

ISSN 0026-8984

Том 58, Номер 3

Май–Июнь 2024



МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 3, 2024

ОБЗОРЫ

Транспорт мРНК в цитоплазме. Адаптеры связывания мРНК с моторными комплексами микротрубочек <i>Ю. А. Вдовина, С. Г. Георгиева, Д. В. Копытова</i>	335
Что актин и миозин делают в ядре: новые функции известных белков <i>А. А. Саидова, И. А. Воробьев</i>	349
Ксенографты <i>Danio rerio</i> в онкологии и персонализированной медицине <i>Н. А. Лунина, Д. Р. Сафина, С. В. Костров</i>	363
Рекомбинантные VLP-вакцины, синтезируемые в растительных системах экспрессии: современные тенденции и перспективы <i>С. М. Розов, Е. В. Дейнеко</i>	385

ГЕНОМИКА. ТРАНСКРИПТОМИКА

Метилирование генов длинных некодирующих РНК: <i>SNHG6</i> , <i>SNHG12</i> , <i>TINCR</i> при раке яичников <i>С. С. Лукина, А. М. Бурдённый, Е. А. Филиппова, Л. А. Урошлев, И. В. Пронина, Н. А. Иванова, М. В. Фридман, К. И. Жордания, Т. П. Казубская, Н. Е. Кушлинский, В. И. Логинов, Э. А. Брага</i>	403
Профиль метилирования ДНК при коморбидности аневризмы и атеросклероза восходящей аорты <i>И. А. Гончарова, А. А. Зарубин, С. А. Шипулина, Ю. А. Королёва, Д. С. Панфилов, Б. Н. Козлов, М. С. Назаренко</i>	414
Анализ транскриптома кишечника у имаго <i>Drosophila melanogaster</i> с нокдауном гена <i>Gagr</i> , доместифицированного гена <i>gag</i> эррантивировусов <i>М. Л. Никитина, П. А. Милева, И. В. Кузьмин, Л. Н. Нефедова</i>	425

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Участие белков комплекса CPSF в полиаденилировании транскриптов, считываемых РНК-полимеразой III с SINE <i>И. Г. Устьянцев, О. Р. Бородулина, Д. А. Крамеров</i>	437
Белок Paip2 <i>Drosophila melanogaster</i> связывается с белком ENY2 и взаимодействует с комплексом TREX-2 в составе мРНК-частиц гистонов <i>М. М. Кушакова, А. Н. Краснов, Е. Н. Набировкина, С. Г. Георгиева</i>	448

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

Специфичность ArgA к различным системам рестрикции модификации I типа <i>А. А. Кудрявцева, А. В. Власов, Е. В. Зиновьев, Д. Д. Яновская, А. А. Уткина, С. М. Расторгуев, И. В. Манухов</i>	462
Биологические микрочипы на алюминиевой подложке с ячейками из щеточных полимеров <i>И. Ю. Шишкин, Г. Ф. Штылев, В. Е. Барский, С. А. Лапа, О. А. Заседателева, В. Е. Кузнецова, В. Е. Шершов, В. А. Василиков, С. А. Поляков, А. С. Заседателев, А. В. Чудинов</i>	469
Синтез бисбензоксазольного аналога Hoechst 33258 как потенциального GC-селективного ДНК-лиганда <i>А. Ф. Арутюнян, М. С. Аксенова, А. А. Костюков, А. А. Стомахин, Д. Н. Калужный, А. Л. Жузе</i>	482

УДК 577.216

ТРАНСПОРТ мРНК В ЦИТОПЛАЗМЕ. АДАПТЕРЫ СВЯЗЫВАНИЯ мРНК С МОТОРНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ МИКРОТРУБОЧЕК

© 2024 г. Ю. А. Вдовина^а, *, С. Г. Георгиева^а, Д. В. Копытова^а^аИнститут молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: yuvdov2020@gmail.com

Поступила в редакцию 10.11.2023 г.

После доработки 02.12.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2023 г.

Процесс локализации мРНК в цитоплазме клетки включает направленный транспорт мРНК-частиц с использованием системы микротрубочек. Этот транспорт опосредован и регулируется специфическими факторами — адаптерами между молекулами мРНК и моторными белками микротрубочек. Адаптеры являются ключевым звеном механизма транспорта мРНК, однако они остаются недостаточно изученными. В представленном обзоре рассмотрены адаптеры связывания мРНК в цитоплазме и механизмы их взаимодействия с моторными белками микротрубочек, особенности и значение адаптерных белков в транспорте мРНК в процессе оогенеза и в функционировании нейронов.

Ключевые слова: цитоплазматический транспорт, мРНК-частица, адаптеры РНК, микротрубочки

DOI: 10.31857/S0026898424030018, EDN: JDPLWQ

ВВЕДЕНИЕ

В клетках эукариот процессы транскрипции и синтеза белка осуществляются в разных компартментах клетки. Транскрипция происходит в ядре, а затем синтезированная мРНК, несущая информацию о белке, экспортируется из ядра в цитоплазму. Большая часть мРНК равномерно без видимых особенностей распределяется по цитоплазме, это так называемая нелокализуемая мРНК. Направленное распределение мРНК особенно важно для нормального функционирования нейронов и формирования осевой симметрии в эмбриогенезе. В этих системах необходим направленный транспорт мРНК на большие расстояния и определенный паттерн их распределения. Подобные мРНК называются локализуемыми [1, 2].

Молекулы мРНК перемещаются в клетке в составе мРНК-частиц, в которых мРНК ассоциирована с белками, выполняющими различные функции. В цитоплазме локализуемая мРНК перемещается с помощью белков цитоскелета. Главным средством перемещения служат микротрубочки, обеспечивающие двунаправленный транспорт мРНК-частиц на большие расстояния. Во взаимодействии мРНК с моторными белками микротрубочек участвуют адаптерные белки, дефицит

которых в клетке ведет к нарушению всего процесса транспорта локализуемой мРНК. К настоящему времени найдено небольшое количество адаптерных белков, но общие принципы их функционирования, степень универсальности или разнообразия не установлены.

Большинство известных адаптерных белков были описаны в ходе изучения эмбриогенеза и оогенеза у *Drosophila melanogaster* и *Xenopus laevis* [3, 4], а также роли транспорта мРНК в обеспечении нейрональных функций у млекопитающих [5]. Нарушения транспорта мРНК в этих процессах приводят к морфологическим дефектам развития [3, 6] и ряду нейродегенеративных заболеваний [7, 8]. Обе модели давно изучаются и охарактеризованы на молекулярном уровне, а направленное движение мРНК к разным полюсам клеток делает их удобным инструментом для отслеживания движения мРНК-частиц.

В данном обзоре рассмотрена роль адаптерных белков в координации транспорта мРНК и механизм связывания как давно известных, так и новых адаптеров с моторными белками микротрубочек.

ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ МИКРОТРУБОЧЕК

Активный транспорт локализуемых мРНК в клетке происходит с помощью моторных белков по системам цитоскелета. Транспортными системами для перемещения молекул служат сети микротрубочек и актиновых филаментов. В большинстве

Сокращения: GRD (glycine-rich domain) — глицин-богатый домен; HR (heptad repeat) — гептапептидный повтор; KH (K homology) — домен гомологии гЯРНК К (hnRNP K); TPR (tetratricopeptide repeat) — тетратрикопептидный повтор; RRM (RNA recognition motif) — домен распознавания РНК.

случаев для внутриклеточного транспорта молекул на большие расстояния используется цитоскелет микротрубочек, в то время как актиновые филаменты чаще используются для перемещения молекул на короткие расстояния и для закоривания их в месте локализации. Микротрубочки состоят из 13 протофиламентов, удерживающихся вместе с помощью многочисленных взаимодействий вдоль их боковой поверхности. Протофиламенты микротрубочек, состоящие из димеров α - и β -тубулина, расположены в определенной повторяющейся ориентации. Конец микротрубочки с открытой субъединицей β -тубулина называется (+)-концом, тогда как конец с открытой субъединицей α -тубулина называется (–)-концом. Во многих типах клеток микротрубочки выходят из немембранной органеллы, называемой центросомой. Внутри центросомы находятся многочисленные центры, организующие микротрубочки (ЦОМТ). Часто центросома находится рядом с ядром. В таких клетках (–)-концы микротрубочек располагаются внутри центросомы, а (+)-концы направлены на периферию клетки (рис. 1а). Организованная подобным образом микротрубочка по сути представляет собой поляризованную структуру.

В клетках млекопитающих направленный внутриклеточный транспорт изучают на поляризованных клетках, таких как нейроны и эпителиальные клетки. В нейронах, учитывая их значительные размеры, транспорт молекул по микротрубочкам осуществляется на большие расстояния. В большинстве нейронов микротрубочки растут из тела клетки по направлению к дистальному концу аксона, тогда как микротрубочки внутри дендритов этой же клетки имеют смешанную ориентацию — некоторые микротрубочки растут по направлению от тела клетки, в то время как другие берут начало на периферии отростка и растут по направлению к телу клетки [9] (рис. 1б). Таким образом, транспортная система микротрубочек в нейронах сильно поляризована. Моторные белки помогают доставлять по микротрубочкам не только белки, мРНК и органеллы по всей огромной длине аксона, но также способствуют сортировке различных “грузов” как по аксонам, так и по дендритам. Организация цитоскелета нейрональных микротрубочек облегчает оба эти процесса. Изучение аксонального транспорта и организации микротрубочек у *Caenorhabditis elegans* показало, что расстояние, пройденное “грузами” перед их конечной остановкой, определяется длиной микротрубочек, “грузы” часто останавливаются на концах микротрубочек [10] и локализуются на них. Все это делает транспорт молекул по микротрубочкам нейронов хорошей модельной системой для изучения внутриклеточного транспорта и локализации мРНК.

Большой интерес вызывает транспорт локализуемых мРНК в эмбриональном развитии и оогенезе

D. melanogaster и *X. laevis*. Асимметричная локализация мРНК необходима для формирования структуры эмбриона *D. melanogaster* и разделения цитоплазмы на будущие соматические и зародышевые клетки. Полярность ооцита и будущего эмбриона зависит от точной локализации трех необходимых мРНК: *gurken* (*grk*), *oskar* (*osk*) и *bicoid* (*bcd*). Показано, что локализация всех трех мРНК зависит от активного транспорта вдоль микротрубочек. Однако и у *D. melanogaster*, и у млекопитающих, кроме уже изученных локализованных мРНК, существуют тысячи других, еще не изученных специфически локализованных мРНК. Ооцит содержит сеть микротрубочек, имеющих сложную и меняющуюся по мере его созревания полярную структуру с двуправленным движением [11] (рис. 1в), и представляет собой прекрасную модельную систему для изучения транспорта локализуемых мРНК.

Движение молекул по системе микротрубочек осуществляют тубулинзависимые АТРАЗы — кинезин и динеин.

Кинезинзависимый транспорт

Кинезин обеспечивает антероградный транспорт, осуществляемый в направлении периферии клетки от (–)-концов к (+)-концам микротрубочек. Ретроградный транспорт имеет противоположное направление — в сторону центросом — и является динеинзависимым. Эти две системы транспорта различаются на уровне взаимодействия моторных комплексов с транспортируемыми молекулами.

Суперсемейство кинезинов (KIF) насчитывает десятки изоформ, чья высокая вариабельность способствует специфическому распознаванию целого спектра переносимых молекул [12]. В табл. 1 представлены субъединицы основных кинезинов, обеспечивающих движение молекул.

Классическим кинезином является кинезин-1 (семейство KIF5), первый обнаруженный представитель этого суперсемейства [13, 14]. Кинезин-1 представляет собой гетеротетрамер, состоящий из двух тяжелых (KHC) и двух легких цепей (KLC). N-концевые глобулярные моторные домены гомодимера KHC содержат сайты связывания микротрубочек и молекул АТР. С-концевые домены KHC взаимодействуют с KLC, которые, в свою очередь, отвечают за взаимодействие с адаптерными белками и переносимыми молекулами, а также участвуют в активации кинезина-1 [15]. В некоторых случаях KHC также принимают участие в связывании переносимых молекул. Например, в ооцитах *D. melanogaster* KHC могут напрямую эффективно связывать мРНК *oskar* при взаимодействии с белком aTm1 (atypical Tropomyosin1-I/C) [16]. Однако в остальных известных случаях кинезин-1 не взаимодействует с мРНК непосредственно — во взаимодействии с мРНК принимают участие адаптерные белки.

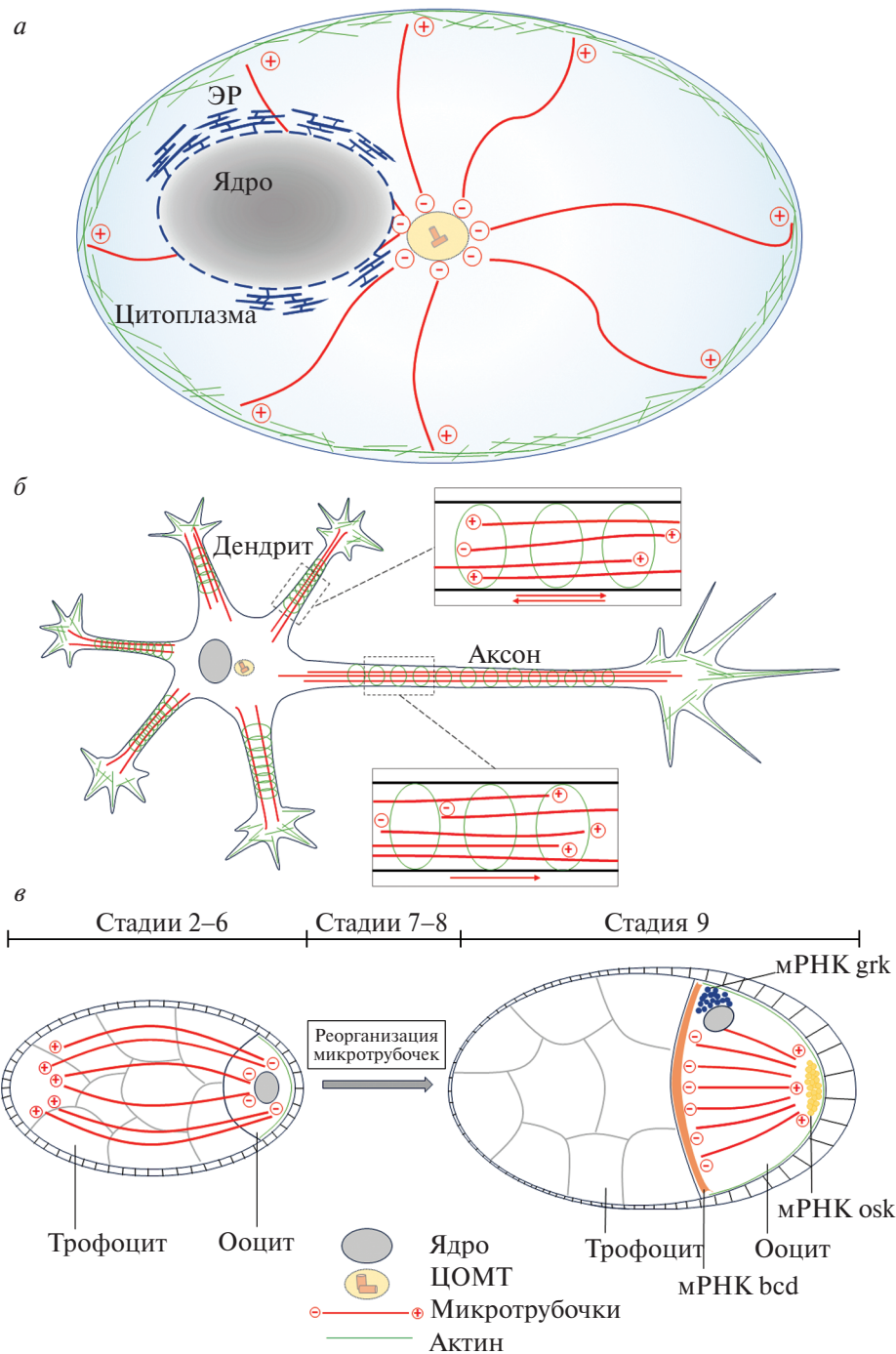


Рис. 1. Организация микротрубочек в различных типах клеток. Эукариотическая клетка — микротрубочки направлены от центра организации микротрубочек (ЦОМТ) к периферии клетки (а). Транспортная система микротрубочек в нейронах — в аксоне микротрубочки расположены в одной ориентации — к дистальному концу аксона; в дендритах — смешанная ориентация микротрубочек (б). Ооцит в процессе созревания — микротрубочки обеспечивают поляризацию ооцита и реорганизуются на различных стадиях (в). Актиновый цитоскелет обеспечивает клеточный каркас и участвует в закреплении “груза” в месте локализации. ЭР — эндоплазматический ретикулум. Полярность микротрубочек обозначена (+) или (–) (цитировано по [9, 11]).

Таблица 1. Субъединицы кинезиновых моторных комплексов

Комплекс	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i> / <i>Rattus norvegicus</i> [#]	<i>Drosophila melanogaster</i>
Кинезин-1 (гетеротетрамер)	KIF5A/ /KIF5B/ /KIF5C (KHC)	Kif5a/ /Kif5b/ /Kif5c	Khc
	KLC1/ /KLC2/ /KLC3/ /KLC4 (KLC)	Klc1/ /Klc2/ /Klc3/ /Klc4	Klc
Кинезин-2 (гетеротример)	KIF3A	Kif3a	Klp64D
	KIF3B/KIF3C	Kif3b или Kif3c	Klp68D
	KIFAP3 (KAP3)	Kifap3	Kap3
Кинезин-2 (гомодимер)	KIF17	Kif17	Kif3c
Кинезин-5 (гомотетрамер)	KIF11 (Eg5)	Kif11	Klp61F

[#]Номенклатура идентична для обоих организмов.

Известен еще один комплекс, относящийся к другому семейству кинезинов, который принимает участие в транспорте мРНК. Кинезин-2 (семейство KIF3) – это гетеротример, состоящий из субъединиц KIF3A, KIF3B или KIF3C, а также кинезин-ассоциированного белка 3 (KAP3). Известно, что этот кинезиновый комплекс, как кинезин-1 и некоторые другие, участвует в транспорте мРНК в нейронах человека [17–19].

Динеинзависимый транспорт

Динеинзависимый транспорт в цитоплазме осуществляется лишь одним моторным комплексом, известным как цитоплазматический динеин-1

(далее динеин). В его функции входит ретроградный транспорт по микротрубочкам различных органелл, мРНК и белковых комплексов, а также позиционирование ядра, сборка и фокусировка веретена деления в митозе [20].

Динеин представляет собой крупный димерный белковый комплекс, в состав мономера которого входят следующие субъединицы: тяжелые цепи (DHC), промежуточные цепи (DIC), легкие промежуточные цепи (DLIC) и легкие цепи (DLC) (табл. 2). Подобно кинезинам, динеин имеет моторный домен (С-концевой домен DHC) и “хвост” (N-концевой домен DHC). В моторной части белка

Таблица 2. Субъединицы комплекса цитоплазматического динеина

Белок	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i> / <i>Rattus norvegicus</i> [#]	<i>Drosophila melanogaster</i>
Тяжелая цепь динеина (DHC)*	DYNC1H1	Dync1h1	Dhc64C
Промежуточная цепь динеина (DIC)	DYNC1I1 DYNC1I2	Dync1i1 Dync1i2	sw
Легкая промежуточная цепь динеина (DLIC)	DYNC1LI1 DYNC1LI2	Dync1li1 Dync1li2	Dlic
Легкие цепи динеина (DLC) (три семейства):			
Tctex1	DYNLT1 DYNLT3	Dynlt1 Dynlt3	Dlc90F
Roadblock	DYNLRB1 DYNLRB2	Dynlrb1 Dynlrb2	robl
LC8	DYNLL1 DYNLL2	Dynll1 Dynll2	ctp

[#]Номенклатура идентична для обоих организмов.

*В скобках указано общее сокращенное название субъединицы. Все субъединицы динеина являются димерами одной из представленных в таблице изоформ.

расположен домен связывания с микротрубочками, а также кольцо из AAA-доменов, АТРазная активность которых способствует движению динеина вдоль микротрубочек. N-концевая область динеина участвует в его димеризации и опосредованном связывании молекул [21, 22].

Функционирование моторного комплекса динеина представляет собой сложно регулируемый процесс, зависящий от таких кофакторов, как динактиновый комплекс, BicD и Hook, Lis1 и NudE и других, еще не изученных белков [23–31].

ЗНАЧЕНИЕ АДАПТЕРОВ В КООРДИНАЦИИ ТРАНСПОРТА мРНК В ЦИТОПЛАЗМЕ

Наиболее хорошо изучено распределение локализуемой мРНК, имеющей определенный паттерн распределения. Направленный транспорт молекул мРНК, доставляемых по микротрубочкам к месту локализации, определяется их взаимодействием с адаптерными белками. В транспорте мРНК-частицы адаптерами служат РНК-связывающие белки, распознающие в мРНК сигнал локализации, также называемый zip-кодом [32]. Взаимодействие zip-кода со специфическим адаптером приводит к направленному движению мРНК-носителя, заданному свойствами адаптера. Определение zip-кодов мРНК затруднено тем, что консенсусная белоксвязывающая последовательность РНК очень вырождена, поэтому важную роль играет также сложная вторичная структура РНК. С другой стороны, хорошо охарактеризованы лишь немногие РНК-связывающие домены адаптеров, а многие еще не известны [32–34]. Вследствие этого на сегодняшний день описано очень мало механизмов транспорта мРНК. Факторы, необходимые для

локализации мРНК, изучают, как правило, в системах, где необходим направленный транспорт на большие расстояния — в ооцитах и нейронах.

Транспорт мРНК в оогенезе и раннем эмбриогенезе

В процессе оогенеза происходит активный транспорт локализуемых мРНК, что ведет к поляризации ооцита и формированию осей развития эмбриона. Эти процессы хорошо изучены у *D. melanogaster* на примере локализации таких ключевых мРНК, как bicoid, gurken, oskar, K10 и staufer [2].

Egalitarian. Наиболее известен и детально описан механизм взаимодействия с динеин-динактиновым моторным комплексом активирующего адаптера Bicaudal-D (BicD) и адаптера РНК Egalitarian (Egl) у *D. melanogaster* [35] (рис. 2).

Адаптер РНК Egl распознает и напрямую связывается с сигналом локализации определенных мРНК, таких как K10, hairy и gurken [36]. Малейшее нарушение в связывании РНК с Egl ведет к нарушениям в локализации мРНК и, как следствие, к аномалиям в развитии эмбриона [37].

Существуют две модели активации динеинзависимого транспорта *in vivo* мРНК hairy и K10. Согласно первой модели, мРНК сама инициирует сборку моторного комплекса, регулируя взаимодействие BicD-Egl. Связанный с молекулой мРНК димер Egl эффективно взаимодействует с BicD и таким образом выводит его из состояния аутоингибирования. В результате такого разблокирования свободный N-конец BicD (BicD-N) вступает во взаимодействие с динеин-динактиновым комплексом и активирует его [38, 39].

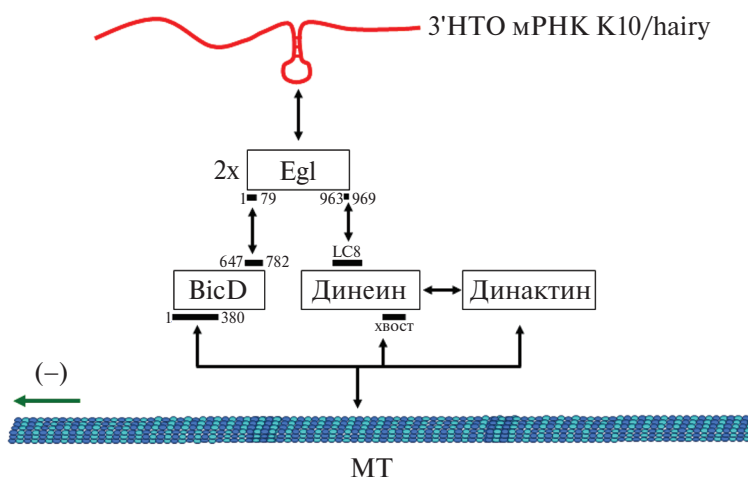


Рис. 2. Механизм взаимодействия мРНК K10/hairy с белками Egl-BicD и динеин-динактиновым моторным комплексом в зародышевых клетках *D. melanogaster*. На схеме обозначена 3'-нетранслируемая область (3'-НТО) мРНК, адаптеры РНК, моторные белки и микротрубочки (МТ). Двусторонние стрелки показывают известные белок-белковые или РНК-белковые взаимодействия. Домены белков обозначены линиями черного цвета. Длина указана в аминокислотах. Стрелка указывает направление движения моторного комплекса по микротрубочкам.

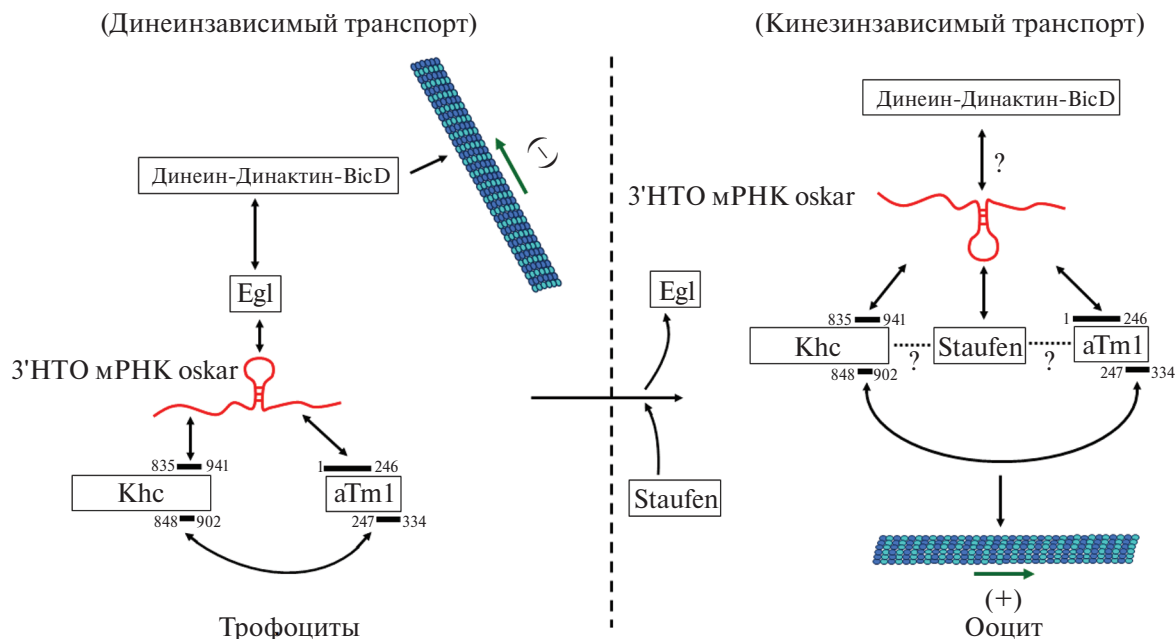


Рис. 3. Переключение направления транспорта мРНК oskar в зародышевых клетках *D. melanogaster*. На схеме обозначена 3'-нетранслируемая область (3'-НТО) мРНК, адаптеры РНК, моторные белки и микротрубочки (МТ). Двусторонние стрелки показывают известные белок-белковые или РНК-белковые взаимодействия. Домены белков обозначены линиями черного цвета. Длина указана в аминокислотных остатках. Стрелка указывает направление движения моторного комплекса по микротрубочкам.

Согласно другой модели, Egl взаимодействует с субъединицей LC8 DLC динеина [40]. Предполагается, что это взаимодействие приводит к димеризации Egl и увеличению его сродства к мРНК, что, в свою очередь, стимулирует дальнейшие этапы по взаимодействию мРНК-Egl с комплексом динеин-динактин-BicD-N [41, 42]. Поскольку комплекс динеин-динактин-BicD-N представляет собой минимальную рабочую систему движения по микротрубочкам *in vitro* как у *Drosophila*, так и у млекопитающих, высока вероятность эволюционной консервативности данного механизма [38].

Staufen и aTm1. Динеинзависимый транспорт мРНК оскар ассоциирован с кинезинзависимым транспортом. Изучение транспорта мРНК oskar в зародышевых клетках *D. melanogaster* показало, что переключение направления транспорта может регулироваться сменой РНК-связывающих адаптеров (рис. 3).

На первом этапе динеин переносит мРНК oskar из трофоцитов в ооцит, взаимодействуя с белками BicD-Egl [43, 44]. Дальнейший транспорт мРНК oskar к заднему полюсу ооцита обеспечивают кинезин-1, адаптер РНК Staufen и стабилизирующий адаптер aTm1 [16, 45, 46].

Кинезин-1 связывается с мРНК oskar еще в трофоцитах и активируется позднее в ооците, когда присоединение Staufen вызывает диссоциацию Egl и, как следствие, инактивацию комплекса BicD-динеин [47, 48]. Показано, что оба адаптера связывания мРНК, Egl и Staufen, имеют перекрывающиеся

сайты связывания на мРНК oskar [49–51]. Интересно, что именно Egl способствует накоплению в ооците своего конкурента Staufen, поскольку опосредует транспорт мРНК stau, кодирующей Staufen [48]. В работе Gáspár и соавт. показано, что Staufen заменяет в мРНК-комплексе адаптер мРНК динеинзависимого транспорта [48], однако возможно, что для функционирования в кинезинзависимом транспорте, кроме Staufen, необходим еще один адаптер — aTm1.

Взаимодействие Staufen с кинезином было описано ранее при изучении транспорта Vg1-содержащей РНП-частицы у *X. laevis* [52]. Помимо транспорта мРНК oskar, Staufen участвует также в транспорте целого ряда других эмбриональных транскриптов у *D. melanogaster*, включая мРНК bicoid в ооците и мРНК prospero в нейробластах [49, 53, 54]. Кроме того, ортологи Staufen (Stau1 и Stau2) принимают участие в транспорте мРНК в нейронах млекопитающих [55, 56]. Таким образом, есть основания полагать, что Staufen-опосредованный транспорт мРНК-частиц является распространенным и эволюционно консервативным.

Транспорт мРНК в нейронах

Интенсивный транспорт молекул в нейронах обеспечивает их стабильную работу. Нейроны состоят из нескольких основных отделов — клеточного тела, дендритов и аксона. Локальная трансляция мРНК в дистальных отделах требует перемещения мРНК-частиц на большие расстояния по

микротрубочкам [57–59]. Изучение механизмов нейронального транспорта мРНК-частиц необходимо для понимания патогенеза и возможного лечения неврологических заболеваний человека [58, 60, 61]. Интерес к нейрональному транспорту повышался по мере технического развития методов молекулярной визуализации *in vivo* и работы с одиночными клетками и молекулами.

SFPQ. Адаптерными функциями обладает фактор сплайсинга SFPQ/PSF (Splicing factor proline- and glutamine-rich). Ранее было показано, что SFPQ входит в состав мРНК-частиц, транспортируемых кинезином-1 (KIF5) в нейронах, однако функция SFPQ оставалась неизвестной [62]. Изучение механизма SFPQ-зависимого транспорта мРНК-частиц и его участия в жизнеобеспечении аксонов выявило молекулярные механизмы, лежащие в основе дегенерации аксонов на ранних стадиях нейродегенеративных заболеваний [63]. Выяснилось, что SFPQ связывается с мРНК и тетрамером моторного комплекса кинезина-1 для транспортировки мРНК-частицы SFPQ к дистальным отделам аксонов [19, 64] (рис. 4).

Во взаимодействии с SFPQ принимают участие вариабельные С-концевые участки как KIF5A, так и KLC1 кинезина-1 [19]. В суперспиральном участке SFPQ располагается “Y-мотив”, характерный для адаптеров, взаимодействующих с KLC1. Мутация центрального тирозина в этом мотиве нарушает связывание SFPQ с TPR-доменом KLC1 [19, 65]. Взаимодействие двух белков может регулироваться также фосфорилированием KLC1 и предварительным взаимодействием SFPQ с мРНК. Известными

мРНК, переносимыми SFPQ, являются мРНК *bclw* и *Imnb2*. Нарушение их аксональной локализации ведет к гибели аксонов [19, 64]. Одной из известных причин их неверной локализации является мутация R280H в моторном домене KIF5A. Эта мутация в консервативном сайте кинезина-1 нарушает SFPQ-зависимый транспорт и ассоциирована с классической формой наследственной нейропатии – болезнью Шарко–Мари–Тута [19].

TDP-43. SFPQ и другие адаптерные белки часто колокализуются в нейронах. Их функции связаны с поддержанием гомеостаза нейронов, патогенезом бокового амиотрофического склероза и лобно-височной дегенерации. Объединяет эти заболевания нарушение функций белка TDP-43 (TAR DNA binding protein, 43 kDa) и его накопление в цитоплазме [66–68]. TDP-43 участвует в сплайсинге, а также, как адаптер, отвечает за транспорт мРНК по микротрубочкам и регуляцию трансляции в аксонах (мРНК *Nefl*) [69] и дендритах (мРНК *Rac1*, *GluR1*, *Map1b*, *CamKII*) [70, 71]. Ортологи TDP-43 различных организмов могут функционально замещать друг друга, что указывает на консервативность его функций. Известен ряд мутаций в TDP-43, вызывающих нарушения транспорта мРНК-частиц в аксонах двигательных нейронов, что приводит к развитию бокового амиотрофического склероза [69].

Недавно выявили колокализацию TDP-43 и мРНК-связывающих адаптеров FMRP и Staufen1/2 в дендритах нейронов мыши. По результатам микроскопического анализа и биохимических экспериментов предложена модель их

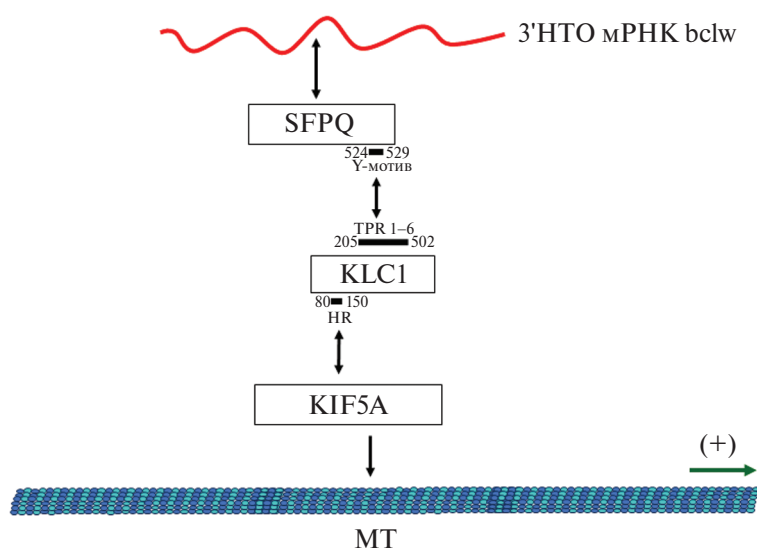


Рис. 4. Механизм взаимодействия мРНК *bclw* с SFPQ и кинезиновым моторным комплексом в сенсорных нейронах спинномозгового ганглия *R. norvegicus*. На схеме обозначена 3'-нетранслируемая область (3'-НТО) мРНК, адаптеры РНК, моторные белки и микротрубочки (MT). Двусторонние стрелки показывают известные белок-белковые или РНК-белковые взаимодействия. Домены белков обозначены линиями черного цвета. Длина указана в аминокислотных остатках. Стрелка указывает направление движения моторного комплекса по микротрубочкам. TPR – тетрапептидный повтор, HR – гептапептидный повтор.

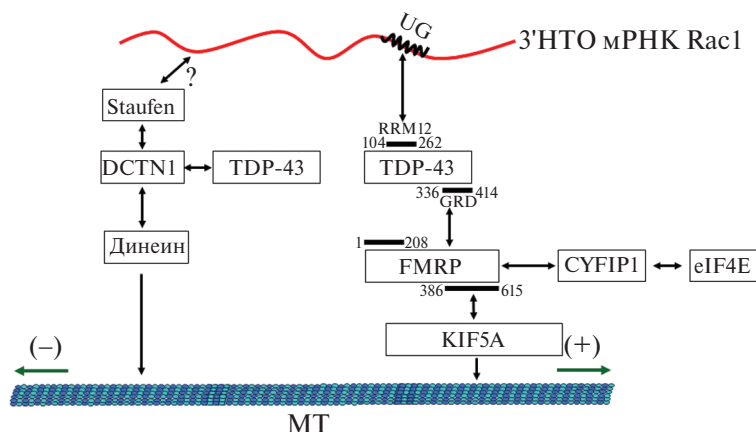


Рис. 5. Модель кооперативного действия TDP-43 с мРНК-связывающими адаптерами FMRP и Staufen1/2 в регуляции транспорта специфического набора нейрональных мРНК у *M. musculus*. На схеме обозначена 3'-нетранслируемая область (3'-НТО) мРНК, адаптеры РНК, моторные белки и микротрубочки (MT). Двусторонние стрелки показывают известные белок-белковые или РНК-белковые взаимодействия. Домены белков обозначены линиями черного цвета. Длина указана в аминокислотных остатках. Стрелка указывает направление движения моторного комплекса по микротрубочкам. GRD — глицин-богатый домен, RRM — домен распознавания РНК.

кооперативного действия в регуляции транспорта специфического набора нейрональных мРНК (рис. 5).

Согласно этой модели, взаимодействие TDP-43 с FMRP рекрутирует связанную с TDP-43 мРНК на кинезин-1 (KIF5). С другой стороны, TDP-43 взаимодействует с UG-богатыми последовательностями мРНК и, связываясь с FMRP, уже ассоциированным с CYFIP1, участвует в репрессии трансляции мРНК в процессе ее локализации [72]. Известно также, что нокдаун TDP-43 отрицательно влияет на ретроградный транспорт нейрональных мРНК, опосредованный Staufen-1/2 [70, 71]. Показано, что TDP-43 взаимодействует с субъединицей динактинового комплекса DCTN1, возможно, это взаимодействие модулирует ретроградный транспорт мРНК. Известен пример мутации в DCTN1, ассоциированной с наследуемой формой паркинсонизма, которая приводит к нарушению взаимодействия DCTN1 с TDP-43 и его накоплению в цитоплазме [73].

АПС. Реконструкция кинезин-2-зависимой системы транспорта мРНК в аксонах нейронов *M. musculus in vitro* выявила адаптерную функцию белка АПС (adenomatous polyposis coli) [18]. Известно, что АПС связывается с микротрубочками, а его мутантные формы обнаружены при раке толстой кишки и желудка [74]. АПС обладает двумя отдельными сайтами связывания с мРНК и с моторным комплексом микротрубочек. В 3'-нетранслируемой области мРНК, транспортируемых АПС, обнаружен G-богатый мотив. Различия в этом мотиве определяют сродство АПС к мРНК и частоту переноса мРНК генов, экспрессирующихся на разном уровне.

На данный момент показано участие АПС в транспорте мРНК двумя моторными комплексами — кинезином-1 (KIF5) и кинезином-2

(KIF3) [18, 75]. АПС функционирует в виде димера, в котором каждый мономер связывает одну молекулу мРНК [18]. В число мРНК, транспортируемых АПС, входят аксональные мРНК β -актина и β 2В-тубулина [76]. АПС взаимодействует с субъединицей KAP3 кинезина-2 и таким образом рекрутирует мРНК [18] (рис. 6).

В отсутствие KAP3 наблюдается лишь диффузное, т.е. ненаправленное движение АПС-мРНК-частиц по микротрубочкам. Показано, что АПС, связанный с мРНК, служит также активатором кинезина-2 и взаимодействие моторного комплекса с мРНК-АПС увеличивает его процессивность. Согласно последним данным, активация моторного комплекса обусловлена изменением конформации АПС, в результате которой открывается сайт взаимодействия с KAP3. АПС является достаточно универсальным фактором, поскольку он обнаруживается также при транспорте таких мРНК, как Rab13, Net1, Trak2 и Kif1c, сосредоточенных в цитоплазматических отростках клеток человека и мышей, кинезином-3 (KIF1C) [77, 78].

Недавно было показано прямое взаимодействие АПС с MT-ассоциированным белком EB1 (end-binding protein 1), предположительно необходимое для распознавания полимеризующихся (+)-концов микротрубочек в процессе направленного транспорта АПС-ассоциированных мРНК-частиц [75].

ZBP1. Адаптерные свойства белка ZBP1 (zipcode binding protein 1), также известного как IGF2BP1, выявлены при изучении механизма локализации мРНК β -актина. ZBP1 участвует в поддержании клеточной подвижности и нейропластичности в процессе эмбрионального развития млекопитающих [79–81]. Высокий уровень экспрессии ZBP1 в клетках взрослого организма связывают

с опухолевыми процессами [82, 83]. ZBP1 распознает специфичную последовательность в 3'-нетранслируемой области мРНК β -актина в ядре и в составе мРНК-частицы экспортируется в цитоплазму [84]. Сайты связывания с мРНК расположены в С-концевых доменах ZBP1, КН3 и КН4, связывающихся друг с другом в обратном направлении [85, 86]. Модель взаимодействия этих доменов с мРНК предполагает образование петли в транскрипте и, как следствие, возникновение сайтов связывания других белков мРНК-частицы [86, 87]. Трансляция ZBP1-зависимой мРНК может регулироваться фосфорилированием ZBP1 тирозинкиназой Src, что приводит к высвобождению мРНК в месте локализации [88, 89].

Показано, что транспорт мРНК β -актина в нейронах млекопитающих опосредован моторным комплексом кинезина-1 (KIF5) [90, 91], а в нейрональных клетках кинезином-5 (KIF11) [17] (рис. 7).

Предполагается, что потенциальным прямым адаптером между ZBP1 и кинезином-1 (KLC) в этом механизме служит белок PAT1 (Protein interacting with APP tail-1) [91]. Кинезин-1 не участвует в механизме транспорта мРНК β -актина в других типах клеток, он может быть специфичным участником нейронального транспорта. В других клетках движение мРНК-частицы ZBP1- β -актина по микротрубочкам опосредовано моторным комплексом кинезин-5 (KIF11) [17]. Нарушение активности кинезина-5, как и его нокдаун, вызывают аномалии в локализации мРНК β -актина. По данным экспериментов *in vitro* и *in vivo* С-концевой участок кинезина-5 прямо взаимодействует с RRM-доменами ZBP1 (RRM12). Этот

же механизм действует в транспорте двух других ZBP1-зависимых мРНК — *Arg16* и α -актина [17, 92]. Таким образом, ZBP1 может быть общим адаптером для транспорта мРНК разными кинезиновыми моторными комплексами.

