergast F.G. (1997) Water (H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O) molar absorptivity in the 1000–4000 cm<sup>-1</sup> range and quantitative infrared spectroscopy of aqueous solutions. *Anal. Biochem.* **248**(2), 234–245. doi: 10.1006/abio.1997.2136
- 36. Venyaminov S.Y., Kalnin N.N. (1990) Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H<sub>2</sub>O) solutions. II. Amide absorption bands of polypeptides and fibrous proteins in α-, β-, and random coil conformations. *Biopolymers.* **30**, 1259–1271. doi:10.1002/bip.360301310
- Makin O.S., Serpell L.C. (2005) Structures for amyloid fibrils. *FEBS J.* 272(23), 5950–5961. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.05025.x
- Astbury W.T., Dickinson S., Bailey K. (1935) The X-ray diffraction interpretation of denaturation and the structure of seed globulins. *Biochem. J.* 29(10), 2351–2360. doi: 10.1042/bj0292351
- Eanes E.D., Glenner G.G. (1968) X-ray diffraction studies on amyloid filaments J. Histochem. Cytochem. 16(11), 673–677. doi: 10.1177/16.11.673
- Jahn T.R., Makin O.S., Morris K.L., Marshall K.E., Tian P., Sikorski P., Serpell L.C. (2010) The common architecture of cross-beta amyloid. *J. Mol. Biol.* 395(4), 717–727. doi: 10.1016/j.jmb.2009.09.039
- 41. Dogra P., Bhattacharya M., Mukhopadhyay S. (2017) pH-Responsive mechanistic switch regulates the formation of dendritic and fibrillar nanostructures of a functional amyloid. *J. Phys. Chem. B.* **121**(2), 412–419. doi: 10.1021/acs.jpcb.6b11281
- Serpell L.C., Berriman J., Jakes R., Goedert M., Crowther R.A. (2000) Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97(9), 4897–4902. doi: 10.1073/pnas.97.9.4897
- 43. Бобылёв А.Г., Якупова Э.И., Бобылёва Л.Г., Галзитская О.В., Никулин А.Д., Шумейко С.А., Юршенас Д.А., Вихлянцев И.М. (2020) Изменения структуры титина при его агрегации. Молекуляр. биология. 54(4), 643–652. doi: 10.31857/ S0026898420040047
- 44. Zandomeneghi G., Krebs M.R., McCammon M.G., Fändrich M. (2004) FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Sci.* 13(12), 3314–3321. doi: 10.1110/ ps.041024904
- 45. Borgia A., Kemplen K.R., Borgia M.B., Soranno A., Shammas S., Wunderlich B., Nettels D., Best R.B., Clarke J., Schuler B. (2015) Transient misfolding dominates multidomain protein folding. *Nat. Commun.* 6(8861), 8861. doi: 10.1038/ncomms9861

#### БОБЫЛЁВА и др.

## Structural Features of Skeletal Muscle Titin Aggregates

L. G. Bobyleva<sup>1</sup>, T. A. Uryupina<sup>1</sup>, N. V. Penkov<sup>2</sup>, M. A. Timchenko<sup>1</sup>, A. D. Ulanova<sup>1</sup>,

A. G. Gabdulkhakov<sup>3</sup>, I. M. Vikhlyantsev<sup>1, \*</sup>, A. G. Bobylev<sup>1, \*\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics Russian Academy of Sciences,

Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

<sup>2</sup>Institute of Cell Biophysics Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

<sup>3</sup>Institute of Protein Research Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

\*e-mail: ivanvikhlyantsev@gmail.com

\*\*e-mail: bobylev1982@gmail.com

Titin is a multidomain protein of striated and smooth muscles of vertebrates. The protein consists of repeating immunoglobulin-like (Ig) and fibronectin-like (FnIII) domains, which are  $\beta$ -sandwiches with a predominant B-structure, and also contains disordered regions. In this work, the methods of atomic force microscopy (AFM). X-ray diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy were used to study the morphology and structure of aggregates of rabbit skeletal muscle titin obtained in two different solutions: 0.15 M glycine-KOH, pH 7.0 and 200 mM KCl, 10 mM imidazole, pH 7.0. According to AFM data, skeletal muscle titin formed amorphous aggregates of different morphology in the above two solutions. Amorphous aggregates of titin formed in a solution containing glycine consisted of much larger particles than aggregates of this protein formed in a solution containing KCl. The "KCl-aggregates" according to AFM data had the form of a "sponge"-like structure, while amorphous "glycine-aggregates" of titin formed "branching" structures. Spectrofluorometry revealed the ability of titin "glycine aggregates" to bind to the dye thioflavin T (TT), and X-ray diffraction revealed the presence of one of the elements of the amyloid cross  $\beta$ -structure, a reflection of ~4.6 Å, in these aggregates. These data indicate that the "glycine-aggregates" of titin are amyloid or amyloid-like. No similar structural features were found in titin "KCl-aggregates"; they also did not show the ability to bind to thioflavin T, indicating the non-amyloid nature of these titin aggregates. Fourier transform infrared spectroscopy revealed differences in the secondary structure of the two types of titin aggregates. The data obtained demonstrate the features of structural changes during the formation of intermolecular bonds between molecules of the giant titin protein during its aggregation. The data expand the understanding of the process of amyloid protein aggregation.

Keywords: muscle proteins, titin, aggregation, amyloids, atomic force microscopy, infrared spectroscopy

### СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УЛК 577.113.3.017

## ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ 5-АРИЛАМИНОУРАЦИЛОВ

© 2024 г. В. А. Кезин<sup>а</sup>, Е. С. Матюгина<sup>а</sup>, С. А. Суржиков<sup>а</sup>, М. С. Новиков<sup>b</sup>, А. А. Маслова<sup>а</sup>, И. Л. Карпенко<sup>а</sup>, А. В. Иванов<sup>а</sup>, С. Н. Кочетков<sup>а</sup>, А. Л. Хандажинская<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия  $^{b}$ Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, 400131 Россия

\*e-mail: khandazhinskaya@bk.ru Поступила в редакцию 14.09.2023 г. После доработки 13.10.2023 г. Принята к публикации 13.10.2023 г.