ТРАНСПОРТ мРНК ПО МЕХАНИЗМУ “АВТОСТОПА”

Предполагается также существование еще одного способа передвижения молекул по цитоскелету, при котором не происходит прямого взаимодействия с моторными комплексами. Этот тип транспорта получил название “автостопа” (“hitchhiking”), поскольку предполагает прикрепление молекул к другому “грузу”, перемещаемому по микротрубочкам по классическому механизму. Такими переносчиками служат, как правило, эндосомы или органеллы, а среди их “пассажиров” встречаются мРНК-частицы [93]. Принцип “автостопа” широко распространен у нитчатых грибов, а недавно его обнаружили и у млекопитающих, что свидетельствует о его возможной эволюционной консервативности.

мРНК-транспорт “автостопом” был впервые описан при изучении патогенного гриба растений *Ustilago maydis*. Показано, что мРНК “путешествует” на ранних эндосомах в двух направлениях — при помощи динеин-динактинового комплекса и кинезина-3. Совместное движение мРНК с эндосомой по микротрубочкам возможно благодаря взаимодействию РНК-связывающего адаптера Rrm4 с мембраносвязанным белком эндосомы Ura1. На С-конце Ura1 находится домен цинковых пальцев для связывания с эндосомой [94]. Таким образом,

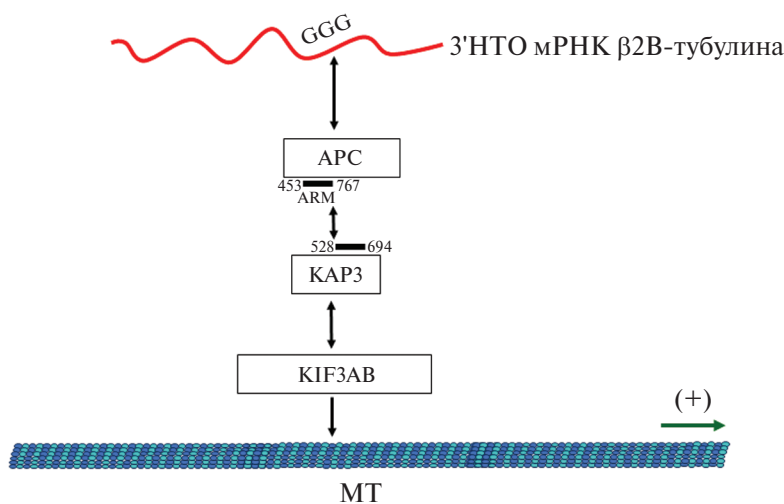


Рис. 6. Механизм взаимодействия APC с кинезином-2 и мРНК β 2В-тубулина в нейронах *M. musculus*. На схеме обозначена 3'-нетранслируемая область (3'-НТО) мРНК, адаптеры РНК, моторные белки и микротрубочки (MT). Двусторонние стрелки показывают известные белок-белковые или РНК-белковые взаимодействия. Домены белков обозначены линиями черного цвета. Длина указана в аминокислотных остатках. Стрелка указывает направление движения моторного комплекса по микротрубочкам. ARM — домен armadillo.

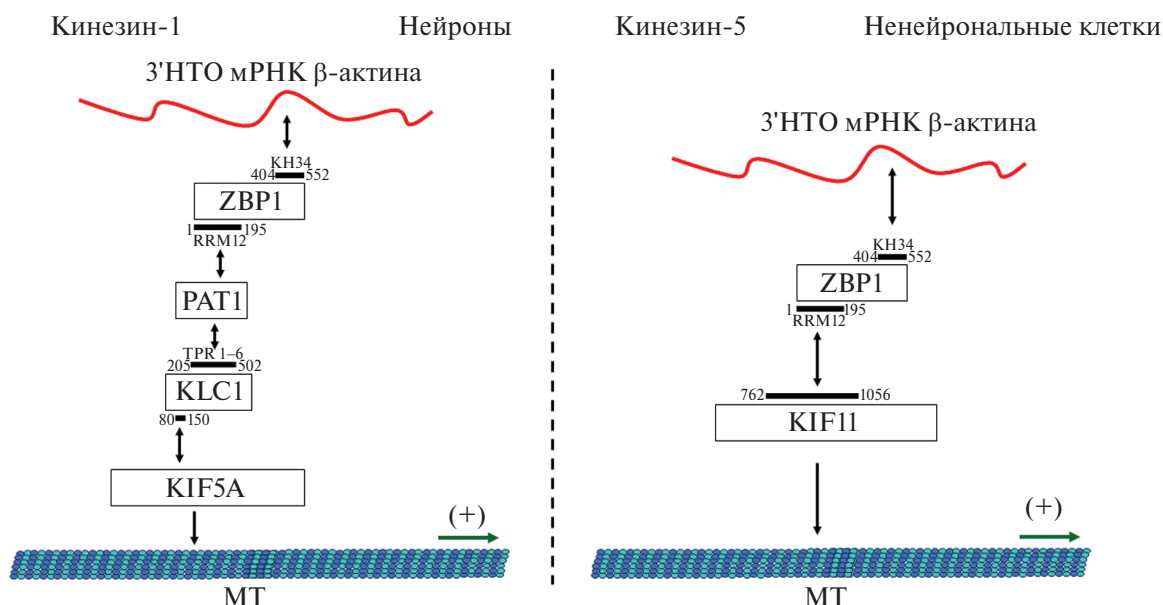


Рис. 7. Механизм взаимодействия ZBP1 с мРНК β-актина и с моторными комплексами кинезином-1 и кинезином-5 в нейронах и в ненейронных клетках *M. musculus* соответственно. На схеме обозначена 3'-нетранслируемая область (3'-НТО) мРНК, адаптеры РНК, моторные белки и микротрубочки (MT). Двусторонние стрелки показывают известные белок-белковые или РНК-белковые взаимодействия. Домены белков обозначены линиями черного цвета. Длина указана в аминокислотных остатках. Стрелка указывает направление движения моторного комплекса по микротрубочкам. КН – домен гомологии гяРНК К, RRM – домен распознавания РНК, TPR – тетратрикопептидный повтор.

эндосома, как первичный “груз”, движется по микротрубочкам вместе с подвешенным за адаптер вторичным “грузом” – мРНК, не имеющей прямых контактов с мотором [95, 96].

В клетках млекопитающих и, в частности, человека обнаружены аналогичные транспортные системы, действующие как в нейронах, так и в других клетках. Одна система определяет транспорт мРНК-частиц на движущихся лизосомах. В роли адаптера для связывания двух “грузов” выступает белок ANXA11 (Annexin A11), который одновременно взаимодействует как с РНК, так и с лизосомой. Этот белок содержит участок связывания с РНК на N-конце и домен взаимодействия с мембраной лизосомы на C-конце. Мутации в этих доменах ANXA11 связаны с патогенезом бокового амиотрофического склероза [97].

Транспорт “автостопом” вовлечен также в доставку и локальную трансляцию мРНК Pink1 к дистальным отделам аксонов, что впоследствии обеспечивает процесс нейрональной митофагии. PINK1 – это короткоживущий белок, который нуждается в локальной трансляции. Переносчиками мРНК Pink1 служат движущиеся по микротрубочкам митохондрии, на которых Pink1 закреплена благодаря взаимодействию двух белков-адаптеров: SYNJ2BP на внешней мембране митохондрий и SYNJ2, связанного с мРНК. Известно, что нарушения в процессах нейрональной митофагии способствуют развитию нейродегенеративных

заболеваний, в том числе болезни Паркинсона и бокового амиотрофического склероза [98].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение механизмов транспорта мРНК в цитоплазме в настоящее время далеко от завершения. Известно не так много адаптерных белков, узнающих специфический zip-код РНК. Нахождение zip-кода РНК затруднительно, поскольку каждая РНК имеет свою специфичную вторичную структуру. Очевидно, что локализация мРНК в нужном месте клетки и в определенное время играет важную роль, а нарушения приводят к огромному количеству заболеваний и патологий (болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, лобно-височная деменция, болезнь Шарко–Мари–Тута). Интересно, что многие факторы, играющие определенную роль в ядре, сопровождают мРНК в цитоплазму и принимают участие в ее транспорте в цитоплазме. Возможно, что в транспорте нелокализуемой мРНК в цитоплазме принимают участие общие факторы созревания и экспорта транскрипта в ядре. Современные биохимические, биоинформатические подходы и более глубокие микроскопические исследования должны помочь найти новые адаптерные белки и выявить общие механизмы рекрутирования мРНК на микротрубочки, а также регуляцию этого сложного процесса.

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

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Becalska A.N., Gavis E.R. (2009) Lighting up mRNA localization in *Drosophila* oogenesis. *Dev. Camb. Engl.* **136**, 2493–2503.
2. Lasko P. (2012) mRNA localization and translational control in *Drosophila* oogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a012294.
3. Micklem D.R. (1995) mRNA localisation during development. *Dev. Biol.* **172**, 377–395.
4. Kloc M., Zearfoss N.R., Etlin L.D. (2002) Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell.* **108**, 533–544.
5. Turner-Bridger B., Caterino C., Cioni J.-M. (2020) Molecular mechanisms behind mRNA localization in axons. *Open Biol.* **10**, 200177.
6. Bashirullah A., Cooperstock R.L., Lipshitz H.D. (1998) RNA localization in development. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 335–394.
7. Wang E.T., Taliaferro J.M., Lee J.-A., Sudhakaran I.P., Rossoll W., Gross C., Moss K.R., Bassell G.J. (2016) Dysregulation of mRNA localization and translation in genetic disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **36**, 11418–11426.
8. Khalil B., Morderer D., Price P.L., Liu F., Rossoll W. (2018) mRNP assembly, axonal transport, and local translation in neurodegenerative diseases. *Brain Res.* **1693**, 75–91.
9. Kapitein L.C., Hoogenraad C.C. (2015) Building the neuronal microtubule cytoskeleton. *Neuron.* **87**, 492–506.
10. Yogeve S., Cooper R., Fetter R., Horowitz M., Shen K. (2016) Microtubule organization determines axonal transport dynamics. *Neuron.* **92**, 449–460.
11. Johnstone O., Lasko P. (2001) Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 365–406.
12. Hirokawa N., Noda Y., Tanaka Y., Niwa S. (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 682–696.
13. Brady S.T. (1985) A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature.* **317**, 73–75.
14. Vale R.D., Reese T.S., Sheetz M.P. (1985) Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell.* **42**, 39–50.
15. Wong Y.L., Rice S.E. (2010) Kinesin's light chains inhibit the head- and microtubule-binding activity of its tail. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 11781–11786.
16. Dimitrova-Paternoga L., Jagtap P.K.A., Cyrklaff A., Vaishali, Lapouge K., Sehr P., Perez K., Heber S., Löw C., Hennig J., Ephrussi A. (2021) Molecular basis of mRNA transport by a kinesin-1-atypical tropomyosin complex. *Genes Dev.* **35**, 976–991.
17. Song T., Zheng Y., Wang Y., Katz Z., Liu X., Chen S., Singer R.H., Gu W. (2015) Specific interaction of KIF11 with ZBP1 regulates the transport of β -actin mRNA and cell motility. *J. Cell Sci.* **128**, 1001–1010.
18. Baumann S., Komissarov A., Gili M., Ruprecht V., Wieser S., Maurer S.P. (2020) A reconstituted mammalian APC-kinesin complex selectively transports defined packages of axonal mRNAs. *Sci. Adv.* **6**, eaaz1588.
19. Fukuda Y., Pazyra-Murphy M.F., Silagi E.S., Tasdemir-Yilmaz O.E., Li Y., Rose L., Yeoh Z.C., Vangos N.E., Geffken E.A., Seo H.S., Adelmant G., Bird G.H., Walensky L.D., Marto J.A., Dhe-Paganon S., Segal R.A. (2021) Binding and transport of SFPQ-RNA granules by KIF5A/KLC1 motors promotes axon survival. *J. Cell Biol.* **220**, e202005051.
20. Reck-Peterson S.L., Redwine W.B., Vale R.D., Carter A.P. (2018) The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 382–398.
21. Roberts A.J., Kon T., Knight P.J., Sutoh K., Burgess S.A. (2013) Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 713–726.
22. Urnavicius L., Lau C.K., Elshenawy M.M., Morales-Rios E., Motz C., Yildiz A., Carter A.P. (2018) Cryo-EM shows how dynactin recruits two dyneins for faster movement. *Nature.* **554**, 202–206.
23. King S.J., Brown C.L., Maier K.C., Quintyne N.J., Schroer T.A. (2003) Analysis of the dynein-dynactin interaction *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 5089–5097.
24. Loening N.M., Saravanan S., Jespersen N.E., Jara K., Barbar E. (2020) Interplay of disorder and sequence specificity in the formation of stable dynein-dynactin complexes. *Biophys. J.* **119**, 950–965.
25. Olenick M.A., Holzbaur E.L.F. (2019) Dynein activators and adaptors at a glance. *J. Cell Sci.* **132**, jcs227132.
26. Qiu R., Zhang J., Xiang X. (2019) LIS1 regulates cargo-adaptor-mediated activation of dynein by overcoming its autoinhibition *in vivo*. *J. Cell Biol.* **218**, 3630–3646.
27. Elshenawy M.M., Kusaki E., Volz S., Baumbach J., Bullock S.L., Yildiz A. (2020) Lis1 activates dynein motility by modulating its pairing with dynactin. *Nat. Cell Biol.* **22**, 570–578.
28. Htet Z.M., Gillies J.P., Baker R.W., Leschziner A.E., DeSantis M.E., Reck-Peterson S.L. (2020) LIS1 promotes the formation of activated cytoplasmic dynein-1 complexes. *Nat. Cell Biol.* **22**, 518–525.
29. Marzo M.G., Griswold J.M., Markus S.M. (2020) Pac1/LIS1 stabilizes an uninhibited conformation of dynein to coordinate its localization and activity. *Nat. Cell Biol.* **22**, 559–569.
30. Gillies J.P., Reimer J.M., Karasmanis E.P., Lahiri I., Htet Z.M., Leschziner A.E., Reck-Peterson S.L. (2022) Structural basis for cytoplasmic dynein-1 regulation by Lis1. *eLife.* **11**, e71229.
31. Garrott S.R., Gillies J.P., DeSantis M.E. (2022) Nde1 and Ndel1: outstanding mysteries in dynein-mediated transport. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 871935.
32. Jambhekar A., DeRisi J.L. (2007) Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport. *RNA.* **13**, 625–642.
33. Marchand V., Gaspar I., Ephrussi A. (2012) An intracellular transmission control protocol: assembly and transport of ribonucleoprotein complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **24**, 202–210.

34. Corley M., Burns M.C., Yeo G.W. (2020) How RNA-binding proteins interact with RNA: molecules and mechanisms. *Mol. Cell.* **78**, 9–29.
35. Claßen M., Suter B. (2005) BicD-dependent localization processes: from *Drosophila* development to human cell biology. *Ann. Anat.* **187**, 539–553.
36. Dienstbier M., Boehl F., Li X., Bullock S.L. (2009) Egalitarian is a selective RNA-binding protein linking mRNA localization signals to the dynein motor. *Genes Dev.* **23**, 1546–1558.
37. Goldman C.H., Neiswender H., Baker F., Veeranan-Karmegam R., Misra S., Gonsalvez G.B. (2021) Optimal RNA binding by Egalitarian, a dynein cargo adaptor, is critical for maintaining oocyte fate in *Drosophila*. *RNA Biol.* **18**, 2376–2389.
38. Sladewski T.E., Billington N., Ali M.Y., Bookwalter C.S., Lu H., Kremmentsova E.B., Schroer T.A., Trybus K.M. (2018) Recruitment of two dyneins to an mRNA-dependent Bicaudal D transport complex. *eLife*. **7**, e36306.
39. McClintock M.A., Dix C.I., Johnson C.M., McLaughlin S.H., Maizels R.J., Hoang H.T., Bullock S.L. (2018) RNA-directed activation of cytoplasmic dynein-1 in reconstituted transport RNPs. *eLife*. **7**, e36312.
40. Navarro C., Puthalakath H., Adams J.M., Strasser A., Lehmann R. (2004) Egalitarian binds dynein light chain to establish oocyte polarity and maintain oocyte fate. *Nat. Cell Biol.* **6**, 427–435.
41. Goldman C.H., Neiswender H., Veeranan-Karmegam R., Gonsalvez G.B. (2019) The Egalitarian binding partners dynein light chain and Bicaudal-D act sequentially to link mRNA to the dynein motor. *Dev. Camb. Engl.* **146**, dev176529.
42. Neiswender H., Goldman C.H., Veeranan-Karmegam R., Gonsalvez G.B. (2021) Dynein light chain-dependent dimerization of Egalitarian is essential for maintaining oocyte fate in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **478**, 76–88.
43. Sanghavi P., Laxani S., Li X., Bullock S.L., Gonsalvez G.B. (2013) Dynein associates with oskar mRNPs and is required for their efficient net plus-end localization in *Drosophila* oocytes. *PLoS One*. **8**, e80605.
44. Jambor H., Mueller S., Bullock S.L., Ephrussi A. (2014) A stem-loop structure directs oskar mRNA to microtubule minus ends. *RNA*. **20**, 429–439.
45. Brendza R.P., Serbus L.R., Duffy J.B., Saxton W.M. (2000) A function for kinesin I in the posterior transport of Oskar mRNA and Stauf protein. *Science*. **289**, 2120–2122.
46. Zimyanin V.L., Belaya K., Pecreaux J., Gilchrist M.J., Clark A., Davis I., St Johnston D. (2008) *In vivo* imaging of oskar mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization. *Cell*. **134**, 843–853.
47. Gáspár I., Sysoev V., Komissarov A., Ephrussi A. (2017) An RNA-binding atypical tropomyosin recruits kinesin-1 dynamically to oskar mRNPs. *EMBO J.* **36**, 319–333.
48. Gáspár I., Phea L.J., McClintock M.A., Heber S., Bullock S.L., Ephrussi A. (2023) An RNA-based feed-forward mechanism ensures motor switching in oskar mRNA transport. *J. Cell Biol.* **222**, e202301113.
49. Laver J.D., Li X., Ancevicus K., Westwood J.T., Smibert C.A., Morris Q.D., Lipshitz H.D. (2013) Genome-wide analysis of Stauf-associated mRNAs identifies secondary structures that confer target specificity. *Nucl. Acids Res.* **41**, 9438–9460.
50. Vazquez-Pianzola P., Schaller B., Colombo M., Beuchle D., Neuenschwander S., Marcil A., Bruggmann R., Suter B. (2016) The mRNA transportome of the BicD/Egl transport machinery. *RNA Biol.* **14**, 73–89.
51. Mohr S., Kenny A., Lam S.T.Y., Morgan M.B., Smibert C.A., Lipshitz H.D., Macdonald P.M. (2021) Opposing roles for Egalitarian and Stauf in transport, anchoring and localization of oskar mRNA in the *Drosophila* oocyte. *PLoS Genet.* **17**, e1009500.
52. Yoon Y.J., Mowry K.L. (2004) Xenopus Stauf is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vg1 RNA and kinesin. *Development*. **131**, 3035–3045.
53. Ferrandon D., Elphick L., Nüsslein-Volhard C., St Johnston D. (1994) Stauf protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell*. **79**, 1221–1232.
54. Broadus J., Fuerstenberg S., Doe C.Q. (1998) Stauf-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature*. **391**, 792–795.
55. Bauer K.E., Segura I., Gaspar I., Scheuss V., Illig C., Ammer G., Hutten S., Basyuk E., Fernández-Moya S.M., Ehses J., Bertrand E., Kiebler M.A. (2019) Live cell imaging reveals 3'-UTR dependent mRNA sorting to synapses. *Nat. Commun.* **10**, 3178.
56. Heraud-Farlow J.E., Sharangdhar T., Li X., Pfeifer P., Tauber S., Orozco D., Hörmann A., Thomas S., Bakosova A., Farlow A.R., Edbauer D., Lipshitz H.D., Morris Q.D., Bilban M., Doyle M., Kiebler M.A. (2013) Stauf2 regulates neuronal target RNAs. *Cell Rep.* **5**, 1511–1518.
57. Hirokawa N., Takemura R. (2005) Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 201–214.
58. Stokin G.B., Goldstein L.S.B. (2006) Axonal transport and Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 607–627.
59. Kapitein L.C., Hoogenraad C.C. (2011) Which way to go? Cytoskeletal organization and polarized transport in neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* **46**, 9–20.
60. Cody N.A.L., Iampietro C., Lécuyer E. (2013) The many functions of mRNA localization during normal development and disease: from pillar to post. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2**, 781–796.
61. Buchan J.R. (2014) mRNP granules. Assembly, function, and connections with disease. *RNA Biol.* **11**, 1019–1030.
62. Kanai Y., Dohmae N., Hirokawa N. (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*. **43**, 513–525.
63. Salvadores N., Sanhueza M., Manque P., Court F.A. (2017) Axonal degeneration during aging and its functional role in neurodegenerative disorders. *Front. Neurosci.* **11**, 451.
64. Cosker K.E., Fenstermacher S.J., Pazyra-Murphy M.F., Elliott H.L., Segal R.A. (2016) The RNA-binding protein SFPQ orchestrates an RNA regulon to promote axon viability. *Nat. Neurosci.* **19**, 690–696.
65. Pernigo S., Chegkazi M.S., Yip Y.Y., Treacy C., Glorani G., Hansen K., Politis A., Bui S., Dodding M.P., Steiner R.A. (2018) Structural basis for isoform-specific kinesin-1 recognition of Y-acidic cargo adaptors. *eLife*. **7**, e38362.
66. Arai T., Hasegawa M., Akiyama H., Ikeda K., Nonaka T., Mori H., Mann D., Tsuchiya K., Yoshida M., Hashizume Y., Oda T. (2006) TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar

- degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**, 602–611.
67. Neumann M., Sampathu D.M., Kwong L.K., Truax A.C., Micsenyi M.C., Chou T.T., Bruce J., Schuck T., Grossman M., Clark C.M., McCluskey L.F., Miller B.L., Masliah E., Mackenzie I.R., Feldman H., Feiden W., Kretschmar H.A., Trojanowski J.Q., Lee V.M. (2006) Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. **314**, 130–133.
 68. Baralle M., Buratti E., Baralle F.E. (2013) The role of TDP-43 in the pathogenesis of ALS and FTL. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 1536–1540.
 69. Alami N.H., Smith R.B., Carrasco M.A., Williams L.A., Winborn C.S., Han S.S.W., Kiskinis E., Winborn B., Freibaum B.D., Kanagaraj A., Clare A.J., Badders N.M., Bilican B., Chaum E., Chandran S., Shaw C.E., Eggan K.C., Maniatis T., Taylor J.P. (2014) Axonal transport of TDP-43 mRNA granules is impaired by ALS-causing mutations. *Neuron*. **81**, 536–543.
 70. Chu J.-F., Majumder P., Chatterjee B., Huang S.-L., Shen C.-K.J. (2019) TDP-43 regulates coupled dendritic mRNA transport-translation processes in co-operation with FMRP and Staufen1. *Cell Rep.* **29**, 3118–3133.e6.
 71. Wong C.-E., Jin L.-W., Chu Y.-P., Wei W.-Y., Ho P.-C., Tsai K.-J. (2021) TDP-43 proteinopathy impairs mRNP granule mediated postsynaptic translation and mRNA metabolism. *Theranostics*. **11**, 330–345.
 72. Majumder P., Chu J.-F., Chatterjee B., Swamy K.B.S., Shen C.-K.J. (2016) Co-regulation of mRNA translation by TDP-43 and Fragile X syndrome protein FMRP. *Acta Neuropathol.* **132**, 721–738.
 73. Deshimaru M., Kinoshita-Kawada M., Kubota K., Watanabe T., Tanaka Y., Hirano S., Ishidate F., Hiramoto M., Ishikawa M., Uehara Y., Okano H., Hirose S., Fujioka S., Iwasaki K., Yuasa-Kawada J., Mishima T., Tsuboi Y. (2021) DCTN1 binds to TDP-43 and regulates TDP-43 aggregation. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 3985.
 74. Munemitsu S., Souza B., Müller O., Albert I., Rubinfeld B., Polakis P. (1994) The APC gene product associates with microtubules *in vivo* and promotes their assembly *in vitro*. *Cancer Res.* **54**, 3676–3681.
 75. Baumann S.J., Grawenhoff J., Rodrigues E.C., Speroni S., Gili M., Komissarov A., Maurer S.P. (2022) APC couples neuronal mRNAs to multiple kinesins, EB1, and shrinking microtubule ends for bidirectional mRNA motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **119**, e2211536119.
 76. Preitner N., Quan J., Nowakowski D.W., Hancock M.L., Shi J., Tcherkezian J., Young-Pearse T.L., Flanagan J.G. (2014) APC is an RNA-binding protein and its interactome provides a link to neural development and microtubule assembly. *Cell*. **158**, 368–382.
 77. Wang T., Hamilla S., Cam M., Aranda-Espinoza H., Mili S. (2017) Extracellular matrix stiffness and cell contractility control RNA localization to promote cell migration. *Nat. Commun.* **8**, 896.
 78. Pichon X., Moissoglu K., Coleno E., Wang T., Imbert A., Robert M.C., Peter M., Chouaib R., Walter T., Mueller F., Zibara K., Bertrand E., Mili S. (2021) The kinesin KIF1C transports APC-dependent mRNAs to cell protrusions. *RNA*. **27**, 1528–1544.
 79. Eom T., Antar L.N., Singer R.H., Bassell G.J. (2003) Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 10433–10444.
 80. Hansen T.V.O., Hammer N.A., Nielsen J., Madsen M., Dalbaeck C., Wewer U.M., Christiansen J., Nielsen F.C. (2004) Dwarfism and impaired gut development in insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1-deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 4448–4464.
 81. Welshhans K., Bassell G.J. (2011) Netrin-1-induced local β -actin synthesis and growth cone guidance requires zipcode binding protein 1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 9800–9813.
 82. Bell J.L., Wächter K., Mühleck B., Pazaitis N., Köhn M., Lederer M., Hüttelmaier S. (2013) Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*. **70**, 2657–2675.
 83. Du Q.-Y., Zhu Z.-M., Pei D.-S. (2021) The biological function of IGF2BPs and their role in tumorigenesis. *Invest. New Drugs*. **39**, 1682–1693.
 84. Oleynikov Y., Singer R.H. (2003) Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr. Biol. CB*. **13**, 199–207.
 85. Farina K.L., Hüttelmaier S., Musunuru K., Darnell R., Singer R.H. (2003) Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *J. Cell. Biol.* **160**, 77–87.
 86. Chao J.A., Patskovsky Y., Patel V., Levy M., Almo S.C., Singer R.H. (2010) ZBP1 recognition of beta-actin zipcode induces RNA looping. *Genes Dev.* **24**, 148–158.
 87. Nicastro G., Candel A.M., Uhl M., Oregioni A., Hollingworth D., Backofen R., Martin S.R., Ramos A. (2017) Mechanism of β -actin mRNA recognition by ZBP1. *Cell Rep.* **18**, 1187–1199.
 88. Hüttelmaier S., Zenklusen D., Lederer M., Dictenberg J., Lorenz M., Meng X., Bassell G.J., Condeelis J., Singer R.H. (2005) Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature*. **438**, 512–515.
 89. Sasaki Y., Welshhans K., Wen Z., Yao J., Xu M., Goshima Y., Zheng J.Q., Bassell G.J. (2010) Phosphorylation of zipcode binding protein 1 is required for brain-derived neurotrophic factor signaling of local beta-actin synthesis and growth cone turning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **30**, 9349–9358.
 90. Ma B., Savas J.N., Yu M.-S., Culver B.P., Chao M.V., Tanese N. (2011) Huntingtin mediates dendritic transport of β -actin mRNA in rat neurons. *Sci. Rep.* **1**, 140.
 91. Wu H., Zhou J., Zhu T., Cohen I., Dictenberg J. (2020) A kinesin adapter directly mediates dendritic mRNA localization during neural development in mice. *J. Biol. Chem.* **295**, 6605–6628.
 92. Gu W., Katz Z., Wu B., Park H.Y., Li D., Lin S., Wells A.L., Singer R.H. (2012) Regulation of local expression of cell adhesion and motility-related mRNAs in breast cancer cells by IMP1/ZBP1. *J. Cell Sci.* **125**, 81–91.
 93. Salogiannis J., Reck-Peterson S.L. (2017) Hitchhiking: a non-canonical mode of microtubule-based transport. *Trends Cell Biol.* **27**, 141–150.
 94. Pohlmann T., Baumann S., Haag C., Albrecht M., Feldbrügge M. (2015) A FYVE zinc finger domain protein specifically links mRNA transport to endosome trafficking. *eLife*. **4**, e06041.

95. König J., Baumann S., Koepke J., Pohlmann T., Zarnack K., Feldbrügge M. (2009) The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of ubi1 and rho3 mRNAs. *EMBO J.* **28**, 1855–1866.
96. Baumann S., Pohlmann T., Jungbluth M., Brachmann A., Feldbrügge M. (2012) Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J. Cell Sci.* **125**, 2740–2752.
97. Liao Y.-C., Fernandopulle M.S., Wang G., Choi H., Hao L., Drerup C.M., Patel R., Qamar S., Nixon-Abell J., Shen Y., Meadows W., Vendruscolo M., Knowles T.P.J., Nelson M., Czekalska M.A., Musteikyte G., Gachechiladze M.A., Stephens C.A., Pasolli H.A., Forrest L.R., St George-Hyslop P., Lippincott-Schwartz J., Ward M.E. (2019) RNA granules hitchhike on lysosomes for long-distance transport, using annexin A11 as a molecular tether. *Cell.* **179**, 147–164.e20.
98. Harbauer A.B., Hees J.T., Wanderoy S., Segura I., Gibbs W., Cheng Y., Ordonez M., Cai Z., Cartoni R., Ashrafi G., Wang C., Perocchi F., He Z., Schwarz T.L. (2022) Neuronal mitochondria transport Pink1 mRNA via synaptojanin 2 to support local mitophagy. *Neuron.* **110**, 1516–1531.e9.

CYTOPLASMIC mRNA TRANSPORT: ADAPTORS OF mRNA BINDING TO MICROTUBULE MOTOR PROTEINS

Y. A. Vdovina¹ *, S. G. Georgieva¹, D. V. Kopytova¹

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

*e-mail: yuvdov2020@gmail.com

The process of mRNA localization in the cytoplasm involves the directed transport of mRNP particles using the microtubule system. This transport is mediated and regulated by specific factors – adaptors between mRNA molecules and microtubule motor proteins. Adaptors are a key link in the mechanism of mRNA transport, but to date their identity and functioning are mostly unknown. In this review, we examine the features and importance of adaptor proteins in mRNA transport during oogenesis and in neuronal function. This article summarizes recent data on mRNA binding adaptors in the cytoplasm and the mechanisms of their interaction with microtubule motor proteins.

Keywords: cytoplasmic transport, mRNP particle, RNA adaptors, microtubules

ЧТО АКТИН И МИОЗИН ДЕЛАЮТ В ЯДРЕ: НОВЫЕ ФУНКЦИИ ИЗВЕСТНЫХ БЕЛКОВ

© 2024 г. А. А. Саидова^{а, *}, И. А. Воробьев^б

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

^бБиологический факультет, Московский государственный университет

им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: saidova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 27.10.2023 г.

После доработки 08.12.2023 г.

Принята к публикации 11.12.2023 г.

Функции актина и моторных белков миозинов в цитоплазме изучают уже более 100 лет, однако само существование этих белков и их работа в ядре до недавнего времени оставались предметом споров. Исследования последнего десятилетия прояснили роль молекул актина и миозинов в контроле динамики процессов в клеточном ядре, организации хроматина и целостности генома. Новые методы микроскопии и использование модифицированных актинсвязывающих зондов позволили впервые напрямую визуализировать полимеризацию актиновых филаментов в ядре живых клеток. В обзоре рассмотрены процессы, контролируемые динамический баланс актина и миозинов между ядром и цитоплазмой, а также участие этих белков в регуляции транскрипции, репарации ДНК, реорганизации хроматина, опухолевой трансформации и клеточной дифференцировке.

Ключевые слова: актин, миозин IC, миозин VI, транскрипция, репарация ДНК

DOI: 10.31857/S0026898424030029, EDN: JDMKVN

ВВЕДЕНИЕ

Актин — один из самых консервативных белков эукариотических клеток. Известны шесть изоформ актина человека, которые кодируются отдельными генами [1] (α -скелетный, α -сердечный, α -гладкомышечный, γ -гладкомышечный, γ -цитоплазматический и β -цитоплазматический актины). Мономерная форма (G-актин) может обратимо собираться в длинные микрофиламенты (F-актин) под контролем множества актинсвязывающих белков [2]. Актиновые филаменты представляют собой один из трех основных компонентов цитоскелета. Вместе с моторными белками миозинами актиновые филаменты играют ключевую роль в определении формы и подвижности клеток, внутриклеточном транспорте, сокращении мышц и динамике органелл. Хорошо известно, что мономерный

актин, как и некоторые миозины и актинсвязывающие белки, постоянно перемещается между цитоплазмой и ядром [3, 4], однако функции этих белков в ядре стали предметом исследований только в начале XXI века, когда появились надежные методы визуализации и изучения динамики фракций ядерного актина и миозина [5]. Цитоплазматический β -актин — единственная изоформа, представленная не только в цитоплазме, но и в клеточном ядре [6]. К основным миозинам, присутствующим в ядре, относятся миозин I (три изоформы), немышечные миозины IIa, IIb, миозины V, X, XVI и XVIIIb [7, 8].

Исследования последних 10 лет показали, что актин и миозины ядра не образуют, как правило, актомиозиновых комплексов, как в цитоплазме [9], но при этом играют важную роль во всех фундаментальных процессах в ядре — от экспрессии генов до репарации ДНК [10–12]. В настоящее время ключевым вопросом биологии клеточного ядра стала его динамичная пространственная организация [13]. Актиновые филаменты и миозины ядра считаются идеальными кандидатами на роль организаторов динамического ядерного каркаса, который контролирует топологию ядерных доменов и их передвижение внутри ядра. Как мономеры актина, так и отдельные молекулы миозинов играют важную роль в качестве сигнальных молекул или кофакторов [14, 15] (например, в аллостерическом

Сокращения: LINC — linker of nucleoskeleton to cytoskeleton (линкер ядерного скелета и цитоскелета); NLS — nuclear localization sequence (сигнал ядерной локализации); NES — nuclear export sequence (сигнал ядерного экспорта); CAAR — calcium-mediated actin reset (кальцийзависимая перестройка актина); FRAP — fluorescence recovery after photobleaching (восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания); FLIP — fluorescence loss in photobleaching (потеря флуоресценции при фотообесцвечивании); TAN — transmembrane actin-associated filaments (трансмембранные актин-связанные филаменты).

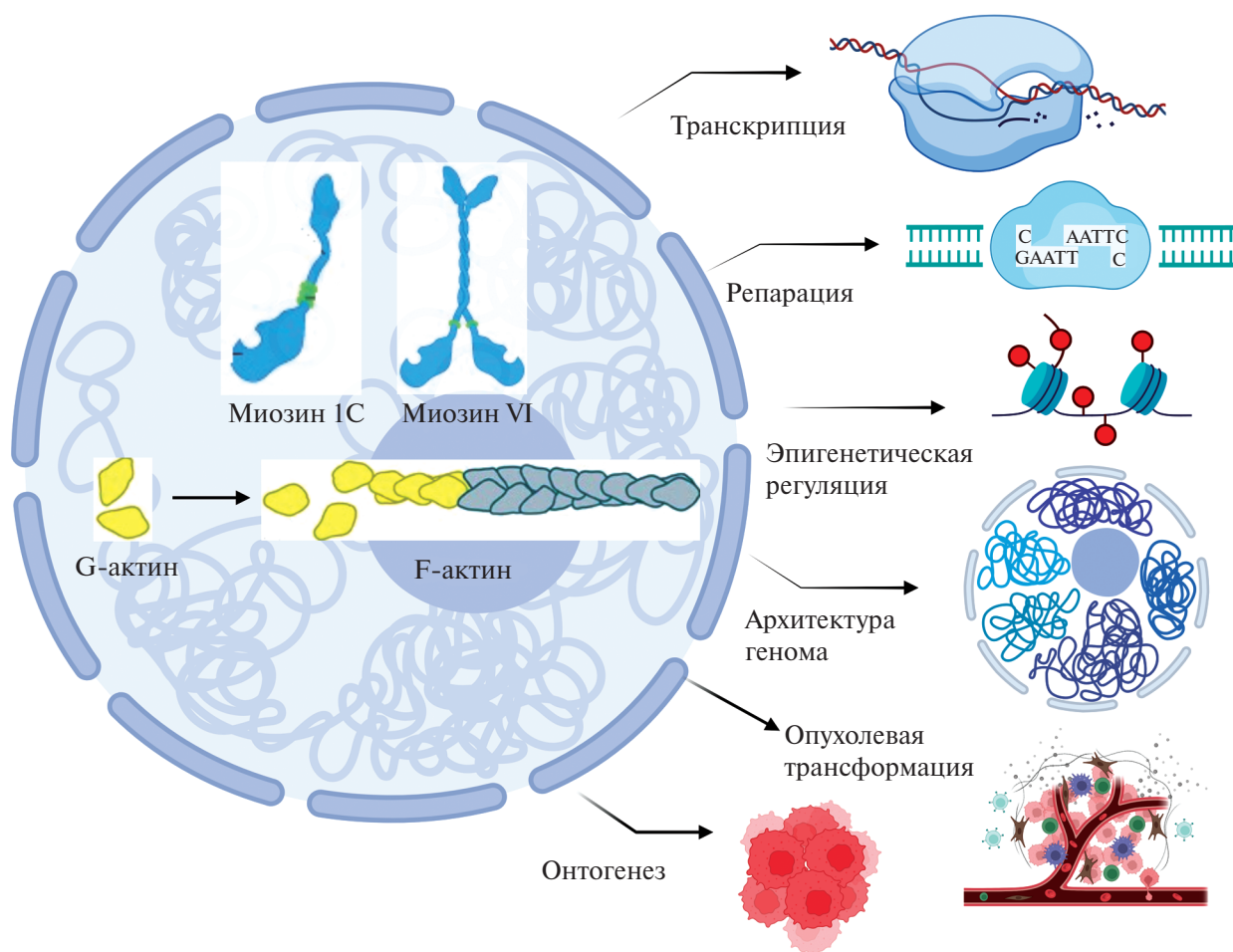


Рис. 1. Роль актина и миозинов в ядре клетки. В качестве примера молекул ядерных миозинов приведены молекулы миозинов IC и VI, основная изоформа актина в ядре – β -актин.

контроле комплексов ремоделирования хроматина). Полимеры актина в ядре вместе с немускульными миозинами участвуют в передвижении хромосом на относительно длинные (свыше 500 нм) расстояния [16], что необходимо для правильной пространственной организации процессов репарации ДНК [17]. Они также участвуют в контроле клеточного цикла [10] и определяют профиль экспрессии генов в онтогенезе млекопитающих [18] (рис. 1).

Важную роль в определении профиля экспрессии генов также играют актиновые филаменты, расположенные в цитоплазме вокруг ядра. Эти структуры являются одним из ключевых компонентов каскада механотрансдукции, который служит для передачи сигналов от цитоскелета в ядро клетки и меняет экспрессию генов дифференцировки, пролиферации и программируемой гибели в ответ на внешние стимулы. В основе передачи сигналов из цитоплазмы в ядро лежит работа комплексов LINC (linker of nucleoskeleton to

cytoskeleton), которые механически соединяют цитоскелет и хроматин через ядерную оболочку [19]. Изменение экспрессии генов при деформации ядра и нарушения работы LINC-комплекса лежат в основе многих заболеваний, связанных с дефектами строения ядерной оболочки [20]. В этом обзоре рассмотрено участие молекул актина и миозинов в процессах, связанных с транскрипцией, динамикой хроматина, репарацией ДНК, ответом на механические стимулы, клеточным циклом, а также приведены некоторые данные о роли актина и миозинов ядра в опухолевой трансформации (табл. 1).

ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ ТРАНСПОРТ АКТИНА И МИОЗИНОВ

Пул мономеров актина находится в динамическом равновесии между ядром и цитоплазмой. В классической модели ядерно-цитоплазматического транспорта, зависящего от градиента GTP/GDP и GTPазы Ran, импорт мономеров

Таблица 1. Основные функции актина и миозинов в ядре

Функция	Полимер/мономер; изоформа	Ссылка
Взаимодействие с РНК-полимеразами	Изоформа В миозина 1С, миозин VI/момеры β-актина, возможные олигомеры β-актина	[1] [9] [44–48]
Организация подвижности ядерных доменов	Изоформа В миозина 1С/возможные полимеры β-актина	[49–52]
Эпигенетическая регуляция экспрессии генов	Полимеры β-актина/изоформа В миозина 1С	[53] [54]
Репарация ДНК	Полимеры β-актина/миозин V, миозин 1С, миозин 1А	[12] [55] [56]
Регуляция клеточного цикла	Полимеры β-актина / изоформа В миозина 1С	[10] [57] [58]
Участие в опухолевой трансформации	Миозин 1С, миозин V, миозин X	[59–62]

актина в ядро происходит в основном с помощью импорта 9, а экспорт с помощью экспорта 6 [3, 21, 22].

Для того, чтобы попасть в ядро, актин связывается с кофилином, так как у самого актина нет сигнала ядерной локализации [23, 24]. Многочисленные белки, способные взаимодействовать с кофилином, определяют его способность связываться с актином и скорость поступления актина в ядро [25].

Недавно было показано, что за импорт актина отвечают одновременно несколько импортинов (Ipo9, Cadmus, Moleskin, RanBP11, Tpo, Tpo-SR) и для существенного уменьшения концентрации ядерного актина, которая влияет на жизнеспособность развивающихся личинок дрозофилы, необходимо одновременно вставить в молекулы актина эффективный сигнал ядерного экспорта (NES) и выключить экспрессию хотя бы одного импортина (Ipo9 или RanBP9) [26]. Повышенная концентрация актина в ядре, как правило, ассоциирована с высоким уровнем транскрипции [27]. Более того, в прямых экспериментах показано, что β-актин является эффективным регулятором своей транскрипции в ответ на стимуляцию сывороткой [28].

Экспорт актина из ядра также контролируется несколькими механизмами. Несмотря на то, что в аминокислотной последовательности актина есть сигнал NES, для эффективного экспорта актина требуется формирование комплекса с профилином [22]. Другой важный регулятор ядерного

актина — белок RASSF1A (изоформа А белков семейства 1 с Ras-ассоциированным доменом) [29], опухолевый супрессор, который локализуется в ядерной оболочке и необходим для экспорта ядерного актина в комплексе с экспортином 6 и профилином. Экспрессия RASSF1A снижается во многих солидных опухолях, что коррелирует с увеличением концентрации ядерного β-актина и замедлением транскрипции MRTF/SRF [29].