Производные 5-ариламиноурацила, как показано нами ранее, способны ингибировать ВИЧ-1, герпесвирусы, микобактерии и другие патогены. В представленной работе оценена цитотоксическая активность 5-ариламиноурацилов и их производных в отношении лейкозных клеток, нейробластомы и глиальных опухолей мозга. Проведен скрининг цитотоксичности производных 5-аминоурацила, содержащих различные заместители, а также их 5'-норкабоциклических и рибопроизводных в отношении двух линий клеток нейробластомы (SH-SY5Y и IMR-32), лимфобластных клеток K-562, промиелобластных клеток HL-60 и низкопассажных вариантов высокодифференцированной мультиформной глиобластомы (GBM5522 и GBM6138). Оценка цитотоксичности полученных соединений с помощью стандартного МТТ-теста показала, что большинство соединений не облалают существенной токсичностью в отношении использованных клеток. Олнако на линии клеток GBM-6138 5-(4-изопропилфениламин)урацил и 5-(4-*трет*-бутилфениламин)урацил проявляли дозозависимый токсический эффект – величина IC<sub>50</sub> составила 9 и 2.3 мкМ соответственно. Противоопухолевая активность соединений этого типа показана впервые и может служить отправной точкой для дальнейших исследований.

Ключевые слова: производные урацила, синтез, противоопухолевая активность, лейкозы, глиома, нейробластома

DOI: 10.31857/S0026898424020156, EDN: MYDBYJ

#### **ВВЕДЕНИЕ**

Смертность от разных видов онкологических заболеваний уверенно занимает второе место после сердечно-сосудистых заболеваний (https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/fullarticle/2787350). Несмотря на очевидный прогресс в терапии опухолей, до сих пор не найдено лекарственных средств, эффективных при многих видах рака, включая лейкозы и опухоли центральной нервной системы (нейробластомы и глиобластомы). Кроме того, часто наблюдается резистентность к проводимой терапии, что определяет неблагоприятный прогноз для пациента.

Лейкозы – группа злокачественных заболеваний, возникновение которых обусловлено неконтролируемой клональной экспансией незрелых лимфоидных или миелоидных клеток-предшественников в костном мозге и периферической крови. Лейкозы сопровождаются нарушением нормальной дифференцировки и пролиферации [1]. В 2019 г. в мире выявлено около 644000 новых случаев лейкоза и зарегистрировано 335000 случаев смерти от этого типа рака (https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/fullarticle/2787350). Лечение лейкозов остается сравнительно малоэффективным. Например, несмотря на недавние достижения в лечении острого миелоидного лейкоза, до 70% пациентов в возрасте 65 лет и старше умирают в течение 1 года после своевременной постановки диагноза. Как стандартная интенсивная химиотерапия, так и трансплантация стволовых клеток нередко не предотвращают рецидивы заболевания.

Нейробластома — наиболее распространенная солидная экстракраниальная злокачественная опухоль у детей, на долю которой приходится 7—10% педиатрических онкозаболеваний и 15% всех летальных случаев [2]. Нейробластомы высокого риска, составляющие примерно половину всех случаев нейробластом, характеризуются частыми рецидивами и относительно низкой пятилетней выживаемостью — 40—50%. Глиобластома относится к наиболее распространенным и агрессивным типам опухолей головного мозга [3]. Медианная выживаемость пациентов даже при проведении терапии составляет всего 14—15 месяцев [4, 5].

Несмотря на значительную гетерогенность лейкозов и нейробластом, эти заболевания имеют много общих особенностей, таких как активация рецепторных тирозинкиназ, регуляция механизмов, связанных с индукцией апоптоза и контроля прохождения клеточного цикла. Существенную роль в развитии опухолевого процесса играют эпигенетические процессы, в том числе метилирование ДНК и модификация гистонов (в первую очередь их ацетилирование/ деацетилирование).

В настоящий момент соединения, регулирующие эпигенетические процессы, находятся на разных стадиях клинических испытаний, а некоторые ингибиторы ДНК-метилтрансфераз и гистондеацетилаз уже получили одобрение Управления по контролю за пищевыми продуктами и лекарствами США и Европейского агентства по лекарственным средствам. Эти препараты могут использоваться по отдельности или в комбинации (например, с венетоклаксом ингибитором антиапоптотического белка BCL-2) для получения синергических эффектов [6–8].

Значительное число генов, в которых обнаруживают мутации, связанные с злокачественным перерождением клеток, кодирует белки и РНК, участвующие в регуляции транскрипции. Прежде всего, это эпигенетические регуляторы и факторы транскрипции [9–12]. Нарушение процессов нормального метилирования генома (как гипо-, так и гиперметилирование) приводит к изменению баланса экспрессии генов. что может инициировать появление трансформированных клеток. Основным классом препаратов, используемых в качестве ДНК-гипометилирующих агентов, являются аналоги пиримидиновых нуклеозидов. Включение 5-азацитидина или децитабина в нуклеиновую кислоту делящихся клеток (ДНК или РНК соответственно) приводит к ее глобальному гипометилированию [13, 14]. Показано, что в клетках нейробластомы высокого риска существенно повышена экспрессия генов, кодирующих ДНК-метилтрансферазы DN-МТЗА и -В. Обработка клеток нейробластомы 5-азацитидином приводит к индукции их дифференцировки, а также к снижению скорости пролиферации и способности образовывать колонии [15, 16]. На перевиваемых клетках нейробластомы показано, что 5-азацитидин может усиливать цитотоксическое действие современных химиотерапевтических препаратов, таких как доксорубицин, цисплатин и этопозид [17].

В попытке найти новые аналоги пиримидиновых нуклеозидов, обладающие противоопухолевой активностью, проведен скрининг цитотоксичности производных 5-аминоурацила с различными заместителями (1a-e), а также их 5'-норкабоциклических и рибопроизводных (2a-e и 3a-e соответственно) (рис. 1) в отношении двух линий клеток нейробластомы (SH-SY5Y и IMR-32), лимфобластоидных клеток K-562, промиелобластных клеток HL-60 и низкопассажных вариантов высокодифференцированной мультиформной глиобластомы (GBM5522 и GBM6138) [18].



Рис. 1. Структура молекул 5-аминоурацилов (1а-е), их 5'-норкабоциклических (2а-е) и рибопроизводных (3а-е).

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Коммерческие реагенты приобретены у компаний "Acros Organics" (Бельгия), "Aldrich" (США) и "Fluka" (Германия). Растворители использовали без дополнительной очистки и перегонки. Колоночная хроматография была проведена на силикагеле 60 0.040-0.063 мм ("Merck". Германия). Тонкослойная хроматография выполнена на алюминиевой фольге silica gel 60F254 ("Merck"). ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре AMX III-400 ("Bruker". США) с рабочей частотой 400 МГц для <sup>1</sup>Н-ЯМР (растворитель DMSO- $d_6$ , Me<sub>4</sub>Si как внутренний стандарт) и 100.6 МГц для <sup>13</sup>С-ЯМР. УФ-спектры были записаны на спектрофотометре Ultrospec 3100 pro ("Amersham Biosciences", США) в этаноле. Масс-спектры высокого разрешения записаны на устройстве Bruker Daltonics MicrO-ТОF-Q II методом ионизационной масс-спектрометрии с электрораспылением (ESI-MS). Измерения проводили в режиме положительных ионов в соответствии с ранее применяемыми условиями [19].

5-Аминоурацилы **1а-е** и соответствующие 5'-норкарбоциклические аналоги **2а-е** получали в соответствии с методикой, описанной ранее [20].

Метод синтеза 5-аминофенилзамещенных производных уридина За-е. 5-Модифицированный урацил (0.86 ммоль) силилировали в 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисилазане (50 мл) в присутствии 1 мг сульфата аммония в течение 4 ч. Полученный прозрачный раствор упаривали досуха в высоком вакууме, соупаривали с толуолом (2 × 50 мл) и 1,2-дихлорэтаном (40 мл) для удаления следов 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисилазана. Полукристаллический остаток растворяли в 1,2-дихлорэтане (20 мл), вносили при перемешивании в одну порцию β-D-1,2,3,5-тетраацетатрибозы (0.688 ммоль), а затем по каплям добавляли триметилсилилтрифторметансульфонат (0.825 ммоль). Полученную смесь перемешивали при 50 °C в течение 4 ч. Контроль за ходом реакции осуществляли по ТСХ в системе  $CH_2Cl_2: C_2H_5OH = 20: 1.$  После окончания реакции реакционную смесь охлаждали и по каплям добавляли к интенсивно перемешиваемой смеси насыщенного раствора бикарбоната натрия и хлористого метилена (100 мл 1/1 по объему). Перемешивали в течение 30 мин. Органический слой отделяли, промывали водой (2 × 50 мл), сушили безводным сульфатом натрия в течение 12 ч и упаривали досуха. Остаток очищали на колонке с силикагелем. Продукт элюировали градиентом этанола в хлористом метилене от 1:40 до 1:20. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и упаривали досуха.

Кристаллический остаток растворяли в этаноле (10 мл), добавляли (10 мл) 32% NH<sub>4</sub>OH и оставляли на 10 ч при 20 °C. Затем растворители упаривали досуха. Конечный продукт очищали кристаллизацией из горячего этанола или колоночной хроматографией на силикагеле в градиенте этанола в хлористом метилене в соотношении от 1 : 20 до 1 : 9. Фракции, содержащие конечный продукт, объединяли и упаривали досуха.

**1-(**β**-D-***рибофуранозил***)-5-**(циклогептиламин) урация (3а). Из 5-(4-циклогептиламин)-урацила (0.18 г, 0.86 ммоль) и β-D-1,2,3,5-тетраацетата рибозы (0.22 г, 0.69 ммоль) в присутствии триметилсилилового эфира трифторметансульфокислоты (0.18 г, 0.83 ммоль) получили 0.13 г соединения За. Суммарный выход – 44.6%. Т. пл. 167 °C; УФ: лмах 318 нм, лміп 282 нм; ESI-MS:  $C_{15}H_{23}N_3O_6$  рассчитано для  $[M + H]^+$  342.3596, найдено m/z 342.3597; <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.55 (4H, s, 2 × CH<sub>2</sub>), 1.69 (4H, s, 2 × CH<sub>2</sub>), 3.10–2.95 (4H, m, 2 × CH<sub>2</sub>), 3.66–3.52 (2H, m, H-5'<sub>a,b</sub>), 3.86–3.83 (1H, m, H-4'), 4.01–3.97  $(1H, dt, J = 3.74, 3.66 \Gamma \mu, H-3'), 4.10-4.04 (1H, dt, J = 3.74, 3.66 \Gamma \mu, H-3'), 4.10-4.04 (1H, dt, J = 3.74, 3.66 \Gamma \mu, H-3')$ dd, J = 5.48, 5.59 Гц, H-2'), 5.02-5.01 (1H, d,  $J = 4.88 \Gamma_{\text{H}}$ , 3'-OH), 5.11–5.08 (1H, t, J = 4.64, 4.69 Γμ, 5'-OH), 5.28–5.26 (1H, d, J = 5.85 Γμ, 2'-OH), 5.85–5.83 (1H, d, J = 5.55 Гц, H-1'), 7.19 (1H, s, H-6), 11.16 (1H, s, N*H*); <sup>13</sup>C-*Я*MP: 8 27.24, 28.82, 51.60, 61.29, 70.76, 73.82, 85.20, 88.14, 121.81, 128.79, 149.91, 161.26.