В целом концентрация актина в ядре во много раз меньше, чем в цитоплазме [3, 22, 30, 31], а его полимеризация в ядре напрямую зависит от актин-связывающих белков [31].

Механизмы импорта молекулы миозина в ядро зависят от ее класса. Наиболее хорошо изучены механизмы ядерно-цитоплазматического транспорта миозина 1С. Миозин 1С имеет общую для всех своих изоформ NLS-последовательность в “шейке” (второй мотив IQ). В каноническом ядерном транспорте миозина 1С предположительно участвуют импортины 5, 7 и β1, однако большая часть транспорта этого белка не зависит от GTPазы Ran и происходит неканоническим путем [32]. Важнейшую роль в регуляции внутриклеточной локализации миозина 1С играет кальций, повышение концентрации которого приводит к активации импорта миозина 1С в ядро [33]. При этом кальмодулин, с которым шейка миозина связывается при низкой концентрации ионов кальция [34], ингибирует ядерный транспорт белка [32]. Авторы предполагают, что повышение концентрации $[Ca^{2+}]$ вызывает диссоциацию кальмодулина от шейки миозина 1С, не только повышая АТРАЗную активность белка и ингибируя его подвижность [32], но и стимулируя транспорт данного белка в ядро, вероятно, за счет экспозиции NLS, необходимого для связывания с импортинами. Поскольку кальмодулин меняет моторную активность миозина 1С [35] и сам импортируется в ядро по облегченному пути [36], изучение роли $[Ca^{2+}]$ в регуляции внутриядерных миозинов представляется крайне перспективным направлением.

Миозин 1С связывается с мембраной через РН-домен (pleckstrin homology domain), т.е. является периферийным мембранным белком. Связывание с мембраной регулируется через фосфатидилинозит-4,5-бифосфат [37]. Предполагается, что эта форма миозина использует для импорта неканонический путь через области слияния эндоплазматического ретикула с ядерной оболочкой, характерный для белков внутренней ядерной мембраны [38], а мутации в NLS приводят к нарушению ядерного импорта не через ядерные поры, а в результате нарушения взаимодействия с фосфолипидами мембран. Наконец, с использованием точечных замен аминокислот показано, что импорт миозина 1С в ядро действительно зависит исключительно от его связывания с фосфоинозитом,

а NLS только облегчает данное взаимодействие, но сам по себе импорт не обеспечивает [39].

Анализируя динамику восстановления флуоресценции меченых белков после фотообесцвечивания (FRAP), удалось показать, что импорт миозина протекает медленнее, чем импорт актина, который зависит от кофилина и импортинов [39]. Учитывая, что активный транспорт нечувствителен к молекулярной массе переносимых белков, разница в скорости может быть объяснена различными механизмами внутриядерного импорта. Кроме того, используя метод FLIP, те же авторы показали, что, хотя миозин IC постоянно экспортируется из ядра, существует иммобилизованная на хроматине ядерная фракция (до 50% молекул), которая не выходит в цитоплазму.

Миозины VI и XVI, по-видимому, транспортируются в ядро по каноническому механизму с использованием NLS. Описано несколько возможных NLS, локализованных в разных доменах миозина VI. Одна из таких последовательностей находится в IQ-мотиве, что позволяет предположить Ca^{2+} -зависимый механизм транспорта этого миозина [40]. Накопление миозина VI происходит в ядре в ответ на стимуляцию ионами калия (K^+) в клетках феохромоцитомы [40] или стимуляцию сывороткой в клетках HeLa [41]. Для транспорта миозина VI в ядра клеток нейронов необходимо формирование его комплекса с регуляторным белком мускулином и транспорт в околоядерную область по микротрубочкам динеином (минус-концевой мотор) [42]. Миозин XVI содержит NLS в хвостовом домене, транспортируется в ядро по классическому Ran-зависимому механизму и локализуется в ядре с актином и кофилином [43]. Механизмы ядерно-цитоплазматического транспорта остальных миозинов изучены далеко не полностью.

АКТИН И МИОЗИНЫ В ЯДРЕ

В целом, в ядре находится около 20% всего клеточного актина, причем фракции ядерного и цитоплазматического актина находятся в динамическом равновесии.

Объем фракции ядерного актина напрямую связан со скоростью транскрипции [3, 22]. Соотношение ядерного и цитоплазматического актина контролируется с помощью сенсора мономерного актина MRTF-A (также известного как MKL1, или MAL) [63]. В обычном состоянии эта молекула в цитоплазме связана с мономером актина, который экранирует ее NLS и запрещает вход в ядро [64]. При стимуляции клеток сывороткой или при создании механического натяжения, стимулирующего полимеризацию актина в цитоплазме, количество мономерного актина в цитоплазме снижается, что приводит к появлению свободных молекул MRTF-A [65]. Не связанные

с мономерным актином молекулы MRTF-A накапливаются в ядре, где связываются с фактором транскрипции SRF и запускают транскрипцию MRTF/SRF-зависимых генов раннего ответа, связанных с перестройками цитоскелета [66]. С использованием полногеномного анализа показано, что клетки млекопитающих содержат примерно 3100 районов связывания SRF, который запускает транскрипцию 960 генов раннего ответа [67]. К таким генам относятся в том числе гены, кодирующие различные изоформы актина.

Мономерный актин в ядре входит в состав ДНК-ремоделирующих комплексов, таких как PBAF [68, 69], INO80 [70] и SWR1 [71]. Внутриядерный актин необходим для транскрипции и процессинга мРНК [72] и, наряду с семейством актин-подобных белков (actin-related proteins – ARF), участвует в посттрансляционной модификации гистонов [73, 74]. Нокаут β -актина в фибробластах мыши приводит к увеличению доли триметилированных гистонов H3 (варианты H3K9Me3 и H3K4Me3), их перераспределению от ядерной оболочки внутрь ядра, а также к общему увеличению размеров ядра [75].

Довольно долго считалось, что актин присутствует в ядре только в форме мономеров, либо имеет специфическую конформацию, либо полимеризуется только в особых условиях [31, 76]. Использование новых зондов позволило показать, что актин действительно способен полимеризоваться в ядре. С помощью зонда на основе известного актинсвязывающего белка утrophина UTR230-EN обнаружены короткие полимеры актина, которые располагались в обедненных хроматином участках ядра [11]. Использование пептидного зонда (Nuclear-targeted LifeAct) и наноантител к ядерному актину позволило показать, что кратковременная полимеризация актина в ядре происходит в ответ на стимуляцию клеток сывороткой [53] и при связывании интегринов в процессе клеточного расщепления [77]. В обоих случаях полимеризация актина происходит с участием форминов mDia1/2 и требует участия MRTF-A, который, в свою очередь, регулирует активность фактора транскрипции SRF [63]. Для полимеризации актина в ядре в процессе клеточного расщепления также необходима активация LINC-комплекса и компонентов ядерной ламины, т.е. в этом случае процесс полимеризации ядерного актина является последним компонентом каскада механотрансдукции, запускаемого фокальными контактами в ответ на растяжение клетки на субстрате. Интересно, что кратковременную полимеризацию ядерного актина в виде длинных нитей без увеличения его концентрации в нуклеоплазме можно наблюдать в ранней G1-фазе клеточного цикла, что, по-видимому, необходимо для деконденсации хроматина после митоза [10], либо для возможного участия актиновых филаментов

в начальных этапах подготовки к репликации ДНК [57]. До сих пор остается неясным, взаимодействуют ли мономеры или полимеры актина в ядре с миозинами.

ТРАНСКРИПЦИЯ

Актин может взаимодействовать со всеми тремя РНК-полимеразами эукариот, и это взаимодействие происходит с участием консервативных субъединиц Rbp6 и Rbp8 [78]. Актин активирует РНК-полимеразы, поддерживая базовый уровень транскрипции [79], а также необходим для работы РНК-полимеразы II на различных этапах транскрипции [44, 46, 72, 80, 81]. Прямое связывание актина с комплексами РНК-полимераз показано в большом числе работ [9, 44–46, 82]. Интересно, что в случае РНК-полимеразы II актин может связываться как с активным, так и с неактивным вариантом комплекса [44, 46].

Внутриядерный актин связывается с РНК-полимеразами не напрямую, а через опосредующие факторы [83], что позволяет поддерживать его эффективную концентрацию на относительно низком уровне. Предполагается, что для активации транскрипции необходимо взаимодействие немышечного миозина IC с актином в комплексе с РНК-полимеразой II [84]. Синтез β -актина в ответ на внеклеточные стимулы также является ключевым звеном в сборке и регуляции комплекса транскрипционных факторов. Используя метод селективной деполимеризации актина в ядре (не способная к полимеризации доминантно активная мутантная форма актина G13 была сцеплена с NLS и сверхэкспрессирована), показали, что ядерный актин необходим для быстрого формирования короткоживущих кластеров РНК-полимеразы II, которые обеспечивают взрывообразную активацию транскрипции [79].

По-видимому, функция олигомеров актина также связана со сборкой и разборкой РНП в сайтах трансляции [47]. В пользу этой гипотезы говорят данные масс-спектрометрии, согласно которым актин динамически связывается с белками, участвующими в процессах преинициации и элонгации, а также в процессинге пре-мРНК [85].

На сегодняшний день остается неясным, участвует ли актин в процессах транскрипции в качестве мономера, или для этого необходима его полимеризация. В клетках со сниженным количеством ядерного актина снижается скорость транскрипции, и ее можно восстановить не только с помощью актина дикого типа, но также с помощью мутантного актина-R62D, который не может полимеризоваться [86]. Этот результат противоречит экспериментам на клетках MEF с нокаутом β -актина, которые показали, что актин-R62D не восстанавливает синтез рРНК, в отличие от

актина дикого типа [87]. Интересно, что с процессами транскрипции связаны такие регуляторные белки, контролирующие полимеризацию актина, как Arp2/3 [88] и его активаторы N-WASP [89], WAVE1 [90] и WASH [91]. Помимо актина, на всех этапах транскрипции необходимы ядерные миозины, в частности миозин IC и миозин VI. Миозин IC входит в состав комплексов со всеми тремя РНК-полимеразами [44], тогда как миозин VI взаимодействует только с РНК-полимеразой II [1]. Миозин IC также входит в состав хроматин-ремоделирующего комплекса SNF2h/WSTF, который участвует в перемещении нуклеосом, необходимым для начала транскрипции РНК-полимеразой I [92] и РНК-полимеразой II [93]. Кроме того, миозин IC участвует в связывании гистон-ацетилтрансферазы PCAF и метилтрансферазы Set1/Ash2, которые поддерживают ацетилирование H3K9a и триметилирование H3K4, необходимые для активной транскрипции [93].

Миозин VI вместе с кофактором NDP52 входит в состав комплексов с РНК-полимеразой II и участвует в транскрипции мРНК [94, 95]. При ингибировании миозина VI в системе *in vitro* и *in vivo* уровень транскрипции ряда генов падает в 4 раза и более [96]. В качестве примера специфической функции миозина VI можно привести его работу в клетках TH1, где он опосредует переход комплекса РНК-полимеразы II от паузы к элонгации через повторную стимуляцию экспрессии TNF [97]. Недавно Gupta и соавт. [48] показали, что миозин VI в ядре действует как молекулярный якорь, который удерживает РНК-полимеразу II в области активной транскрипции, а инактивация или подавление экспрессии миозина VI приводят к изменению локализации РНК-полимеразы II и общей перестройке хроматина. Эти данные позволяют предположить, что миозин VI начинает работать при смене профиля экспрессии генов, что косвенно подтверждается сверхэкспрессией этого белка в некоторых типах опухолей, где он запускает экспрессию опухолеспецифичных генов [98, 99].

Учитывая, что миозины IC и VI связываются с комплексами РНК-полимеразы II, возникает вопрос, являются ли эти белки комплементарными или конкурирующими. В экспериментах по изменению уровня экспрессии миозинов с ядерной локализацией показано, что нокдаун миозина IC не влияет на скорость транскрипции в клетках U2OS [94]. Нокдаун миозина VI также не останавливает полностью транскрипцию [100], что позволяет предположить как минимум частичную взаимозаменяемость миозинов на различных этапах процесса транскрипции.

ДИНАМИКА ХРОМАТИНА

Хроматин в ядре постоянно перемещается на короткие (менее 0.2 мкм) и, реже, длинные (более 0.5 мкм) расстояния [16]. Большие перемещения хроматина связаны с его глобальной реорганизацией при дифференцировке клеток, а также предшествуют репарации ДНК [101, 102]. Кроме непосредственного участия в регуляции транскрипции, актиновые филаменты и молекулы миозинов также поддерживают общую архитектуру генома, перемещая участки хроматина и даже целые хромосомы на расстояния до нескольких микрон. В качестве примеров можно привести миграцию хромосом от периферии к центру ядра при активации транскрипции на их участках [52]; передвижение локуса U2 мРНК к тельцам Кахаля [49], перемещение белка Hsp70 к ядерным спеклам при индукции теплового шока [51] и релокализацию хромосом при сывороточном голодании [50]. В экспериментах по иммунопреципитации и глубокому секвенированию показано, что сайты связывания актина разбросаны по всему геному человека и дрозофилы [87, 103].

Необходимость полимеризации ядерного актина для перемещения хроматина на большие расстояния подтверждается рядом экспериментов с использованием ингибиторов полимеризации актина [52], а также экспрессией неспособных к полимеризации мутантных форм данного белка [49, 51, 52, 66].

Известно также, что в фибробластах с нокаутом β -актина нарушается общая архитектура гетерохроматина, уменьшается размер ядра и меняется профиль экспрессии генов [75]. В более поздних работах прямо показано участие актина и миозина 1C в передвижении хромосом в интерфазном ядре. Так, в клетках *S. cerevisiae* при активации транскрипции локус INO1 перемещается от центра ядра к периферии за счет направленного движения на относительно большие расстояния (свыше 500 нм). Это движение зависит от хроматин-ремоделирующих белков INO80 и SWR, а также от белков, запускающих полимеризацию актина, таких как гомолог формина Bnr1, которые, вероятно, необходимы для создания пула коротких актиновых филаментов в ядре [16].

РЕПАРАЦИЯ ДНК

Репарация повреждений ДНК — еще один процесс, в котором участвуют актин и миозины ядра. В частности, они обеспечивают перемещение хромосом на относительно большие расстояния для формирования “репарационных фабрик” [101, 103].

Первые доказательства потенциального участия F-актина в репарации двухцепочечных разрывов ДНК были получены в экспериментах по

соосаждению ядерных экстрактов с очищенным полимерным актином, в которых обнаружили связывание с актином белков репарации ДНК, включая Ku80, Mre11 и Rad51 [104, 105].

На клетках дрозофилы удалось показать, что полимеризация ядерного актина происходит при индукции двухцепочечных разрывов ДНК. В этом случае хроматин с индуцированными разрывами направленно передвигается к сайтам репарации, и это движение происходит по сети актиновых филаментов, которые собираются с помощью Arp2/3 в районе репарационных комплексов [56]. Моторами, перемещающими хроматин, служат ядерные миозины 1A, 1B и миозин V вместе со своим активатором Unc45, который приходит в сайты репарации с помощью белка структурной поддержки хромосом Smc5/6 [56].

В клетках млекопитающих картина участия актина в процессах репарации ДНК выглядит значительно сложнее. Если двойные разрывы возникают в активно транскрибируемых генах, то они сначала собираются в кластеры и лишь затем происходит репарация по механизму гомологичной рекомбинации (HDR). Этот процесс происходит преимущественно в фазе G1 и зависит от активности комплекса MRN, формина 2 (FMN2) и комплекса LINC [55]. При возникновении разрывов в фазе G2 активируется Arp2/3-зависимый процесс полимеризации актина, который способствует перемещению поврежденной ДНК в кластеры, что также обеспечивает их репарацию по механизму HDR вместо более распространенного механизма негомологичного соединения концов ДНК (non-homologous end joining — NHEJ) [106].

Индукция двухцепочечных разрывов ДНК цисплатином приводит к сверхэкспрессии миозина 1C и его связыванию с хроматином, а нокаут всех трех изоформ миозина 1C останавливает перемещение хромосом [107]. Миозин 1C также работает как мотор при репарации двухцепочечных разрывов по механизму HDR, когда гомологичным хромосомам необходимо вступить в контакт, чтобы создать матрицу для репарации [108].

Таким образом, внутриядерные актин и миозины играют важную роль в индукции механизма HDR для репарации двухцепочечных разрывов ДНК, подавляя NHEJ, что обеспечивает большую точность процесса репарации.

ОПУХОЛЕВАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ

Известно, что в некоторых видах опухолей наблюдается сверхэкспрессия ядерных миозинов [109]. Основной моделью, в которой описана сверхэкспрессия ядерных миозинов, являются клетки рака предстательной железы, характеризующиеся сверхэкспрессией как миозина VI, так и изоформы А миозина 1C. Внутриядерный миозин VI

в клетках рака предстательной железы контролирует экспрессию рецептора андрогенов [110]. Нокдаун миозина VI приводит к снижению уровня экспрессии ряда андрогензависимых генов. Такая же картина характерна для клеток рака молочной железы, в которых нокдаун гена *MYOVI* приводит к снижению уровня экспрессии генов, зависящих от рецептора эстрогенов [94].

Изоформа А миозина 1С, тканеспецифичная в отличие от двух других изоформ этого белка, экспрессируется в нормальной ткани почек, надпочечников, поджелудочной железы и яичников [111]. Анализ экспрессии изоформы А в клеточных линиях рака предстательной железы, проведенный в нашей лаборатории, показал, что повышение уровня экспрессии мРНК данной изоформы можно детектировать даже при соотношении нормальных и опухолевых клеток предстательной железы 1: 1000, что позволяет использовать ее в качестве маркера рака предстательной железы даже в образцах с малым количеством клеток или в образцах с большим количеством стромального компонента [102]. Также нами показано повышение уровня экспрессии изоформы А в клинических образцах рака предстательной железы, что позволяет достоверно отличить не только опухолевый процесс от реактивной доброкачественной гиперплазии предстательной железы, но и различить стадии опухоли, что открывает новые перспективы в использовании данной изоформы в качестве диагностического и прогностического маркера [59]. В онкогенезе принимают участие и другие ядерные миозины. Так, сверхэкспрессия миозина V (*MYO5A*) показана при колоректальном раке [60], а сверхэкспрессия миозина X характерна для клеток рака молочной железы [61, 62].

С другой стороны, ядерные миозины могут, напротив, действовать как супрессоры опухолевых процессов, например миозин XVIII при колоректальном раке [112], а также немышечный миозин IIА в различных плоскоклеточных карциномах [113].

Процессы, происходящие внутри ядра, также зависят от его морфологии и положения в клетке. В качестве примера такой зависимости можно привести деление эпителиальных клеток, которое может произойти только после транслокации ядра к апикальной поверхности клетки, а также различные процессы дифференцировки, в которых изменение профиля экспрессии генов происходит в ответ на изменение морфологии ядра. Морфология и положение ядра в клетке также зависят от актиновых филаментов, которые образуют особые околоядерные структуры — перинуклеарную шапочку и TAN-линии.

МОРФОЛОГИЯ ОКОЛОЯДЕРНОГО АКТИНА

Специальная сеть актиновых филаментов вокруг ядра организована в структуры, которые связывают цитоскелет в цитоплазме и хроматин в ядре. Первой такой структурой являются трансмембранные ассоциированные с актином нити (transmembrane actin-associated nuclear lines, TAN lines). Они представляют собой тонкие несократимые актиновые нити вокруг ядра, которые связаны с внутренней ядерной мембраной через LINC-комплекс. TAN-нити взаимодействуют со многими белками, включая торзин А, эмерин, Samp1, SUN1, ламины, LAP1, фасцин и белки ядерных пор [114–117]. Торзин А и LAP1 связывают ламины, SUN1 и несприн-2G со стороны ядра, тогда как FHOD1 и фасцин локализуются на цитоплазматической стороне ядерной оболочки и работают как адапторы для связывания несприна-2G с актином [115, 118].

Вторая структура, которая формирует околоядерный актин, — перинуклеарная актиновая шапочка (perinuclear actin cap). Актиновая шапочка отличается от TAN-нитей присутствием фосфорилированного миозина и способностью к сокращению. В фибробластах и эндотелиальных клетках актиновые нити перинуклеарной актиновой шапочки вытягиваются вдоль длинной оси клетки и ориентируют ядро в направлении ее миграции. Такие филаменты связаны с ядерной оболочкой через несприн-2 и на каждом конце связаны с фокальными контактами [119–121]. Перинуклеарную актиновую шапочку можно увидеть и в 3D культуре, например, в клетках эпителия молочной железы, где ядра имеют глубокие инвагинации в местах прикрепления актиновых филаментов к ядерной оболочке [122]. Для организации перинуклеарной актиновой шапочки необходимо скоординированное взаимодействие множества белков, ключевые из которых филамин А и рефилин В [123]. Ось “филамины—рефилины” особенно важна для передачи сигналов об изменении формы клетки в процессе формирования скелетных тканей [124]. Для формирования актиновой шапочки, по-видимому, также необходимо взаимодействие ее адапторных белков с белками ядерной ламины, так как клетки с нокаутом ламина А/С не образуют актиновой шапочки [121]. По-видимому, перинуклеарная актиновая шапочка играет ключевую роль в каскадах механохимического сопряжения. Остается непонятным, являются ли TAN-линии и перинуклеарная актиновая шапочка производными одной и той же структуры и имеют ли они общие регуляторные белки.

ОКОЛОЯДЕРНЫЕ АКТИНОВЫЕ СТРУКТУРЫ УЧАСТВУЮТ В ОПРЕДЕЛЕНИИ ФОРМЫ И ПОЛОЖЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО ЯДРА

В процессе миграции внутри организма клеткам часто приходится менять свою форму, в частности вытягиваться и сжиматься. Классическим примером клеток, вынужденных мигрировать в узком пространстве, служат нейтрофилы, проползающие через эндотелиальные и эпителиальные барьеры, и опухолевые клетки в процессе метастазирования. Если клетке необходимо мигрировать в узком канале, то ее ядро должно быть деформировано. Существуют два механизма проталкивания ядра. В LINC-зависимом механизме фибробласты сжимают свое ядро с помощью актомиозинового сокращения на переднем крае клетки, проталкивая его через узкое место. В этом случае несприн-2 накапливается перед ядром и координирует формирование бочонкоподобной структуры из актиновых филаментов, которые сжимают ядро и проталкивают его [125]. В случае LINC-независимого механизма происходит актомиозиновое сокращение на заднем крае клетки, в результате чего ядро также выталкивается вперед, однако в этом случае не наблюдается сокращение актиновых структур вокруг ядра [126].

Если к клетке приложить локальное усилие в виде растяжения или сдвига, то в ответ можно увидеть очень быструю реорганизацию околоядерного актина, формирующего кольцо. Этот процесс, описанный как минимум в эпителиальных клетках, зависит от белка Inf2 (inverted formin2) и называется CAAR (calcium-mediated actin reset) [127, 128]. Его можно запустить через выход ионов кальция из эндоплазматического ретикула в цитоплазму по Piezo1-зависимому механизму [128]. В клетках эндотелия перестройка актина вокруг ядра зависит от эмерина и начинается с передислокации этого белка с внутренней ядерной мембраны на внешнюю [129]. Такой клеточный ответ приводит к уменьшению количества гетерохроматина и быстрому снижению жесткости ядра, что можно рассматривать как способ защиты генома от механических повреждений [128]. С другой стороны, быстрое циклическое растяжение-сжатие мезенхимальных стволовых клеток, напротив, приводит к разобшению ядра и цитоплазматического цитоскелета через подавление транскрипции и фосфорилирование SUN2 — ключевого компонента комплекса LINC [130]. До сих пор сложно собрать в единую картину процессы, которые происходят в самом ядре в ответ на механическое растяжение/сжатие, однако понятно, что большинство из них связано с перестройкой актомиозиновых комплексов.

Еще одна важная функция сети актиновых филаментов — определение правильного положения ядра клетки в соответствии с текущим

физиологическим состоянием. Яркий пример этой функции — перемещение ядер в клетках псевдомногослойного эпителия, где митоз возможен, только если ядро с помощью стресс-фибрилл переходит из базальной части клетки в апикальную. Еще один пример клеток, в которых положение ядра зависит от актомиозинового сокращения, — фоторецепторы сетчатки и клетки заднего мозга *Danio rerio* [131, 132]. Движение ядра в клетках заднего мозга зависит от активации RhoA-ROCK-киназного каскада, тогда как в сетчатке ведущую роль играет нуклеация актиновых филаментов с помощью формин-подобного белка 3 (formin-like protein 3) [133, 134]. В обоих случаях сеть полимеризующихся актиновых филаментов выталкивает ядро к апикальной поверхности клетки. По сходному механизму происходит движение ядра в клетках зачатка крыла у дрозофилы, где белки Diaphanos (ортолог белка mDia) и ROK (активатор миозина) принимают участие в выталкивании ядра к апикальной поверхности [135]. Осцилляция ядер между апикальной и базальной поверхностью клетки описана также на модели фотоцитов сетчатки мыши [136]. Таким образом, в клетках многорядного эпителия разных организмов движение ядра к апикальной поверхности происходит за счет актомиозинового сокращения и полимеризации актиновых филаментов с участием форминов.

В многоядерных мышечных клетках в процессе формирования миофибриллы происходит перемещение ядер от центра клетки к периферии. В этом случае актиновые филаменты стимулируют образование сшивок из десмина, которые стягивают миофибриллы и помогают выталкивать ядра к периферии клетки [137, 138]. В клетках-няньках растущего ооцита *Drosophila melanogaster* актиновые стресс-фибриллы связываются со структурами перинуклеарного актина и с помощью белка Cheerio (ортолог филамина А) фиксируют ядро, не давая ему перекрывать кольцевые каналы, питающие ооцит [139].

Позиционирование ядра в клетках является активным процессом, который регулируется через систему микротрубочек и микрофиламентов. Для связи ядерной оболочки с микротрубочками используется динеин, а с микрофиламентами — комплекс LINC, в состав которого входят белки SUN (или их ортологи), связанные с внутренней ядерной мембраной и KASH, связанные с наружной ядерной мембраной [140].

В распластанных на субстрате фибробластах перемещение ядра сопряжено с ретроградным током актина и смещение ядра назад достигается через стимуляцию актомиозинового сокращения с помощью cdc42/MRCK. Интересно, что в процессе взаимной реориентации ядра и центросомы последняя должна оставаться малоподвижной, за что отвечает система микротрубочек [141]. Процесс перемещения ядра начинается с натяжения

трансмембранных актинсвязанных нитей (TAN), которые обеспечивают ретроградное смещение ядра [114–117]. Таким образом, предложена схема, согласно которой компоненты TAN-line комплекса фибробластов вместе с белком внутренней ядерной мембраны SUN2 отвечают за движение ядра назад, тогда как движение ядра вперед по направлению движения клетки зависит от работы микротрубочковых моторов и белка SUN1 [141]. В обоих случаях центральным адапторным элементом для связи цитоскелета с внутренней ядерной мембраной (с белками SUN) служит белок несприн-2G.

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

За последние 20 лет исследование актина и миозинов в клеточном ядре, их локализации и функций в нормальных и опухолевых клетках получило активное развитие. Резюмируя достижения в этой области, следует сказать, что функции молекул актина и миозина в ядре, по-видимому, совершенно отличны от функций этих белков в цитоплазме и часто не связаны с механической работой. Большой интерес представляет вопрос о необходимости взаимодействия актиновых филаментов и миозиновых моторов для выполнения специфических ядерных функций. До сих пор не существует прямых наблюдений, доказывающих присутствие в ядре актомиозиновых комплексов, аналогичных комплексам, которые формируются в цитоплазме. Остается неясным, могут ли молекулы миозинов выполнять специфические функции в транскрипции и движении хромосом без участия полимерного и мономерного актина, и могут ли миозины в ядре работать как сигнальные молекулы.

Еще одну проблему, которую предстоит решить, представляет поиск новых методов выяснения функций ядерных миозинов. В этом случае методы генетического нокдауна и нокаута не позволяют получить определенные результаты, так как разные формы миозинов в ядре компенсируют друг друга, по крайней мере частично. Кроме того, пока не удалось провести нокдаун/нокаут или ингибирование молекул миозина только в ядре, не затронув цитоплазматическую фракцию белка.

Мутации, связанные с нарушением структуры и функций внутриядерного актина/миозинов, лежат в основе некоторых наследственных миопатий и нейропатий. В частности, появление длинных нитевидных филаментов в ядре показано при немалиновой миопатии [142] и болезни Хантингтона, где аномальная экспрессия хантингтина, по-видимому, стабилизирует такие филаменты [143]. Кроме того, описано появление стабильных актиновых филаментов в ядре стареющих нейронов [144]. Непонятно, связано ли появление таких структур с причиной заболеваний, или скорее это их следствие, однако и в этом случае очевидно, что

функции актиновых филаментов в ядре не связаны с сократимостью клеток, но имеют отношение к транскрипции и динамике хроматина. Таким образом, изучение механизмов формирования актиновых филаментов и их роли в клетке поможет пролить свет на патогенез многих заболеваний.

Поэтому наиболее перспективным направлением изучения функций актина и миозина остается детальный анализ динамического равновесия этих белков между ядром и цитоплазмой в нормальных и патологических процессах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00714).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vreugde S., Ferrai C., Miluzio A., Hauben E., Marchisio P.C., Crippa M.P., Bussi M., Biffo S. (2006) Nuclear myosin VI enhances RNA polymerase II dependent transcription. *Mol. Cell.* **23**(5), 749–755.
2. Pollard T.D. (2016) Actin and actin-binding proteins. *Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.* **8**(8), a018226.
3. Dopie J., Skarp K.P., Kaisa Rajakylä E., Tanhuanpää K., Vartiainen M.K. (2012) Active maintenance of nuclear actin by importin 9 supports transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**(9), E544–552.
4. Hyrskyluoto A., Vartiainen M.K. (2020) Regulation of nuclear actin dynamics in development and disease. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **64**, 18–24.
5. Plessner M., Grosse R. (2019) Dynamizing nuclear actin filaments. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **56**, 1–6.
6. Olave I.A., Reck-Peterson S.L., Crabtree G.R. (2002) Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* **71**(1), 755–781.
7. Cook A.W., Gough R.E., Toseland C.P. (2020) Nuclear myosins – roles for molecular transporters and anchors. *J. Cell. Sci.* **133**(11), jcs242420.
8. de Lanerolle P. (2012) Nuclear actin and myosins at a glance. *J. Cell. Sci.* **125**(21), 4945–4949.
9. Fomproix N., Percipalle P. (2004) An actin-myosin complex on actively transcribing genes. *Exp. Cell. Res.* **294**(1), 140–148.
10. Baarlink C., Plessner M., Sherrard A., Morita K., Misu S., Virant D., Kleinschmitz E.-M., Harniman R., Alibhai D., Baumeister S., Miyamoto K., Endesfelder U., Kaidi A., Grosse R. (2017) A transient pool of nuclear F-actin at mitotic exit controls chromatin organization. *Nat. Cell. Biol.* **19**(12), 1389–1399.
11. Belin B.J., Cimini B.A., Blackburn E.H., Mullins R.D. (2013) Visualization of actin filaments and monomers in somatic cell nuclei. *Mol. Biol. Cell.* **24**(7), 982–994.
12. Belin B.J., Lee T., Mullins R.D. (2015) DNA damage induces nuclear actin filament assembly by formin-2 and spire-1/2 that promotes efficient DNA repair. *Elife.* **4**, e11935

13. Barth R., Bystricky K., Shaban H.A. (2020) Coupling chromatin structure and dynamics by live super-resolution imaging. *Sci. Adv.* **6**(27), eaaz2196.
14. Maly I.V., Hofmann W.A. (2020) Myosins in the nucleus. In: *Myosins: A Superfamily of Molecular Motors*. Ed Coluccio L.M. Cham: Springer, pp. 199–231.
15. Venit T., El Said N.H., Mahmood S.R., Percipalle P. (2021) A dynamic actin-dependent nucleoskeleton and cell identity. *J. Biochem.* **169**(3), 243–257.
16. Wang A., Kolhe J.A., Gioacchini N., Baade I., Briehner W.M., Peterson C.L., Freeman B.C. (2020) Mechanism of long-range chromosome motion triggered by gene activation. *Dev. Cell.* **52**(3), 309–320.
17. Chatterjee N., Walker G.C. (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* **58**(5), 235–263.
18. Mahmood S.R., El Said N.H., Percipalle P. (2022) The role of nuclear actin in genome organization and gene expression regulation during differentiation. *Results Probl. Cell Differ.* **70**, 607–624.
19. Wong X., Loo T.H., Stewart C.L. (2021) LINC complex regulation of genome organization and function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **67**, 130–141.
20. Janin A., Bauer D., Ratti F., Millat G., Méjat A. (2017) Nuclear envelopathies: a complex LINC between nuclear envelope and pathology. *Orphanet J. Rare Dis.* **12**(1), 147.
21. Fiore A.P.Z.P., Spencer V.A., Mori H., Carvalho H.F., Bissell M.J., Bruni-Cardoso A. (2017) Laminin-111 and the level of nuclear actin regulate epithelial quiescence via exportin-6. *Cell. Rep.* **19**(10), 2102–2115.
22. Stuken T. (2003) Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin-actin complexes. *EMBO J.* **22**(21), 5928–5940.
23. Bamburg J.R., Wiggan O.P. (2002) ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol.* **12**(12), 598–605.
24. Pendleton A., Pope B., Weeds A., Koffer A. (2003) Latrunculin B or ATP depletion induces cofilin-dependent translocation of actin into nuclei of mast cells. *J. Biol. Chem.* **278**(16), 14394–14400.
25. Dopie J., Rajakylä E.K., Joensuu M.S., Huet G., Ferrantelli E., Xie T., Jäälinoja H., Jokitalo E., Vartiainen M.K. (2015) Genome-wide RNAi screen for nuclear actin reveals a network of cofilin regulators. *J. Cell Sci.* **128**(13), 2388–2400.
26. Borkúti P., Kristó I., Szabó A., Bajusz C., Kovács Z., Réthi-Nagy Z., Lipinszki Z., Lukácsovich T., Bogdan S., Vilmos P. (2022) Parallel import mechanisms ensure the robust nuclear localization of actin in *Drosophila*. *Front. Mol. Biosci.* **9**, 963635.
27. Misu S., Takebayashi M., Miyamoto K. (2017) Nuclear actin in development and transcriptional reprogramming. *Front. Genet.* **8**, 27.
28. Kalo A., Kanter I., Shraga A., Sheinberger J., Tzemach H., Kinor N., Singer R.H., Lionnet T., Shav-Tal Y. (2015) Cellular levels of signaling factors are sensed by β -actin alleles to modulate transcriptional pulse intensity. *Cell Rep.* **11**(3), 419–432.
29. Chatzifrangkeskou M., Pefani D., Eyres M., Vendrell I., Fischer R., Pankova D., O'Neill E. (2019) RASSF 1A is required for the maintenance of nuclear actin levels. *EMBO J.* **38**(16), e101168.
30. Görlich D., Seewald M.J., Ribbeck K. (2003) Characterization of Ran-driven cargo transport and the RanGTPase system by kinetic measurements and computer simulation. *EMBO J.* **22**(5), 1088–1100.
31. Vartiainen M.K. (2008) Nuclear actin dynamics – from form to function. *FEBS Lett.* **582**(14), 2033–2040.
32. Dzijak R., Yildirim S., Kahle M., Novák P., Hnilicova J., Venit T., Hozák P. (2012) Specific nuclear localizing sequence directs two myosin isoforms to the cell nucleus in calmodulin-sensitive manner. *PLoS One.* **7**(1), e30529.
33. Maly I.V., Hofmann W.A. (2016) Calcium-regulated import of myosin IC into the nucleus. *Cytoskeleton.* **73**(7), 341–350.
34. Gillespie P.G., Cyr J.L. (2002) Calmodulin binding to recombinant myosin-1c and myosin-1c IQ peptides. *BMC Biochem.* **3**(1), 31.
35. Lu Q., Li J., Ye F., Zhang M. (2015) Structure of myosin-1c tail bound to calmodulin provides insights into calcium-mediated conformational coupling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**(1), 81–88.
36. Pruschy M., Ju Y., Spitz L., Carafoli E., Goldfarb D.S. (1994) Facilitated nuclear transport of calmodulin in tissue culture cells. *J. Cell Biol.* **127**(6), 1527–1536.
37. Hokanson D.E., Laakso J.M., Lin T., Sept D., Ostap E.M. (2006) Myo1c binds phosphoinositides through a putative pleckstrin homology domain. *Mol. Biol. Cell.* **17**(11), 4856–4865.
38. Ungricht R., Kutay U. (2015) Establishment of NE asymmetry-targeting of membrane proteins to the inner nuclear membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* **34**, 135–141.
39. Nevzorov I., Sidorenko E., Wang W., Zhao H., Vartiainen M.K. (2018) Myosin-1C uses a novel phosphoinositide-dependent pathway for nuclear localization. *EMBO Rep.* **19**(2), 290–304.
40. Majewski L., Nowak J., Sobczak M., Karatsai O., Havrylov S., Lenartowski R., Suszek M., Lenartowska M., Redowicz M.J. (2018) Myosin VI in the nucleus of neurosecretory PC12 cells: stimulation-dependent nuclear translocation and interaction with nuclear proteins. *Nucleus.* **9**(1), 125–141.
41. Hari-Gupta Y., Fili N., Dos Santos Á., Cook A.W., Gough R.E., Reed H.C.W., Wang L., Aaron J., Venit T., Wait E., Grosse-Berkenbusch A., Christof J., Gebhardt M., Percipalle P., Chew T.L., Martin-Fernandez M., Toseland C.P. (2020) Nuclear myosin VI regulates the spatial organization of mammalian transcription initiation. *Nat. Commun.* **13**(1), 1346.
42. Kneussel M., Sánchez-Rodríguez N., Mischak M., Heisler F.F. (2021) Dynein and muskellin control myosin VI delivery towards the neuronal nucleus. *iScience.* **24**(5), 102416.
43. Cameron R.S., Liu C., Mixon A.S., Pihkala J.P.S., Rahn R.J., Cameron P.L. (2007) Myosin16b: The COOH-tail region directs localization to the nucleus and overexpression delays S-phase progression. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **64**(1), 19–48.
44. Hofmann W.A., Stojiljkovic L., Fuchsova B., Vargas G.M., Mavrommatis E., Philimonenko V., Kysela K., Goodrich J.A., Lessard J.L., Hope T.J., Hozak P., de Lanerolle P. (2004) Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat. Cell. Biol.* **6**(11), 1094–1101.