1-(β-D-рибофуранозил)-5-(N-фенилпиперазин)урацил (3b). Из 5-(N-фенилпиперазин)урацила (0.32 г, 1.17 ммоль) и β-D-1,2,3,5-тетраацетата рибозы (0.3 г, 0.94 ммоль) в присутствии триметилсилилового эфира трифторметансульфокислоты (0.25 г, 1.13 ммоль) получили 0.34 г соединения **3b**. Суммарный выход – 77.7%. *T*. пл. 227 °C; УФ: λmax 293 нм, λmin 271 нм; ESI-MS:  $C_{19}H_{24}N_4O_6$  рассчитано для  $[M + H]^+$ 405.4171, найдено *m/z* 405.4173; <sup>1</sup>Н-ЯМР (DM-SO-d<sub>6</sub>): § 3.07–2.91 (4H, m, 2 × CH<sub>2</sub>), 3.25–3.15  $(4H, m, 2 \times CH_2), 3.73-3.57 (2H, m, H-5'_{a, b}),$ 3.90-3.87 (1H, m, H-4'), 4.05-4.01 (1H, dt, J = 3.72, 4.91  $\Gamma$ <sub>II</sub>, H-3'), 4.12-4.07 (1H, dd,  $J = 5.74, 5.81 \Gamma_{\text{II}}, \text{H}-2$ '), 5.05-5.03 (1H, d, J = 5.01, d)3'-OH), 5.22-5.20 (1H, t, J = 4.44, 5'-OH), 5.33–5.31 (1H, d, *J* = 5.64 Гц, 2'-OH), 5.85–5.83  $(1H, d, J = 5.0 \Gamma \mu, H-1'), 7.26-6.78 (5H, m, C_6H_5),$ 7.48 (1H, s, H-6), 11.33 (1H, s, NH); <sup>13</sup>C-ЯМР: δ 48.70, 50.03, 61.08, 70.48, 74.27, 85.14, 88.59, 116.01, 119.51, 125.07, 127.45, 129.26, 150.01, 151.42, 160.89.

**1-(β-D-рибофуранозил)-5-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин)урацил (3с).** Из 5-(1,2,3,4-тетрагидроизохинолин)-урацила (0.28 г, 1.15 ммоль)

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

и β-D-1,2,3,5-тетраацетата рибозы (0.30 г. 0.93 ммоль) в присутствии триметилсилилового эфира трифторметансульфокислоты (0.25 г, 1.13 ммоль) получили 0.25 г соединения **3с**. Суммарный выход – 72.6%. *Т*. пл. 210 °С; УФ: λmax 298 нм, λmin 269 нм; ESI-MS: C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> рассчитано для [M + H]<sup>+</sup> 392.4183, найдено *m/z* 392.4185; <sup>1</sup>Н-ЯМР: δ 2.86–2.90 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.08–3.26 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.57–3.73 (2H, m, H-5'<sub>a,b</sub>), 3.88-3.92 (1H, m, H-4'), 3.97-4.12 (3H, m, H-3', H-2', CH<sub>2</sub>), 5.06–5.04 (1H, d,  $J = 5.13 \Gamma \mu$ , 3'-OH), 5.26–5.23 (1H, t, J = 4.52, 4.58, 5'-OH), 5.35–5.33 (1H, d, J = 5.87 Гц, 2'-OH), 5.84-5.85 (1H, d, J = 5.96 Fu, H-1'), 7.10-7.16 (4H, m, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.53 (1H, s, H-6), 11.35 (1H, s, N*H*); <sup>13</sup>C-ЯМР: δ 29.08, 47.93, 52.48, 61.02, 70.38, 74.28, 85.07, 88.66, 125.23, 126.04, 126.60, 126.80, 127.40, 129.04, 134.17, 134.55, 150.01, 161.04.

1-(β-D-рибофуранозил)-5-(4-изопропилфениламин)урацил (3d). Из 5-(4-изопропилфениламин)урацила (0.22 г, 0.90 ммоль) и β-D-1,2,3,5-тетраацетата рибозы (0.22 г. 0.69 ммоль) в присутствии триметилсилилового эфира трифторметансульфокислоты (0.17 г., 0.76 ммоль) получили 0.17 г соединения 3d. Суммарный выход – 66.2%. Т. пл. 197.5 °С; УФ: λmax 263 нм, λmin 243 нм; ESI-MS: C<sub>18</sub>H-<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> рассчитано для [M + H]<sup>+</sup> 378.3917, найдено *m/z* 378.3919; <sup>1</sup>Н-ЯМР (DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1.14 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 2.83-2.70 (1H, q, *J* = 6.93, 6.89 Гц, CH<sub>3</sub>C*H*CH<sub>3</sub>), 3.62–3.50 (2H, m, H-5'<sub>a,b</sub>), 3.87-3.84 (1H, m, H-4'), 3.99-3.95 (1H, dt, J = 3.72, 4.91  $\Gamma$ u, H-3'), 4.11–4.06 (1H, dd, J = 5.74, 5.81  $\Gamma$ u, H-2'), 5.08–5.04 (2H, m, 5'-OH, 3'-OH), 5.37–5.35 (1H, d, J = 5.87  $\Gamma_{\text{U}}$ , 2'-OH), 5.89–5.87 (1H, d, J = 5.97  $\Gamma_{\text{U}}$ , H-1'), 7.03–6.75 (5H, m, NH, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.75 (1H, s, H-6), 11.55 (1H, s, N*H*); <sup>13</sup>C-ЯМР: δ 24.62, 33.06, 61.57, 70.86, 73.96, 85.46, 88.02, 115.22, 118.14, 127.07, 127.98, 138.88, 143.52, 150.13, 161.74.

**1-(β-D-рибофуранозил)-5-(4-***трет***бу-тилфениламин)урацил (3е)**. Из 5-(4-*трет***бу-**тилфениламин)-урацила (0.34 г, 1.38 ммоль) и β-D-1,2,3,5-тетраацетата рибозы (0.35 г, 1.11 ммоль) в присутствии триметилсилилового эфира трифторметансульфокислоты (0.26 г, 1.15 ммоль) получили 0.30 г соединения **3е**. Суммарный выход – 69.7%. *Т*. пл. 199 °C; УФ:  $\lambda$ тах 263 нм,  $\lambda$ min 241 нм; ESI-MS: C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> рассчитано для [M + H]<sup>+</sup> 392.4183, найдено *m/z* 392.4185; <sup>1</sup>H-NMR:  $\delta$  1.24 (9H, s, 3 × CH<sub>3</sub>), 3.63–3.53 (2H, m, H-5'<sub>a,b</sub>), 3.86–3.82 (1H, m, H-4'), 4.00–3.96 (1H, dt, *J* = 3.73, 4.92 Гц, H-3'), 4.12–4.06 (1H, dd, *J* = 5.75, 5.82 Hz, H-2'), 5.07–5.04 (2H, m, 5'-OH, 3'-OH), 5.36–5.34 (1H, d, *J* = 5.87 Hz, 2'-OH), 5.89–5.87 (1H, d, *J* = 5.96 Гц, H-1'), 7.18–6.76 (5H, m, N*H*, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.75 (1H, s, H-6), 11.54 (1H, s, N*H*); <sup>13</sup>C NMR:  $\delta$  31.85, 34.08, 61.56, 70.86, 73.94, 85.46, 88.00, 114.85, 118.08, 125.80, 128.00, 141.12, 143.18, 150.13, 161.75.

Тест на цитотоксичность (МТТ-тест). Клетки линии SH-SY5Y (CRL-2266) получены от АТСС. Низкопассажные культуры первичной мультиформной глиобластомы GBM6138 и GBM5522 из хирургически удаленных опухолей получены в НМИЦ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко (Москва, Россия) и описаны ранее [18]. Клетки культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS) и 2 мМ глутамина, при 37 °С во влажной атмосфере.

Клетки рассаживали на 96-луночные планшеты ("ТРР", Швейцария) в плотности 1 × 10<sup>4</sup> клеток/лунка. Через 24 ч добавляли тестируемые вещества в диапазоне концентраций 1.5–100 мкМ. После 48 ч инкубации культуральную среду заменяли на свежую с добавлением 0.5 мг/ мл бромида метилтриазолилдифенилтетразолия (МТТ). Через 4 ч среду убирали, кристаллы формазана растворяли в изопропаноле с добавлением 4 мМ HCl, измеряли отптическую плотность раствора на планшетном анализаторе Plate Chameleon (Hidex) при длине волны 595 нм.

Статистическая обработка данных. Эксперименты проводили в трех повторностях. Результаты обрабатывали в программе GraphPad Prism v.9.5 (GraphPad Software).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пиримидиновые нуклеозиды, замещенные в С-5-положении гетероциклического основания, представляют собой класс биологически значимых молекул. В частности, соединения такого рода являются компонентами тРНК [21, 22]. В 1995 году была синтезирована серия ациклических нуклеозидов, содержащих 5-бензилзамещенный урацил с метоксиалкильными заместителями в бензильном кольце [22], оказавшихся высокоэффективными ингибиторами фермента уридинфосфорилазы, отвечающей за деградацию химиотерапевтических агентов, таких как 5-фтор-2'-дезоксиуридин [23]. 5-Бензилурацилы без N-1-(2-гидроксиэтокси)метильного остатка проявили на 2-3 порядка меньшую активность, вероятно из-за плохой биодоступности. Похожая проблема, была причиной низкой активности 2,4-диамино-5-бензилпиримидинов, исследуемых в качестве антибактериальных агентов [24]. Введение в положение N-1 алкильного остатка или в бензильное кольцо гидрофильных групп, таких как гидроксиметильная или цианогруппы, приводит к увеличению рас-



Схема 1. Условия реакций. і : 5-R-персилилированный урацил, TMCSiTfl, 1,2-дихлорэтан, іі : NH<sub>4</sub>OH/EtOH.

творимости соединений до биологически активных концентраций [25].

Серия соединений на основе 5-бензил-2.4-диаминопиримидинов с заместителями в бензильном кольце впервые была синтезирована еще в 1999 году. Оказалось, что эти соединения являются хорошими ингибиторами дигидрофолатредуктазы, используемой в качестве терапевтической мишени при опухолевых заболеваниях и малярии [26]. Причем в данном случае наибольшую активность *in vitro* проявили соединения с длинными (6–10 атомов углерода) алкильными заместителями в бензильном кольце. Группой Holy была открыта высокая ингибиторная активность 6-галогенмодифицированных урацилов с гидрофобными заместителями в позиции С5 в отношении тимидинфосфорилазы, играющей ключевую роль в ангиогенезе при онкологических и ряде других заболеваний [27].

Ранее мы показали, что производные 5-ариламиноурацила посредством различных механизмов могут ингибировать ВИЧ-1, герпесвирусы, микобактерии и другие патогены [28–30]. В данной работе оценена цитотоксическая активность 5-ариламиноурацилов и их производных в отношении лейкозов, нейробластом и глиальных опухолей мозга. Помимо полученных нами ранее 5-ариламиноурацилов **1а-е** и соответствующих 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов **2а-е**, осуществлен синтез 5-ариламинопроизводных уридина **3а-е**.

5-фениламинозамещенные производные уридина были синтезированы по силильному методу Фриделя – Крафтса в присутствии кислоты Льюиса в качестве катализатора [31, 32] (схема 1). В качестве предшественника углеводного фрагмента использовали β-D-1,2,3,5-тетраацетат рибозы. Конденсация в ацетонитриле

в присутствии Me<sub>3</sub>SiSO<sub>3</sub>CF<sub>3</sub> приводила к осмолению реакционной смеси и значительному снижению выхода конечного продукта. Использование в качестве катализатора хлорного олова (от полуторакратного до трехкратного молярного избытка) также не приводило к повышению выхода целевого нуклеозида. Выбор неполярного 1,2-дихлорэтана в качестве растворителя позволил получить 5-ариламинозамещенные рибоуридины с хорошими выходами. В ЯМР-спектрах высокого разрешения (400 МГц) аномерный протон разрешается в виде дублета с малой константой спин-спинового взаимодействия J<sub>1'.2'</sub> равной примерно 5-6 Гц, что соответствует геминальному расположению протонов <sup>1</sup>H и <sup>2</sup>H, и подтверждает  $\beta$ -конфигурацию аномерного центра. Структура всех синтезированных соединений подтверждена УФ, <sup>1</sup>Н, <sup>13</sup>С ЯМР-спектрами. Удаление ацетильных групп в стандартных условиях приводило к образованию целевых соединений За-е.