45. Hu P., Wu S., Hernandez N. (2004) A role for β -actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev.* **18**(24), 3010–3015.
46. Kukalev A., Nord Y., Palmberg C., Bergman T., Percipalle P. (2005) Actin and hnRNP U cooperate for productive transcription by RNA polymerase II. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**(3), 238–244.
47. Kotani T., Yasuda K., Ota R., Yamashita M. (2013) Cyclin B1 mRNA translation is temporally controlled through formation and disassembly of RNA granules. *J. Cell Biol.* **202**(7), 1041–1055.
48. Hari-Gupta Y., Fili N., dos Santos Á., Cook A.W., Gough R.E., Reed H.C.W., Wang L., Aaron J., Venit T., Wait E., Grosse-Berkenbusch A., Gebhardt J.C.M., Percipalle P., Chew T.L., Martin-Fernandez M., Toseland C.P. (2022) Myosin VI regulates the spatial organisation of mammalian transcription initiation. *Nat. Commun.* **13**(1), 1346.
49. Dundr M., Ospina J.K., Sung, M.H., John S., Upender M., Ried T., Hager G.L., Matera A.G. (2007) Actin-dependent intranuclear repositioning of an active gene locus *in vivo*. *J. Cell Biol.* **179**(6), 1095–1103.
50. Mehta I.S., Amira M., Harvey A.J., Bridger J.M. (2010) Rapid chromosome territory relocation by nuclear motor activity in response to serum removal in primary human fibroblasts. *Genome Biol.* **11**(1), R5.
51. Khanna N., Hu Y., Belmont A.S. (2014) HSP70 Transgene directed motion to nuclear speckles facilitates heat shock activation. *Curr. Biol.* **24**(10), 1138–1144.
52. Chuang C.H., Carpenter A.E., Fuchsova B., Johnson T., de Lanerolle P., Belmont A.S. (2006) Long-range directional movement of an interphase chromosome site. *Curr. Biol.* **16**(8), 825–831.
53. Baarlink C., Wang H., Grosse R. (2013) Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL. *Science.* **340**(6134), 864–867.
54. Percipalle P., Fomproix N., Cavellán E., Voit R., Reimer G., Krüger T., Thyberg J., Scheer U., Grummt I., Östlund Farants A. (2006) The chromatin remodelling complex WSTF–SNF2h interacts with nuclear myosin I and has a role in RNA polymerase I transcription. *EMBO Rep.* **7**(5), 525–530.
55. Aymard F., Aguirrebengoa M., Guillou E., Javierre B.M., Bugler B., Arnould C., Rocher V., Iacovoni J.S., Biernacka A., Skrzypczak M., Ginalski K., Rowicka M., Fraser P., Legube G. (2017) Genome-wide mapping of long-range contacts unveils clustering of DNA double-strand breaks at damaged active genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**(4), 353–361.
56. Caridi C.P., D'Agostino C., Ryu T., Zapotoczny G., Delabaere L., Li X., Khodaverdian V.Y., Amaral N., Lin E., Rau A.R., Chiolo I. (2018) Nuclear F-actin and myosins drive relocalization of heterochromatic breaks. *Nature.* **559**(7712), 54–60.
57. Parisi N., Krasinska L., Harker B., Urbach S., Rossignol M., Camasses A., Dewar J., Morin N., Fisher D. (2017) Initiation of DNA replication requires actin dynamics and formin activity. *EMBO J.* **36**(21), 3212–3231.
58. Sarshad A., Sadeghifar F., Louvet E., Mori R., Böhm S., Al-Muzzaini B., Vintermist A., Fomproix N., Östlund A.K., Percipalle P. (2013) Nuclear myosin 1c facilitates the chromatin modifications required to activate rRNA gene transcription and cell cycle progression. *PLoS Genet.* **9**(3), e1003397.
59. Saidova A.A., Potashnikova D.M., Tvorogova A.V., Paklina O.V., Veliev E.I., Knyshinsky G.V., Setdikova G.R., Rotin D.L., Maly I.V., Hofmann W.A., Vorobjev I.A. (2021) Myosin 1C isoform A is a novel candidate diagnostic marker for prostate cancer. *PLoS One.* **16**(5), e0251961.
60. Lan L., Han H., Zuo H., Chen Z., Du Y., Zhao W., Gu J., Zhang Z. (2010) Upregulation of myosin Va by Snail is involved in cancer cell migration and metastasis. *Int. J. Cancer.* **126**(1), 53–64.
61. Arjonen A., Kaukonen R., Ivaska J. (2011) Filopodia and adhesion in cancer cell motility. *Cell Adh. Migr.* **5**(5), 421–430.
62. Cao R., Chen J., Zhang X., Zhai Y., Qing X., Xing W., Zhang L., Malik Y.S., Yu H., Zhu X. (2014) Elevated expression of myosin X in tumours contributes to breast cancer aggressiveness and metastasis. *Br. J. Cancer.* **111**(3), 539–550.
63. Vartiainen M.K., Guettler S., Larjani B., Treisman R. (2007) Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science.* **316**(5832), 1749–1752.
64. Pawłowski R., Rajakylä E.K., Vartiainen M.K., Treisman R. (2010) An actin-regulated importin α/β -dependent extended bipartite NLS directs nuclear import of MRTF-A. *EMBO J.* **29**(20), 3448–3458.
65. Mouilleron S., Langer C.A., Guettler S., McDonald N.Q., Treisman R. (2011) Structure of a pentavalent G-actin • MRTF-A complex reveals how G-actin controls nucleocytoplasmic shuttling of a transcriptional coactivator. *Sci. Signal.* **4**(177), ra40.
66. Posern G., Treisman R. (2006) Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol.* **16**(11), 588–596.
67. Esnault C., Stewart A., Gualdrini F., East P., Horswell S., Matthews N., Treisman R. (2014) Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblasts. *Genes Dev.* **28**(9), 943–958.
68. Nishimoto N., Watanabe M., Watanabe S., Sugimoto N., Yugawa T., Ikura T., Koiwai O., Kiyono T., Fujita M. (2012) Heterocomplex formation by Arp4 and β -actin involved in integrity of the Brg1 chromatin remodeling complex. *J. Cell Sci.* **125**(16), 3870–3882.
69. Zhao K., Wang W., Rando O.J., Xue Y., Swiderek K., Kuo A., Crabtree G.R. (1998) Rapid and phosphoinositide-dependent binding of the SWI/SNF-like BAF complex to chromatin after T lymphocyte receptor signaling. *Cell.* **95**(5), 625–636.
70. Kapoor P., Chen M., Winkler D.D., Luger K., Shen X. (2013) Evidence for monomeric actin function in INO80 chromatin remodeling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**(4), 426–432.
71. Kapoor P., Shen X. (2014) Mechanisms of nuclear actin in chromatin-remodeling complexes. *Trends Cell Biol.* **24**(4), 238–246.
72. Qi T., Tang W., Wang L., Zhai L., Guo L., Zeng X. (2011) G-actin participates in RNA polymerase II dependent transcription elongation by recruiting positive transcription elongation factor b (P-TEFb). *J. Biol. Chem.* **286**(17), 15171–15181.
73. Galarneau L., Nourani A., Boudreault A.A., Zhang Y., Hélot L., Allard S., Savard J., Lane W.S., Stillman D.J., Côté J. (2000) Multiple links between the NuA4 histone

- acetyltransferase complex and epigenetic control of transcription. *Mol. Cell.* **5**(6), 927–937.
74. Serebryanny L.A., Cruz, C.M., de Lanerolle P. (2016) A role for nuclear actin in HDAC1 and 2 regulation. *Sci. Rep.* **6**(1), 28460.
 75. Xie X., Almuzzaini B., Drou N., Kremb S., Yousif A., Farrants A.Ö., Gunsalus K., Percipalle P. (2018) β -Actin-dependent global chromatin organization and gene expression programs control cellular identity. *FASEB J.* **32**(3), 1296–1314.
 76. Grosse R., Vartiainen M.K. (2013) To be or not to be assembled: progressing into nuclear actin filaments. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **14**(11), 693–697.
 77. Plessner M., Melak M., Chinchilla P., Baarlink C., Grosse R. (2015) Nuclear F-actin formation and reorganization upon cell spreading. *J. Biol. Chem.* **290**(18), 11209–11216.
 78. Percipalle P. (2013) Co-transcriptional nuclear actin dynamics. *Nucleus.* **4**(1), 43–52.
 79. Wei M., Fan X., Ding M., Li R., Shao S., Hou Y., Meng S., Tang F., Li C., Sun, Y. (2020) Nuclear actin regulates inducible transcription by enhancing RNA polymerase II clustering. *Sci. Adv.* **6**(16), eaay6515.
 80. Percipalle P., Fomproix N., Kylberg K., Miralles F., Björkroth B., Daneholt B., Visa N. (2003) An actin–ribonucleoprotein interaction is involved in transcription by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**(11), 6475–6480.
 81. Sjölander M., Björk P., Söderberg E., Sabri N., Östlund Farrants A.K., Visa N. (2005) The growing pre-mRNA recruits actin and chromatin-modifying factors to transcriptionally active genes. *Gen. Dev.* **19**(16), 1871–1884.
 82. Philimonenko V.V., Zhao J., Iben S., Dingová H., Kyselá K., Kahle M., Zentgraf H., Hofmann W.A., de Lanerolle P., Hozák P., Grummt I. (2004). Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat. Cell. Biol.* **6**(12), 1165–1172.
 83. Xie X., Percipalle P. (2018) An actin-based nucleoskeleton involved in gene regulation and genome organization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **506**(2), 378–386.
 84. Sarshad A.A., Corcoran M., Al-Muzzaini B., Borgonovo-Brandt L., Von Euler A., Lamont D., Visa N., Percipalle P. (2014) Glycogen synthase kinase (GSK) 3 β phosphorylates and protects nuclear myosin 1c from proteasome-mediated degradation to activate rDNA transcription in early G1 cells. *PLoS Genet.* **10**(6), e1004390.
 85. Viita T., Kyheröinen S., Prajapati B., Virtanen J., Frilander M.J., Varjosalo M., Vartiainen M.K. (2019) Nuclear actin interactome analysis links actin to KAT14 histone acetyl transferase and mRNA splicing. *J. Cell Sci.* **132**(8), jcs226852.
 86. Spencer V.A., Costes S., Inman J.L., Xu R., Chen J., Henzel M.J., Bissell M.J. (2011) Depletion of nuclear actin is a key mediator of quiescence in epithelial cells. *J. Cell Sci.* **124**(1), 123–132.
 87. Almuzzaini B., Sarshad A.A., Rahmanto A.S., Hansson M.L., Von Euler A., Sangfelt O., Visa N., Farrants A.Ö., Percipalle P. (2016) In β -actin knockouts, epigenetic reprogramming and rDNA transcription inactivation lead to growth and proliferation defects. *FASEB J.* **30**(8), 2860–2873.
 88. Yoo Y., Wu X., Guan J.L. (2007) A novel role of the actin-nucleating Arp2/3 complex in the regulation of RNA polymerase II-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* **282**(10), 7616–7623.
 89. Wu X., Yoo Y., Okuhama N.N., Tucker P.W., Liu G., Guan J.L. (2006) Regulation of RNA-polymerase-II-dependent transcription by N-WASP and its nuclear-binding partners. *Nat. Cell. Biol.* **8**(7), 756–763.
 90. Miyamoto K., Teperek M., Yusa K., Allen G.E., Bradshaw C.R., Gurdon J.B. (2013) Nuclear Wave1 is required for reprogramming transcription in oocytes and for normal development. *Science.* **341**(6149), 1002–1005.
 91. Xia P., Wang S., Huang G., Zhu P., Li M., Ye B., Du Y., Fan Z. (2014) WASH is required for the differentiation commitment of hematopoietic stem cells in a c-Myc-dependent manner. *J. Exp. Med.* **211**(10), 2119–2134.
 92. Vintermist A., Böhm S., Sadeghifar F., Louvet E., Mansén A., Percipalle P., Östlund Farrants A.K. (2011) The chromatin remodelling complex B-WICH changes the chromatin structure and recruits histone acetyl-transferases to active rRNA genes. *PLoS One.* **6**(4), e19184.
 93. Almuzzaini B., Sarshad A.A., Farrants A.K.Ö., Percipalle P. (2015) Nuclear myosin I contributes to a chromatin landscape compatible with RNA polymerase II transcription activation. *BMC Biol.* **13**(1), 35.
 94. Fili N., Hari-Gupta Y., dos Santos Á., Cook A., Poland S., Ameer-Beg S.M., Parsons M., Toseland C.P. (2017) NDP52 activates nuclear myosin VI to enhance RNA polymerase II transcription. *Nat. Commun.* **8**(1), 1871.
 95. Fili N., Hari-Gupta Y., Aston B., dos Santos Á., Gough R.E., Alamad B., Wang L., Martin-Fernandez M.L., Toseland C.P. (2020) Competition between two high- and low-affinity protein-binding sites in myosin VI controls its cellular function. *J. Biol. Chem.* **295**(2), 337–347.
 96. Cook A., Hari-Gupta Y., Toseland C.P. (2018) Application of the SSB biosensor to study in vitro transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **496**(3), 820–825.
 97. Zorca C.E., Kim L.K., Kim Y.J., Krause M.R., Zenklusen D., Spilianakis C.G., Flavell R.A. (2015) Myosin VI regulates gene pairing and transcriptional pause release in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **112**(13), E1587–E1593.
 98. Puri C., Chibalina M.V., Arden S.D., Kruppa A.J., Kendrick-Jones J., Buss F. (2010) Overexpression of myosin VI in prostate cancer cells enhances PSA and VEGF secretion, but has no effect on endocytosis. *Oncogene.* **29**(2), 188–200.
 99. Loikkanen I., Toljamo K., Hirvikoski P., Väisänen T., Päävonen T.K., Vaarala M.H. (2009) Myosin VI is a modulator of androgen-dependent gene expression. *Oncol. Rep.* **22**(5), 991–995.
 100. Venit T., Dzajak R., Kalendová A., Kahle M., Rohožková J., Schmidt V., Rülcke T., Rathkolb B., Hans W., Bohla A., Eickelberg O., Stoeger T., Wolf E., Yildirim A.Ö., Gailus-Durner V., Fuchs H., de Angelis M.H., Hozák P. (2013) Mouse nuclear myosin I knock-out shows interchangeability and redundancy of myosin isoforms in the cell nucleus. *PLoS One.* **8**(4), e61406.
 101. Mehta I. S., Kulashreshtha M., Chakraborty S., Kolthur-Seetharam U., Rao B.J. (2013) Chromosome territories reposition during DNA damage-repair response. *Genome Biol.* **14**(12), R135.
 102. Saidova A.A., Potashnikova D.M., Tvorogova A.V., Maly I.V., Hofmann W.A., Vorobjev I.A. (2018) Specific and reliable detection of myosin 1C isoform A by RTqPCR in prostate cancer cells. *Peer J.* **6**, e5970.

103. Fatakia S.N., Kulashreshtha M., Mehta I.S., Rao B.J. (2017) Chromosome territory relocation paradigm during DNA damage response: some insights from molecular biology to physics. *Nucleus*. **8**(5), 449–460.
104. Sokolova M., Moore H.M., Prajapati B., Dopie J., Meriläinen L., Honkanen M., Matos R.C., Poukkula M., Hietakangas V., Vartiainen M.K. (2018) Nuclear actin is required for transcription during *Drosophila* oogenesis. *iScience*. **9**, 63–70.
105. Andrin C., McDonald D., Attwood K.M., Rodrigue A., Ghosh S., Mirzayans R., Masson J.Y., Dellaire G., Hendzel M.J. (2012) A requirement for polymerized actin in DNA double-strand break repair. *Nucleus*. **3**(4), 384–395.
106. Schrank B.R., Aparicio T., Li Y., Chang W., Chait B.T., Gundersen G.G., Gottesman M.E., Gautier J. (2018) Nuclear ARP2/3 drives DNA break clustering for homology-directed repair. *Nature*. **559**(7712), 61–66.
107. Kulashreshtha M., Mehta I.S., Kumar P., Rao B.J. (2016) Chromosome territory relocation during DNA repair requires nuclear myosin I recruitment to chromatin mediated by γ -H2AX signaling. *Nucl. Acids Res.* **44**(17), 8272–8291.
108. Evdokimova V.N., Gandhi M., Nikitski A.V., Bakkenist C.J., Nikiforov Y.E. (2018) Nuclear myosin/actin-motored contact between homologous chromosomes is initiated by ATM kinase and homology-directed repair proteins at double-strand DNA breaks to suppress chromosome rearrangements. *Oncotarget*. **9**(17), 13612–13622.
109. Li Y.R., Yang W.X. (2016) Myosins as fundamental components during tumorigenesis: diverse and indispensable. *Oncotarget*. **7**(29), 46785–46812.
110. Dunn T. A., Chen S., Fait D.A., Hicks J.L., Platz E.A., Chen Y., Ewing C.M., Sauvageot J., Isaacs W.B., De Marzo A.M., Luo J. (2006) A novel role of myosin VI in human prostate cancer. *Am.J. Pathol.* **169**(5), 1843–1854.
111. Ihnatovych I., Sielski N.L., Hofmann, W.A. (2014) Selective expression of myosin IC isoform A in mouse and human cell lines and mouse prostate cancer tissues. *PLoS One*. **9**(9), e108609.
112. Nakano T., Tani M., Nishioka M., Kohno T., Otsuka A., Ohwada S., Yokota J. (2005) Genetic and epigenetic alterations of the candidate tumor-suppressor gene MYO18B, on chromosome arm 22q, in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. **43**(2), 162–171.
113. Schramek D., Sendoel A., Segal J.P., Beronja S., Heller E., Oristian D., Reva B., Fuchs E. (2014) Direct *in vivo* RNAi screen unveils myosin IIa as a tumor suppressor of squamous cell carcinomas. *Science*. **343**(6168), 309–313.
114. Borrego-Pinto J., Jegou T., Osorio D.S., Auradé F., Górnácz M., Koch B., Mattaj I.W., Gomes E.R. (2012) Samp1 is a component of TAN lines and is required for nuclear movement. *J. Cell Sci.* **125**(5), 1099–1105.
115. Jayo A., Malboubi M., Antoku S., Chang W., Ortiz-Zapater E., Groen C., Pfisterer K., Tootle T., Charras G., Gundersen G.G., Parsons M. (2016) Fascin regulates nuclear movement and deformation in migrating cells. *Dev. Cell*. **38**(4), 371–383.
116. Saunders C.A., Harris N.J., Willey P.T., Woolums B.M., Wang Y., McQuown A.J., Schoenhofen A., Worman H.J., Dauer W.T., Gundersen G.G., Luxton G.W.G. (2017) Torisin A controls TAN line assembly and the retrograde flow of dorsal perinuclear actin cables during rearward nuclear movement. *J. Cell Biol.* **216**(3), 657–674.
117. Chang W., Folker E.S., Worman H.J., Gundersen G.G. (2013) Emerin organizes actin flow for nuclear movement and centrosome orientation in migrating fibroblasts. *Mol. Biol. Cell*. **24**(24), 3869–3880.
118. Kutscheidt S., Zhu R., Antoku S., Luxton G.W.G., Staljar I., Fackler O.T., Gundersen G.G. (2014) FHOD1 interaction with nesprin-2G mediates TAN line formation and nuclear movement. *Nat. Cell Biol.* **16**(7), 708–715.
119. Maninová M., Vomastek T. (2016) Dorsal stress fibers, transverse actin arcs, and perinuclear actin fibers form an interconnected network that induces nuclear movement in polarizing fibroblasts. *FEBS J.* **283**(20), 3676–3693.
120. Khatau S.B., Hale C.M., Stewart-Hutchinson P.J., Patel M.S., Stewart C.L., Searson P.C., Hodzic D., Wirtz D. (2009) A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**(45), 19017–19022.
121. Kim J.K., Louhghalam A., Lee G., Schafer B.W., Wirtz D., Kim D.H. (2017) Nuclear lamin A/C harnesses the perinuclear apical actin cables to protect nuclear morphology. *Nat. Commun.* **8**(1), 2123.
122. Jorgens D.M., Inman J.L., Wojcik M., Robertson C., Palsdottir H., Tsai W.T., Huang H., Bruni-Cardoso A., López C.S., Bissell M.J., Xu K., Auer M. (2016) Deep nuclear invaginations linked to cytoskeletal filaments: integrated bioimaging of epithelial cells in 3D culture. *J. Cell Sci.* **130**(1), 177–189.
123. Gay O., Nakamura F., Baudier J. (2011) Refilin holds the cap. *Commun. Integr. Biol.* **4**(6), 791–795.
124. Baudier J., Jenkins Z.A., Robertson S.P. (2018) The filamin-B–refilin axis – spatiotemporal regulators of the actin-cytoskeleton in development and disease. *J. Cell Sci.* **131**(8), jcs213959.
125. Wu J., Kent I.A., Shekhar N., Chancellor T.J., Mendonça A., Dickinson R.B., Lele T.P. (2014) Actomyosin pulls to advance the nucleus in a migrating tissue cell. *Biophys. J.* **106**(1), 7–15.
126. Thiam H.R., Vargas P., Carpi N., Crespo C.L., Raab M., Terriac E., King M.C., Jacobelli J., Alberts A.S., Stradal T., Lennon-Dumenil A.M., Piel M. (2016) Perinuclear Arp2/3-driven actin polymerization enables nuclear deformation to facilitate cell migration through complex environments. *Nat. Commun.* **7**(1), 10997.
127. Shao X., Li Q., Mogilner A., Bershadsky A.D. Shivashankar G.V. (2015) Mechanical stimulation induces formin-dependent assembly of a perinuclear actin rim. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**(20), E2595–E2601.
128. Wales P., Schuberth C.E., Aufschnaiter R., Fels J., García-Aguilar I., Janning A., Dlugos C.P., Schäfer-Herte M., Klingner C., Wälte M., Kuhlmann J., Menis E., Hockaday Kang L., Maier K.C., Hou W., Russo A., Higgs H.N., Pavenstädt H., Vogl T., Wedlich-Söldner R. (2016) Calcium-mediated actin reset (CaAR) mediates acute cell adaptations. *Elife*. **5**, e19850.
129. Le H.Q., Ghatak S., Yeung C.Y.C., Tellkamp F., Günemann C., Dieterich C., Yeroslaviz A., Habermann B., Pombo A., Niessen C.M., Wickström S.A. (2016) Mechanical regulation of transcription controls Polycomb-mediated gene silencing during lineage commitment. *Nat. Cell Biol.* **18**(8), 864–875.
130. Gilbert H.T.J., Mallikarjun V., Dobre O., Jackson M.R., Pedley R., Gilmore A.P., Richardson S.M., Swift J. (2019) Nuclear decoupling is part of a rapid protein-level cellular

- response to high-intensity mechanical loading. *Nat. Commun.* **10**(1), 4149.
131. Norden C., Young S., Link B.A., Harris W.A. (2009) Actomyosin is the main driver of interkinetic nuclear migration in the retina. *Cell*. **138**(6), 1195–1208.
 132. Strzyz P.J., Lee H.O., Sidhaye J., Weber I.P., Leung L.C., Norden C. (2015) Interkinetic nuclear migration is centrosome independent and ensures apical cell division to maintain tissue integrity. *Dev. Cell*. **32**(2), 203–219.
 133. Yanakieva I., Erzberger A., Matejčić M., Modes C.D., Norden C. (2019) Cell and tissue morphology determine actin-dependent nuclear migration mechanisms in neuroepithelia. *J. Cell Biol.* **218**(10), 3272–3289.
 134. Lahne M., Li J., Marton R.M., Hyde D.R. (2015) Actin-cytoskeleton- and rock-mediated INM are required for photoreceptor regeneration in the adult zebrafish retina. *J. Neurosci.* **35**(47), 15612–15634.
 135. Kirkland N.J., Yuen A.C., Tozluoglu M., Hui N., Paluch E.K., Mao Y. (2020) Tissue mechanics regulate mitotic nuclear dynamics during epithelial development. *Curr. Biol.* **30**(13), 2419–2432.e4.
 136. Yu J., Lei K., Zhou M., Craft C.M., Xu G., Xu T., Zhuang Y., Xu R., Han M. (2011) KASH protein Syne-2/Nesprin-2 and SUN proteins SUN1/2 mediate nuclear migration during mammalian retinal development. *Hum. Mol. Genet.* **20**(6), 1061–1073.
 137. Roman W., Martins J.P., Carvalho F.A., Voituriez R., Abella J.V.G., Santos N.C., Cadot B., Way M., Gomes E.R. (2017) Myofibril contraction and crosslinking drive nuclear movement to the periphery of skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* **19**(10), 1189–1201.
 138. Huelsmann S., Ylännä J., Brown, N.H. (2013) Filopodia-like actin cables position nuclei in association with perinuclear actin in *Drosophila* nurse cells. *Dev. Cell*. **26**(6), 604–615.
 139. Burke B. (2019) Chain reaction: LINC complexes and nuclear positioning. *F1000Res.* **8**, 136.
 140. Luxton G.W.G., Gomes E.R., Folker E.S., Vintinner E., Gundersen G.G. (2010) Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement. *Science*. **329**(5994), 956–959.
 141. Zhu R., Antoku S., Gundersen G.G. (2017) Centrifugal displacement of nuclei reveals multiple LINC complex mechanisms for homeostatic nuclear positioning. *Curr. Biol.* **27**(20), 3097–3110.e5.
 142. Stenzel W., Preusse C., Allenbach Y., Pehl D., Junckorstorff R., Heppner F.L., Nolte K., Aronica E., Kana V., Rushing E., Schneider U., Claeys K.G., Benveniste O., Weis J., Goebel H.H. (2015) Nuclear actin aggregation is a hallmark of anti-synthetase syndrome-induced dysimmune myopathy. *Neurology*. **84**, 1346–1354.
 143. Munsie L., Caron N., Atwal R.S., Marsden I., Wild E.J., Bamberg J.R., Tabrizi S.J., Truant R. (2011) Mutant huntingtin causes defective actin remodeling during stress: defining a new role for transglutaminase 2 in neurodegenerative disease. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 1937–1951.
 144. Bamberg J.R., Wiggan O.P. (2002) ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell. Biol.* **12**, 598–605.

WHAT ACTIN AND MYOSIN DO IN THE NUCLEUS: NEW FUNCTIONS OF THE WELL-KNOWN PROTEINS

A. A. Saidova^{1, *}, I. A. Vorobjev²

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

²Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: saidova@mail.bio.msu.ru

The functions of actin and its motor proteins myosins in the cytoplasm have been the subject of research for more than 100 years, but the existence and function of these proteins in the nucleus has been a matter of debate until recently. Recent data has clarified the role of actin and myosin molecules in controlling the dynamics of processes in the cell nucleus, chromatin organization and genome integrity. New microscopy techniques and the use of modified actin-binding probes have made it possible for the first time to directly visualize the polymerization of actin filaments in the nucleus of living cells. Here we discuss the processes that control the dynamic balance of actin and myosins between the nucleus and the cytoplasm, as well as the role of these proteins in the regulation of transcription, DNA repair, chromatin reorganization, tumor transformation and cell differentiation.

Keywords: actin, myosin 1C, myosin VI, transcription, DNA repair

КСЕНОГРАФТЫ *Danio rerio* В ОНКОЛОГИИ И ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ

© 2024 г. Н. А. Лунина^а, *, Д. Р. Сафина^а, С. В. Костров^а

^аНациональный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

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

Поступила в редакцию 17.11.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 15.12.2023 г.

Костистая рыба *Danio rerio* (полосатый данио) стала одним из важных модельных организмов, используемых в биомедицинских исследованиях опухолей, в том числе и для разработки противоопухолевых препаратов с применением ксенотрансплантационных подходов. Внеутробное развитие данио, прозрачные ткани в первый месяц роста, а также незрелая адаптивная иммунная система в этот период значительно облегчают манипуляции с эмбрионами. В случае высокоагрессивных опухолей, когда прогнозируемая выживаемость пациента может составлять всего несколько месяцев, анализ ксенотрансплантата в данио может стать единственным подходящим методом, поскольку он требует всего 4–7 дней. Тысячи эмбрионов данио могут быть имплантированы биопсийной тканью пациента для получения ксенографтов и проведения с их помощью автоматизированного скрининга большого количества лекарственных препаратов и соединений для выработки эффективной схемы лечения конкретного больного. В представленном обзоре рассмотрены преимущества и недостатки *D. rerio* в качестве модели для онкологических исследований. Основное внимание уделено использованию ксенографтов *D. rerio* для изучения метастазирования и создания аватаров в персонализированной медицине.

Ключевые слова: злокачественные опухоли человека, *Danio rerio*, ксенографты, метастазирование, аватар, персонализированная медицина

DOI: 10.31857/S0026898424030032, EDN: JDCUGG

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания остаются одной из главных проблем мирового здравоохранения, занимая второе место по смертности в развитых странах [1]. Трудность эффективного лечения этих заболеваний в значительной степени обусловлена гетерогенностью опухолей. Опухоли одного и того же гистологического типа могут иметь отличия у разных пациентов (межиндивидуальная гетерогенность), обусловленные главным образом особенностями генетического ландшафта и мутациями в раковых клетках [2]. Эта общая гетерогенность усиливается внутриопухолевой гетерогенностью, вызванной изменчивостью клеток внутри опухоли и характерной для большинства типов опухолей. Причиной таких различий могут быть вариации генома, транскриптома, протеома и эпигенома [3]. В целом разнообразие опухолей проявляется в активации разных сигнальных путей, в разной способности к миграции, инвазии, метастазированию и, что особенно важно, в чувствительности или резистентности к терапевтическим воздействиям [4]. Поэтому за последние десятилетия проведены как *in vitro*, так и *in vivo* исследования различных типов опухолей, направленные на стимуляцию разработки новых более эффективных

терапевтических средств. Основное преимущество использования живых организмов перед моделями *in vitro* заключается в прямом взаимодействии опухолевых клеток и хозяйского организма, что позволяет изучать как опухоль, так и ее микроокружение, а также такие свойства, как метастатический потенциал, ангиогенез или лекарственную устойчивость [5, 6]. Более того, моделям *in vitro* не хватает клинической прогностической способности [7]. Модели *in vivo* позволяют точнее моделировать сложность опухоли, поскольку клетки имплантируются в живой организм, где могут подвергаться различным динамическим взаимодействиям. Это представляет собой явный контраст с моделями *in vitro*, где взаимодействия ограничены клетками, уже присутствующими в опухоли, или искусственно реконструируются и поддерживаются путем добавления больших количеств (часто не физиологических) цитокинов, факторов роста, сыворотки, питательных веществ и т.д.

В живом организме, в котором работают сердце, кровеносная и лимфатическая системы, печень, костный мозг, почки, ЦНС и другие органы, опухоли могут вступать как в локальные, так и в системные межклеточные взаимодействия, обеспечивающие их прогрессирование. Эти взаимодействия между опухолью и хозяином могут происходить на

больших расстояниях, что позволяет воспроизвести такие свойства опухолевых клеток, как миграция, инвазия, метастазирование, ангиогенез, угнетение иммунной системы, которые невозможно наблюдать *in vitro* [8]. Наиболее часто в качестве различных доступных *in vivo* моделей выбирают мышей [9]. Однако в последние годы все чаще с этой целью используют аквариумную рыбку *Danio rerio* (полосатый данио, или данио) [10], в том числе для ксенотрансплантации опухолевых клеток человека и разработки лекарственных средств [11]. Большой вклад *D. rerio* в исследования рака и поиск методов борьбы с ним подтверждается сообщениями более чем о 300 проектах, направленных на получение противоопухолевых средств с использованием этого организма [12]. Особенно система *D. rerio* привлекает своими возможностями в персонализированной медицине для создания аватаров пациентов. Ксенографты пациента (patient-derived xenograft – PDX), также называемые раковыми аватарами [13], генерируются путем имплантации первичных опухолевых клеток или фрагментов тканей человека, полученных в результате хирургического вмешательства или биопсии.

Анализ аватаров идеально подходит для персонализированной медицины. Хотя прецизионную онкологию и персонализированную медицину часто считают синонимами, они сосредоточены на разных аспектах одной и той же проблемы. Прецизионная онкология фокусируется главным образом на поиске продуктов специфических генов-биомаркеров для эффективных методов лечения [14]. Однако каждый отдельный пациент при этом не учитывается. В персонализированной медицине, напротив, на живые клетки, полученные от пациента, воздействуют лекарственными препаратами, ответ на которые может быть оценен в режиме реального времени, а результаты непосредственно перенесены в клинику. В связи с этим необходимо использовать преимущества обоих подходов: прецизионная онкология сократит набор возможных вариантов лечения, а затем персонализированные тесты на аватарах определят наилучший вариант [7].

Наиболее часто в онкологических исследованиях используется моделирование на грызунах, в том числе и создание аватаров. Однако они обременены рядом ограничений, которые включают длительное время ожидания потомства и его ограниченное количество, длительное время получения аватаров опухолей человека (несколько месяцев и даже до года), а также высокую стоимость исследований. Учитывая все это, очевидными становятся многие преимущества маленькой пресноводной рыбки *D. rerio*, которые позволяют включать ее в исследования злокачественных новообразований [15].

В клинических условиях использование модели данио-аватара (zPDX) может происходить по

следующей схеме: пациенту с диагностированной злокачественной опухолью проводят биопсию с последующим получением суспензии единичных опухолевых клеток и вводят эти клетки в большое количество эмбрионов данио. Далее анализируют влияние различных комбинаций химиотерапевтических соединений на рост ксенотрансплантированных клеток с целью выработки оптимальной схемы терапии [16].

В настоящем обзоре рассмотрены преимущества и недостатки модели *D. rerio* в онкологических исследованиях. Основное внимание уделено ксенотрансплантации опухолей человека в *D. rerio* и использованию этой модели для изучения метастазирования и создания аватаров для персонализированной медицины.

ОСОБЕННОСТИ МОДЕЛИ *Danio rerio* В ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Популярные аквариумные рыбки *D. rerio* широко используются в научных исследованиях, причем более 800 лабораторий в мире применяют их в качестве модельных объектов для изучения различных заболеваний [5]. С 1960-х годов *D. rerio* традиционно служили модельными организмами в биологии развития и генетике позвоночных [17]. Затем их использование распространилось и на другие области, включая моделирование заболеваний человека [16].

D. rerio имеют высокую генетическую гомологию с человеком. Секвенированный геном этой рыбки (25 пар хромосом) содержит 26206 генов, кодирующих белки, среди которых много ортологов генов человека: 71,4% генов человека имеют по крайней мере один ортолог у данио. Установлено, что 82% генов человека, связанных с заболеваниями, имеют по крайней мере один ортолог в *D. rerio*, что делает этот организм подходящим для моделирования болезней человека [18, 19]. Кроме того, множественные эпигенетические маркеры, регулирующие экспрессию генов, консервативны у позвоночных, включая рыб и человека [20]. Основные органы и ткани данио и человека (мозг, сердце, почки, мышцы, печень) обладают сходством как на анатомическом и физиологическом, так и на молекулярном уровне [21–24].

Рыбки *D. rerio* имеют небольшой размер, их можно разводить в больших количествах при относительно низких затратах. Лабораторные данио, как правило, содержатся в специальных аквариумных системах, где поддерживается температура 26–28°C с контролируемым циклом свет–темнота. Они очень плодовиты, беременная самка может откладывать сотни икринок 1 раз в 1–2 недели в результате естественного нереста. Эмбриональное развитие проходит быстро, в течение 24 ч одноклеточная зигота превращается в подвижный

прозрачный эмбрион с классическим строением тела позвоночных [25]. При температуре около 28°C большая часть морфогенеза завершается через 3 дня после оплодотворения, и эмбрион вылупляется из защитного хориона. Это знаменует переход от эмбриональной стадии к личиночной. Личинки продолжают расти, между 5 и 6 днями после оплодотворения пищеварительная система и рот начинают функционировать. Желточный мешок, который поддерживал животное на эмбриональной и ранней личиночной стадиях, к этому времени истощается и полностью исчезает к 7 дню после оплодотворения [25]. *D. rerio* считаются молодыми, когда они приобрели большинство характеристик взрослых особей, и взрослыми, когда они могут производить жизнеспособные гаметы и воспроизводиться [26]. В оптимальных условиях они достигают половой зрелости на третьем месяце своего развития.

Несколько характеристик *D. rerio* делают их хорошей моделью для исследования биологии и метастазирования опухолей человека. Многие из факторов, участвующих в прогрессии опухолей, очень консервативны у данио и у человека. Консервативность генов клеточного цикла, опухолевых супрессоров и онкогенов позволяет изучать эти опухолевые пути у рыб, однако следует отметить, что у данио не экспрессируются ортологи нескольких генов человека, которые, как известно, участвуют в развитии рака, такие как фактор ингибирования лейкемии (LIF), онкостатин М (OSM) и белок 1, связанный с ранним развитием рака молочной железы (BRCA1) [18]. Однако поскольку гены рецепторов этих белков присутствуют в геноме *D. rerio*, можно предположить, что существуют и белки с функциями, подобными LIF и OSM, но разнообразие их последовательностей слишком велико, чтобы распознавать их как ортологи.

Важно отметить дупликацию генома костистых рыб после расхождения рыб и млекопитающих [27], которая привела к тому, что геном *D. rerio* содержит две копии многих генов (известных как *ohnologues*), а геном млекопитающих только одну.

С *D. rerio* можно проводить различные генетические манипуляции, включая нокдаун, нокаут, сверхэкспрессию генов и транскрипцию, что позволяет создавать и изучать модели опухолей. Важно отметить сходство гистопатологии опухолей человека и данио [28]. Быстрое внеутробное развитие оплодотворенной яйцеклетки делает возможной прямую визуализацию и манипуляции на протяжении эмбриогенеза и развития личинок, а прозрачность животного на этих стадиях в сочетании с генерацией трансгенных флуоресцентных линий позволяет проводить визуализацию *in vivo*, контролировать опухоль и ее микросреду в режиме реального времени. Это одно из самых значимых преимуществ

в использовании *D. rerio* для изучения биологии рака [15].

Созревание врожденной и адаптивной иммунных систем у данио разделено во времени. Врожденная иммунная система начинает функционировать на второй день после оплодотворения, однако адаптивная иммунная система созревает только на 28 день [29]. Отсутствие адаптивного иммунитета у личинок делает их идеальной *in vivo* моделью для ксенотрансплантации раковых клеток. Таким образом можно исследовать пролиферацию, инвазию и метастазирование введенных клеток, взаимодействие между донорскими и хозяинскими клетками, а также с внеклеточной средой.

Хотя многие характеристики делают *D. rerio* подходящей животной моделью для исследования рака, существуют и некоторые особенности, такие как температура инкубации, отсутствие некоторых органов или их компонентов.

Поскольку клетки человека культивируют при 37°C, а оптимальная температура для данио составляет 28°C, необходимо использовать температуру 28–37°C. Однако при этом могут произойти метаболические изменения, которые следует принимать во внимание [30].

Ортопическая ксенотрансплантация заключается в инъекции опухолевых клеток человека в область, гомологичную месту их происхождения (например, клетки опухоли мозга человека, трансплантированные в мозг *D. rerio*). Ортопические инъекции более надежно имитируют заболевание человека, поскольку клетки развиваются в сходном анатомическом участке. Многие исследователи успешно использовали этот метод в случае клеток ретинобластомы и глиобластомы [31, 32]. Однако данный подход не может быть применен к каждому типу клеток и к каждой ткани из-за отсутствия у рыб определенных органов, например молочной железы или легкого.

Наконец, микроокружение опухоли (tumor microenvironment, TME) следует учитывать при анализе ксенотрансплантата, независимо от используемого хозяина. TME включает клеточные и неклеточные компоненты, окружающие опухоль и содержащиеся внутри нее, которые, как правило, представлены раковыми клетками, нераковыми клетками (например, фибробластами, эндотелиальными клетками или иммунными клетками) и белками внеклеточного матрикса. TME представляет собой участок или среду, где взаимодействие клеток хозяина и опухоли играет ключевую роль в росте и прогрессировании опухоли [33]. Эти взаимодействия важно учитывать, чтобы максимально имитировать TME человека и максимально использовать весь потенциал введенных клеток, что позволит изучать их поведение в условиях, приближенных к реальным.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ОПУХОЛЕЙ ПУТЕМ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ В *D. rerio*

Ксенотрансплантационная модель *D. rerio* zPDX

Ксенотрансплантационные модели опухолей в *D. rerio* получают путем введения меченых злокачественных клеток человека в различные области эмбрионов, личинок или взрослых рыб для отслеживания их прогрессирования, поведения и взаимодействия с микросредой хозяина [34, 35]. В 2005 году впервые недифференцированные клетки меланомы человека ксенотрансплантировали в *D. rerio* и проанализировали их “поведение”. Клетки меланомы вводили эмбрионам на стадии бластулы и контролировали во времени. Опухолевые клетки человека выживали, делились и специфически мигрировали внутри эмбрионов подобно тому, как клетки меланомы распределяются в их оптимальной среде — коже. Организм данио поддерживал трансплантированные клетки необходимыми сигналами для специфической интеграции в органы, демонстрируя непосредственное взаимодействие клеток человека с микроокружением [36]. Таким образом, впервые была показана совместимость клеток человека и клеток эмбрионов рыбы и подчеркнута потенциальная ценность *D. rerio* как инструмента для исследования рака. В дальнейшем эти выводы были подтверждены, и был разработан первый стандартизированный протокол ксенотрансплантации в *D. rerio* [35, 37]. Наилучшей для трансплантации оказалась стадия развития эмбриона 48 ч после оплодотворения, поскольку к этому сроку завершается миграция развивающихся клеток эмбриона, и распространение раковых клеток после инъекции, вероятно, будет активным процессом [37]. К тому же, второй день после оплодотворения считается наиболее подходящим для ксенотрансплантации из-за следующих особенностей модели:

- адаптивная иммунная система данио становится зрелой через 4–6 недель после оплодотворения и в течение первых 12–14 дней развития представлена только врожденными иммунными клетками. Таким образом, для приживания опухолевых клеток человека в первые 2 недели после оплодотворения *D. rerio* не требуется иммуносупрессия; опухолевые клетки могут эффективно пролиферировать и метастазировать в неизменном хозяине и даже взаимодействовать и поляризовать врожденные иммунные клетки данио, такие как макрофаги [29, 38];

- прозрачность эмбрионов позволяет визуализировать опухолевые клетки как флуоресцентно меченные посредством конститутивной экспрессии флуоресцентного белка (RFP или GFP), так и окрашенные липофильными красителями (DiI, DiD, DiO) [39, 40];

- раковые клетки человека могут взаимодействовать с эмбриональными клетками *D. rerio* благодаря межклеточной коммуникации, общей у этих двух видов. Об активности взаимодействий клетка–хозяин, таких как взаимодействие между раковыми клетками и иммунной системой, можно судить по привлечению нейтрофилов и макрофагов в область опухоли [41].

В соответствии с разработанным стандартным протоколом предпочтительным местом инъекции является желточный мешок, при этом анализ альтернативных областей трансплантации показал, что они одинаково эффективны [42, 43]. Выбор места инъекции зависит от типа вводимых клеток, биологического фенотипа или события, которое предполагается изучить. Основные места инъекций перечислены ниже.

(А) Желточный мешок. Этот бесклеточный компартмент, состоящий из таких липидов, как холестерин, фосфатидилхолин или триглицериды, обеспечивает рыб энергией до тех пор, пока они не смогут самостоятельно питаться, что происходит на 5-й день после оплодотворения [44]. Липиды представляют собой источник питательных веществ и для введенных раковых клеток человека, способствуя их пролиферации и росту опухоли. Кроме того, желточный мешок — это ограниченное пространство, в котором меченые клетки можно легко визуализировать в течение нескольких дней. Таким образом, инъекция в желточный мешок используется при изучении выживаемости, клеточного деления, пролиферации и миграции (если клетки подвижны) [45].

(Б) Проток Кювье (общая кардинальная вена). При инъекции в проток Кювье клетки попадают непосредственно в кровоток, поэтому такие стадии онкогенного процесса, как метастазирование/миграция, инвазия и мезенхимально-эпителиальный переход, могут быть оценены *in vivo* [46]. Клетки также можно вводить в периваскулярное пространство протока для оценки эффективности интравазации. В кровотоке клетки способны выживать, делиться, экстравазировать вблизи каудальной кроветворной ткани (caudal hematopoietic tissue, СНТ), расположенной в хвосте эмбриона, и образовывать опухоли [46]. Меченые клетки можно отслеживать и количественно определять их пролиферацию и инвазию в СНТ [47]. СНТ представляет собой специфическую нишу, благоприятную для развития опухоли [48].

(В) Перивителлиновое пространство. Расположенное между перидермой и синцитиальным слоем желтка перивителлиновое пространство не содержит сосудов и не сообщается непосредственно с областью сосудистой сети. Помимо пролиферации и образования опухоли, инъекция опухолевых клеток в этот участок позволяет однозначно идентифицировать новообразованные сосуды [35, 37].

Кроме того, можно оценить также эффективность интравазации, дальнейшей миграции и метастатического поведения опухолевых клеток [47, 49].

Сравнительное исследование мест инъекции для ксенотрансплантации опухолевых клеток в *D. rerio* показало, что опухоли лучше формируются и растут при выборе перивителлинового пространства [50]. Кроме того, введенные глубоко в желток опухолевые клетки труднее распознать, чем опухолевые клетки в довольно поверхностном перивителлиновом пространстве. Однако вводить клетки в перивителлиновое пространство технически сложнее.

(Г) Внутривителлиновая полость. Как указывалось ранее, опухолевые клетки обычно инъецируют в эмбрионы *D. rerio*, у которых еще не сформировалась адаптивная иммунная система, тогда как при ксенотрансплантации взрослым рыбам требуется подавление иммунной системы; в этой ситуации инъекции выполняют непосредственно во внутривителлиновую полость.

Ксенотрансплантация во взрослых *D. rerio*. Преимущество ксенотрансплантации взрослым рыбам заключается в том, что зрелые ткани более точно соответствуют тканевой среде, в которой находятся раковые клетки. До недавнего времени использование для ксенотрансплантации взрослых особей было ограничено необходимостью подавления их иммунной системы либо γ -облучением, либо дексаметазоном [51, 52]. Но в настоящее время получены линии *D. rerio* с ослабленным иммунитетом, например оптически транспарентная линия *Casper* (*prkdc*^{-/-}, *il2rga*^{-/-}), особям которой можно прививать опухолевые клетки человека [53].