В качестве клеточных моделей нейробластомы использовали линии SH-SY5Y и IMR-32. Линия SH-SY5Y представляет собой трижды клонированную сублинию клеточной линии нейробластомы SK-N-SH (АТСС НТВ-11) [33-35]. Нейробласты IMR-32 исходно получены из ткани головного мозга пациента с нейробластомой. В этой культуре присутствуют два типа клеток: небольшие нейробластоподобные клетки (основной вариант) и крупные гиалиновые фибробласты. Модели глиобластомы были представлены первичными вариантами клеток опухолей, полученных ранее от пациентов. В качестве модели лейкоза использовали известные линии К562 и HL-60. К-562 - лимфобластные клетки, выделенные из костного мозга 53-летнего больного хроническим миелогенным лейкозом. Клетки HL-60 представляют собой
промиелобласты, выделенные из периферической крови с помощью лейкофереза у 36-летней белой женщины с острым промиелоцитарным лейкозом [36]. Оценка цитотоксичности полученных соединений на указанных линиях клеток с помошью стандартного МТТ-теста показала, что большинство соединений не обладают существенной токсичностью. Однако на линии клеток GBM-6138 соединения 1d и 1e проявляли дозозависимый токсический эффект, и величина  $IC_{50}$ , рассчитанная в программе GraphPad Prism, составила 9 и 2.3 мкМ соответственно. Эти значения удовлетворяют критериям Национального института рака (National Cancer Institute) для первичного скрининга соединений как потенциальных антипролиферативных агентов [37]. Таким образом, соединения 1d и 1e можно рассматривать как отправную точку для дальнейшей работы.

Исследование выполнено при поддержке грантов Российского научного фонда (№ 19-74-10048, https://rscf.ru/project/19-74-10048/: синтез 5-ариламинопроизводных уридина; № 23-64-10018, https://rscf.ru/project/23-64-10018/: изучение цитотоксичности).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kantarjian H., Kadia T., DiNardo C., Daver N., Borthakur G., Jabbour E., Garcia-Manero G., Konopleva M., Ravandi F. (2021) Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood Cancer J.* 11, 41. https://doi.org/10.1038/s41408-021-00425-3
- Matthay K.K., Maris J.M., Schleiermacher G., Nakagawara A., Mackall C.L., Diller L., Weiss W.A. (2016) Neuroblastoma. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2, 16078. https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.78
- Koshy M., Villano J.L., Dolecek T.A., Howard A., Mahmood U., Chmura S.J., Weichselbaum R.R., McCarthy B.J. (2012) Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *J. Neurooncol.* **107**, 207–212. https://doi. org/10.1007/s11060-011-0738-7
- 4. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., Weller M., Fisher B., Taphoorn M.J., Belanger K., Brandes A.A., Marosi C., Bogdahn U., Curschmann J., Janzer R.C., Ludwin S.K., Gorlia T., Allgeier A., Lacombe D., Cairncross J.G., Eisenhauer E., Mirimanoff R.O., European Organisation for R., Treatment of Cancer Brain T., Radiotherapy G., National Cancer Institute of Canada Clinical Trials G. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

glioblastoma. N. Engl. J. Med. 352, 987–996. https:// doi.org/10.1056/NEJMoa043330

- Tan A.C., Ashley D.M., Lopez G.Y., Malinzak M., Friedman H.S., Khasraw M. (2020) Management of glioblastoma: state of the art and future directions. *CA Cancer J. Clin.* **70**, 299–312. https://doi. org/10.3322/caac.21613
- Vijayaraghavalu S., Dermawan J.K., Cheriyath V., Labhasetwar V. (2013) Highly synergistic effect of sequential treatment with epigenetic and anticancer drugs to overcome drug resistance in breast cancer cells is mediated via activation of *p21* gene expression leading to G2/M cycle arrest. *Mol. Pharm.* 10, 337– 352. https://doi.org/10.1021/mp3004622
- Housman G., Byler S., Heerboth S., Lapinska K., Longacre M., Snyder N., Sarkar S. (2014) Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers* (Basel). 6, 1769–1792. https://doi.org/10.3390/cancers6031769
- Qiu T., Zhou L., Zhu W., Wang T., Wang J., Shu Y., Liu P. (2013) Effects of treatment with histone deacetylase inhibitors in solid tumors: a review based on 30 clinical trials. *Future Oncol.* 9, 255–269. https:// doi.org/10.2217/fon.12.173
- 9. Tyner J.W., Tognon C.E., Bottomly D., Wilmot B., Kurtz S.E., Savage S.L., Long N., Schultz A.R., Traer E., Abel M., Agarwal A., Blucher A., Borate U., Bryant J., Burke R., Carlos A., Carpenter R., Carroll J., Chang B.H., Coblentz C., d'Almeida A., Cook R., Danilov A., Dao K.T., Degnin M., Devine D., Dibb J., Edwards D.K. 5th., Eide C.A., English I., Glover J., Henson R., Ho H., Jemal A., Johnson K., Johnson R., Junio B., Kaempf A., Leonard J., Lin C., Liu S.Q., Lo P., Loriaux M.M., Luty S., Macey T., MacManiman J., Martinez J., Mori M., Nelson D., Nichols C., Peters J., Ramsdill J., Rofelty A., Schuff R., Searles R., Segerdell E., Smith R.L., Spurgeon S.E., Sweeney T., Thapa A., Visser C., Wagner J., Watanabe-Smith K., Werth K., Wolf J., White L., Yates A., Zhang H., Cogle C.R., Collins R.H., Connolly D.C., Deininger M.W., Drusbosky L., Hourigan C.S., Jordan C.T., Kropf P., Lin T.L., Martinez M.E., Medeiros B.C., Pallapati R.R., Pollyea D.A., Swords R.T., Watts J.M., Weir S.J., Wiest D.L., Winters R.M., McWeeney S.K., Druker B.J. (2018) Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia. Nature. 562, 526-531. https://doi. org/10.1038/s41586-018-0623-z
- Patel J.P., Gonen M., Figueroa M.E., Fernandez H., Sun Z., Racevskis J., Van Vlierberghe P., Dolgalev I., Thomas S., Aminova O., Huberman K., Cheng J., Viale A., Socci N.D., Heguy A., Cherry A., Vance G., Higgins R.R., Ketterling R.P., Gallagher R.E., Litzow M., van den Brink M.R., Lazarus H.M., Rowe J.M., Luger S., Ferrando A., Paietta E., Tallman M.S., Melnick A., Abdel-Wahab O., Levine R.L. (2012) Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1079–1089. https://doi.org/10.1056/NEJ-Moa1112304
- 11. Papaemmanuil E., Gerstung M., Bullinger L., Gaidzik V.I., Paschka P., Roberts N.D., Potter N.E.,