Параллельные сравнительные ксенотрансплантации рабдомиосаркомы иммунодефицитным рыбам и мышам выявили в обоих случаях сходную дозозависимость и кинетику при комбинированной терапии темозоломидом (TMZ) и олапарибом [54]. Примечательно, что гистологические и молекулярные особенности полученных ксенографтов были сопоставимыми в обеих моделях. Однако ксенографты *D. rerio* обладают заметными экспериментальными преимуществами по сравнению с мышинной системой. Рыбки меньше по размеру, их содержание обходится дешевле. Самое главное, ксенографты данио могут быть визуализированы с разрешением в одну клетку, что позволяет отслеживать в режиме реального времени поведение отдельных клеток, изменения их морфологии, миграции и динамики клеточного цикла [54]. Особенно удобно в ксенотрансплантационной модели использовать трансгенные линии рыб с флуоресцентно меченными органами и тканями, что позволяет детально исследовать взаимодействие опухолевых клеток с микроокружением. Кроме того, для более адекватной оценки таких взаимодействий создаются линии гуманизированных *D. rerio*, например,

путем введения генов цитокинов, специфичных для кроветворения человека и отсутствующих у данио [55].

Температура содержания zPDX. Одним из основных недостатков модели ксенотрансплантации клеток человека в *D. rerio* остаются температурные ограничения, связанные с хозяином. Температура инкубации эмбрионов была предметом обсуждения с момента создания этого метода в 2005–2006 годах [36, 37]. Эмбрионы данио развиваются при температуре 28°C в контролируемых условиях, а раковые клетки человека размножаются и растут при 37°C. По этой причине исследователи искали “температуру баланса” между оптимальным развитием эмбрионов рыб и клеток человека [35].

Чтобы обеспечить температуру, более оптимальную для введенных клеток человека, стандартную температуру инкубации эмбрионов после проведения ксенотрансплантации увеличили до 34°C, сократив при этом время инкубации до 3–6 дней после инъекции [56–60] из-за повышенной гибели эмбрионов [61]. В большинстве опубликованных исследований использовали стандартный протокол — 34°C и 6 дней инкубации. Однако некоторые исследователи модифицировали этот стандартный протокол, чтобы попытаться адаптировать его к различным экспериментальным условиям в зависимости от того, что требуется проанализировать или оценить [62–64]. Температуру инкубации эмбрионов после ксенотрансплантации повышали до 35–36°C, а время анализа сокращали до 3–4 дней после инъекции из-за повышения смертности [62, 64–69]. Хотя методологическое препятствие было преодолено, повышение температуры инкубации эмбрионов могло влиять на некоторые метаболические пути. Изучение регуляции генов при повышении температуры выявило увеличение экспрессии генов, связанных с катаболизмом липидов и окислительно-восстановительными процессами, а также модуляцию экспрессии генов, связанных с иммунной системой, что может влиять на введенные опухолевые клетки [30].

Взаимодействие между опухолевыми и иммунными клетками в zPDX. Несмотря на отсутствие адаптивной иммунной системы, эмбрионы данио обладают врожденной иммунной системой, состоящей из макрофагов и нейтрофилов, которые к 48 ч после оплодотворения распределяются по всему эмбриону [59, 70]. Изучение взаимодействий макрофагов и нейтрофилов данио с клетками опухоли человека показало, что эти иммунные клетки участвуют в ангиогенезе и метастазировании, в том числе за счет сопровождения раковых клеток в циркуляции и облегчения их миграции и инвазии в метастатические ниши [71, 72].

Для более глубокого изучения взаимодействий между злокачественными клетками человека и иммунными клетками хозяина получены трансгенные

линии *D. rerio*, в том числе *Tg(mpx:GFP)ⁱ¹¹⁴* [73] с маркированными нейтрофилами, *Tg(mpeg1:eGFP)^{g122}* [74] и *Tg(mpeg1:mCherry)^{UMSF001}* [75] с маркированными макрофагами, *Tg(fli1:eGFP)^{y1}* [76]; *Tg(flk1:eGFP)^{s843}* [77]; *Tg(flk1:mCherry)* с маркированным эндотелием сосудов [78]. С помощью стерео- и конфокальной микроскопии можно легко отслеживать в режиме реального времени не только отдельные клетки, но также образование и рост новых сосудов [79]. Когда опухолевые клетки вводят непосредственно в кровотоки через дистальную ветвь протока Кювье или в перивителлиновое пространство, наблюдается их пролиферация и инвазия в СНТ [47]. Затем иммунные клетки *D. rerio* рекрутируются в область опухоли в СНТ, таким образом увеличивается количество нейтрофилов и макрофагов, которые инфильтрируют и окружают участок опухоли [41]. Показано, что иммунные клетки колокализуются с опухолевыми как в месте первичного роста опухоли, так и в местах микрометастазирования. Опухолевые и иммунные клетки взаимодействовали с эндотелиальными клетками протока Кювье, образуя структуры, подобные новым сосудам, которые впоследствии формировали функциональную сосудистую сеть [80]. На моделях как *D. rerio*, так и мышей обнаружен перенос содержимого цитоплазмы макрофагов в опухолевые клетки, и этот процесс коррелировал с усилением распространения клеток меланомы [81]. На модели zPDX меланомы показано, как опухолевые клетки мигрировали из места инъекции (желточного мешка), взаимодействовали с эндотелием кровеносных сосудов и формировали вторичные опухоли из единичных клеток [48]. Использование линий с репортерными макрофагами позволило обнаружить взаимодействие между ними и кровеносными сосудами, а также положительную корреляцию между количеством иммунных клеток, рекрутируемых в очаг опухоли, и степенью ангиогенеза [82].

Таким образом, использование линий *D. rerio* с репортерными сосудистой сетью, макрофагами и нейтрофилами позволяет визуализировать в реальном времени прогрессирование опухолевых клеток и их миграцию, индуцированный опухолью ангиогенез и взаимодействие опухолевых клеток с клетками хозяина с разрешением до одной клетки [83].

Имитация тканевой ниши — ортотопическая ксенотрансплантация. Имплантация опухолевых клеток человека в гомологичный месту образования опухоли орган модельного организма для имитации исходной тканевой ниши называется ортотопической ксенотрансплантацией [84]. Важными характеристиками конкретной тканевой ниши являются строение внеклеточного матрикса, а также такие параметры, как pH и межклеточное давление [33]. Показано, что изменения внеклеточного матрикса влияют на клеточную пролиферацию, миграцию, ангиогенез и метастазирование [85, 86].

В одной из первых ортотопических ксенотрансплантаций в *D. rerio* клетки глиобластомы человека ввели в головной мозг данио и обнаружили важные различия в поведении опухолевых клеток. При ортотопической ксенотрансплантации клетки глиобластомы проникали в мозг, а также рассеивались по поверхности его кровеносных сосудов, но те же клетки, введенные в желточный мешок, не могли пролиферировать и проникать в окружающие ткани [87]. Эти результаты согласуются с тем фактом, что в желточном мешке *D. rerio* отсутствуют миелинизированные участки аксональной поверхности, которые вместе с кровеносными сосудами представляют собой пути распространения клеток глиобластомы в головном мозге [88]. Дополнительные технические достижения, такие как покадровая конфокальная микроскопия и методы количественной оценки прогрессирования опухоли и клеточных взаимодействий в 4D, привели к лучшему пониманию поведения опухолевых клеток человека в мозге данио [89]. zPDX глиобластомы человека послужила инструментом для идентификации матриксной металлопротеиназы 9 (ММР-9) как основного фактора повышенной инвазивности этих клеток. При этом подтверждена эффективность ингибитора ММР-9 в сдерживании распространения раковых клеток [90].

Также ортотопическую ксенотрансплантационную модель *D. rerio* успешно применили для изучения ретинобластомы, наиболее распространенной злокачественной опухоли глаза у детей [91–93]. Кроме того, недавно получена новая модель ортотопической ксенотрансплантации для изучения меланомы конъюнктивы путем ретроорбитальной инъекции [83].

Все эти результаты доказывают значимость модели ортотопической ксенотрансплантации *D. rerio* для изучения прогрессирования опухоли, миграции, ангиогенеза в зависимости от тканевого микроокружения. Однако, как упоминалось выше, в *D. rerio* представлены не все органы человека (например, нет молочной железы или легкого), поэтому этот метод применим не ко всем типам опухолей.

Изучение метастазирования на модели zPDX

Метастазирование — это сложный многоступенчатый процесс, включающий инвазию и отделение клеток от первичной опухоли, проникновение в кровеносные или лимфатические сосуды, экстравазацию в заранее определенные вторичные ткани, приживание в новом микроокружении и, в конечном счете, пролиферацию опухолевых клеток [94–96]. Существование внутри- и межопухолевой гетерогенности предполагает, что механизмы метастазирования могут варьировать как у разных пациентов, так и в различных типах клеток даже в пределах одной и той же опухоли [97, 98].

Модель zPDX широко используется для изучения различных аспектов метастазирования опухолей. Предпочтительным местом скопления трансплантированных клеток в теле *D. rerio* является вентрально-каудальная сосудистая сеть, поэтому для оценки миграции (метастазирования) обычно подсчитывают количество эмбрионов с мечеными опухолевыми клетками в хвосте. Таким образом были выявлены терапевтические мишени нескольких типов рака (пути YAP–CXCR2 [99, 100] и PIT1–CXCR4 [101, 102]), а также потенциальные лекарственные средства (ингибиторы путей CXCR2 и CXCR4 [103]) и новые методы лечения [104–108].

Оценка с помощью визуализации с субклеточным разрешением [109] позволяет изучать разные стадии метастазирования, включая взаимодействие с микроокружением опухоли, секрецию внеклеточных везикул (экзосом), транспортировку по сосудам, остановку опухолевых клеток, экстравазацию, проникновение внеклеточных везикул в предметастатическую нишу и метастатическую колонизацию.

Ангиогенез, индуцированный опухолью. Модели zPDX эмбриональных и взрослых особей могут использоваться для изучения механизмов ангиогенеза, индуцированного опухолью. Неоангиогенез в местах первичных и метастатических опухолей является ключевым фактором распространения и прогрессирования рака. Считается, что неоангиогенез происходит после запуска “ангиогенного переключателя”. В этот момент колония опухолевых клеток достигает размера, при котором в ней развивается гипоксия, и для обеспечения роста опухоли необходима перфузия питательными веществами и кислородом [110].

Исследования zPDX показали, что микроопухоли сначала прорастают бескровными “эндотелиальными тяжами” в течение 6–7 дней, прежде чем в них устанавливается кровоток [111]. Интересно, что ингибирование образования эндотелиальных тяжей и их проникновения в опухоль привело к значительному уменьшению роста опухоли. Необходимость взаимодействия между раковыми и эндотелиальными клетками для инициации опухоли также может указывать на наличие потенциальных периваскулярных ниш – среды, способствующей выживанию опухолевых клеток, прогрессированию и устойчивости опухоли к терапии [112]. Индукция неоангиогенеза опухолевыми клетками человека в организме *D. rerio* зависит от количества таких клеток и окружающей микросреды [113].

Изучение двух линий рака эндометрия с разным уровнем экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) и фактора роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF) выявило индукцию ангиогенеза у 75% личинок *D. rerio* при ксенотрансплантации клеток только высокоангиогенной линии [114]. Причем как

гипоксия, так и сверхэкспрессия VEGF значительно увеличивали метастазирование. Авторы пришли к выводу, что неоангиогенез, индуцированный VEGF и гипоксией, является решающим событием при метастазировании. Эти исследования доказали роль передачи сигналов VEGF на начальных стадиях неоангиогенеза и метастазирования.

Использование антиангиогенных соединений, применяемых у млекопитающих, уменьшало неоваскуляризацию всех личинок zPDX, не влияя на физиологическое развитие сосудов [34].

Интравазация. Одной из начальных стадий метастазирования является интравазация опухолевых клеток в сосуды. Использование модели zPDX позволило визуализировать процесс интравазации и изучить его в режиме реального времени. Инъекция флуоресцирующих опухолевых клеток человека в брюшную полость одномесечных данио, получавших дексаметазон (для индукции иммуносупрессии), привела к образованию микроопухоли в месте инъекции [51]. Один из генов, связанных с метастазированием, ген *RhoC*, кодирует малую GTPазу семейства Rho, которые контролируют актин/миозиновый цитоскелет. Оказалось, что экспрессия *RhoC* индуцирует примитивную амебоподобную клеточную инвазию, характеризующуюся образованием динамических мембранных выступов и пузырьков. Удивительно, но эти структуры проникают в стенку кровеносного сосуда исключительно в местах сосудистого ремоделирования, а не в областях уже существующих интактных сосудов. Поэтому для интравазации требуется, чтобы опухолевые клетки секретировали VEGF, индуцирующий “открытие” сосудов для доступа *RhoC*-экспрессирующих клеток в кровеносную систему [51]. Таким образом, на ранних этапах интравазации и метастазирования необходимы два независимых события: (1) динамическая регуляция актин/миозинового цитоскелета в опухолевой клетке для формирования выступающих структур и (2) проницаемость и ремоделирование сосудов.

На модели zPDX подтверждено также участие в интравазации ассоциированных с опухолью макрофагов (tumor-associated macrophages (TAM)) [115, 116]. Совместное введение TAM и раковых клеток в *D. rerio* показало, что макрофаги активно влияют на метастазирование путем прямых межклеточных взаимодействий. Причем в сосудистой сети большинство диссеминированных опухолевых клеток тесно связаны с макрофагами, активированными IL6 и TNF α , увеличивающими интравазацию [117].

Циркулирующие опухолевые клетки и их экстравазация. После интравазации опухолевые клетки составляют субпопуляцию циркулирующих опухолевых клеток (circulating tumor cell, CTC), которая фенотипически отличается от первичной опухолевой массы, что позволяет CTC выживать в кровотоке. Очевидно, что для полного понимания

поведения СТС необходимо исследование этих клеток в живом организме. Модель *D. rerio* позволяет получить изображение единичных СТС, изучить их поведение и роль в формировании микрометастазов в реальном времени. Показано, что замедление кровотока способствует адгезии СТС к эндотелию и может приводить к экстравазации и образованию метастазов [118, 119]. Было неясно, как экстравазируют опухолевые клетки. Обладают ли многоклеточные скопления опухолевых клеток способностью выходить целиком, или сначала они должны диссоциировать? Исследование, оценивающее эту трудноуловимую стадию метастазирования на модели zPDX, выявило два типа экстравазации клеток [120] — обычную экстравазацию по типу инвазии и экстравазацию по типу эндотелиального покрытия, когда клетки эндотелия покрывают СТС и обеспечивают экстравазацию. Ингибирование передачи сигналов VEGF нарушало экстравазацию инвазивного типа, подавляя поляризацию и подвижность раковых клеток. Однако при этом наблюдалась стимуляция, а не ингибирование экстравазации раковых клеток по типу эндотелиального покрытия со структурными изменениями в эндотелиальных стенках. Эти результаты могут стать ключом к лучшему пониманию метастатического процесса, в том числе ускорения метастазирования антиангиогенными реагентами, наблюдаемого в доклинических исследованиях [120].

На модели zPDX доказано, что СТС обладают способностью выходить из кровеносных сосудов как в виде одиночных клеток, так и в виде многоклеточных кластеров с помощью процесса ангиопеллеза, который заключается в перестройке сосудистой стенки вокруг циркулирующих клеток и в активном вытеснении этих клеток в окружающие ткани [121]. СТС прикрепляются посредством адгезии к эндотелию просвета кровеносного сосуда и активируют сосудистое ремоделирование, что позволяет проникать в окружающие ткани либо единичным клеткам, либо многоклеточным скоплениям [122]. Таким образом, раковые клетки могут экстравазировать как в виде кластеров, так и отдельных клеток, причем СТС, которые попадают в кровоток уже в виде кластеров, имеют более высокую способность к выживанию и больший потенциал метастазирования по сравнению с одиночными циркулирующими клетками [123]. В zPDX модели меланомы было замечено, что клетки, которые выходят из сосудов в виде кластеров, образуют большие опухолевые массы, чем те, которые существовали в виде отдельных клеток [121, 124]. В кластерах СТС усиливаются межклеточная адгезия, стволовость и пролиферация. К тому же понижаются апоптоз и пути иммунной активации, такие как презентация антигенов главного комплекса гистосовместимости типа II, активация Т-клеток и передача сигналов фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor, TNF) [125].

Изучение динамики экстравазации опухолевых клеток, введенных в перикард эмбрионов *D. rerio*, выявило пассивную задержку клеток в мелких капиллярах в области головы и хвоста примерно в первые 3–5 ч с последующей активной миграцией вдоль стенки сосудов [126]. Экстравазация — это высокодинамичный процесс, который включает модуляцию адгезии опухолевых клеток к эндотелию и внутрисосудистую миграцию клеток вдоль поверхности просвета сосудистой стенки. Опухолевые клетки не повреждают сосуды в месте экстравазации, скорее они индуцируют локальное ремоделирование сосудов, характеризующееся скоплением эндотелиальных клеток и межклеточных контактов. Внутрисосудистое перемещение опухолевых клеток не зависит от направления кровотока и требует опосредованной β 1-интегрином адгезии к стенке кровеносного сосуда. Интересно, что экспрессия прометастатического гена *Twist* в опухолевых клетках увеличивает их внутрисосудистую миграцию и экстравазацию через стенку сосуда. Однако экспрессия *Twist* заставляет опухолевые клетки переключаться на β 1-интегриннезависимый режим экстравазации. Таким образом, экстравазация модулируется экспрессией прометастатических генов *Twist*, *VEGFA* и *ITGB1* (последний ген кодирует β 1-интегрин) опухолевыми клетками.

Эффективность экстравазации варьирует в разных линиях раковых клеток, что коррелирует с их метастатическим потенциалом. Кроме того, сверхэкспрессия генов *Twist* и *VEGFA*, связанных с метастазированием, приводит к увеличению экстравазации, в то время как подавление β 1-интегрина снижает этот процесс [126].

Распространение и колонизация опухолевых клеток. Некоторые солидные опухоли, например рак молочной и предстательной железы, склонны к метастазированию в костную ткань, однако механизмы этой направленной диссеминации и колонизации не установлены. Существующие модели PDX на мышах (mPDX), позволяющие анализировать ранние метастазы в костной ткани, имеют свои ограничения, особенно в крупномасштабных исследованиях и отслеживании раковых клеток *in vivo* в течение длительного периода. Модель zPDX позволяет преодолеть эти ограничения и изучать распространение клеток множественной миеломы и их скоплений в СНТ [127]. Предполагалось, что СНТ содержит нишу гемопоэтических стволовых клеток, сходную с костным мозгом, и является областью кроветворения у эмбрионов *D. rerio*, участвующей в направлении трансплантированных опухолевых клеток в костный мозг [128]. При этом обнаружена локализация флуоресцентно меченых миеломных клеток в СНТ через 30 мин. после инъекции в сердечную мышцу эмбрионов данио. Изучение экспрессии генов в образце человека и *D. rerio* показало, что клетки, локализованные

в области СНТ, экспрессируют гены компонентов пути IL6, гены адгезии и ангиогенеза на более высоком уровне, чем клетки вне СНТ.

Изучение локализации опухолевых клеток, инъецированных в проток Кювье, в области СНТ выявило участие нейтрофилов и макрофагов *D. rerio* (расположенных преимущественно в СНТ) в распространении ксенотрансплантированных раковых клеток [80]. Важно отметить, что ингибиторы VEGFR подавляют локализованный рост опухоли, однако этим они способствуют инвазии опухоли и образованию микрометастазов, усиливая миграцию нейтрофилов.

Оценка метастатического потенциала опухолевых клеток человека в zPDX. Модель zPDX позволяет проводить сравнительные исследования метастатического потенциала различных опухолей человека. Показано, что клетки увеальной меланомы человека, выделенные из метастазов, обладают большей способностью к миграции и пролиферации, чем клетки первичных опухолей [59]. Аналогичные исследования проведены на других видах рака, включая как клеточные линии, так и материал, полученный от пациента. Все клеточные линии анализировали с использованием одной и той же процедуры: опухолевые клетки инъецировали в периваскулярное пространство эмбрионов *D. rerio* с последующим количественным определением метастатических клеток. Оказалось, что степень метастатического потенциала клеток, введенных в *D. rerio*, коррелирует с их инвазивностью *in vitro* [129]. Клеточные линии, классифицированные как неметастатические (например, линия T-47D рака молочной железы и линия HT-29 колоректальной аденокарциномы человека), не дали метастазов и в организме *D. rerio*, а химическое или генетическое подавление инвазивности клеток привело к уменьшению их распространения. В дальнейшем показали, что кусочки ткани, а также суспензии клеток, полученные из опухолей желудочно-кишечного тракта человека (рак поджелудочной железы, толстой кишки и желудка), способны образовывать метастазы при пересадке в желточный мешок эмбрионов *D. rerio*, в отличие от неопухолевых тканей человека [130]. Высокую метастатическую активность раковых клеток наблюдали также при трансплантации клеток первичной опухоли поджелудочной железы в печень личинок *D. rerio*. Однако в мутантной линии *D. rerio*, в которой отсутствуют функциональная сосудистая сеть и кровообращение, опухолевые клетки, пересаженные в желточный мешок, оставались в месте инъекции. Это позволяет предположить, что для распространения клеток необходима сформированная сосудистая система.

Таким образом, модель zPDX можно успешно использовать для оценки метастатического

потенциала различных опухолей человека, что важно для персонализированной медицины.

Аватары *D. rerio*

Что такое аватар? В качестве классических ксенотрансплантатов ранее использовали полученные в лабораторных условиях стабильные линии раковых клеток, которые в большинстве случаев резко отличаются от первичных опухолевых клеток или фрагментов опухоли, полученных от пациента [48]. Возможность использования клеток, полученных от пациента, обеспечило заметный прогресс в области ксенотрансплантологии.

Клетки и первичные культуры опухолей имеют исходно гетерогенные фенотипы и особенности опухолей, из которых они были выделены, что очень важно для дальнейших исследований [131]. Кроме того, в них сохраняются фенотипы, подобные стволовым, что делает их ценным доклиническим инструментом для прогнозирования ответа пациентов на лечение, поскольку известно, что стволовые опухолевые клетки играют важную роль в механизмах лекарственной устойчивости [132]. Рост разработок, предназначенных для лечения конкретных пациентов, делает создание аватаров особенно актуальным [133, 134].

Модель аватара, в которой часть опухоли пациента пересаживается животному или выращивается в виде 3D органоидной культуры, служит функциональным суррогатом этого пациента. Аватары позволяют изучать поведение опухоли и ее чувствительность к лекарственным препаратам, одновременно избавляя пациента от нежелательных побочных эффектов и напрасной траты времени на неэффективную терапию [135]. В настоящее время используют следующие модели опухолей, выделенных от пациентов [136]: (1) культуру клеток пациента (patient-derived cell culture, PDC); (2) сфероиды, полученные от пациента (patient-derived spheroids, PDS), и органоиды, полученные от пациента (patient-derived organoids, PDO); (3) культуры срезов тканей пациента (patient-derived tissue slice cultures, PDTSC); (4) ксенографты, полученные от пациента (patient-derived xenografts, PDX).

mPDX и PDO. Из всех перечисленных моделей наиболее широкое применение получили mPDX и 3D PDO. Эти модели используются уже продолжительное время, но каждая из них имеет существенные ограничения. Известно, что не все образцы опухолей могут быть имплантированы мышам для формирования PDX, а некоторые не выживают даже как PDO. Например, показатель успеха в генерации mPDX рака молочной железы и почек составил 13 и 8.9% соответственно [137], а PDO получены только для 16% образцов рака предстательной железы [138]. Непредсказуемость приживления этих моделей ограничивает их полезность. Но критическим фактором, ограничивающим

применимость этих моделей, является время, затрачиваемое на их разработку, несовместимое с необходимостью быстрого принятия решений в онкологической практике [139]. В Соединенных Штатах среднее время между постановкой диагноза и началом терапии составляет 26 дней при раке толстой кишки и 79 дней при раке предстательной железы [140]. Сроки разработки аватаров mPDX измеряются месяцами, при этом в среднем на их получение требуется 6–8 месяцев [141]. Получение mPDX рака предстательной железы может занять до 37 месяцев, необходимых для внедрения и закрепления у мышей ксенотрансплантатов [142]. Такие сроки невозможны при особенно агрессивных видах рака, например при некоторых глиобластомах [143]. PDO культивируются *in vitro* и имеют более короткие сроки генерации, однако для их развития из образцов тканей требуется 4–6 недель. Поэтому mPDX — используют для персонализированной медицины только при рецидивирующих/метастатических опухолях. Кроме того, для создания аватара на основе мышей требуется большое количество свежего опухолевого материала, что затрудняет имплантацию микробиопсийного материала мышам. Наконец, создание mPDX — это дорогой и ресурсоемкий процесс с ограниченной статистической мощностью, не говоря уже об этических последствиях использования взрослого животного.

zPDX. PDX с использованием *D. rerio* (zPDX) являются более дешевой моделью и, что самое главное, позволяют всего за несколько дней оценить опухоль пациента [144]. Прозрачность эмбрионов и мальков не имеет аналогов среди позвоночных. Они идеально подходят для микроскопии, а новые современные методы визуализации позволяют изучать поведение раковых клеток с беспрецедентным разрешением [109]. Кроме того, уникально короткое время эксперимента (3–7 дней) и небольшие потребности в тканях пациента (100–200 клеток на животное) позволяют определять в том числе чувствительность конкретного пациента к химиотерапии. zPDX могут воспроизвести разнообразие и биологические особенности опухоли, сохранить экспрессию генов и мутационный профиль исходной опухоли, предсказать ее чувствительность к химиотерапии и потенциальный исход терапии [145].

Впервые zPDX был разработан в 2009 году, когда фрагменты ткани и суспензии клеток первичных опухолей толстой кишки, поджелудочной железы и желудка трансплантировали в желточный мешок эмбрионов *D. rerio*. В результате была создана надежная модель *in vivo* для изучения инвазивности опухолевых клеток и метастатического поведения первичных опухолей человека [130]. Аналогичные модели получены также для изучения острого лимфобластного лейкоза [68], метастазов рака молочной железы в костный мозг [46], рака поджелудочной железы [145], множественной миеломы [146].

При скрининге лекарственных средств с использованием zPDX предложено оценивать количество клеток человека по уровню экспрессии гена домашнего хозяйства человека *GADPH*, определяемого методом количественной ПЦР и капельной цифровой ПЦР, вместо визуализации клеток для более точного определения эффективности препарата и дозозависимых реакций [147].

Для изучения влияния микроокружения опухоли получена zPDX модель рака поджелудочной железы с фибробластами, ассоциированными с опухолью (CAF — cancer associated fibroblasts). Смесь раковых клеток и фибробластов вводили в желточный мешок эмбрионов, в воду для содержания рыбок добавляли гемцитабин и/или навитоклак. CAF стимулируют пролиферацию и миграцию клеток рака за счет опосредованного TGF- β паракринного эффекта. Ингибитор рецептора TGF- β значительно снижал пролиферацию и метастазирование клеток, что подтверждало статус рецептора TGF как потенциальной терапевтической мишени [148]. В другом эксперименте проведена совместная инъекция клеток рака молочной железы и макрофагов в желточный мешок эмбрионов *D. rerio*. Показано, что сверхэкспрессия фактора транскрипции (POU1F1) в этих клетках модулирует микроокружение опухоли, приводит к привлечению макрофагов и их дальнейшей дифференцировке в TAM. При этом взаимодействие между раковыми клетками и TAM еще больше увеличивает пролиферацию опухоли [149].

При имплантации опухолевых клеток в опухолевый очаг рекрутируется множество различных клеток организма-хозяина, таких как эндотелиальные клетки, для реконструкции кровеносной и лимфатической систем, перициты, которые покрывают эндотелиальные клетки, TAM, CAF и другие клетки из TME [150–152]. Эти рекрутируемые клетки хозяина могут быть либо ближайшими тканевыми резидентными клетками, либо клетками, системно рекрутированными из отдаленных органов, таких как костный мозг [153, 154].

Динамичное взаимодействие между клетками иллюстрируют несколько примеров: макрофаги, способствующие проникновению опухолевых клеток в кровоток, усиливают метастазирование [155, 156]; клетки костного мозга, “обученные” раковыми клетками, подготавливают предметастатические ниши [157]. Привлечение рекрутированных клеток приводит к изменениям внеклеточного матрикса, что увеличивает жесткость/плотность матрикса [158–160], повышает давление интерстициальной жидкости, модулируя формирование градиентов сигнальных молекул и диффузию/доставку лекарственных средств [161], влияя, в конечном счете, на онкогенез [162, 163]. Наконец, определение чувствительности опухолевых клеток к лекарственным средствам с использованием моделей *in*

in vivo позволяет оценить фармакокинетику, фармакодинамику и токсичность в живом организме, при этом соединения должны абсорбироваться, достигнуть целевых значений, обойти элиминацию и не быть слишком токсичными, иначе животное не выживет [164].

Технологии развиваются с высокой скоростью, и эра “омики”, больших данных и искусственного интеллекта породила огромные объемы информации, которые привели к успешной разработке многих целевых методов терапии опухолей [165]. Подходы системной биологии или математической онкологии опираются на эти массивы данных и имеют большие перспективы [166]. Однако при этом не всегда удается учитывать клеточный ответ *in vivo* на введение лекарственного средства, а также такие взаимодействия, как генетические и межбелковые, клональный отбор, внутриклеточные и метаболические механизмы перестройки, взаимодействия опухоль–иммунитет и опухоль–строма. Эти и другие переменные ответственны за отсутствие чувствительности к лекарственным средствам или за приобретение механизмов резистентности [167].

Модель zPDX позволяет получить результаты (гибель клеток, ангиогенез и обнаружение микрометастазов) всего за 4 дня, что соответствует срокам, необходимым для принятия клинических решений. Разница во временном масштабе анализа связана не с более быстрым развитием *D. rerio*, а скорее с тем, что личинки *D. rerio* в 10000 раз меньше взрослых мышей. Это позволяет вводить меньше клеток в одно животное (мышам требуется в 2000 раз больше материала) и, следовательно, получать больше ксенографтов для статистического анализа. Кроме того, недавно была создана автоматическая установка для скрининга в 96-луночных планшетах с анализом изображений опухолевых образований в ксенографтах [50]. Модель zPDX вместе с автоматизированной визуализацией и анализом изображений обещает стать мощной системой тестирования лекарственных средств, заполняя нишу между скринингом *in vitro* и mPDX. zPDX можно использовать в персонализированной медицине при выборе лекарств и их комбинаций, адаптированных для конкретного пациента, в течение минимального промежутка времени [50].

Таким образом, zPDX обладает значительными преимуществами перед mPDX, такими как масштабируемость, низкая стоимость, визуализация, а также скорость разработки моделей и возможность высокопроизводительного скрининга.

Изучение гетерогенности опухоли с помощью zPDX. Внутриопухолевая гетерогенность, или различия в генетических и фенотипических профилях клеток внутри одной опухоли, играют значительную роль в резистентности к проводимой терапии [168–170]. Генетические, эпигеномные

и транскриптомные изменения, определяющие внутриопухолевую гетерогенность, влияют на реакцию отдельных опухолевых клеток на лечение. Гетерогенность снижает эффективность классического подхода прецизионной медицины, который опирается исключительно на мутации в ДНК, но не учитывает негенетические факторы, которые могут предсказать ответ опухоли [171].

Секвенирование ДНК выявило высокую гетерогенность опухолей молочной железы у разных пациенток [172], которая может быть обусловлена различными этиологическими факторами и факторами окружающей среды. Например, у 100 больных раком молочной железы обнаружены 73 уникальные комбинации нарушений в генах, связанных с канцерогенезом [173, 174]. Эти данные свидетельствуют о том, что клиницисты могут назначить терапию, но практически невозможно предсказать ее эффективность, опираясь только на результаты секвенирования. Более того, существует также и внутриопухолевая гетерогенность, т.е. опухоль состоит из разнообразных популяций клеток, или субклонов, с отличительными фенотипами, включая изменение генетических, эпигенетических и метаболических особенностей, а также поведение опухоли и чувствительность к лекарственным средствам [175]. Секвенирование опухолевого генома позволяет получить представление о возможных мутациях и рекомендовать способы эффективной точной медицины, тогда как аватары используются для функциональной оценки внутриопухолевой гетерогенности и анализа ответа на терапию. Если специфические методы лечения не устраняют рак в модели аватара, то можно пробовать другие препараты до тех пор, пока не отреагируют все субклоны опухоли. Использование аватаров в процессе принятия клинических решений позволит предсказать, какие комбинации лекарств могут быть успешными при гетерогенной опухоли, избавляя пациентов от побочных эффектов и напрасной траты времени на неэффективную терапию.

Современные методы генерации mPDX не идеальны для повторной оценки гетерогенности опухолей, поскольку обычно требуется не менее трех последовательных трансплантаций опухолей человека мышам [176]. mPDX, полученный после такой последовательной трансплантации, демонстрирует более агрессивные фенотипы опухоли (большую скорость пролиферации, способность к метастазированию и инвазии). С увеличением числа пассажей ксенотрансплантата у мышей усиливается рост опухоли и ее злокачественность [177]. Геномные изменения, вызванные или отобранные путем пассирования, также влияют на чувствительность опухолевых клеток к лекарственным средствам, особенно на более поздних пассажах [178, 179].

Кроме того, при последовательной трансплантации mPDX может измениться клональный состав

опухоли. Так, с использованием mPDX показано, что каждая последующая трансплантация лейкозных клеток приводила к сокращению числа субклонов на 30–90% [180]. Последовательная трансплантация клеток рака молочной железы в mPDX также влияла на кинетику роста опухоли [181]. Эти результаты свидетельствуют о влиянии избирательного давления отбора на ксенотрансплантированные клетки, приводящего к адаптации опухоли человека к окружающей среде в mPDX. Гетерогенная опухоль у пациента динамична и реагирует на стрессирующие воздействия, поэтому выживают наиболее приспособленные клоны, стимулирующие рост опухоли. Это может привести к потенциальной неверности модели [182]. Следовательно, скрининг лекарств в этих аватарах может неточно отражать ответ опухоли в организме пациента.

Личиночный zPDX может решить эту проблему, так как клетки человека ксенотрансплантируют в личинки непосредственно из первичной опухоли после диссоциации до единичных клеток и эксперименты завершаются в течение 5–10 дней [46, 145, 183–187]. Эти короткие временные рамки придают личиночной модели zPDX способность к лучшему сохранению гетерогенности опухоли пациента. Во взрослых данио с ослабленным иммунитетом ксенотрансплантаты могут сохраняться в течение более длительного времени и оцениваться в течение 60 дней после трансплантации. Подобно mPDX, взрослый zPDX может проявлять селективность в отношении специфических субклонов опухоли, способных адаптироваться к микросреде *D. rerio*. В целом для выяснения клонального поведения опухоли как в личиночном, так и во взрослом zPDX необходимы дальнейшие исследования.

Как правило, в одно животное можно инъектировать 100–800 клеток пациента, а в сотни личинок могут быть трансплантированы практически все субклоны опухоли [145]. Гетерогенная опухоль будет разделена на более мелкие части, и с помощью аватаров zPDX можно быстро тестировать терапевтические схемы и оценивать результаты лечения. Флуоресцентное маркирование опухолевых клеток позволяет отобрать резистентные клоны и путем секвенирования выявить механизмы их резистентности, которые станут основой для вторых раундов тестирования лекарств. Это может помочь оценить опухолевый ландшафт пациента за несколько дней [188], тогда как в случае mPDX для этого требуются месяцы [189]. Большое количество используемых животных обеспечивает статистическую значимость результатов, а одноклеточное разделение при визуализации личинки данио позволит идентифицировать субклоны с лекарственной устойчивостью, не обнаруженные ранее [43, 190, 191].

В качестве дополнения к личиночному zPDX используется и модель zPDX на взрослых *D. rerio*, которая дает больше времени для оценки субклонального

поведения, поскольку приживление происходит в течение 28–60 дней. Взрослым рыбкам пересаживают примерно по 100 опухолевых клеток, поэтому каждая из них будет содержать гетерогенную опухоль, имитирующую образец пациента [54]. Таким образом, эта модель может быть полезна при идентификации опухолевых клонов, которые приводят к формированию рецидива, потенциально раскрывая индивидуальную информацию о генетических и молекулярных профилях рецидивирующей опухоли, что поможет выбрать правильный алгоритм лечения.

Danio rerio в фармакологии. *D. rerio* уже много лет используют в фармацевтических исследованиях, в крупномасштабных низкомолекулярных скринингах *in vivo* [164]. В настоящее время установлено, что определенные лекарственные средства сходным образом действуют и на людей, и на данио. Например, кардиотоксичные для человека препараты вызывают отек перикарда и нарушения кровообращения у данио [192]. *D. rerio* является хорошо зарекомендовавшей себя моделью для изучения фармакокинетики, при этом многие компоненты метаболических реакций, участвующих в трансформации лекарственных средств, консервативны у данио и млекопитающих [193–195]. Консервативность метаболических процессов у данио и человека предполагает, что лекарственные средства у них метаболизируются и используются практически одинаковым образом [196]. Проведение химических скринингов на модели *D. rerio* выявило несколько препаратов, которые в настоящее время находятся на разных стадиях клинических испытаний [197, 198]. Например, был идентифицирован дорсоморфин, первый ингибитор морфогенетического белка кости. Производные этого соединения проходят клинические испытания при прогрессирующей оссифицирующей фибродисплазии [199]. Фармацевтические компании также осознают ценность *D. rerio* в качестве модели и создают собственные предприятия по их выращиванию или сотрудничают с внешними организациями по контрактным исследованиям этих организмов [200]. Личиночные zPDX позволяют оценивать фармакокинетику, фармакодинамику и токсичность лекарственных средств на уровне организма. Кроме того, ксенотрансплантированными личинками *D. rerio* легко манипулировать в 96-луночном планшете [164].

Кожа личинок данио обладает высокой проницаемостью, что позволяет проводить скрининг лекарств наружным методом и делает процесс тестирования более быстрым, чем при применении мышей, которых инъектируют [201]. Однако этот метод не подходит в случае лекарств с ограниченной растворимостью в воде. Медикаментозное лечение при температуре ниже 37°C (температура содержания рыб 28°C) также может влиять на

эффективность некоторых химиотерапевтических средств [202]. Более того, скрининг лекарственных средств и другие способы определения характеристик опухоли обычно ограничиваются 7–8 днями после получения личиночного zPDX, прежде чем иммунная система рыбы начнет отторгать трансплантат [203]. Поэтому препараты, которым требуется более длительное время, чтобы вызвать гибель клеток (например, включающие вмешательство в клеточный цикл или вызывающие эпигенетические изменения), не могут показать значительный эффект в этой краткосрочной модели [204].

Несомненно, mPDX продолжают играть важную роль в тестировании лекарств в системах млекопитающих, однако высокая стоимость и трудоемкость процедуры ограничивают их применение в крупномасштабных скринингах, направленных на проверку эффективности прецизионных лекарственных соединений. Модели zPDX могут восполнить этот пробел. Роботизированная система позволяет injectировать до 2000 эмбрионов за 1 ч с вероятностью успеха 99% для высокопроизводительных анализов [205]. Этапы визуализации также могут быть автоматизированы с помощью нескольких подходов. Например, VAST BioImager™ (“Union Biometrica”, США) может получать изображения до 100 личинок/ч с 85%-ным успехом визуализации [206]. Для регистрации миграции раковых клеток в режиме реального времени использовали микроскопию селективного плоского освещения (SPIM). Этот метод позволил дифференцировать характер и скорость распространения опухолевых клеток разного происхождения, например рака молочной железы и лейкоза [207]. Рост, инвазию и выживаемость клеток глиобластомы при ортотопической ксенотрансплантации оценивали с использованием флуоресцентной визуализации в реальном времени и анализа изображений с помощью искусственного интеллекта [208]. В окологлазную мышцу взрослых особей *D. rerio* (иммунодефицитная линия *prkdc^{-/-}*, *il2rga^{-/-}*) прививали клетки рабдомиосаркомы человека и через 7 дней проводили медикаментозное лечение с помощью перорального зондирования. Показано, что комбинированная терапия олапарибом и темозоломидом приводила к формированию большего количества клеток с задержкой в фазе G2 по сравнению с контрольными особями [54]. В настоящее время эта комбинация проходит фазу I клинических испытаний у детей с рабдомиосаркомой (clinicaltrials.gov идентификатор: NCT01858168) [Phase I Study of Olaparib and Temozolomide for Ewings Sarcoma or Rhabdomyosarcoma. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01858168> (accessed on 15 December 2022)].

Аватары *D. rerio* для прогнозирования результатов лечения пациентов. В последнее время все больший интерес вызывают исследования, направленные

на оценку способности zPDX прогнозировать ответ пациентов на лечение. При этом параллельно используют результаты клинических испытаний и анализа аватаров *D. rerio* [66, 184, 187, 189, 209]. Показано, что эффективность химиотерапии, определенная на zPDX, в основном соответствует клинической картине [209].

Результат данной работы [209] лег в основу первого испытания XenoZ (clinicaltrials.gov идентификатор: NCT03668418): клинического исследования на пациентах с раком поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта и их аватарах. Эффективность прогнозирования оптимального режима лечения на модели zPDX оценивали на 120 пациентах [210]. Эквивалентную дозу химиотерапии у *D. rerio* рассчитывали с использованием коэффициента пересчета; этот коэффициент был определен путем объединения данных исследований безопасности (максимально переносимая доза) и эффективности (значительное уменьшение площади опухоли). В исследование вошли 24 пациента с раком поджелудочной железы, толстой кишки и желудка, проходящих химиотерапию; биопсийный материал этих пациентов использовали для создания аватаров. На полученных zPDX оценивали влияние химиотерапии с использованием адаптированных к *D. rerio* критериев ответа при солидных опухолях (RECIST), основанных на изменении площади опухоли в модельном организме. Чувствительность различных типов привитых опухолей к химиотерапии соответствовала чувствительности, о которой сообщалось в клиническом контексте. Например, у аватаров рака толстой кишки, как и у пациентов, комбинированное лечение FOLFIRI, FOLFOX, FOLFOXIRI было более эффективным, чем однократное применение 5-FU [66]. Аватары *D. rerio* также могут предсказывать реакцию на лечение при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы [184]. В этом исследовании считали, что пациент не отвечает на лечение, если рецидив у него происходил в течение одного года, и отвечает, если рецидивов не было. В модели zPDX ответом на лечение считали уменьшение размера опухоли более чем на 50%. Из 31 пациента, биопсийный материал которых исследовали, 16 находились под наблюдением в среднем в течение 19 мес. На модели zPDX показано, что опухоли семи из 16 пациентов отвечали на лечение, а 9 не реагировали. При этом только один пациент из семи (ошибка 14.3%), ответивших на лечение, сообщил о рецидиве рака, в то время как у шести из 9 (точность 66.7%) пациентов, аватары которых идентифицированы как не ответившие, наступил рецидив рака. Таким образом, модели zPDX могут достаточно точно предсказать реакцию пациента на химиотерапевтические средства.