Heuser M., Thol F., Bolli N., Gundem G., Van Loo P., Martincorena I., Ganly P., Mudie L., McLaren S., O'Meara S., Raine K., Jones D.R., Teague J.W., Butler A.P., Greaves M.F., Ganser A., Dohner K., Schlenk R.F., Dohner H., Campbell P.J. (2016) Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **374**, 2209–2221. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1516192

- 12. Cancer Genome Atlas Research N., Ley T.J., Miller C., Ding L., Raphael B.J., Mungall A.J., Rob-ertson A., Hoadley K., Triche T.J. Jr., Laird P.W., Baty J.D., Fulton L.L., Fulton R., Heath S.E., Kalicki-Veizer J., Kandoth C., Klco J.M., Koboldt D.C., Kanchi K.L., Kulkarni S., Lamprecht T.L., Larson D.E., Lin L., Lu C., McLellan M.D., McMichael J.F., Payton J., Schmidt H., Spencer D.H., Tomasson M.H., Wallis J.W., Wartman L.D., Watson M.A., Welch J., Wendl M.C., Ally A., Balasundaram M., Birol I., Butterfield Y., Chiu R., Chu A., Chuah E., Chun H.J., Corbett R., Dhalla N., Guin R., He A., Hirst C., Hirst M., Holt R.A., Jones S., Karsan A., Lee D., Li H.I., Marra M.A., Mayo M., Moore R.A., Mungall K., Parker J., Pleasance E., Plettner P., Schein J., Stoll D., Swanson L., Tam A., Thiessen N., Varhol R., Wye N., Zhao Y., Gabriel S., Getz G., Sougnez C., Zou L., Leiserson M.D., Vandin F., Wu H.T., Applebaum F., Baylin S.B., Akbani R., Broom B.M., Chen K., Motter T.C., Nguyen K., Weinstein J.N., Zhang N., Ferguson M.L., Adams C., Black A., Bowen J., Gastier-Foster J., Grossman T., Lichtenberg T., Wise L., Davidsen T., Demchok J.A., Shaw K.R., Sheth M., Sofia H.J., Yang L., Downing J.R., Elev G. (2013) Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. N. Engl. J. Med. 368, 2059-2074. https://doi. org/10.1056/NEJMoa1301689
- Christman J.K. (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*. 21, 5483–5495. https:// doi.org/10.1038/sj.onc.1205699
- Estey E.H. (2013) Epigenetics in clinical practice: the examples of azacitidine and decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 27, 1803–1812. https://doi.org/10.1038/leu.2013.173
- Bartolucci S., Estenoz M., Longo A., Santoro B., Momparler R.L., Rossi M., Augusti-Tocco G. (1989) 5-Aza-2'-deoxycytidine as inducer of differentiation and growth inhibition in mouse neuroblastoma cells. *Cell Differ Dev.* 27, 47–55. https://doi. org/10.1016/0922-3371(89)90043-9
- Carpinelli P., Granata F., Augusti-Tocco G., Rossi M., Bartolucci S. (1993) Antiproliferative effects and DNA hypomethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine in human neuroblastoma cell lines. *Anticancer Drugs.* 4, 629–635. https://doi.org/10.1097/00001813-199312000-00004
- Charlet J., Schnekenburger M., Brown K.W., Diederich M. (2012) DNA demethylation increases sensitivity of neuroblastoma cells to chemotherapeutic drugs. *Biochem. Pharmacol.* 83, 858–865. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.009

- Lipatova A.V., Soboleva A.V., Gorshkov V.A., Bubis J.A., Solovyeva E.M., Krasnov G.S., Kochetkov D.V., Vorobyev P.O., Ilina I.Y., Moshkovskii S.A., Kjeldsen F., Gorshkov M.V., Chumakov P.M., Tarasova I.A. (2021) Multi-omics analysis of glioblastoma cells' sensitivity to oncolytic viruses. *Cancers* (Basel). 13(21), 5268. https://doi. org/10.3390/cancers13215268
- Khandazhinskaya A.L., Alexandrova L.A., Matyugina E.S., Solyev P.N., Efremenkova O.V., Buckheit K.W., Wilkinson M., Buckheit R.W. Jr., Chernousova L.N., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Leonova O.G., Popenko V.I., Kochetkov S.N., Seley-Radtke K.L. (2018) Novel 5'-norcarbocyclic pyrimidine derivatives as antibacterial agents. *Molecules.* 23(12), 3069. https://doi.org/10.3390/molecules23123069
- Kezin V.A., Matyugina E.S., Novikov M.S., Chizhov A.O., Snoeck R., Andrei G., Kochetkov S.N., Khandazhinskaya A.L. (2022) New derivatives of 5-substituted uracils: potential agents with a wide spectrum of biological activity. *Molecules*. 27(9), 2866. https://doi.org/10.3390/molecules27092866
- Carbon J., David H., Studier M.H. (1968) Thiobases in *Escherchia coli* transfer RNA: 2-thiocytosine and 5-methylaminomethyl-2-thiouracil. *Science*. 161, 1146–1147. https://doi.org/10.1126/science.161.3846.1146
- Orr G.F., Musso D.L., Boswell G.E., Kelley J.L., Joyner S.S., Davis S.T., Baccanari D.P. (1995) Inhibition of uridine phosphorylase: synthesis and structure-activity relationships of aryl-substituted 5-benzyluracils and 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-5-benzyluracils. J. Med. Chem. 38, 3850–3856. https://doi.org/10.1021/jm00019a015
- 23. El Kouni M.H., el Kouni M.M., Naguib F.N. (1993) Differences in activities and substrate specificity of human and murine pyrimidine nucleoside phosphorylases: implications for chemotherapy with 5-fluoropyrimidines. *Cancer Res.* **53**, 3687–3693.
- 24. Roth B., Aig E., Lane K., Rauckman B.S. (1980) 2,4-Diamino-5-benzylpyrimidines as antibacterial agents. 4. 6-Substituted trimethoprim derivatives from phenolic Mannich intermediates. Application to the synthesis of trimethoprim and 3,5-dialkylbenzyl analogues. J. Med. Chem. 23, 535–541. https:// doi.org/10.1021/jm00179a012
- Orr G.F., Musso D.L., Kelley J.L., Joyner S.S., Davis S.T., Baccanari D.P. (1997) Inhibition of uridine phosphorylase. Synthesis and structure-activity relationships of aryl-substituted 1-((2-hydroxyethoxy) methyl)-5-(3-phenoxybenzyl)uracil. *J. Med. Chem.* 40, 1179–1185. https://doi.org/10.1021/jm960688j
- Chowdhury S.F., Villamor V.B., Guerrero R.H., Leal I., Brun R., Croft S.L., Goodman J.M., Maes L., Ruiz-Perez L.M., Pacanowska D.G., Gilbert I.H. (1999) Design, synthesis, and evaluation of inhibitors of trypanosomal and leishmanial dihydrofolate reductase. J. Med. Chem. 42, 4300–4312. https://doi. org/10.1021/jm981130+