Кроме того, в рамках этого же совместного клинического исследования разработана модель zPDX

колоректального рака, для оценки которой применяли адаптивные критерии RECIST прогнозирования ответа на химиотерапию при лечении 5-FU, FOLFIRI, FOLFOX, FOLFOXIRI в течение 2 дней. Полученные аватары предсказывали ответ на химиотерапию с точностью 75% [184], поэтому планируется проведение аналогичного исследования под названием “Оценка роста опухоли и онкологического лечения у пациентов с колоректальными метастазами в печень” (CRLM) с использованием модели эмбриона *D. rerio* (CRLM-Z) (clinicaltrials.gov идентификатор: NCT05289076). Этот проект представляет собой когортное исследование, в котором примут участие 40 пациентов. Анализ ответа на разные методы лечения как у пациентов, так и у zPDX может послужить основой для дальнейших шагов [211]. Таким образом, аватары *D. rerio* теперь служат мощным инструментом точной медицины и потенциально могут помочь в принятии обоснованных решений о персонифицированной терапии [204, 212, 213].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени созданы модели zPDX для различных типов рака, включая рак желудка [145], колоректальный рак [43], рак молочной железы [183], немелкоклеточную аденокарциному легкого [214], аденокарциному протоков поджелудочной железы [184] и другие [185, 186, 215].

Сравнили модели zPDX и mPDX в качестве аватаров. Реакция zPDX на стандартное лечение очень хорошо коррелирует с реакцией mPDX и пациентов [214]. Сравнение mPDX и zPDX (в случае колоректального рака) показало, что в обеих моделях применение химиотерапии приводило к значительному увеличению апоптоза и уменьшению пролиферации опухолевых клеток. Дифференциальная чувствительность к химиотерапии некоторых раковых клеток, выявленная с помощью моделей zPDX, подтверждена на моделях mPDX [43].

Короткие сроки создания аватаров zPDX, их потенциал в проведении скрининговых исследований лекарственных средств и более низкая стоимость, чем у мышинных моделей, делают zPDX все более популярной и привлекательной моделью для прецизионной терапии опухолей. В настоящее время доказано, что личиночный zPDX является клинически значимой моделью, которая позволяет тестировать лекарства на 96-луночных планшетах, сохраняя при этом сложность целого организма с физиологическими функциями [164, 199, 201, 216–218]. Взрослые и личиночные zPDX позволяют выявлять внутриопухолевую гетерогенность и предоставлять ценную информацию о генетических, молекулярных и поведенческих профилях субклонов, вызывающих резистентность пациентов к проведению терапии.

Тем не менее каждая модель аватара рака имеет свои недостатки, и ни одна из них не может полностью воссоздать болезнь человека. Необходимо тщательно оценивать пригодность всех типов PDX, включая zPDX, для ответа на конкретные вопросы, относящиеся к опухоли пациента, включая гетерогенность и субклональный ответ на проведение терапии. В конечном счете разные модели будут играть свои собственные важные роли в конвейере прецизионной медицины. Требуется проделать определенную работу, чтобы приблизить аватары *D. rerio* к клиническим условиям. Методы получения zPDX для личинок и взрослых особей должны быть стандартизированы во всех лабораториях, чтобы результаты, полученные с их использованием, были надежными и воспроизводимыми. Дополнительное сравнение моделей zPDX и mPDX покажет, как они перекрываются и дополняют друг друга. Наконец, необходимы более обширные совместные клинические исследования, охватывающие различные типы рака, чтобы сравнить данные zPDX с ответами пациентов на лечение.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ “Курчатовский институт”.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **71**(3), 209–249.
2. Özdemir B.C., Dotto G.-P. (2017) Racial differences in cancer susceptibility and survival: more than the color of the skin? *Trends Cancer.* **3**, 181–197.
3. Li S., Garrett-Bakelman F.E., Chung S.S., Sanders M.A., Hricik T., Rapaport F., Patel J., Dillon R., Vijay P., Brown A.L., Perl A.E., Cannon J., Bullinger L., Luger S., Becker M., Lewis I.D., To L.B., Delwel R., Löwenberg B., Döhner H., Döhner K., Guzman M.L., Hassane D.C., Roboz G.J., Grimwade D., Valk P.J., D’Andrea R.J., Carroll M., Park C.Y., Neuberg D., Levine R., Melnick A.M., Mason C.E. (2016) Distinct evolution and dynamics of epigenetic and genetic heterogeneity in acute myeloid leukemia. *Nat. Med.* **22**(7), 792–799.
4. Almendro V., Marusyk A., Polyak K. (2013) Cellular heterogeneity and molecular evolution in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **8**, 277–302.
5. Li J., Ge W. (2020) Zebrafish as a model for studying ovarian development: recent advances from targeted gene knockout studies. *Mol. Cell. Endocrinol.* **507**, 110778.
6. Cagan R.L., Zon L.I., White R.M. (2019) Modeling cancer with flies and fish. *Dev. Cell.* **49**, 317–324.
7. Costa B., Estrada M.F., Mendes R.V., Fior R. (2020) Zebrafish avatars towards personalized medicine: a comparative review between avatar models. *Cells.* **9**, 293.

8. Quail D.F., Joyce J.A. (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**, 1423–1437.
9. Malaney P., Nicosia S.V., Dave V. (2014) One mouse, one patient paradigm: new avatars of personalized cancer therapy. *Cancer Lett.* **344**, 1–12.
10. Hamilton F. (1822) An account of the fishes found in the river Ganges and its branches. Edinburgh: Printed for A. Constable and company.
11. Astell K.R., Sieger D. (2020) Zebrafish *in vivo* models of cancer and metastasis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **10**(8), a037077.
12. Letrado P., de Miguel I., Lamberto I., Díez-Martínez R., Oyarzabal J. (2018) Zebrafish: speeding up the cancer drug discovery process. *Cancer Res.* **78**(21), 6048–6058.
13. Matchett K.B., Lynam-Lennon N., Watson R.W., Brown J.A.L. (2017) Advances in precision medicine: tailoring individualized therapies. *Cancers.* **9**, 146.
14. Lee J.K., Liu Z., Sa J.K., Shin S., Wang J., Bordyuh M., Cho H.J., Elliott O., Chu T., Choi S.W., Rosenbloom D.I.S., Lee I.H., Shin Y.J., Kang H.J., Kim D., Kim S.Y., Sim M.H., Kim J., Lee T., Seo Y.J., Shin H., Lee M., Kim S.H., Kwon Y.J., Oh J.W., Song M., Kim M., Kong D.S., Choi J.W., Seol H.J., Lee J.I., Kim S.T., Park J.O., Kim K.M., Song S.Y., Lee J.W., Kim H.C., Lee J.E., Choi M.G., Seo S.W., Shim Y.M., Zo J.I., Jeong B.C., Yoon Y., Ryu G.H., Kim N.K.D., Bae J.S., Park W.Y., Lee J., Verhaak R.G.W., Iavarone A., Lee J., Rabadan R., Nam D.H. (2018) Pharmacogenomic landscape of patient-derived tumor cells informs precision oncology therapy. *Nat. Genet.* **50**(10), 1399–1411.
15. Мизгирев И.В., Сафина Д.Р., Демидюк И.В., Костров С.В. (2018) Опухолевые модели организменного уровня на основе *Danio rerio*. *Acta Naturae.* **10**(2), 26–31.
16. Kirchberger S., Sturtzel C., Pascoal S., Distel M. (2017) *Quo natus, Danio?* Recent progress in modeling cancer in zebrafish. *Front. Oncol.* **7**, 186.
17. Streisinger G., Walker C., Dower N., Knauber D., Singer F. (1981) Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature.* **291**, 293–296.
18. Howe K., Clark M.D., Torroja C.F., Torrance J., Berthelot C., Muffato M., Collins J.E., Humphray S., McLaren K., Matthews L., McLaren S., Sealy I., Caccamo M., Churcher C., Scott C., Barrett J.C., Koch R., Rauch G.J., White S., Chow W., Kilian B., Quintais L.T., Guerra-Assunção J.A., Zhou Y., Gu Y., Yen J., Vogel J.H., Eyre T., Redmond S., Banerjee R., Chi J., Fu B., Langley E., Maguire S.F., Laird G.K., Lloyd D., Kenyon E., Donaldson S., Sehra H., Almeida-King J., Loveland J., Trevanion S., Jones M., Quail M., Willey D., Hunt A., Burton J., Sims S., McLay K., Plumb B., Davis J., Clee C., Oliver K., Clark R., Riddle C., Elliot D., Threadgold G., Harden G., Ware D., Begum S., Mortimore B., Kerry G., Heath P., Phillimore B., Tracey A., Corby N., Dunn M., Johnson C., Wood J., Clark S., Pelan S., Griffiths G., Smith M., Glithero R., Howden P., Barker N., Lloyd C., Stevens C., Harley J., Holt K., Panagiotidis G., Lovell J., Beasley H., Henderson C., Gordon D., Auger K., Wright D., Collins J., Raisen C., Dyer L., Leung K., Robertson L., Ambridge K., Leongamornlert D., McGuire S., Gilderthorp R., Griffiths C., Manthavadi D., Nichol S., Barker G., Whitehead S., Kay M., Brown J., Murnane C., Gray E., Humphries M., Sycamore N., Barker D., Saunders D., Wallis J., Babbage A., Hammond S., Mashreghi-Mohammadi M., Barr L., Martin S., Wray P., Ellington A., Matthews N., Ellwood M., Woodmansey R., Clark G., Cooper J., Tromans A., Grafham D., Skuce C., Pandian R., Andrews R., Harrison E., Kimberley A., Garnett J., Fosker N., Hall R., Garner P., Kelly D., Bird C., Palmer S., Gehring I., Berger A., Dooley C.M., Ersan-Ürün Z., Eser C., Geiger H., Geisler M., Karotki L., Kirn A., Konantz J., Konantz M., Oberländer M., Rudolph-Geiger S., Teucke M., Lanz C., Raddatz G., Osoegawa K., Zhu B., Rapp A., Widaa S., Langford C., Yang F., Schuster S.C., Carter N.P., Harrow J., Ning Z., Herrero J., Searle S.M., Enright A., Geisler R., Plasterk R.H., Lee C., Westerfield M., de Jong P.J., Zon L.I., Postlethwait J.H., Nüsslein-Volhard C., Hubbard T.J., Roest Crolius H., Rogers J., Stemple D.L. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* **496**(7446), 498–503.
19. Shin J.T. (2005) Human-zebrafish non-coding conserved elements act *in vivo* to regulate transcription. *Nucl. Acids Res.* **33**, 5437–5445.
20. Long H.K., Sims D., Heger A., Blackledge N.P., Kutter C., Wright M.L., Grützner F., Odom D.T., Patient R., Ponting C.P., Klose R.J. (2013) Epigenetic conservation at gene regulatory elements revealed by non-methylated DNA profiling in seven vertebrates. *Elife.* **2**, e00348.
21. Giardoglou P., Beis D. (2019) On zebrafish disease models and matters of the heart. *Biomedicines.* **7**, 15.
22. Outtandy P., Russell C., Kleta R., Bockenbauer D. (2019) Zebrafish as a model for kidney function and disease. *Pediatr. Nephrol.* **34**, 751–762.
23. Dubińska-Magiera M., Daczewska M., Lewicka A., Migocka-Patrzałek M., Niedbalska-Tarnowska J., Jagla K. (2016) Zebrafish: a model for the study of toxicants affecting muscle development and function. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1941.
24. Cox A.G., Goessling W. (2015) The lure of zebrafish in liver research: regulation of hepatic growth in development and regeneration. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **32**, 153–161.
25. Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**, 253–310.
26. Parichy D.M., Elizondo M.R., Mills M.G., Gordon T.N., Engeszer R.E. (2009) Normal table of post embryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Dev. Dyn.* **238**, 2975–3015.
27. Meyer A., Schartl M. (1999) Gene and genome duplications invertebrates: the one-to-four (–to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 699–704.
28. Amatruda J.F., Shepard J.L., Stern H.M., Zon L.I. (2002) Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell.* **1**, 229–231.
29. Lam S.H., Chua H.L., Gong Z., Lam T.J., Sin Y.M. (2004) Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, *in situ* hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol.* **28**, 9–28.
30. Long Y., Li L., Li Q., He X., Cui Z. (2012) Transcriptomic characterization of temperature stress responses in larval zebrafish. *PLoS One.* **7**, e37209.
31. Chen X., Wang J., Cao Z., Hosaka K., Jensen L., Yang H., Sun Y., Zhuang R., Liu Y., Cao Y. (2015) Invasiveness and metastasis of retinoblastoma in an orthotopic zebrafish tumor model. *Sci. Rep.* **5**, 10351.

32. Cam M., Charan M., Welker A.M., Dravid P., Studebaker A.W., Leonard J.R., Pierson C.R., Nakano I., Beatrice C.E., Hwang E.I., Kambhampati M., Nazarian J., Finlay J.L., Cam H. (2020) Δ Np73/ETS2 complex drives glioblastoma pathogenesis—targeting downstream mediators by rebastinib prolongs survival in preclinical models of glioblastoma. *Neuro Oncol.* **22**(3), 345–356.
33. Sounni N.E., Noel A. (2013) Targeting the tumor microenvironment for cancer therapy. *Clin. Chem.* **59**, 85–93.
34. Nicoli S., Ribatti D., Cotelli F., Presta M. (2007) Mamalian tumor xenografts induce neovascularization in zebrafish embryos. *Cancer Res.* **67**, 2927–2931.
35. Nicoli S., Presta M. (2007) The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nat. Protoc.* **2**, 2918.
36. Lee L.M., Seftor E.A., Bonde G., Cornell R.A., Hendrix M.J. (2005) The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev. Dyn. O. Publ. Am. Assoc. Anat.* **233**, 1560–1570.
37. Haldi M., Ton C., Seng W.L., McGrath P. (2006) Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis.* **9**, 139–151.
38. Renshaw S.A., Trede N.S. (2012) A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. *Dis. Models Mech.* **5**, 38–47.
39. Sullivan C., Kim C.H. (2008) Innate immune system of the zebrafish, *Danio rerio*. In: *Innate Immunity of Plants, Animals, and Humans*. Ed. Heine H. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 113–133.
40. White R., Rose K., Zon L. (2013) Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. *Nat. Rev. Cancer.* **13**, 624–636.
41. Tulotta C., He S., Chen L., Groenewoud A., van der Ent W., Meijer A.H., Spaik H.P., Snaar-Jagalska B.E. (2016) Imaging of human cancer cell proliferation, invasion, and micrometastasis in a zebrafish xenogeneic engraftment model. In: *Zebrafish*. Eds Kawakami K., Pattons E.E., Orger M. New York: Springer, pp. 155–169.
42. Ikonopoulou M.P., Fernandez-Rojo M.A., Pineda S.S., Cabezas-Sainz P., Winnen B., Morales R.A., Brust A., Sánchez L., Alewood P.F., Ramm G.A. (2018) Gimesin inhibits melanoma growth by manipulating key signaling cascades that control cell death and proliferation. *Sci. Rep.* **8**, 1–14.
43. Fior R., Póvoa V., Mendes R.V., Carvalho T., Gomes A., Figueiredo N., Ferreira M.G. (2017) Single-cell functional and chemosensitive profiling of combinatorial colorectal therapy in zebrafish xenografts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, E8234–E8243.
44. Fraher D., Sanigorski A., Mellett N.A., Meikle P.J., Sinclair A.J., Gibert Y. (2016) Zebrafish embryonic lipidomic analysis reveals that the yolk cell is metabolically active in processing lipid. *Cell Rep.* **14**, 1317–1329.
45. Veinotte C.J., Delliare G., Berman J.N. (2014) Hooking the big one: the potential of zebrafish xenotransplantation to reform cancer drug screening in the genomic era. *Dis. Models Mech.* **7**, 745–754.
46. Mercatali L., La Manna F., Groenewoud A., Casadei R., Recine F., Miserocchi G., Pieri F., Liverani C., Bongiovanni A., Spadazzi C. (2016) Development of a patient-derived xenograft (PDX) of breast cancer bone metastasis in a zebrafish model. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1375.
47. Drabsch Y., Snaar-Jagalska B.E., Ten Dijke P. (2017) Fish tales: the use of zebrafish xenograft human cancer cell models. *Histol. Histopathol.* **32**, 673–686.
48. Hill D., Chen L., Snaar-Jagalska E., Chaudhry B. (2018) Embryonic zebrafish xenograft assay of human cancer metastasis. *F1000Res.* **7**, 1682.
49. Brown H.K., Schiavone K., Tazzyman S., Heymann D., Chico T.J. (2017) Zebrafish xenograft models of cancer and metastasis for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **12**, 379–389.
50. Sturtzel C., Grissenberger S., Bozatz P., Scheuringer E., Wenninger-Weinzierl A., Zajec Z., Dernovšek J., Pascoal S., Gehl V., Kutsch A., Granig A., Rifatbegovic F., Carre M., Lang A., Valtinogier I., Moll J., Lötsch D., Erhart F., Widhalm G., Surdez D., Delattre O., André N., Stampfl J., Tomašič T., Taschner-Mandl S., Distel M. (2023) Refined high-content imaging-based phenotypic drug screening in zebrafish xenografts. *NPJ Precis Oncol.* **7**(1), 44.
51. Stoletov K., Montel V., Lester R.D., Gonias S.L., Klemke R. (2007) High-resolution imaging of the dynamic tumor cell–vascular interface in transparent zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 17406–17411.
52. Khan N., Mahajan N.K., Sinha P., Jayandharan G.R. (2019) An efficient method to generate xenograft tumor models of acute myeloid leukemia and hepatocellular carcinoma in adult zebrafish. *Blood Cells Mol. Dis.* **75**, 48–55.
53. Moore J.C., Tang Q., Yordan N.T., Moore F.E., Garcia E.G., Lobbardi R., Ramakrishnan A., Marvin D.L., Anselmo A., Sadreyev R.I., Langenau D.M. (2016) Single-cell imaging of normal and malignant cell engraftment into optically clear prkdc-null SCID zebrafish. *J. Exp. Med.* **213**(12), 2575–2589.
54. Yan C., Brunson D.C., Tang Q., Do D., Iftimia N.A., Moore J.C., Hayes M.N., Welker A.M., Garcia E.G., Dubash T.D., Hong X., Drapkin B.J., Myers D.T., Phat S., Volorio A., Marvin D.L., Ligorio M., Dershowitz L., McCarthy K.M., Karabacak M.N., Fletcher J.A., Sgroi D.C., Iafra J.A., Maheswaran S., Dyson N.J., Haber D.A., Rawls J.F., Langenau D.M. (2019) Visualizing engrafted human cancer and therapy responses in immunodeficient zebrafish. *Cell.* **177**(7), 1903–1914.e14.
55. Rajan V., Melong N., Wong W.H., King B., Tong R.S., Mahajan N., Gaston D., Lund T., Rittenberg D., Delliare G. (2020) Humanized zebrafish enhance human hematopoietic stem cell survival and promote acute myeloid leukemia clonal diversity. *Haematologica.* **105**, 2391.
56. Eguira A., Holgado O., Belouqui I., Abalde L., Sanchez Y., Callol C., Martin A.G. (2011) Xenografts in zebrafish embryos as a rapid functional assay for breast cancer stem-like cell identification. *Cell Cycle.* **10**(21), 3751–3757.
57. Ghotra V.P., He S., De Bont H., van Der Ent W., Spaik H.P., van DeWater, B., Snaar-Jagalska B.E., Danen E.H. (2012) Automated whole animal bio-imaging assay for human cancer dissemination. *PLoS One.* **7**, e31281.
58. Ban J., Aryee D.N., Fourtouna A., Van Der Ent W., Kauer M., Niedan S., Machado I., Rodriguez-Galindo C., Tirado O.M., Schwentner R. (2014) Suppression of deacetylase SIRT1 mediates tumor-suppressive NOTCH response and offers a novel treatment option in metastatic Ewing sarcoma. *Cancer Res.* **74**, 6578–6588.
59. van der Ent W., Burrello C., de Lange M.J., van der Velden P.A., Jochemsen A.G., Jager M.J., Snaar-Jagalska B.E. (2015) Embryonic zebrafish: different phenotypes

- after injection of human uveal melanoma cells. *Ocul. Oncol. Pathol.* **1**(3), 170–181.
60. Kong L., Chen Q., Campbell F., Snaar-Jagalska E., Kros A. (2020) Light-triggered cancer cell specific targeting and liposomal drug delivery in a zebrafish xenograft model. *Adv. Healthc. Mater.* **9**, e1901489.
 61. Pyper C., Verbueken E., Saad M.A., Casteleyn C.R., Van Ginneken C.J., Knapen D., Van Cruchten S.J. (2015) Incubation at 32.5°C and above causes malformations in the zebrafish embryo. *Reprod. Toxicol.* **56**, 56–63.
 62. Guo Y., Fan Y., Pei X. (2020) Fangjihuangqi decoction inhibits MDA-MB-231 cell invasion *in vitro* and decreases tumor growth and metastasis in triple-negative breast cancer xenografts tumor zebrafish model. *Cancer Med.* **9**, 2564–2578.
 63. Pascoal S., Salzer B., Scheuringer E., Wenninger-Weinzierl A., Sturtzel C., Holter W., Taschner-Mandl S., Lehner M., Distel M. (2020) A preclinical embryonic zebrafish xenograft model to investigate CAR T cells *in vivo*. *Cancers* **12**, 567.
 64. Wang Y., Ma Q., Zhang S., Liu H., Zhao B., Du B., Wang W., Lin P., Zhang Z., Zhong Y. (2020) Digoxin enhances the anticancer effect on non-small cell lung cancer while reducing the cardiotoxicity of adriamycin. *Front. Pharmacol.* **11**, 186.
 65. Zhang B., Shimada Y., Kuroyanagi J., Nishimura Y., Umamoto N., Nomoto T., Shintou T., Miyazaki T., Tanaka T. (2014) Zebrafish xenotransplantation model for cancer stem-like cell study and high-throughput screening of inhibitors. *Tumour Biol.* **35**(12), 11861–11869.
 66. Usai A., Di Franco G., Colucci P., Pollina L.E., Vasile E., Funel N., Palmeri M., Dente L., Falcone A., Morelli L. (2020) A model of a zebrafish avatar for co-clinical trials. *Cancers.* **12**, 677.
 67. Corkery D.P., Dellaire G., Berman J.N. (2011) Leukaemia xenotransplantation in zebrafish—chemotherapy response assay *in vivo*. *Br.J. Haematol.* **153**, 786–789.
 68. Bentley V.L., Veinotte C.J., Corkery D.P., Pinder J.B., LeBlanc M.A., Bedard K., Weng A.P., Berman J.N., Dellaire G. (2015) Focused chemical genomics using zebrafish xenotransplantation as a pre-clinical therapeutic platform for T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* **100**, 70–76.
 69. Cabezas-Sainz P., Guerra-Varela J., Carreira M.J., Mariscal J., Roel M., Rubiolo J.A., Sciara A.A., Abal M., Botana L.M., López R. (2018) Improving zebrafish embryo xenotransplantation conditions by increasing incubation temperature and establishing a proliferation index with Zf tool. *BMC Cancer.* **18**, 3.
 70. Meijer A.H. (2016) Protection and pathology in TB: learning from the zebrafish model. *Semin. Immunopathol.* **38**, 261–273.
 71. Yang X.-J., Chen G.-L., Yu S.-C., Xu C., Xin Y.-H., Li T. T., Shi Y., Gu A., Duan J.-J., Qian C. (2013) TGF- β 1 enhances tumor-induced angiogenesis via JNK pathway and macrophage infiltration in an improved zebrafish embryo/xenograft glioma model. *Int. Immunopharmacol.* **15**, 191–198.
 72. Rodriguez G.V., Abrahamsson A., Jensen L.D.E., Dabrosin C. (2017) Estradiol promotes breast cancer cell migration via recruitment and activation of neutrophils. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 234–247.
 73. Renshaw S., Loynes C., Trushell D., Elworthy S., Ingham P., Whyte M. (2007) A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood.* **108**, 3976–3978.
 74. Ellett F., Pase L., Hayman J.W., Andrianopoulos A., Lieschke G.J. (2011) Mpeg1 promoter transgenes direct macrophage-lineage expression in zebrafish. *Blood.* **117**, e49–e56.
 75. Bernut A., Herrmann J.-L., Kissa K., Dubremetz J.-F., Gaillard J.-L., Lutfalla G., Kremer L. (2014) *Mycobacterium abscessus* cording prevents phagocytosis and promotes abscess formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, E943–E952.
 76. Lawson N.D., Weinstein B.M. (2002) *In vivo* imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* **248**, 307–318.
 77. Jin S.-W., Beis D., Mitchell T., Chen J.-N., Stainier D.Y.R. (2005) Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish. *Development.* **132**, 5199.
 78. Wang Y., Kaiser M.S., Larson J.D., Nasevicius A., Clark K.J., Wadman S.A., Roberg-Perez S.E., Ekker S.C., Hackett P.B., McGrail M., Essner J.J. (2010) Moesin1 and Ve-cadherin are required in endothelial cells during *in vivo* tubulogenesis. *Development.* **137**(18), 3119–3128.
 79. Zhao S., Huang J., Ye J. (2015) A fresh look at zebrafish from the perspective of cancer research. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **34**, 80.
 80. He S., Lamers G.E., Beenakker J.W., Cui C., Ghotra V.P., Danen E.H., Meijer A.H., Spaik H.P., Snaar-Jagalska B.E. (2012) Neutrophil-mediated experimental metastasis is enhanced by VEGFR inhibition in a zebrafish xenograft model. *J. Pathol.* **227**(4), 431–445.
 81. Roh-Johnson M., Shah A.N., Stonick J.A., Poudel K.R., Kargl J., Yang G.H., di Martino J., Hernandez R.E., Gast C.E., Zarour L.R., Antoku S., Houghton A.M., Bravo-Cordero J.J., Wong M.H., Condeelis J., Moens C.B. (2017) Macrophage-dependent cytoplasmic transfer during melanoma invasion *in vivo*. *Dev. Cell.* **43**(5), 549–562.e6.
 82. Britto D.D., Wyroba B., Chen W., Lockwood R.A., Tran K.B., Shepherd P.R., Hall C.J., Crosier K.E., Crosier P.S., Astin J.W. (2018) Macrophages enhance VEGFA-driven angiogenesis in an embryonic zebrafish tumour xenograft model. *Dis. Models Mech.* **11**, dmm035998.
 83. Chen Q., Ramu V., Aydar Y., Groenewoud A., Zhou X.Q., Jager M.J., Cole H., Cameron C.G., McFarland S.A., Bonnet S., Snaar-Jagalska B.E. (2020) TLD1433 photosensitizer inhibits conjunctival melanoma cells in zebrafish ectopic and orthotopic tumour models. *Cancers (Basel).* **12**(3), 587.
 84. Williams J.A. (2018) Using PDX for preclinical cancer drug discovery: the evolving field. *J. Clin. Med.* **7**, 41.
 85. Noël A., Gutiérrez-Fernández A., Sounni N.E., Behrendt N., Maquoi E., Lund I.K., Cal S., Hoyer-Hansen G., López-Otin C. (2012) New and paradoxical roles of matrix metalloproteinases in the tumor microenvironment. *Front. Pharmacol.* **3**, 140.
 86. Detry B., Erpicum C., Paupert J., Blacher S., Maillard C., Bruyère F., Pendeville H., Rémacle T., Lambert V., Balsat C., Ormenese S., Lamaye F., Janssens E., Moons L., Cataldo D., Kridelka F., Carmeliet P., Thiry M., Foidart J.M., Struman I., Noël A. (2012) Matrix metalloproteinase-2 governs lymphatic vessel formation as an interstitial collagenase. *Blood.* **119**(21), 5048–5056.

87. Lal S., La Du J., Tanguay R.L., Greenwood J.A. (2012) Calpain 2 is required for the invasion of glioblastoma cells in the zebrafish brain microenvironment. *J. Neurosci. Res.* **90**(4), 769–781.
88. Farin A., Suzuki S.O., Weiher M., Goldman J.E., Bruce J.N., Canoll P. (2006) Transplanted glioma cells migrate and proliferate on host brain vasculature: a dynamic analysis. *Glia*. **53**, 799–808.
89. Gamble J.T., Reed-Harris Y., Barton C.L., La Du J., Tanguay R., Greenwood J.A. (2018) Quantification of glioblastoma progression in zebrafish xenografts: adhesion to laminin alpha 5 promotes glioblastoma microtumor formation and inhibits cell invasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **506**, 833–839.
90. Yang Y., Hao E., Pan X., Tan D., Du Z., Xie J., Hou X., Deng J., Wei K. (2019) Gomisins M2 from Baizuan suppresses breast cancer stem cell proliferation in a zebrafish xenograft model. *Aging*. **11**, 8347–8361.
91. Ortiz M.V., Dunkel I.J. (2016) Retinoblastoma. *J. Child Neurol.* **31**, 227–236.
92. Asnaghi L., White D.T., Key N., Choi J., Mahale A., Alkatan H., Edward D.P., Elkhamary S.M., Al-Mesfer S., Maktabi A., Hurtado C.G., Lee G.Y., Carcaboso A.M., Mumm J.S., Safieh L.A., Eberhart C.G. (2019) ACVR1C/SMAD2 signaling promotes invasion and growth in retinoblastoma. *Oncogene*. **38**(12), 2056–2075.
93. Asnaghi L., White D.T., Yoon L., Price A., Lee G.Y., Sahoo A., Mumm J.S., Eberhart C.G. (2019) Downregulation of Nodal inhibits metastatic progression in retinoblastoma. *Acta Neuropathol. Commun.* **7**, 137.
94. Chambers A.F., Groom A.C., MacDonald I.C. (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer*. **2**(8), 563–572.
95. Kang Y. (2009) Analysis of cancer stem cell metastasis in xenograft animal models. *Methods Mol. Biol.* **568**, 7–19.
96. Nguyen D.X., Bos P.D., Massague J. (2009) Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer*. **9**(4), 274–284.
97. Marusyk A., Almendro V., Polyak K. (2012) Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat. Rev. Cancer*. **12**(5), 323–334.
98. Tellez-Gabriel M., Ory B., Lamoureux F., Heymann M.F., Heymann D. (2016) Tumour heterogeneity: the key advantages of single-cell analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**(12), 2142.
99. Armandis T., Monteiro P., Adams S.D., Bridgeman V.L., Rajeev V., Gadaleta E., Marzec J., Chelala C., Malanchi I., Cutillas P.R., Godinho S.A. (2018) Oxidative stress in cells with extra centrosomes drives non-cell-autonomous invasion. *Dev. Cell*. **47**(4), 409–424.e9.
100. Sharif G.M., Schmidt M.O., Yi C., Hu Z., Haddad B.R., Glasgow E., Riegel A.T., Wellstein A. (2015) Cell growth density modulates cancer cell vascular invasion via Hippo pathway activity and CXCR2 signaling. *Oncogene*. **34**(48), 5879–5889.
101. Martinez-Ordoñez A., Seoane S., Cabezas P., Eiro N., Sendon-Lago J., Macia M., Garcia-Caballero T., Gonzalez L.O., Sanchez L., Vizoso F., Perez-Fernandez R. (2018) Breast cancer metastasis to liver and lung is facilitated by Pit-1-CXCL12-CXCR4 axis. *Oncogene*. **37**(11), 1430–1444.
102. Tulotta C., Stefanescu C., Beletkaia E., Bussmann J., Tarbashevich K., Schmidt T., Snaar-Jagalska B.E. (2016) Inhibition of signaling between human CXCR4 and zebrafish ligands by the small molecule IT1t impairs the formation of triple-negative breast cancer early metastases in a zebrafish xenograft model. *Dis. Model. Mech.* **9**, 141–153.
103. Cheng Y., Ma X.L., Wei Y.Q., Wei X.W. (2019) Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*. **1871**(2), 289–312.
104. Das I., Gad H., Bräutigam L., Pudelko L., Tuominen R., Höiom V., Almlöf I., Rajagopal V., Hansson J., Helleday T., Egyházi Brage S., Warpman Berglund U. (2020) AXL and CAV-1 play a role for MTH1 inhibitor TH1579 sensitivity in cutaneous malignant melanoma. *Cell Death Differ.* **27**(7), 2081–2098.
105. Li Y., Drabsch Y., Pujuguet P., Ren J., van Laar T., Zhang L., van Dam H., Clement-Lacroix P., Ten Dijke P. (2015) Genetic depletion and pharmacological targeting of alphav integrin in breast cancer cells impairs metastasis in zebrafish and mouse xenograft models. *Breast Cancer Res.* **17**, 28.
106. Zheng M.W., Zhang C.H., Chen K., Huang M., Li Y.P., Lin W.T., Zhang R.J., Zhong L., Xiang R., Li L.L., Liu X.Y., Wei Y.Q., Yang S.Y. (2016) Preclinical evaluation of a novel orally available SRC/Raf/VEGFR2 inhibitor, SKLB646, in the treatment of triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 366–378.
107. Hsieh T.H., Hsu C.Y., Tsai C.F., Chiu C.C., Liang S.S., Wang T.N., Kuo P.L., Long C.Y., Tsai E.M. (2016) A novel cell-penetrating peptide suppresses breast tumorigenesis by inhibiting β -catenin/LEF-1 signaling. *Sci. Rep.* **6**, 19156.
108. Fenizia C., Bottino C., Corbetta S., Fittipaldi R., Floris P., Gaudenzi G., Carra S., Cotelli F., Vitale G., Caretti G. (2019) SMYD3 promotes the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Nucl. Acids Res.* **47**(3), 1278–1293.
109. Osmani N., Goetz J.G. (2019) Multiscale imaging of metastasis in zebrafish. *Trends Cancer*. **5**, 766–778.
110. Bergers G., Benjamin L.E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer*. **3**(6), 401–410.
111. Zhao C., Zhang W., Zhao Y., Yang Y., Luo H., Ji G., Dong E., Deng H., Lin S., Wei Y., Yang H. (2016) Endothelial cords promote tumor initial growth prior to vascular function through a paracrine mechanism. *Sci. Rep.* **6**, 19404.
112. Calabrese C., Poppleton H., Kocak M., Hogg T.L., Fuller C., Hamner B., Oh E.Y., Gaber M.W., Finklestein D., Allen M., Frank A., Bayazitov I.T., Zakharenko S.S., Gajjar A., Davidoff A., Gilbertson R.J. (2007) A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell*. **11**(1), 69–82.
113. Zhao C., Yang H., Shi H., Wang X., Chen X., Yuan Y., Lin S., Wei Y. (2011) Distinct contributions of angiogenesis and vascular co-option during the initiation of primary microtumors and micrometastases. *Carcinogenesis*. **32**(8), 1143–1150.
114. Lee S.L., Rouhi P., Dahl Jensen L., Zhang D., Ji H., Hauptmann G., Ingham P., Cao Y. (2009) Hypoxia-induced pathological angiogenesis mediates tumor cell dissemination, invasion, and metastasis in a zebrafish tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**(46), 19485–19490.
115. Joyce J.P., Pollard J.W. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer*. **9**, 239–252.
116. Pollard J. (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer*. **4**, 71–78.

117. Aras S., Zaidi M.R. (2017) TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. *Br.J. Cancer.* **117**(11), 1583–1591.
118. Follain G., Osmani N., Fuchs C., Allio G., Harlepp S., Goetz J.G. (2018) Using the zebrafish embryo to dissect the early steps of the metastasis cascade. In: *Cell Migration: Methods and Protocols*. Ed Gautreau A. N.Y.: Springer, pp. 195–211.
119. Follain G., Osmani N., Azevedo A.S., Allio G., Mercier L., Karreman M.A., Solecki G., Leòn M.J.G., Lefebvre O., Fekonja N., Hille C., Chabannes V., Dollé G., Metivet T., Hovsepian F., Prudhomme C., Pichot A., Paul N., Carapito R., Bahram S., Ruthensteiner B., Kemmling A., Siemonsen S., Schneider T., Fiehler J., Glatzel M., Winkler F., Schwab Y., Pantel K., Harlepp S., Goetz J.G. (2018) Hemodynamic forces tune the arrest, adhesion, and extravasation of circulating tumor cells. *Dev. Cell.* **45**(1), 33–52.e12.
120. Kanada M., Zhang J., Yan L., Sakurai T., Terakawa S. (2014) Endothelial cell-initiated extravasation of cancer cells visualized in zebrafish. *PeerJ.* **2**, e688.
121. Allen T.A., Graciele D., Talib M., Tokarz D.A., Hensley M.T., Cores J., Vandergriff A., Tang J., de Andrade J.B., Dinh P.U., Yoder J.A., Cheng K. (2017) Angiogenesis as an alternative mechanism of cell extravasation. *Stem Cells.* **35**(1), 170–180.
122. Allen T.A., Asad D., Amu E., Hensley M.T., Cores J., Vandergriff A., Tang J., Dinh P.-U., Shen D., Qiao L., Su T., Hu S., Liang H., Shive H., Harrell E., Campbell C., Peng X., Yoder J.A., Cheng K. (2019) Circulating tumor cells exit circulation while maintaining multicellularity, augmenting metastatic potential. *J. Cell Sci.* **132**(17), jcs231563.
123. Hong Y., Fang F., Zhang Q. (2016) Circulating tumor cell clusters: what we know and what we expect (review). *Int. J. Oncol.* **49**, 2206–2216.
124. Martínez-Pena I., Hurtado P., Carmona-Ule N., Abuiñ C., Dávila-Ibáñez A.B., Sánchez L., Abal M., Chaachou A., Hernández-Losa J., Cajal S.R.Y., López-López R., Piñeiro R. (2021) Dissecting breast cancer circulating tumor cells competence via modelling metastasis in zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(17), 9279.
125. Amintas S., Bedel A., Moreau-Gaudry F., Boutin J., Buscail L., Merlio J.-P., Vendrely V., Dabernat S., Buscail E. (2020) Circulating tumor cell clusters: united we stand divided we fall. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2653.
126. Stoletov K., Kato H., Zardoujian E., Kelber J., Yang J., Shattil S., Klemke R. (2010) Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *J. Cell Sci.* **123**(13), 2332–2341.
127. Sacco A., Roccaro A.M., Ma D., Shi J., Mishima Y., Moschetta M., Chiarini M., Munshi N., Handin R.I., Ghobrial I.M. (2016) Cancer cell dissemination and homing to the bone marrow in a zebrafish model. *Cancer Res.* **76**(2), 463–471.
128. Shiozawa Y., Eber M.R., Berry J.E., Taichman R.S. (2015) Bone marrow as a metastatic niche for disseminated tumor cells from solid tumors. *Bonekey Rep.* **4**, 689.
129. Teng Y., Xie X., Walker S., White D.T., Mumm J.S., Cowell J.K. (2013) Evaluating human cancer cell metastasis in zebrafish. *BMC Cancer.* **13**, 453.
130. Marques I.J., Weiss F.U., Vlecken D.H., Nitsche C., Bakkers J., Lagendijk A.K., Partecke L.I., Heidecke C.D., Lech M.M., Bagowski C.P. (2009) Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model. *BMC Cancer.* **9**, 128.
131. Miserocchi G., Mercatali L., Liverani C., De Vita A., Spadazzi C., Pieri F., Bongiovanni A., Recine F., Amadori D., Ibrahim T. (2017) Management and potentialities of primary cancer cultures in preclinical and translational studies. *J. Transl. Med.* **15**, 229.
132. Shibue T., Weinberg R.A. (2017) EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 611–629.
133. Baxendale S., van Eeden F., Wilkinson R. (2017) The power of zebrafish in personalised medicine. In: *Personalised Medicine*. Ed El-Khamisy Sh. Cham: Springer, pp. 179–197.
134. Al-Hamaly M.A., Turner L.T., Rivera-Martinez A., Rodriguez A., Blackburn J.S. (2023) Zebrafish cancer avatars: a translational platform for analyzing tumor heterogeneity and predicting patient outcomes. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 2288.
135. Xiao J., Glasgow E., Agarwal S. (2020) Zebrafish xenografts for drug discovery and personalized medicine. *Trends Cancer.* **6**(7), 569–579.
136. Idrisova K.F., Simon H.-U., Gomzikova M.O. (2023) Role of patient-derived models of cancer in translational oncology. *Cancers.* **15**, 139.
137. Jung J., Seol H.S., Chang S. (2018) The generation and application of patient-derived xenograft model for cancer research. *Cancer Res. Treat. Off. J. Korean Cancer Assoc.* **50**, 1–10.
138. Servant R., Garioni M., Vlajnic T., Blind M., Pueschel H., Müller D.C., Zellweger T., Templeton A.J., Garofoli A., Maletti S. (2021) Prostate cancer patient-derived organoids: detailed outcome from a prospective cohort of 81 clinical specimens. *J. Pathol.* **254**, 543–555.
139. Green S., Dam M.S., Svendsen M.N. (2021) Mouse avatars of human cancers: the temporality of translation in precision oncology. *Hist. Philos. Life Sci.* **43**, 1–22.
140. Cone E.B., Marchese M., Paciotti M., Nguyen D.-D., Nabi J., Cole A.P., Molina G., Molina R.L., Minami C.A., Mucci L.A. (2020) Assessment of time-to-treatment initiation and survival in a cohort of patients with common cancers. *JAMA Netw. Open.* **3**, e2030072.
141. Hidalgo M., Amant F., Biankin A.V., Budinská E., Byrne A.T., Caldas C., Clarke R.B., de Jong S., Jonkers J., Mølandsmo G.M. (2014) Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov.* **4**, 998–1013.
142. Lin D., Wyatt A.W., Xue H., Wang Y., Dong X., Haegert A., Wu R., Brahmabhatt S., Mo F., Jong L. (2014) High fidelity patient-derived xenografts for accelerating prostate cancer discovery and drug development next-generation models of prostate cancer. *Cancer Res.* **74**, 1272–1283.
143. Mathew R.K., Rutka J.T. (2018) Diffuse intrinsic pontine glioma: clinical features, molecular genetics, and novel targeted therapeutics. *J. Korean Neurosurg. Soc.* **61**, 343–351.
144. Wang L., Chen H., Fei F., He X., Sun S., Lv K., Yu B., Long J., Wang X. (2019) Patient-derived heterogeneous xenograft model of pancreatic cancer using zebrafish larvae as hosts for comparative drug assessment. *J. Vis. Exp.* **146**, 59507.
145. Wu J.-Q., Zhai J., Li C.-Y., Tan A.-M., Wei P., Shen L.-Z., He M.-F. (2017) Patient-derived xenograft in zebrafish embryos: A new platform for translational research in gastric cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **36**, 160.

146. Lin J., Zhang W., Zhao J.J., Kwart A., Yang C., Ma D., Ren X., Tai Y.T., Anderson K., Handin R., Munshi N.C. (2016) A clinically relevant in vivo zebrafish model of human multiple myeloma (MM) to study preclinical therapeutic efficacy. *Blood*. **128**(2), 249–252.
147. Al-Samadi A., Tuomainen K., Kivimäki A., Salem A., Al-Kubati S., Hyytiäinen A., Parikka M., Mesimäki K., Wilkman T., Makitie A., Grenman R., Salo T. (2019) PCR-based zebrafish model for personalised medicine in head and neck cancer. *J. Transl. Med.* **17**(1), 235.
148. Sun D.Y., Wu J.Q., He Z.H., He M.F., Sun H.B. (2019) Cancer-associated fibroblast regulate proliferation and migration of prostate cancer cells through TGF- β signaling pathway. *Life Sci.* **235**, 116791.
149. Seoane S., Martinez-Ordoñez A., Eiro N., Cabezas-Sainz P., Garcia-Caballero L., Gonzalez L.O., Macia M., Sanchez L., Vizoso F., Perez-Fernandez R. (2019) POU1F1 transcription factor promotes breast cancer metastasis via recruitment and polarization of macrophages. *J. Pathol.* **249**, 381–394.
150. Bissell M.J., Hines W.C. (2011) Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat. Med.* **17**(3), 320–329.
151. Hanahan D., Weinberg R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. **144**, 646–674.
152. Koller D., Yu P., Pollock R.E. (2016) Patient-derived xenografts use in cancer: a review. *Clin. Surg.* **1**, 1277.
153. Bradford J.R., Wappett M., Beran G., Logie A., Delpuech O., Brown H., Boros J., Camp N.J., McEwen R., Mazzone A.M., D'Cruz C., Barry S.T. (2016) Whole transcriptome profiling of patient-derived xenograft models as a tool to identify both tumor and stromal specific biomarkers. *Oncotarget*. **7**(15), 20773–20787.
154. Chao C., Widen S.G., Wood T.G., Zatarain J.R., Johnson P., Gajjar A., Gomez G., Qiu S., Thompson J., Spratt H., Hellmich M.R. (2017) Patient-derived xenografts from colorectal carcinoma: a temporal and hierarchical study of murine stromal cell replacement. *Anticancer Res.* **37**(7), 3405–3412.
155. Sidani M., Wycko J., Xue C., Segall J.E., Condeelis J. (2006) Probing the microenvironment of mammary tumors using multiphoton microscopy. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. **11**, 151–163.
156. Linde N., Casanova-Acebes M., Sosa M.S., Mortha A., Rahman A., Farias E., Harper K., Tardio E., Reyes Torres I., Jones J., Condeelis J., Merad M., Aguirre-Ghiso J.A. (2018) Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis. *Nat. Commun.* **9**(1), 21.
157. Psaila B., Lyden D. (2009) The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat. Rev. Cancer*. **9**, 285–293.
158. Kalluri R. (2016) The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **16**, 582–598.
159. Velez D.O., Tsui B., Goshia T., Chute C.L., Han A., Carter H., Fraley S.I. (2017) 3D collagen architecture induces a conserved migratory and transcriptional response linked to vasculogenic mimicry. *Nat. Commun.* **8**, 1651.
160. Chaudhuri O., Koshy S.T., Branco da Cunha C., Shin J.W., Verbeke C.S., Allison K.H. (2014) Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium. *Nat. Mater.* **13**, 970–978.
161. Munson J.M., Shieh A.C. (2014) Interstitial fluid flow in cancer: implications for disease progression and treatment. *Cancer Manag. Res.* **6**, 317–328.
162. Cox T.R., Erler J.T. (2011) Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis. Model Mech.* **4**, 165–178.
163. Padera T.P., Meijer E.F., Munn L.L. (2016) The lymphatic system in disease processes and cancer progression. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **18**, 125–158.
164. Rennekamp A.J., Peterson R.T. (2015) 15 years of zebrafish chemical screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **24**, 58–70.
165. Chiu Y.-C., Chen H.-I.H., Zhang T., Zhang S., Gorthi A., Wang L.-J., Huang Y., Chen Y. (2019) Predicting drug response of tumors from integrated genomic profiles by deep neural networks. *BMC Med. Genom.* **12**, 18.
166. Rockne R.C., Hawkins-Daarud A., Swanson K.R., Sluka J.P., Glazier J.A., Macklin P., Hormuth D.A., Jarrett A.M., Lima E.A.B.F., Tinsley Oden J., Biros G., Yankeelov T.E., Curtius K., Al Bakir I., Wodarz D., Komarova N., Aparicio L., Bordyuh M., Rabadan R., Finley S.D., Enderling H., Caudell J., Moros E.G., Anderson A.R.A., Gatenby R.A., Kaznatcheev A., Jeavons P., Krishnan N., Pelesko J., Wadhwa R.R., Yoon N., Nichol D., Marusyk A., Hinczewski M., Scott J.G. (2019) The 2019 mathematical oncology roadmap. *Phys. Biol.* **16**(4), 041005.
167. Montero J., Sarosiek K.A., DeAngelo J.D., Maertens O., Ryan J., Ercan D., Piao H., Horowitz N.S., Berkowitz R.S., Matulonis U., Jänne P.A., Amrein P.C., Cichowski K., Drapkin R., Letai A. (2015) Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. *Cell*. **160**(5), 977–989.
168. Jamal-Hanjani M., Quezada S.A., Larkin J., Swanton C. (2015) Translational implications of tumor heterogeneity. *Clin. Cancer Res.* **21**(6), 1258–1266.
169. Stanta G., Bonin S. (2018) Overview on clinical relevance of intra-tumor heterogeneity. *Front. Med.* **5**, 85.
170. Zellmer V.R., Zhang S. (2014) Evolving concepts of tumor heterogeneity. *Cell Biosci.* **4**, 69.
171. Dienstmann R., Vermeulen L., Guinney J., Kopetz S., Tejpar S., Tabernero J. (2017) Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **17**, 79–92.
172. Zardavas D., Irrthum A., Swanton C., Piccart M. (2015) Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12**, 381–394.
173. Stephens P.J., Tarpey P.S., Davies H., Van Loo P., Greenman C., Wedge D.C., Nik-Zainal S., Martin S., Varela I., Bignell G.R. (2012) The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*. **486**, 400–404.
174. Perou C.M., Sørlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A. (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. **406**, 747–752.
175. Turajlic S., Sottoriva A., Graham T., Swanton C. (2019) Resolving genetic heterogeneity in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 404–416.
176. Dobroletcki L.E., Airhart S.D., Alferez D.G., Aparicio S., Behbod F., Bentires-Alj M., Briskin C., Bult C.J., Cai S., Clarke R.B. (2016) Patient-derived xenograft (PDX) models in basic and translational breast cancer research. *Cancer Metastasis Rev.* **35**, 547–573.

177. Pearson A.T., Finkel K.A., Warner K.A., Nör F., Tice D., Martins M.D., Jackson T.L., Nör J.E. (2016) Patient-derived xenograft (PDX) tumors increase growth rate with time. *Oncotarget*. **7**, 7793.
178. Perez D.R., Nickl C.K., Waller A., Delgado-Martin C., Woods T., Sharma N.D., Hermiston M.L., Loh M.L., Hunger S.P., Winter S.S. (2018) High-throughput flow cytometry identifies small-molecule inhibitors for drug repurposing in T-ALL. *SLAS Discov*. **23**(7), 732–741.
179. Ben-David U., Ha G., Tseng Y.-Y., Greenwald N.F., Oh C., Shih J., McFarland J.M., Wong B., Boehm J.S., Beroukhi R. (2017) Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nat. Genet*. **49**, 1567–1575.
180. Belderbos M.E., Koster T., Ausema B., Jacobs S., Sowdagar S., Zwart E., de Bont E., de Haan G., Bystrykh L.V. (2017) Clonal selection and asymmetric distribution of human leukemia in murine xenografts revealed by cellular barcoding. *Blood J. Am. Soc. Hematol*. **129**, 3210–3220.
181. Nguyen L.V., Cox C.L., Eirew P., Knapp D.J., Pellacani D., Kannan N., Carles A., Moksa M., Balani S., Shah S. (2014) DNA barcoding reveals diverse growth kinetics of human breast tumour subclones in serially passaged xenografts. *Nat. Commun*. **5**, 5871.
182. Shi J., Li Y., Jia R., Fan X. (2020) The fidelity of cancer cells in PDX models: characteristics, mechanism and clinical significance. *Int. J. Cancer*. **146**, 2078–2088.
183. Yin J., Zhao G., Kalirai H., Coupland S.E., Jochemsen A.G., Forn-Cuní G., Wierenga A.P.A., Jager M.J., Snaar-Jagalska B.E., Groenewoud A. (2023) Zebrafish patient-derived xenograft model as a preclinical platform for uveal melanoma drug discovery. *Pharmaceuticals*. **16**, 598.
184. Usai A., Di Franco G., Piccardi M., Cateni P., Pollina L.E., Vivaldi C., Vasile E., Funel N., Palmeri M., Dente L. (2021) Zebrafish patient-derived xenografts identify chemo-response in pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Cancers*. **13**, 4131.
185. Gamble J.T., Elson D.J., Greenwood J.A., Tanguay R.L., Kolluri S.K. (2021) The zebrafish xenograft models for investigating cancer and cancer therapeutics. *Biology*. **10**, 252.
186. Ai X., Ye Z., Xiao C., Zhong J., Lancman J.J., Chen X., Pan X., Yang Y., Zhou L., Wang X. (2022) Clinically relevant orthotopic xenograft models of patient-derived glioblastoma in zebrafish. *Dis. Model. Mech*. **15**, dmm049109.
187. Di Franco G., Usai A., Piccardi M., Cateni P., Palmeri M., Pollina L.E., Gaeta R., Marmorino F., Cremolini C., Dente L. (2022) Zebrafish patient-derived xenograft model to predict treatment outcomes of colorectal cancer patients. *Biomedicines*. **10**, 1474.
188. Martinez-Lopez M., Póvoa V., Fior R. (2021) Generation of zebrafish larval xenografts and tumor behavior analysis. *JoVE J. Vis. Exp*. **172**, e62373.
189. Clohessy J.G., Pandolfi P.P. (2015) Mouse hospital and co-clinical trial project – from bench to bedside. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. **12**, 491–498.
190. Yan C., Do D., Yang Q., Brunson D.C., Rawls J.F., Langenau D.M. (2020) Single-cell imaging of human cancer xenografts using adult immunodeficient zebrafish. *Nat. Protoc*. **15**, 3105–3128.
191. Blackburn J.S., Langenau D.M. (2014) Zebrafish as a model to assess cancer heterogeneity, progression and relapse. *Dis. Model. Mech*. **7**, 755–762.
192. Zhu J.J., Xu Y.Q., He J.H., Yu H.P., Huang C.J., Gao J.M., Dong Q.X., Xuan Y.X., Li C.Q. (2014) Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish. *J. Appl. Toxicol*. **34**(2), 139–148.
193. Ruchika, Sharma A., Saneja A. (2022) Zebrafish as a powerful alternative model organism for preclinical investigation of nanomedicines. *Drug Discov. Today*. **27**(5), 1513–1522.
194. de Souza Anselmo C., Sardela V.F., de Sousa V.P., Pereira H.M.G. (2018) Zebrafish (*Danio rerio*): a valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans? *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol*. **212**, 34–46.
195. Guarin M., Faelens R., Giusti A., De Croze N., Léonard M., Cabooter D., Annaert P., de Witte P., Ny A. (2021) Spatiotemporal imaging and pharmacokinetics of fluorescent compounds in zebrafish eleuthero-embryos after different routes of administration. *Sci. Rep*. **11**, 12229.
196. Goldstone J.V., McArthur A.G., Kubota A., Zanette J., Parente T., Jönsson M.E., Nelson D.R., Stegeman J.J. (2010) Identification and developmental expression of the full complement of cytochrome P450 genes in zebrafish. *BMC Genom*. **11**, 643.
197. Patton E.E., Zon L.I., Langenau D.M. (2021) Zebrafish disease models in drug discovery: from pre-clinical modelling to clinical trials. *Nat. Rev. Drug Discov*. **20**, 611–628.
198. Cully M. (2019) Zebrafish earn their drug discovery stripes. *Nat. Rev. Drug Discov*. **18**, 811–814.
199. MacRae C.A., Peterson R.T. (2015) Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov*. **14**, 721–731.
200. Fleming A., Alderton W. (2013) Zebrafish in pharmaceutical industry research: finding the best fit. *Drug Discov. Today Dis. Model*. **10**, e43–e50.
201. Zon L.I., Peterson R.T. (2005) *In vivo* drug discovery in the zebrafish. *Nat. Rev. Drug Discov*. **4**(1), 35–44.
202. Cabezas-Sáinz P., Pensado-López A., Sáinz B.Jr., Sánchez L. (2020) Modeling cancer using zebrafish xenografts: drawbacks for mimicking the human microenvironment. *Cells*. **9**(9), 1978.
203. Fazio M., Ablain J., Chuan Y., Langenau D.M., Zon L.I. (2020) Zebrafish patient avatars in cancer biology and precision cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. **20**, 263–273.
204. Gatzweiler C., Ridinger J., Herter S., Gerloff X.F., El-Harouni D., Berker Y., Imle R., Schmitt L., Kreth S., Stainczyk S. (2022) Functional therapeutic target validation using pediatric zebrafish xenograft models. *Cancers*. **14**, 849.
205. Spaink H.P., Cui C., Wiweger M.I., Jansen H.J., Veneman W.J., Marín-Juez R., de Sonnevile J., Ordas A., Torraca V., van der Ent W. (2013) Robotic injection of zebrafish embryos for high-throughput screening in disease models. *Methods*. **62**, 246–254.
206. Pulak R. (2016) Tools for automating the imaging of zebrafish larvae. *Methods*. **96**, 118–126.
207. Asokan N., Daetwyler S., Bernas S.N., Schmied C., Vogler S., Lambert K., Wobus M., Wermke M., Kempermann G., Huysken J. (2020) Long-term *in vivo* imaging reveals tumor-specific dissemination and captures host tumor interaction in zebrafish xenografts. *Sci. Rep*. **10**, 13254.
208. Almstedt E., Rosén E., Gloger M., Stockgard R., Hekmati N., Koltowska K., Krona C., Nelander S. (2022) Real-time evaluation of glioblastoma growth in patient-specific zebrafish xenografts. *Neuro-Oncology*. **24**, 726–738.

209. Di Franco G., Usai A., Funel N., Palmeri M., Montesanti I.E.R., Bianchini M., Gianardi D., Furbetta N., Guadagni S., Vasile E. (2020) Use of zebrafish embryos as avatar of patients with pancreatic cancer: a new xenotransplantation model towards personalized medicine. *World J. Gastroenterol.* **26**, 2792.
210. Sachs N., de Ligt J., Kopper O., Gogola E., Bounova G., Weeber F., Balgobind A.V., Wind K., Gracanin A., Begthel H. (2018) A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell.* **172**, 373–386.e310.
211. Bose S., Clevers H., Shen X. (2021) Promises and challenges of organoid-guided precision medicine. *Med.* **2**(9), 1011–1026.
212. Raynaud F., Mina M., Tavernari D., Ciriello G. (2018) Pan-cancer inference of intra-tumor heterogeneity reveals associations with different forms of genomic instability. *PLoS Genet.* **14**, e1007669.
213. Worst B.C., van Tilburg C.M., Balasubramanian G.P., Fiesel P., Witt R., Freitag A., Boudalil M., Previti C., Wolf S., Schmidt S. (2016) Next-generation personalised medicine for high-risk paediatric cancer patients – The INFORM pilot study. *Eur. J. Cancer.* **65**, 91–101.
214. Ali Z., Vildevall M., Rodriguez G.V., Tandiono D., Vamvakaris I., Evangelou G., Lolas G., Syrigos K.N., Villanueva A., Wick M. (2022) Zebrafish patient-derived xenograft models predict lymph node involvement and treatment outcome in non-small cell lung cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **41**, 58.
215. Costa B., Estrada M.F., Barroso M.T., Fior R. (2022) Zebrafish patient-derived avatars from digestive cancers for anti-cancer therapy screening. *Curr. Protoc.* **2**, e415.
216. Taylor K.L., Grant N.J., Temperley N.D., Patton E.E. (2010) Small molecule screening in zebrafish: an *in vivo* approach to identifying new chemical tools and drug leads. *Cell Commun. Signal.* **8**, 11.
217. Phillips J.B., Westerfield M. (2014) Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health. *Dis. Model. Mech.* **7**, 739–743.
218. Yoganantharajah P., Gibert Y. (2017) The use of the zebrafish model to aid in drug discovery and target validation. *Curr. Top. Med. Chem.* **17**, 2041–2055.

ZEBRAFISH XENOGRAPHS IN ONCOLOGY AND PERSONALIZED MEDICINE

N. A. Lunina^{1, *}, D. R. Safina¹, S. V. Kostrov¹

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

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

The bony fish *Danio rerio* (zebrafish) has become one of the important vertebrate model organisms in biomedical cancer research and is used, among other things, for the development of anticancer drugs using xenotransplantation approaches. The *ex utero* development of zebrafish, optically transparent tissues in the first month of growth, as well as the immature adaptive immune system during this period greatly facilitate the manipulation of embryos. For highly aggressive cancers where patient survival may be expected to be only a few months, the zebrafish xenograft assay may be the only appropriate method as it requires only 4 to 7 days. Thousands of embryos can be implanted with biopsy tissue from a patient to produce zebrafish xenografts and use them to automatically screen a large number of drugs and compounds to develop an effective treatment regimen for a specific patient. The review examines the advantages and disadvantages of the zebrafish model in oncology research. The main focus is on the use of zebrafish xenografts to study metastasis and create avatars in personalized medicine.

Keywords: human malignancies, zebrafish, *Danio rerio*, xenografts, metastasis, avatar, personalized medicine

УДК 581.19:578.74

РЕКОМБИНАНТНЫЕ VLP-ВАКЦИНЫ, СИНТЕЗИРУЕМЫЕ В РАСТИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ ЭКСПРЕССИИ: СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

© 2024 г. С. М. Розов^{а, *}, Е. В. Дейнеко^{а, **}^аИнститут цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: rozov@bionet.nsc.ru

**e-mail: deineko@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 17.11.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принята к публикации 20.12.2023 г.

Разработка и создание вакцин нового поколения на основе рекомбинантных белков, собирающихся в вирусоподобные частицы (virus-like particles, VLP), а также рекомбинантных белков в виде наночастиц — перспективные направления современной биотехнологии. За счет больших размеров (20–200 нм) и многократно повторенных антигенных детерминант рекомбинантные VLP-вакцины позволяют стимулировать сильные гуморальные и клеточные иммунные ответы. Кроме того, эти вакцины безопасны, так как не содержат чужеродного генетического материала. В обзоре рассмотрены типы VLP, а также особенности и недостатки экспрессионных систем, применяемых для их биосинтеза. Основной акцент сделан на растительные экспрессионные системы, обеспечивающие биосинтез целевого рекомбинантного белка с матрицы, интегрированной в ядерный или хлоропластный геном растения (стабильная экспрессия), либо с матрицы, предназначенной для временной наработки целевого продукта (транзистентная экспрессия). Рассмотрены различные пути увеличения выхода VLP-формирующих рекомбинантных белков, в том числе с использованием сигнальных пептидов, направляющих белок в хлоропласты. Также обсуждены перспективы использования специальных сигнальных последовательностей для транспорта VLP-образующих рекомбинантных белков и их накопления в других наночастицах — белковых тельцах.

Ключевые слова: рекомбинантные белки, вирусоподобные частицы, растительные системы экспрессии, стабильная экспрессия, транзистентная экспрессия, VLP-вакцины

DOI: 10.31857/S0026898424030047, EDN: JDBSNP

ВВЕДЕНИЕ

Подавляющее большинство вакцин, используемых в настоящее время, получено классическими способами. Это либо инактивированные, либо живые аттенуированные патогены. Несколько особняком стоят вакцины, получаемые на основе

инактивированных токсинов микроорганизмов и формирующие антитоксический иммунитет. Хотя эти традиционные вакцины многие годы с успехом применяют против широкого круга инфекционных заболеваний, они не лишены недостатков, связанных в основном с низкой иммуногенностью [1]. Поразившая весь мир пандемия COVID-19 заставила научное сообщество задуматься о разработке новых вакцин, высокоэффективных и иммуногенных. Сейчас основная задача состоит в том, чтобы разработать новые технологические подходы, которые позволят повысить иммуногенность вакцин без ущерба для их безопасности и переносимости. Последние достижения в создании вакцин на основе ДНК, мРНК и рекомбинантных вирусных векторов — новое направление в борьбе с трудноизлечимыми и новыми инфекционными заболеваниями [2]. Активно разрабатываемая в настоящее время технология вирусоподобных частиц (virus-like particles, VLP) представляет собой альтернативную платформу для разработки эффективных вакцин. Она основана на рекомбинантных антигенах,

Сокращения: VLP (virus-like particles) — вирусоподобные частицы; AIMV (alfalfa mosaic virus) — вирус мозаики люцерны; CCMV (cowpea chlorotic mosaic virus) — вирус хлоротичной пятнистости вьюн; CMV (cucumber mosaic virus) — вирус огуречной мозаики; CPMV (cowpea mosaic virus) — вирус мозаики вьюн; HBV (hepatitis B virus) — вирус гепатита В; HCV (hepatitis C virus) — вирус гепатита С; HPV (human papillomavirus) — вирус папилломы человека; MaMV (malt virus) — вирус мозаики ячменя; PapMV (papaya mosaic virus) — вирус мозаики папайи; PhMV (physalis mottle virus) — вирус пятнистой мозаики физалиса; PTM (post-translation modification) — посттрансляционные модификации; PVY (potato virus Y) — вирус Y картофеля; TEV (tobacco etch virus) — вирус увядания табака; TMV (tobacco mosaic virus) — вирус табачной мозаики; ОРБ — общий растворимый белок.

синтезируемых в различных системах экспрессии и способных собираться в VLP. Эта технология развивается параллельно с вакцинами на основе ДНК, мРНК и вирусных векторов [3]. VLP-вакцины гораздо более иммуногенны по сравнению с субъединичными, ДНК- и РНК-вакцинами, так как содержат многократно повторяющиеся антигенные эпитопы/детерминанты в правильной конформации, которые иммунная система эффективно распознает. Заметим, что низкая иммуногенность субъединичных вакцин часто обусловлена именно неправильной конформацией целевого антигена [4]. Кроме того, в случае субъединичных и мРНК- и ДНК-вакцин чаще всего необходимо введение в их состав адъювантов и проведение повторных вакцинаций для индукции протективного иммунного ответа [5].

Изначально, с середины XX века, термин “virus-like particles” использовали в вирусологии для обозначения видимых при электронной микроскопии частиц, которые предположительно были вирусами. С развитием биотехнологии этот термин приобретает новое значение: сейчас под VLP понимают частицы, лишенные вирусного генетического материала, состоящие только из капсидных и/или других вирусных белков [6]. Впервые VLP были получены в 1968 году в результате реассоциации белков оболочки вируса хлоротической крапчатости вигны (cowpea chlorotic mottle virus, CCMV) [7]. В 1976 году были получены VLP на основе белков вируса мозаики папайи (papaya mosaic virus, PapMV) [8]. Платформа VLP позволяет решать различные проблемы, которые связаны с традиционными вакцинами: возможную реверсию к вирулентной форме аттенуированных штаммов патогенов, низкую иммуногенность, длительный период формирования иммунного ответа для инактивированных вакцин, — и обеспечить сильный иммунный ответ [9]. VLP — это мультимерные самособирающиеся комплексы одного или нескольких вирусных белков, которые образуют наночастицы размером 20–200 нм (в случае палочковидных или нитевидных вирусов длина может быть больше), по форме близкие к нативному вирусу, но лишенные его генетического материала и поэтому не способные к репликации [9]. VLP могут служить вакциной не только от вирусов, белки которых были использованы для их сборки, но также содержать иммуногенные эпитопы других патогенов. Для их получения используют методы конъюгации белков, слияния генов или химической модификации. Это так называемые химерные, или гибридные, VLP [9, 10]. Благодаря своим размерам VLP свободно проникают в лимфатические узлы и легко узнаются антигенпрезентирующими клетками, что повышает их иммуногенность по сравнению с другими вакцинами как на гуморальном, так и клеточном уровне [11]. Наличие множества копий антигена на их поверхности — еще один фактор, увеличивающий

эффективность VLP-вакцин. Кроме того, использование VLP в качестве вакцин гораздо безопаснее по сравнению с классическими и нуклеиновыми вакцинами, так как они не содержат генетического материала патогенов.

VLP могут быть синтезированы в различных экспрессионных системах, как прокариотических (*Escherichia coli*), так и эукариотических (дрожжи, клетки млекопитающих и насекомых, растения и их клеточные культуры). В представленном обзоре рассмотрены в основном VLP-вакцины, синтезируемые в растительных системах экспрессии. Растительные системы, по сравнению с другими, имеют ряд преимуществ.

Так как многие вирусные белки гликозилированы, а прокариоты не способны к посттрансляционным модификациям (post-translation modification, PTM), то для получения эффективных VLP-вакцин предпочтение отдают эукариотическим системам экспрессии. Паттерны гликозилирования у растений и животных сильно отличаются, поэтому для синтеза VLP предпочитают использовать гуманизированные растения или культуры их клеток [10]. Растительные системы экспрессии требуют значительно меньших материальных затрат, чем культуры клеток млекопитающих, легко масштабируются и лишены опасности контаминации патогенами человека и животных. Кроме того, вакцины на основе VLP вирусов растений, а также животных безопасны для окружающей среды в целом, так как лишены вирусного генетического материала. Проблемы низкого уровня экспрессии VLP в клетках растений и сайленсинга случайно встроенных в геном целевых генов в большинстве случаев могут быть решены в системах транзientной экспрессии с использованием репликонных систем вирусов растений: например, BeYDV-репликона [12, 13] и MagnICON [13, 14], созданных на основе вирусов желтой карликовости фасоли (bean yellow dwarf virus, BeYDV) и табачной мозаики (tobacco mosaic virus, TMV) соответственно.

СТРУКТУРА И ТИПЫ ВИРУСОПОДОБНЫХ ЧАСТИЦ

VLP образуются в результате самопроизвольного взаимодействия одного или нескольких белков вируса, образуя единую наноструктуру. VLP структурно похожи на вирусную частицу, но лишены вирусного генома или содержат только его фрагмент. Чаще всего VLP собираются в сферические, палочковидные или нитевидные структуры — в зависимости от вида формирующего их вируса. VLP, состоящие из одного белка, имеют относительно простое строение, в то время как мультибелковые VLP могут содержать два или даже три слоя, причем с разной структурой. Более сложные VLP, например на основе белков вируса иммунодефицита

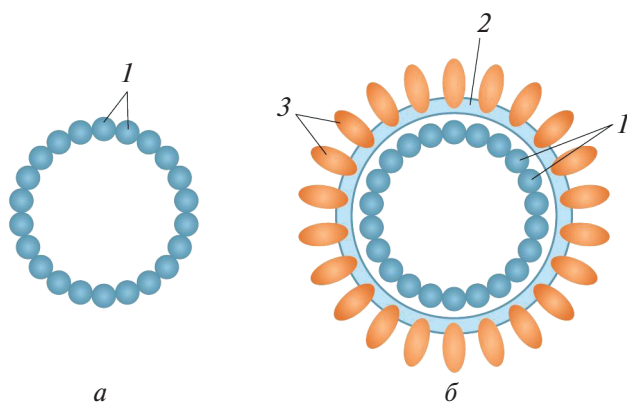


Рис. 1. Общая схема строения безоболочечных (а) и оболочечных (б) VLP. 1 — Структурный белок вируса, формирующий монобелковую VLP (если вирусных белков несколько, то они формируют мультibelковую VLP, в которой может быть уже несколько слоев); 2 — фосфолипидная мембрана, образованная из мембраны эндоплазматического ретикулума клетки-продуцента; 3 — вирусные мембранные или трансмембранные гликопротеины.

человека типа 1 (ВИЧ-1) или вируса гриппа, имеют внешнюю фосфолипидную мембрану, в которую встроены антигенные детерминанты поверхностных белков вируса. По этому признаку принято делить VLP на два типа: безоболочечные, состоящие только из вирусных белков, и оболочечные (eVLP), окруженные фосфолипидной мембраной, заимствованной у клетки-продуцента (рис. 1). Необходимость формирования у eVLP мембраны со встроенными вирусными гликопротеинами ограничивает выбор экспрессионных систем для их синтеза. Оба типа VLP могут нести эпитопы чужеродных антигенов, присоединенные к вирусным белкам тем или иным способом (конъюгация на уровне белков, слияние генов, химическая модификация) [15].

Безоболочечные VLP

Безоболочечные VLP состоят из множества молекул одного или 2–3 самособирающихся вирусных белков и не имеют фосфолипидной мембраны хозяина (рис. 1). Для их образования обычно достаточно экспрессии генов, кодирующих соответствующие белки, в используемой системе. Безоболочечные VLP до сих пор остаются наиболее привлекательной платформой для создания вакцин против многих патогенов, так как их легко получать и очищать [16]. Более того, безоболочечные VLP имеют значительно меньшие размеры, чем оболочечные, что позволяет им проходить через тканевые барьеры и проникать в лимфоузлы [17]. Безоболочечные VLP делятся на моно- и мультibelковые, а также на одно-, двух- и трехслойные. В качестве примера монобелковых VLP можно привести вакцины на основе вируса папилломы человека (human papillomavirus, HPV).

Единственный капсидный белок этого вируса можно экспрессировать как в прокариотических, так и в эукариотических системах. В некоторых случаях простые VLP могут быть сформированы в бесклеточной среде. В этом случае растворимый белок сначала нарабатывается в клетке, а затем выводится наружу, где собирается в VLP правильной конфигурации [18, 19].

Получение мультibelковых безоболочечных VLP — более трудная задача. Они чаще всего многослойные, со сложным взаимодействием мономеров друг с другом [20]. Эти VLP обычно синтезируются и собираются в эукариотических системах экспрессии, таких как дрожжи [21], клетки насекомых [22] и растений [23]. Разные белки мультibelковых VLP могут быть синтезированы и собраны в одной клетке. В качестве примера мультibelковых многослойных VLP можно привести синтезированные в клетках насекомых VLP на основе белков вирусов блятанг [24], энтеровируса-71 [25], полиовируса [26] и ротавируса [27]. Также мультibelковые VLP были получены из белков L1 и L2 HPV 16 типа (HPV-16) [28].

Оболочечные VLP (eVLP)

По сравнению с безоболочечными, eVLP имеют более сложное строение (рис. 1). У них есть внешняя фосфолипидная мембрана, происходящая из клетки-хозяина, с заякоренными в ней одним или несколькими вирусными гликопротеинами [29]. Эти поверхностные гликопротеины служат главными антигенами для образования нейтрализующих эти вирусы антител. Для формирования eVLP необходимо выполнение следующих условий: совместной экспрессии нескольких генов структурных белков вируса, сборки их в наночастицы в клетке и высвобождения последних наружу. Сборка кора VLP и приобретение фосфолипидной оболочки предположительно происходят в эндоплазматическом ретикулуме [30, 31]. К сожалению, минимальные компоненты, необходимые для образования eVLP, недостаточно хорошо изучены и варьируют от вируса к вирусу. Обычно их образование происходит в два этапа. Сначала из структурных белков вируса собирается кор VLP, который затем инкапсулируется мембраной, чаще всего происходящей из эндоплазматического ретикулума клетки-хозяина. На этом же этапе к образованной фосфолипидной мембране eVLP присоединяются вирусные гликопротеины, представляющие его основные антигенные детерминанты. Самосборка eVLP и выход их из клетки зависят как от структуры белков кора, так и гликопротеиновой оболочки вируса или от того и другого [32–34]. Так, для образования eVLP ретровирусов, например ВИЧ-1, достаточно экспрессии гликопротеина Gag, а в случае флавивирусов и коронавирусов — только гликопротеина оболочки [29].

Правильный фолдинг и гликозилирование поверхностных антигенов вируса в составе оболочечных eVLP-вакцин — чрезвычайно важные факторы для эффективного распознавания патогенов иммунной системой хозяина [35]. Например, мутантный вирус Зика, содержащий негликозилированный белок оболочки (Е), не вызывает у млекопитающих серьезного заболевания и индуцирует слабый иммунный ответ [36]. Показано, что гликозилирование белка Е — один из факторов патогенности вируса Денге (DENV) [37]. Поскольку eVLP имеют фосфолипидную мембрану, полученную от клетки-хозяина, они значительно более чувствительны, чем безоболочечные VLP, к условиям внешней среды. Так, температурные сдвиги, а также процессы выделения и очистки могут привести к нежелательным воздействиям на их структуру. В некоторых случаях eVLP подвергают модификациям, вводя в них мутации, повышающие устойчивость к повышенной температуре [38]. Наиболее известны eVLP вируса гриппа [39], ретровирусов [40] и вируса гепатита С (hepatitis C virus, HCV) [30]. Сконструированы eVLP вируса болезни Ньюкасла, которые формировались при одновременной экспрессии белков HN, F, NP и М в клетках птиц. Эти наночастицы структурно напоминали нативные вирионы, сохраняли функциональную активность ассоциированных с оболочкой гликопротеинов. Эффективность формирования этих eVLP составила 84%, что позволяет получать их в больших количествах, необходимых для производства вакцины [41].

Химерные VLP

Химерные VLP, наряду со структурными белками одного вируса, содержат еще белки или иммуногенные эпитопы других патогенов. Химерные VLP считают наиболее эффективным инструментом для разработки вакцин, которые обеспечивают широкую и мощную комплексную защиту от инфекционных заболеваний [42]. Такие сложные наноструктуры, содержащие иммуногенные эпитопы разных вирусов, могут быть сконструированы с использованием рекомбинантных векторов, содержащих как гены структурных вирусных белков, формирующих VLP, так и гены пептидов или белков других патогенов [43]. Химерные VLP имеют на своей поверхности множество сайтов, к которым методами генной инженерии или химической модификации могут быть присоединены антигены других вирусов [44]. Химерные VLP могут быть созданы как на основе безоболочечных, так и оболочечных вирусов. Несколько вакцин на основе химерных VLP уже проходят клинические испытания, включая вакцины против гепатита В (M2-HBcAg) и против малярии (MalariaVax) [29]. Также сконструированы вакцины против вируса гриппа A/Udorn/72 (H3N2) [43] и ВИЧ-1 [45, 46].

Химерные VLP-вакцины значительно более иммуногенны, чем субъединичные, и индуцируют сильный не только В-клеточный, но и Т-клеточный иммунные ответы, включая как CD4⁺, так и CD8⁺ лимфоциты [47].

Разработаны и проходят клинические испытания химерные VLP-вакцины, предназначенные для борьбы с неинфекционными заболеваниями. На основе бактериофага Q β созданы химерные VLP против артериальной гипертензии, рака, аллергического ринита, астмы, диабета, болезни Альцгеймера и даже от никотиновой зависимости [48, 49]. В экспериментах на животных продемонстрирована высокая эффективность вакцин против малярии [50, 51], некоторых онкологических [44, 51] и аутоиммунных заболеваний [49], болезни Альцгеймера [51, 52] и аллергических реакций [51]. Эти потенциальные вакцины, основанные на VLP вирусов растений: вируса огуречной мозаики (cucumber mosaic virus, CMV), вируса мозаики вигны (cowpea mosaic virus, CPMV) и TMV, — были высокоэффективны в экспериментах на животных [49–53].

ЭКСПРЕССИОННЫЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА VLP. РАСТИТЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ

Для производства VLP-вакцин могут быть использованы различные системы экспрессии — как прокариотические, так и эукариотические. У каждой платформы есть свои преимущества и недостатки; их выбор определяется строением и сложностью получаемых VLP, а также балансом между выходом продукта и стоимостью процесса наработки рекомбинантного белка [11]. Эукариотические системы включают *Baculovirus/insect cells* (B/IC) [29], культуры клеток млекопитающих [54] и растения или их клеточные культуры [23]. Правильный выбор экспрессионной системы — важнейший фактор обеспечения корректного фолдинга и РТМ белков, образующих VLP. Третичная структура VLP-формирующих вирусных белков и строение VLP могут различаться в разных экспрессионных системах из-за различий в гликозилировании и фосфорилировании, что влияет на иммуногенность вакцины, так как РТМ антигенов часто необходимы для стимуляции иммунного ответа [54].

Нерастительные экспрессионные системы: преимущества и недостатки

Бактерии, в основном *Escherichia coli*, относятся к широко используемым экспрессионным системам для получения VLP. Однако в связи с рядом факторов, таких как отсутствие системы РТМ, неправильное формирование дисульфидных связей и низкая растворимость синтезируемых

рекомбинантных белков, бактериальные системы не подходят для синтеза eVLP [16], хотя вполне удовлетворяют требованиям для получения безоболочечных VLP с одним или двумя структурными вирусными белками [54].

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* часто используют для синтеза VLP, так как они быстро растут, продуцируют высокие уровни рекомбинантных белков, производят некоторые РТМ, их культивирование не требует больших затрат и легко масштабируемо. Однако отсутствие метаболических путей для осуществления сложных РТМ, высокоманнозное гликозилирование, более низкий по сравнению с бактериальными системами экспрессии выход рекомбинантных белков и склонность к потере плазмид значительно ограничивают использование дрожжевой платформы для синтеза VLP [29]. Тем не менее в дрожжевых системах экспрессии получены эффективные VLP-вакцины, например против вируса гепатита В (hepatitis B virus, HBV). Несмотря на отличные от клеток млекопитающих паттерны РТМ, эта вакцина индуцировала высокий иммунный ответ [10].

Бакуловирусные системы экспрессии в культурах клеток насекомых (В/IC-системы) наиболее распространены для получения как безоболочечных, так и eVLP [29]. В этих системах уровни синтезируемых рекомбинантных белков сопоставимы с бактериальными и дрожжевыми платформами. В клетках насекомых происходят сложные РТМ и формируются мультибелковые VLP [55]. К основным недостаткам В/IC-платформы относятся более простые по сравнению с млекопитающими паттерны N-гликозилирования, что может быть неприемлемо для некоторых VLP, а также плохая масштабируемость и высокая стоимость по сравнению с бактериальными системами экспрессии. Следует подчеркнуть, что паттерны гликозилирования могут быть изменены введением в геном клеток насекомых гликозилтрансфераз млекопитающих [56].

Культуры клеток млекопитающих и птиц считаются идеальной платформой для производства как безоболочечных, так и eVLP-вакцин, но и они не лишены недостатков. Это, прежде всего, высокая стоимость, трудности с масштабированием и возможность загрязнения патогенами клеток-продуцентов [29]. Бесклеточные экспрессионные системы имеют ряд преимуществ по сравнению с клеточными платформами и позволяют быстро набирать требуемое количество VLP, не загрязненных клетками и клеточными компонентами. Но их коммерческое использование ограничено высокой стоимостью и плохой масштабируемостью [55, 57].

Растительные экспрессионные системы: преимущества и недостатки

Растительные системы экспрессии, как целые растения, так и их суспензионные клеточные культуры, обладают, по сравнению с другими экспрессионными платформами, рядом преимуществ. Это низкая стоимость производства и очистки рекомбинантных белков и VLP, возможность масштабирования, комплексное гликозилирование белков и отсутствие возможности контаминации патогенами млекопитающих. Современные технологии транзientной экспрессии, такие как MagnICON, BeYDV-репликон [12–14], Magniffection [58] и CPMV-НТ [59], основанные на репликациях вирусов растений, позволяют быстро, в течение нескольких суток, синтезировать в растениях до 5 г рекомбинантного белка на 1 кг сырой биомассы (до 80% общего растворимого белка) [58]. Общая схема растительных систем экспрессии, используемых для наработки рекомбинантных белков для получения VLP-вакцин, представлена на рис. 2.

Транзientная и ядерная системы экспрессии для наработки VLP-вакцин в растениях

Химерные или модифицированные вирусы растений, безопасные для животных и человека, широко используют в биотехнологии для создания вакцин. Более 50 вирусов растений в настоящее время служат основой для создания VLP и химерных вирусов, несущих на своей поверхности чужеродные антигены. Среди них TMV, CMV, вирус мозаики люцерны (AIMV), CPMV, CCMV, PapMV и X- и Y-вирусы картофеля (PVX и PVY соответственно). Химерные вирусы TMV, PVX, CPMV и CCMV оказались наиболее стабильными при высоких температурах и щелочных pH и могут быть получены в больших количествах в растениях-хозяевах [29, 60]. Показано, что CPMV и вирус легкой крапчатости перца (pepper mild mottle virus, PMMoV) высокостабильны в условиях пищеварительного тракта человека [61] и, следовательно, могут быть использованы для создания так называемых “съедобных” вакцин. Также многие вирусы растений используются или могут найти применение в дальнейшем для создания химерных VLP-вакцин [49, 62]. В табл. 1 представлены некоторые примеры такого использования растительных вирусов.