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ том 58 № 2 2024

- Nencka R., Votruba I., Hrebabecky H., Jansa P., Tloust'ova E., Horska K., Masojidkova M., Holy A. (2007) Discovery of 5-substituted-6-chlorouracils as efficient inhibitors of human thymidine phosphorylase. J. Med. Chem. 50, 6016–6023. https://doi. org/10.1021/jm070644i
- Novikov M.S., Buckheit R.W. Jr., Temburnikar K., Khandazhinskaya A.L., Ivanov A.V., Seley-Radtke K.L. (2010) 1-Benzyl derivatives of 5-(arylamino)uracils as anti-HIV-1 and anti-EBV agents. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 8310–8314. https://doi. org/10.1016/j.bmc.2010.09.070
- Maslova A.A., Matyugina E.S., Snoeck R., Andrei G., Kochetkov S.N., Khandazhinskaya A.L., Novikov M.S. (2020) Uracil-containing heterodimers of a new type: synthesis and study of their anti-viral properties. *Molecules*. 25(15), 3350. https://doi. org/10.3390/molecules25153350
- Matyugina E., Novikov M., Babkov D., Ozerov A., Chernousova L., Andreevskaya S., Smirnova T., Karpenko I., Chizhov A., Murthu P., Lutz S., Kochetkov S., Seley-Radtke K.L., Khandazhinskaya A.L. (2015) 5-Arylaminouracil derivatives: new inhibitors of Mycobacterium tuberculosis. *Chem. Biol. Drug. Des.* 86, 1387–1396. https://doi.org/10.1111/ cbdd.12603
- Vorbruggen H., Krolikiewicz K., Niedballa U. (1975) Synthesis of nucleosides with use of trimethylsilyl-heterocycles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 255, 8–90. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1975.tb29215.x

- 32. Vorbrüggen H., Ruh-Pohlenz C. (2001) Handbook of nucleoside synthesis. New York: Wiley.
- Lopez-Suarez L., Awabdh S.A., Coumoul X., Chauvet C. (2022) The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: focus on organic pollutants. *Neurotoxicology*. 92, 131–155. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.07.008
- Kovalevich J., Santerre M., Langford D. (2021) Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol. Biol.* 2311, 9–23. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1437-2\_2
- 35. Cheung Y.T., Lau W.K., Yu M.S., Lai C.S., Yeung S.C., So K.F., Chang R.C. (2009) Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as *in vitro* model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*. **30**, 127–135. https://doi. org/10.1016/j.neuro.2008.11.001
- 36. Amrati F.E., Chebaibi M., Galvao de Azevedo R., Conte R., Slighoua M., Mssillou I., Kiokias S., de Freitas Gomes A., Soares Pontes G., Bousta D. (2023) Phenolic composition, wound healing, antinociceptive, and anticancer effects of *Caralluma europaea* extracts. *Molecules*. 28(4), 1780. https://doi. org/10.3390/molecules28041780
- 37. Monga M., Sausville E.A. (2002) Developmental therapeutics program at the NCI: molecular target and drug discovery process. *Leukemia*. **16**, 520–526. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402464

## ASSESSMENT OF CYTOTOXICITY OF 5-ARYLAMINOURACIL DERIVATIVES

## V. A. Kezin<sup>1</sup>, E. S. Matyugina<sup>1</sup>, S. A. Surzhikov<sup>1</sup>, M. S. Novikov<sup>2</sup>, A. A. Maslova<sup>1</sup>, I. L. Karpenko<sup>1</sup>, A. V. Ivanov<sup>1</sup>, S. N. Kochetkov<sup>1</sup>, A. L. Khandazhinskaya<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia <sup>2</sup>Volgograd State Medical University, Volgograd, 400131 Russia \*e-mail: khandazhinskaya@bk.ru

We have previously shown that 5-arylaminouracil derivatives can inhibit HIV-1, herpesviruses, mycobacteria and other pathogens through various mechanisms. The purpose of this study was to evaluate the potential of 5-arylaminouracils and their derivatives against leukemia, neuroblastoma and glial brain tumors. The cytotoxicity of 5-aminouracils with various substituents, as well as their 5'-norcabocyclic and ribo derivatives, was screened against two neuroblastoma cell lines (SH-SY5Y and IMR-32), lymphoblastic cells K-562, promyeoloblastic cells HL-60 and low-passage variants of well-differentiated glioblastoma multiforme (GBM5522 and GBM6138). As a result of assessing the cytotoxicity of the resulting compounds on the above cell lines using the standard MTT test, it was revealed that most of the compounds do not have significant toxicity. However, in the GBM-6138 cell line, 5-(4-isopropylphenylamine)uracil and 5-(4-tert-butylphenyl-amine)uracil exhibited a dose-dependent toxic effect, with half-maximal inhibition concentrations IC50 of 9  $\mu$ M and 2.3  $\mu$ M, respectively. The antitumor activity of compounds of this type has been demonstrated for the first time and can serve as a starting point for further research.

Keywords: uracil derivatives, synthesis, antitumor activity, leukemia, glioma, neuroblastoma