Помимо специфического иммунного ответа, вызванного присоединенными чужеродными антигенами, гибридные VLP на основе вирусов растений и целые модифицированные растительные вирусы способны вызывать сильные неспецифические иммунные реакции, то есть могут выступать в качестве сильных адъювантов. Этот эффект особенно важен при лечении неинфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний. Собственные антигены, расположенные на поверхности VLP вирусов растений, взаимодействуют

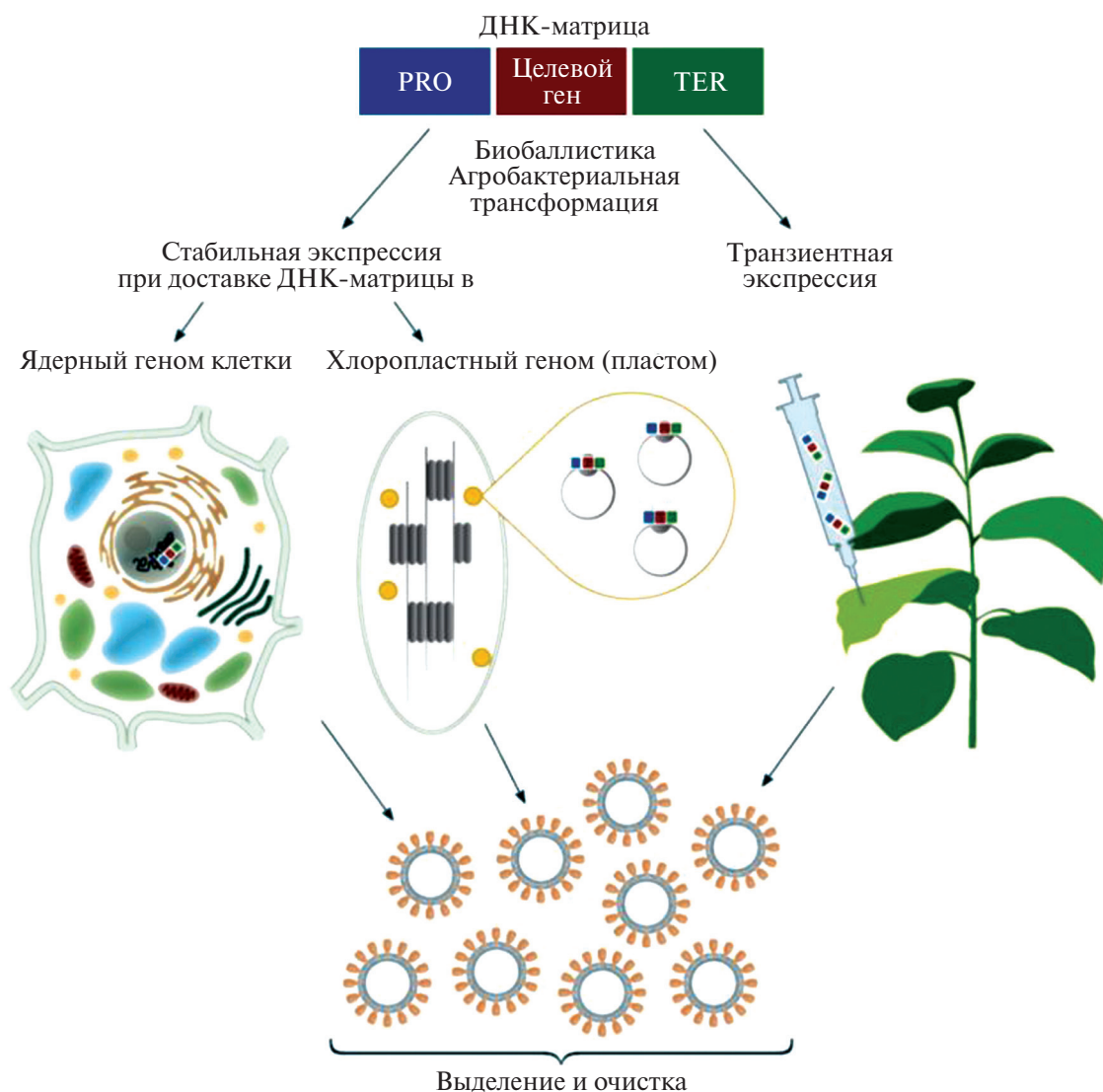


Рис. 2. Схема биосинтеза рекомбинантных VLP в растительной системе экспрессии. Обозначения: PRO – промотор, TER – терминатор.

с антигенпрезентирующими комплексами, что приводит к активации и увеличению числа нейтрофилов, макрофагов и дендритных клеток и, следовательно, к выработке широкого спектра интерлейкинов и хемокинов. Так, VLP на основе белков CPMV, как и исходный вирус, проявляют иммуномодулирующую активность, которая индуцирует регрессию опухоли [60]. За последние годы разработано более 100 экспериментальных вакцин, основанных на вирусах растений и их VLP. Они предназначены как для человека, так и для использования в ветеринарии и направлены против широкого круга заболеваний, включая онкологические, инфекционные и аутоиммунные [49–53]. В трех системах, использующих репликоны модифицированных вирусов растений (часть нежелательных или подлежащих контролю функций вируса передана другим компонентам экспрессионной системы), выявлено значительное усиление экспрессии

VLP вирусов растений при транзientной экспрессии. Это основанная на РНК-репликоне TMV система MagnICON [13, 14], на РНК-репликоне CPMV система CPMV-HT [59] и на ДНК-репликоне геминивирuсов система BeYDV [12, 13].

Растительные системы экспрессии также широко используют для получения VLP на основе вирусов животных и человека. VLP безоболочечного вируса Норволк (Norwalk virus, NV), этиологического агента гастроэнтерита, успешно синтезированные в стабильно трансформированных растениях томата, картофеля, табака и салата, имели структуру, сходную с нативным NV, реплицирующимся в клетках кишечника человека. Очищенные VLP проявляли высокую иммуногенность на мышинной модели. Однако в этих системах экспрессии синтез VLP NV проходил медленно и выход составлял менее 1% от общего растворимого белка (ОРБ), что

Таблица 1. Вирусы растений, используемые для создания кандидатных VLP-вакцин

VLP-формирующий вирус	Заболевание	Патоген	Антиген	Система экспрессии	Источник
AIMV	бешенство, гидрофобия	вирус бешенства	пептид Drg24 гликопротеина G (5–24 а.о.) и 31D-эпитоп	<i>Nicotiana benthamiana</i>	[63]
	ВИЧ-инфекция	ВИЧ-1	V3-домен белка gp120	<i>N. benthamiana</i>	[63]
	малярия	<i>Plasmodium falciparum</i>	белок Pfs25	<i>N. benthamiana</i>	[64]
	респираторная инфекция нижних дыхательных путей	респираторно-синцитиальный вирус	пептид G-белка (21 а.о.)	<i>E. coli</i>	[65]
CCMV	столбняк	<i>Clostridium tetani</i>	тетанотоксин	<i>E. coli</i>	[66]
	стрептококковая инфекция	<i>Streptococcus agalactiae</i>	пептид S9	<i>Pichia pastoris</i>	[67]
CPMV	стрептококковая инфекция	<i>Streptococcus agalactiae</i>	пептид S9	<i>P. pastoris</i>	[67]
	парвовирусный энтерит собак	парвовирус собак	пептид 3L17 белка VP2	<i>Vigna unguiculata</i>	[68]
PVY	гепатит В	HBV	эпитоп preS1	<i>E. coli</i>	[69]
	аллергия на кошек		аллерген кошек Fel d1	<i>E. coli</i>	[70]
MaMV ^a	грипп	вирусы гриппа А (H1N1 и H3N8)	M2e-пептид белка M2	<i>E. coli</i>	[71]
PhMV ^b	рак молочной железы		СН401-эпитоп белка HER2	<i>E. coli</i>	[72]
PapMV	гепатит С	HCV	эпитоп E2	<i>E. coli</i>	[73]
	грипп, пневмония	вирус гриппа и <i>Streptococcus pneumoniae</i>	некодирующая оцРНК	<i>E. coli</i>	[74]
	листериоз	<i>Listeria monocytogenes</i>	некодирующая оцРНК	<i>E. coli</i>	[75]
TMV	поражения кожи и слизистых у кроликов	папилломавирусы кролика CRPV/ROPV ^c	эпитопы белка L2	<i>N. benthamiana</i> <i>N. tabacum</i>	[76]
CMV	псориаз		IL-17 + Т-клеточный эпитоп титанотоксина	<i>E. coli</i>	[77]
	аллергия на кошек		Fel d1 + Т-клеточный эпитоп титанотоксина		
	болезнь Альцгеймера		Aβ _{1–6} -эпитоп β-амилоида + Т-клеточный эпитоп титанотоксина		
TEV ^d	репродуктивный и респираторный синдром свиней	PRRSV ^e	эпитопы белков GP3, GP4, GP5 и М	<i>E. coli</i>	[78]

^aвирус мозаики мальвы (malva mosaic virus);^bвирус пятнистой мозаики физалиса (physalis mottle virus);^cвирусы папилломы кролика (Cottontail rabbit papillomavirus) и оральной папилломы кролика (Rabbit oral papillomavirus);^dвирус увядания табака (tobacco etch virus);^eвирус репродуктивного и респираторного синдрома свиней (porcine reproductive and respiratory syndrome virus).

ограничивало их возможное использование в качестве вакцины. В системах транзientной экспрессии MagnICON и BeYDV удалось повысить выход этих VLP более чем в 80 раз и получить в листьях *Nicotiana benthamiana* через 12 суток после инфильтрации 0.86 мг/г сырой биомассы [13].

Транзientная экспрессионная система CPMV-НТ, основанная на репликоне CPMV, была использована для синтеза гетеромультимерных VLP вирусов гриппа А (H1N1 и H5N1) в листьях *N. benthamiana*. Показано, что в этой транзientной системе можно за несколько дней синтезировать в растении значительные количества VLP обоих штаммов вируса гриппа. Вирус гриппа оболочечный и содержит на поверхности вириона два белка: нейраминидазу (NA) и гемагглютинин (HA). Гликопротеин HA несет основные антигенные детерминанты вируса гриппа. Показано, что для создания сильного иммунного ответа достаточно присутствия на поверхности VLP белка HA. При транзientной экспрессии HA в *N. benthamiana* образовавшиеся VLP концентрировались в пространстве между цитоплазматической мембраной и клеточной стенкой, что облегчало их выделение. Авторами показано, что на платформе CPMV-НТ можно продуцировать в растении химерные VLP, несущие HA сразу нескольких штаммов вируса гриппа, что значительно расширяет спектр действия вакцины. Процесс легко масштабировать и получать за месяц столько доз вакцины, сколько другими конвенциональными методами достигается за год [79]. Эта же транзientная система была использована для создания VLP вируса птичьего гриппа А(H7N9); их высокая иммуногенность продемонстрирована на мышинной модели [80]. На базе транзientной платформы CPMV-НТ в листьях *N. benthamiana* получены VLP, сформированные четырьмя белками вируса африканской чумы лошадей (African horse sickness virus, AHSV). Протестирована способность этой вакцины вызывать сильный иммунный ответ на AHSV в экспериментах на морских свинках [81]. В последнее время для синтеза рекомбинантных белков и VLP в промышленных масштабах широко используют основанную на системе CPMV-НТ платформу транзientной экспрессии pEAQ-НТ, обеспечивающую высокий выход целевых продуктов [82].

Вирион HBV несет поверхностный белок HBsAg, способный формировать VLP. Ген, кодирующий HBsAg, перенесли в геномы картофеля, томата, люпина и салата и из биомассы этих растений выделили VLP HBsAg. Однако их выход был очень низким — микрограммы на грамм сырого веса, что недостаточно для дальнейшего их использования в качестве растительной вакцины. И только использование платформы транзientной экспрессии позволило повысить выход VLP HBsAg до 2 мг/г [60, 83]. Следовательно, этот подход можно считать перспективным для создания вакцины против гепатита В.

На основе AIMV и поверхностного белка Pfs25 малярийного плазмодия (*Plasmodium falciparum*) создана антималярийная вакцина Pfs25 VLP-FhCMB (Fraunhofer USA Center for Molecular Biotechnology, США), транзientно нарабатываемая в листьях *N. benthamiana*; в ходе клинических испытаний продемонстрирована ее безопасность и высокая иммуногенность [50, 84]. Канадская биофармацевтическая компания “Medicago Inc.” разработала эффективную платформу транзientной экспрессии рекомбинантных белков в листьях *N. benthamiana* для получения VLP-вакцин против инфекций, вызванных вирусами гриппа, коронавирусами, ротавирусами и норовирусами [85]. Недавно компания сообщила о создании квадριвалентной VLP-вакцины, защищающей сразу от 4 штаммов сезонных вирусов гриппа. В ходе клинических испытаний этой вакцины выявлена высокая иммуногенность и сильный гуморальный и клеточный иммунный ответ [86].

Этот же подход был использован для создания VLP-вакцины Covifenz (разработка Medicago in Canada & GlaxoSmithKline, UK) против SARS-CoV-2, содержащей рекомбинантный белок шипа (S), модифицированный для улучшения его стабильности и формирования VLP. S-белок образует тримеры, заякоренные в липидной оболочке VLP, сформированной из клеточной мембраны *N. benthamiana* [87]. Протективная эффективность вакцины Covifenz составляет 78.8% [88]. Другая VLP-вакцина против SARS-CoV-2, разработанная компанией “Kentucky Bioprocessing” (США), KBP-201, основана на VLP TMV и рецепторсвязывающем домене (receptor-binding domain, RBD) белка S. Оба компонента были совместно синтезированы в транзientной системе *N. benthamiana* и затем химически сшиты в процессе очистки. Для повышения стабильности вакцины KBD-201 последовательность RBD белка S была слита с Fc-доменом IgG1 человека, а также с пептидом экстенсина *N. benthamiana*, обеспечивающим секрецию рекомбинантного белка в апопласт [89]. В экспериментах на мышах показана протективная эффективность этой вакцины: около 100% при двукратном введении [90]. Серию SARS-CoV-2 VLP-вакцин разрабатывает компания “iBio, Inc.” (США): IBIO-200, IBIO-201 и IBIO-202. Вакцины основаны на полноразмерном S-белке с применением технологии FastFarming и транзientной системы экспрессии в *N. benthamiana* [91].

Вирус Зика (Zika virus, ZIKV) относится к семейству Flaviviridae, как и вирусы Денге (Dengue virus, DENV), Западного Нила (West Nile virus, WNV), клещевого энцефалита (tick-borne encephalitis virus, TBEV), японского энцефалита (Japanese encephalitis virus, JEV) и желтой лихорадки (yellow fever virus, YFV). Гликопротеин оболочки ZIKV (zE) состоит из трех доменов (EDI, EDII и EDIII) и отвечает

за сборку вируса, прикрепление к клеточным рецепторам и последующее слияние мембран при проникновении вируса в клетку. Гликопротеин zE также — основная мишень иммунного ответа хозяина [92]. Поскольку вирусы ZIKV и DENV генетически очень близки и эти инфекции совместно циркулируют в человеческой популяции, то вакцины против одной инфекции могут вызывать перекрестные реакции с другой и, как следствие, приводить к антителозависимому усилению инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE) второго возбудителя, что затрудняет создание вакцин [93]. Экспериментальная VLP-вакцина против ZIKV, основанная на структурном белке нуклеокапсида (coat protein, HBcAg) HBV, слитого с EDIII ZIKV (HBcAg–zEDIII), и транзientно экспрессируемая в *N. benthamiana*, индуцировала в мышах как В-, так и Т-клеточный иммунный ответ. Важно, что эта вакцина не вызывала ADE по отношению к DENV [92]. Другая экспериментальная вакцина против ZIKV создана на основе VLP CMV, в состав которого введен эпитоп тетанотоксина *Clostridium tetani* и EDIII ZIKV. В экспериментах на мышах вакцина индуцировала высокие уровни ZIKV-нейтрализующих антител и не вызывала ADE при DENV-инфекции [94].

Экспериментальная VLP-вакцина против DENV, tHBcAg–сEDIII, транзientно синтезируемая в *N. benthamiana*, сконструирована на основе VLP HBV и EDIII DENV. Вакцина эффективна против 4 серотипов DENV. Для лучшего представления EDIII-эпитопа иммунной системе этот домен был встроен в иммунодоминантную область петли c/e1 HBcAg так, чтобы он оказался на шиповидных структурах собранных частиц. Иммунизация мышшей вызвала высокие титры антител к DENV через 4 недели после введения вакцины [95]. Другая кандидатная VLP-вакцина против DENV, транзientно синтезируемая в листьях *N. benthamiana*, основана на VLP, получаемых на основе полноразмерного белка E DENV. Продемонстрирована ее более высокая иммуногенность и эффективность по сравнению с VLP DENV EDIII [96].

Недавно были получены VLP TBEV, транзientно синтезируемые в *N. benthamiana* и основанные на вирусных белках С и рgМ-Е. Образование VLP подтвердили микроскопически и серологически, но в экспериментах на мышах, которым перорально вводили свежие листья *N. benthamiana* + VLP TBEV, не выявили никакого иммунного ответа. Скорее всего, отсутствие иммунной реакции связано с разрушением VLP в желудочно-кишечном тракте животных [97]. Однако такие же VLP TBEV, полученные ранее в клетках насекомых, были высокоиммуногенными при парентеральном введении и вызывали у мышшей образование антител к вирусу [98]. Экспериментальная VLP-вакцина против JEV была создана на основе VLP

вируса мозаики бамбука (BaMV) и EDIII JEV. Эти VLP транзientно нарабатывали в *N. benthamiana* и в листьях *Chenopodium quinoa*. Иммунизация мышшей этой вакциной приводила к выработке у них JEV-нейтрализующих антител [99].

Флавивирус WNV переносится птицами и комарами и широко распространен по всему миру [100]. Создано большое число кандидатных вакцин против WNV, в том числе две экспериментальные VLP: на основе рgМ-Е WNV (содержит полноразмерный вирусный белок Е) и химерная на основе HBV и EDIII WNV. Эти VLP-вакцины были транзientно синтезированы в листьях *N. benthamiana* и вызывали у мышшей сильный В- и Т-клеточный ответ [101, 102].

Распространенные в человеческой популяции штаммы HPV высокого онкогенного риска считаются основной причиной развития рака шейки матки у женщин. Основным белком капсида HPV, L1, способен к самосборке в VLP, морфологически подобные нативным вирионам и несущие на поверхности его основные антигены. Эти VLP могут индуцировать сильный иммунный ответ как В-, так и Т-клеток [103]. За последние годы получено множество кандидатных противораковых VLP-вакцин на основе белка L1 HPV-16 и HPV-11. Некоторые из них содержат либо модифицированный белок L1, либо несут дополнительные белки HPV, например L1Е6/Е7 или L1/Л2, либо содержат фрагменты белков других вирусов. Гены для синтеза этих VLP либо встраиваются в ядерный геном, либо транзientно экспрессируются в различных растениях: *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *S. tuberosum*, *Arabidopsis thaliana*. Наиболее полный список этих экспериментальных противораковых вакцин приведен в обзоре В. Shanmugaraj с соавт. [104].

Трансмембранный белок gp41 оболочки ВИЧ-1 играет важную роль в проникновении вируса через слизистые и инфицировании CD4⁺-клеток. Полипептид Gag — важный структурный компонент ВИЧ-1, который образует капсид и несет важные антигенные детерминанты вируса. Совместная экспрессия этих белков (полноразмерного Gag и модифицированного gp41, dgp41) — как стабильная ядерная, так и транзientная — в листьях *N. benthamiana* приводит к образованию оболочечных VLP, которые в дальнейшем могут служить основой для создания вакцины против ВИЧ-1 [105].

Другие методы получения белковых наночастиц в клетках растений для производства вакцин

Трансформация хлоропластов, по сравнению с ядерной, имеет целый ряд преимуществ. Прежде всего, за счет большого числа хлоропластных геномов (пластомов) — до 10000 на клетку (рис. 2) — она обеспечивает высокий уровень экспрессии трансгенов, сопоставимый с методами транзientной

экспрессии, но который, в отличие от последних, стабилен. Трансформация хлоропластов происходит адресно по механизму гомологичного обмена, позволяет избежать инактивации трансгенов и дает возможность создавать искусственные опероны из нескольких белков. Кроме того, двойная мембрана хлоропласта защищает рекомбинатные белки от расщепления цитозольными протеазами, а наследование хлоропластов по материнской линии исключает вероятность переноса пыльной трансгенов на другие растения. В то же время неспособность посттрансляционного аппарата хлоропластов осуществлять гликозилирование может значительно снижать эффективность синтезируемых в них VLP-вакцин. Кроме того, трансформация пластид происходит с низкой частотой и возникают проблемы при отборе гомопластичных и гомопластидных растений [106, 107]. В связи с этими недостатками, несмотря на всю привлекательность транспластичных растений, синтезировать VLP-вакцины в хлоропластах удавалось только в нескольких единичных случаях.

Ген белка L1 HPV-16 методом биобаллистической трансформации был встроен в хлоропластный геном *N. tabacum*, а последующий многоступенчатый отбор привел к получению гомопластичных и гомопластидных растений, стабильно синтезирующих рекомбинантный белок L1 в хлоропластах. По сравнению с количеством L1, получаемым при ядерной трансформации табака (<0.1 мг/г сырой биомассы), содержание этого белка, синтезированного в хлоропластах, достигало 3 мг/г, что составляло 24% от ОРБ. По результатам седиментационного анализа ~30% L1 находилось в составе VLP, не отличающихся по форме и размеру от нативного вириона (диаметр ~60 нм). Остальные наночастицы были меньше 55 нм и состояли из 12–24 пентамерных капсомеров L1, тогда как полный капсид образован 72 капсомерами, то есть 360 молекулами L1. Иммунизация мышей частично очищенными экстрактами листьев транспластичных растений с добавлением адъюванта Фрейнда или гидроксида алюминия индуцировала продукцию HPV-нейтрализующих антител в сыворотке крови мышей в титрах 1 : 400 и 1 : 100 соответственно. Эти титры сопоставимы с таковыми для VLP HPV, синтезированными в клетках насекомых (1 : 400) [108]. В другом исследовании трансформацию хлоропластов *N. tabacum* геном белка L1 HPV проводили в двух вариантах: нативном и оптимизированном по составу кодонов. В результате полученный белок L1 составлял 1.5% от массы ОРБ. Наряду с VLP из L1-белка регистрировали более легкие фракции наночастиц, а также отдельные пентамерные капсомеры [109]. В транспластичных растениях *N. tabacum*, синтезирующих мутантный вариант рекомбинантного L1 HPV, у которого два консервативных остатка Cys, образующих дисульфидные связи, были заменены на остатки Ser, почти весь

белок L1 находился в составе капсомеров, также обладающих высокой иммуногенностью [110].

Белок Gag (Pr55^{gag}) ВИЧ-1 формирует VLP, обладающие высокой иммуногенностью, но при транзientной и ядерной экспрессии синтезируется в очень малом количестве. Продукция Pr55^{gag} ВИЧ-1 резко повышалась при экспрессии в хлоропластах транспластичных растений и достигала 7–8% от ОРБ. При слиянии гена белка Gag с последовательностью, кодирующей N-концевой участок фотосинтетического белка RbcL, было достигнуто 25-кратное увеличение уровня Gag (до 338 мг/кг сырой биомассы) в транспластичных растениях *N. tabacum*. Также обнаружили, что накопление Gag падает в старых листьях табака, что может быть связано со сниженной интенсивностью транскрипции/трансляции в них и усилением протеолитической деградации белков. Электронная микроскопия подтвердила образование в хлоропластах VLP, не отличимых по форме и размеру от VLP ВИЧ-1, полученных в клетках насекомых [111]. В транспластичных растениях было синтезировано несколько экспериментальных VLP-вакцин: против DENV (из белков rgM/E) [112]) и против трех серотипов вируса полиомиелита [113] в хлоропластах салата и против вируса некроза нервов рыб (NNV) в генетически модифицированных хлоропластах *N. tabacum* [114].

Совершенно иной подход к повышению уровня накопления VLP-вакцин в растениях предложен в ряде других работ. Он заключается в транзientной или ядерной экспрессии вирусного гена, кодирующего VLP-образующий белок, слитый с транзитным сигнальным пептидом, направляющим синтезированный белок в хлоропласты. Низкая протеазная активность в хлоропластах позволяет значительно повысить выход вирусных белков и образованных ими VLP. Подробно этот подход рассмотрен в обзоре Т. Muthamilselvan и др. [115]. С использованием этого подхода в *N. benthamiana* и *N. tabacum* был синтезирован рекомбинантный белок L1 HPV-16, собирающийся в VLP и составляющий 11% от ОРБ [116]. В работе Т. Muthamilselvan с соавт. [117] получена ДНК-конструкция, кодирующая белок L1 HPV-16, слитый с 79-аминокислотной последовательностью белка хлоропластов RbcS, которая направляет белок в хлоропласты, а также с доменом SUMO. Одновременная транзientная экспрессия этого рекомбинантного белка с направляемой в хлоропласты специфической протеазой bdSENPI, расщепляющей белок по сайту SUMO, позволила синтезировать в *N. benthamiana* L1 HPV-16 с выходом 6–8 мкг на 1 г сырой биомассы и получить соответствующие VLP, обладавшие высокой иммуногенностью в экспериментах на мышах [117]. Введение в рекомбинантный белок Gag ВИЧ-1 последовательности другого транзитного пептида, направляющего белок в хлоропласты,

также приводило к увеличению продукции целевого белка в транзientной системе экспрессии *N. benthamiana* [111]. Цирковир свиней (porcine circovirus, PCV) вызывает серьезные заболевания свиней, с высоким уровнем летальности. При транзientной экспрессии в *N. benthamiana* рекомбинантного белка капсида (rCap) PCV типа 2, слитого с транзитным пептидом, направляющим белок в хлоропласты, были получены VLP PCV2 в количестве 102 мг/кг сырой биомассы, вызывающие сильный иммунный ответ у морских свинок [118].

Наряду с VLP для разработчиков эффективных вакцин представляют значительный интерес и другие наночастицы, которые могут быть синтезированы и накоплены в растениях. Прежде всего, это белковые тельца — производные эндоплазматического ретикула. Белковые тельца содержат мало воды, проявляют низкую протеазную активность, имеют высокую плотность седиментации и идеально подходят для длительного хранения и выделения больших количеств фармацевтических белков. Модифицированный N-концевой сигнальный пептид γ -зеина кукурузы, названный Zera, содержит 112 а.о.; он направляет слитый с ним белок в эндоплазматический ретикулум, где и образуются белковые тельца [119, 120]. Интересно, что сигнальный пептид Zera приводит к накоплению слитых с ним белков не только в клетках растений, но и в клетках насекомых и млекопитающих [120, 121]. При транзientной экспрессии гена белка E7 HPV-16, слитого с последовательностью, кодирующей пептид Zera, в *N. benthamiana* формировались белковые тельца E7 в количестве 0.1–6.0 г/кг сырой биомассы. У мышей, иммунизированных этими белковыми тельцами, регистрировали сильный как В-, так и Т-клеточный иммунный ответ, а также регрессию экспериментальных опухолей. Слитый с E7 Zera-пептид усиливал иммуногенность E7-белковых телец по типу молекулярного адьюванта [122]. Недавно получены белковые тельца из рекомбинантного белка E_{np} ВИЧ-1, слитого с Zera-пептидом (gp140-Zera), которые у кроликов индуцировали сильный иммунный ответ [123].

Эластиноподобные сигнальные пептиды (ELP) [124, 125] и гидрофобины (HFB) [126] также относятся к перспективным молекулам для создания вакцин, основанных на формировании белковых телец. Как и Zera-пептид, они направляют слитый с ними рекомбинантный белок в эндоплазматический ретикулум с дальнейшим образованием белковых телец [127]. Использование этих пептидов для формирования белковых телец позволяет значительно повысить выход рекомбинантных белков. Так, экспрессия в листьях табака широко используемого в качестве репортера зеленого флуоресцентного белка (GFP), слитого с EPL, достигает 40% от ОРБ [128], а при слиянии с HFB — 51% [129].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, современная биотехнология открывает совершенно новые перспективы для создания безопасных и эффективных вакцин против широкого спектра возбудителей как вирусных, так и бактериальных инфекций. Кроме того, вакцины нового поколения эффективны при протозойных заболеваниях, в частности малярии, а также могут найти применение при неинфекционных патологиях, таких как болезнь Альцгеймера, аутоиммунные, системные и онкологические заболевания. VLP и другие биологические наночастицы, служащие основой этих новых вакцин, обеспечивают их высокую иммуногенность и презентацию иммунокомпетентным клеткам, а их биосинтез в клетках растений позволяет получать биобезопасные вакцинные продукты с относительно небольшими затратами и адекватными РТМ, а также их биобезопасность и невысокую себестоимость.

Производство VLP и других наночастиц представляет особый интерес для разработки вакцин нового поколения, так как они презентуют иммунокомпетентным клеткам млекопитающих множество эпитопов белкового антигена, причем без предварительного их синтеза в клетках, как это необходимо в случае ДНК- и мРНК-вакцин. Сравнимые с вирионами размеры VLP — еще один фактор, повышающий эффективность презентации антигенов иммунной системе. Этот эффект усиливается тем, что антигенные детерминанты многократно повторены на поверхности VLP. Довольно простые безоболочечные VLP могут быть синтезированы в разных экспрессионных системах, включая прокариотические. Однако прокариоты не способны ко многим РТМ, в том числе гликозилированию, что необходимо для высокой иммуногенности многих VLP вакцин. Для производства более сложных, eVLP-вакцин, используют эукариотические системы: дрожжевые, бакуловирусные, клетки насекомых и млекопитающих, — большинство из которых высокзатратны и трудно масштабируемы. Напротив, растения и культуры их клеток легко масштабируются и значительно дешевле. Кроме того, клетки растений способны к сложным РТМ — одному из ключевых факторов высокой иммуногенности VLP. Синтез вакцин в растениях также исключает их контаминацию вирусами животных и человека.

Сейчас в свете необходимости создания вакцин нового поколения на основе наночастиц сформировалось три главных направления: вакцины, основанные (i) на VLP патогенных вирусов человека и животных, (ii) на химерных VLP вирусов растений и (iii) на химерных вирусах растений, содержащих генетический материал самого вируса. Несколько особняком стоит еще одно направление — (iv) получение белковых телец, содержащих вирусные белки с антигенными детерминантами

соответствующего патогена. Первое, второе и четвертое направления безопасны для биосферы в целом, тогда как третье представляет определенную опасность для фитоценозов. Основное преимущество вакцин, основанных на VLP патогенных вирусов животных, состоит в том, что они презентуют иммунной системе все эпитопы антигена патогена, тогда как вакцины на основе химерных растительных вирусов и их VLP представляют только те эпитопы патогена, которые были слиты с белками, формирующими VLP. Кроме того, эти эпитопы, из-за особенностей конформации VLP-формирующих белков, могут оказаться недоступными для компетентных иммунных клеток. Но, с другой стороны, сами белки вирусов растений могут быть молекулярными адъювантами и усиливать иммуногенность вакцины.

Основной недостаток растительных экспрессионных систем — низкий выход продукта. Разработанные системы транзientной экспрессии позволяют получать в короткие сроки большие количества VLP и других наночастиц, предназначенных для создания вакцин нового поколения. Конститутивная экспрессия VLP-вакцин в хлоропластах транспластомных растений или ядерная трансформация с направлением синтезированных в цитоплазме белков в хлоропласты с помощью слитых с ними транзитных пептидов позволяет также получать большие количества VLP-вакцин в течение длительного времени. Направление синтезированных белков, слитых с сигнальными пептидами Zera, ELP или HFB, в эндоплазматический ретикулум и далее в белковые тельца позволяет постоянно синтезировать VLP-вакцины в большом количестве, а высокая плотность белковых телец облегчает их выделение и очистку. Таким образом, растительные системы экспрессии обладают многими преимуществами по сравнению с другими и представляют значительный интерес для получения вакцин нового поколения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования (грант № FWNR-2022-0022).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. С.М. Розов и Е.В. Дейнеко внесли равный вклад в написание обзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yan X., Zhou M., Yu S., Jin Z., Zhao K. (2020) An overview of biodegradable nanomaterials and applications in vaccines. *Vaccine*. **38**, 1096–1104. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.11.031
2. Aida V., Pliasis V.C., Neasham P.J., North J.F., McWhorter K.L., Glover S.R., Kyriakis C.S. (2021) Novel vaccine

technologies in veterinary medicine: a herald to human medicine vaccines. *Front. Vet. Sci.* **8**, 654289. doi: 10.3389/fvets.2021.654289

3. Lampinen V., Heinimäki S., Laitinen O.H., Pesu M., Hankaniemi M.M., Blazevic V., Hytönen V.P. (2021) Modular vaccine platform based on the norovirus-like particle. *J. Nanobiotechnol.* **19**, 25. doi: 10.1186/s12951-021-00772-0
4. Noad R., Roy P. (2003) Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* **11**, 438–444. doi: 10.1016/s0966-842x(03)00208-7
5. Brisse M., Vrba S.M., Kirk N., Liang Y., Ly H. (2020) Emerging concepts and technologies in vaccine development. *Front. Immunol.* **11**, 2578. doi: 10.3389/fimmu.2020.583077
6. Hyman P., Trubl G., Abedon S.T. (2021) Virus-like particle: evolving meanings in different disciplines. *Phage (New Rochelle)*. **2**(1), 11–15. doi: 10.1089/phage.2020.0026
7. Bancroft J.B., Wagner G.W., Bracker C.E. (1968) The self-assembly of a nucleic-acid free pseudo-top component for a small spherical virus. *Virology*. **36**, 146–149. doi: 10.1016/0042-6822(68)90126-8
8. Erickson J.W., Bancroft J.B., Horne R.W. (1976) The assembly of papaya mosaic virus protein. *Virology*. **72**, 514–517. doi: 10.1016/0042-6822(76)90180-X
9. Mohsen M.O., Zha L., Cabral-Miranda G., Bachmann M.F. (2017) Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin. Immunol.* **34**, 123–132. doi: 10.1016/j.smim.2017.08.014
10. Zhang L., Xu W., Ma X., Sun X., Fan J., Wang Y. (2023) Virus-like particles as antiviral vaccine: mechanism, design, and application. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **28**(1), 1–16. doi: 10.1007/s12257-022-0107-8
11. Сёмин Б.В., Ильин Ю.В. (2019) Вирусоподобные частицы как инструмент для производства вакцин. *Молекуляр. биология*. **53**(3), 367–379.
12. Huang Z., Chen Q., Hjelm B., Arntzen C., Mason H.A. (2009) DNA replicon system for rapid high-level production of virus-like particles in plants. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 706–714. doi: 10.1002/bit.22299
13. He J., Lai H., Brock C., Chen Q. (2012) A novel system for rapid and cost-effective production of detection and diagnostic reagents of West Nile virus in plants. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 106783. doi: 10.1155/2012/106783
14. Santi L., Batchelor L., Huang Z., Hjelm B., Kilbourne J., Arntzen C.J., Chen Q., Mason H.S. (2008) An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles. *Vaccine*. **26**, 1846–1854. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.01.053
15. Chroboczek J., Szurgot I., Szolajska E. (2014) Virus-like particles as vaccine. *Acta Biochim. Pol.* **61**(3), 531–539. doi: 10.18388/abp.2014_1875
16. Naskalska A., Pyrc K. (2015) Virus like particles as immunogens and universal nanocarriers. *Pol. J. Microbiol.* **64**, 3–13.
17. Keikha R., Daliri K., Jebali A. (2021) The use of nanobiotechnology in immunology and vaccination. *Vaccines (Basel)*. **9**, 74. doi: 10.3390/vaccines9020074

18. Bundy B.C., Swartz J.R. (2011) Efficient disulfide bond formation in virus-like particles. *J. Biotechnol.* **154**, 230–239. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.04.011
19. Bundy B.C., Franciszkowicz M.J., Swartz J.R. (2008) *Escherichia coli*-based cell-free synthesis of virus-like particles. *Biotechnol. Bioeng.* **100**, 28–37. doi: 10.1002/bit.21716
20. Lua L.H., Connors N.K., Sainsbury F., Chuan Y.P., Wibowo N., Middelberg A.P. (2014) Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 425–440. doi: 10.1002/bit.25159
21. Li H.-Y., Han J.-F., Qin C.-F., Chen R. (2013) Virus-like particles for enterovirus 71 produced from *Saccharomyces cerevisiae* potentially elicits protective immune responses in mice. *Vaccine*. **31**, 3281–3287. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.019
22. Fernandes F., Teixeira A.P., Carinhas N., Carrondo M.J., Alves P.M. (2013) Insect cells as a production platform of complex virus-like particles. *Expert Rev. Vaccines*. **12**, 225–236. doi: 10.1586/erv.12.153
23. Scotti N., Rybicki E.P. (2013) Virus-like particles produced in plants as potential vaccines. *Expert Rev. Vaccines*. **12**, 211–224. doi: 10.1586/erv.12.147
24. French T., Roy P. (1990) Synthesis of bluetongue virus (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV. *J. Virol.* **64**, 1530–1536. doi: 10.1128/jvi.64.4.1530-1536.1990
25. Lin Y.-L., Yu C.-I., Hu Y.-C., Tsai T.-J., Kuo Y.-C., Chi W.-K., Lin A.N., Chiang B.L. (2012) Enterovirus type 71 neutralizing antibodies in the serum of macaque monkeys immunized with EV71 virus-like particles. *Vaccine*. **30**, 1305–1312. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.12.081
26. Brautigam S., Snezhkov E., Bishop D.H. (1993) Formation of poliovirus-like particles by recombinant baculoviruses expressing the individual VP0, VP3, and VP1 proteins by comparison to particles derived from the expressed poliovirus polypeptide. *Virology*. **192**, 512–524. doi: 10.1006/viro.1993.1067
27. Vieira H.L., Esteve C., Roldao A., Peixoto C.C., Sousa M.F., Cruz P.E., Carrondo M.J., Alves P.M. (2005) Triple layered rotavirus VLP production: kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production. *J. Biotechnol.* **120**, 72–82. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.03.026
28. Kirnbauer R., Taub J., Greenstone H., Roden R., Durst M., Gissmann L., Lowy D.R., Schiller J.T. (1993) Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1–L2 into virus-like particles. *J. Virol.* **67**, 6929–6936. doi: 10.1128/jvi.67.12.6929-6936.1993
29. Nooraei S., Bahrulolum H., Hoseini Z.S., Katalani C., Hajizade A., Easton A.J., Ahmadian G. (2021) Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J. Nanobiotechnol.* **19**, 59. doi: 10.1186/s12951-021-00806-7
30. Baumert T.F., Ito S., Wong D.T., Liang T.J. (1998) Hepatitis C virus structural proteins assemble into virus-like particles in insect cells. *J. Virol.* **72**, 3827–3836. doi: 10.1128/JVI.72.5.3827-3836.1998
31. Kushnir N., Streatfield S.J., Yusibov V. (2012) Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*. **31**, 58–83. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.083
32. Welsch S., Muller B., Krausslich H.-G. (2007) More than one door – budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS Lett.* **581**, 2089–2097. doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.060
33. Zhang P., Narayanan E., Liu Q., Tsybovsky Y., Boswell K., Ding S., Hu Z., Follmann D., Lin Y., Miao H., Schmeisser H., Rogers D., Falcone S., Elbashir S.M., Presnyak V., Bahl K., Prabhakaran M., Chen X., Sarfo E.K., Ambrozak D.R., Gautam R., Martin M.A., Swerczek J., Herbert R., Weiss D., Misamore J., Ciaramella G., Himansu S., Stewart-Jones G., McDermott A., Koup R.A., Mascola J.R., Finzi A., Carfi A., Fauci A.S., Lusso P. (2021) A multiclade *env-gag* VLP mRNA vaccine elicits tier-2 HIV-1-neutralizing antibodies and reduces the risk of heterologous SHIV infection in macaques. *Nat. Med.* **27**, 2234–2245. doi: 10.1038/s41591-021-01574-5
34. Mortola E., Roy P. (2004) Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. *FEBS Lett.* **576**, 174–178. doi: 10.1016/j.febslet.2004.09.009
35. Rudd P.M., Wormald M.R., Stanfield R.L., Huang M., Mattsson N., Speir J.A., DiGennaro J.A., Fetrow J.S., Dwek R.A., Wilson I.A. (1999) Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. *J. Mol. Biol.* **293**, 351–366. doi: 10.1006/jmbi.1999.3104
36. Fontes-Garfias C.R., Shan C., Luo H., Muruato A.E., Medeiros D.B., Mays E., Xie X., Zou J., Roundy C.M., Wakamiya M., Rossi S.L., Wang T., Weaver S.C., Shi P.Y. (2017) Functional analysis of glycosylation of Zika virus envelope protein. *Cell Rep.* **21**, 1180–1190. doi: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.016
37. Bryant J.E., Calvert A.E., Mesesan K., Crabtree M.B., Volpe K.E., Silengo S., Kinney R.M., Huang C.Y., Miller B.R., Roehrig J.T. (2007) Glycosylation of the dengue 2 virus E protein at N67 is critical for virus growth *in vitro* but not for growth in intrathoracic inoculated *Aedes aegypti* mosquitoes. *Virology*. **366**, 415–423. doi: 10.1016/j.virol.2007.05.007
38. Marsian J., Fox H., Bahar M.W., Kotecha A., Fry E.E., Stuart D.I., Macadam A.J., Rowlands D.J., Lomonosoff G.P. (2017) Plant-made polio type 3 stabilized VLPs – a candidate synthetic polio vaccine. *Nat. Commun.* **8**, 245. doi: 10.1038/s41467-017-00090-w
39. Chen B.J., Leser G.P., Morita E., Lamb R.A. (2007) Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J. Virol.* **81**, 7111–7123. doi: 10.1128/JVI.00361-07
40. Yamshchikov G.V., Ritter G.D., Vey M., Compans R.W. (1995) Assembly of SIV virus-like particles containing envelope proteins using a baculovirus expression system. *Virology*. **214**, 50–58. doi: 10.1006/viro.1995.9955
41. McGinnes L.W., Pantua H., Laliberte J.P., Gravel K.A., Jain S., Morrison T.G. (2010) Assembly and biological and

- immunological properties of Newcastle disease virus-like particles. *J. Virol.* **84**, 4513–4523.
doi: 10.1128/JVI.01931-09
42. Wetzel D., Barbian A., Jenzelewski V., Schembecker G., Merz J., Piontek M. (2019) Bioprocess optimization for purification of chimeric VLP displaying BVDV E2 antigens produced in yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Biotechnol.* **306**, 203–212.
doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.10.008
 43. Latham T., Galarza J.M. (2001) Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J. Virol.* **75**, 6154–6165.
doi: 10.1128/JVI.75.13.6154–6165
 44. Caldeira J.C., Perrine M., Pericle F., Cavallo F. (2020) Virus-like particles as an immunogenic platform for cancer vaccines. *Viruses*. **12**, 488.
doi: 10.3390/v12050488
 45. Tremouillaux-Guiller J., Moustafa K., Hefferon K., Gaobotse G., Makhzoum, A. (2020) Plant-made HIV vaccines and potential candidates. *Curr. Opin. Biotechnol.* **61**, 209–216.
doi: 10.1016/j.copbio.2020.01.004
 46. Andersson A.C., Schwerdtfeger M., Holst P.J. (2018) Virus-like-vaccines against HIV. *Vaccines* (Basel). **6**, 10.
doi: 10.3390/vaccines6010010
 47. Qian C., Liu X., Xu Q., Wang Z., Chen J., Li T., Zheng Q., Yu H., Gu Y., Li S., Xia N. (2020) Recent progress on the versatility of virus-like particles. *Vaccines* (Basel). **8**, 139.
doi: 10.3390/vaccines8010139
 48. Huang X., Wang X., Zhang J., Xia N., Zhao Q. (2017) *Escherichia coli*-derived virus-like particles in vaccine development. *NPJ Vaccines*. **2**, 3.
doi:10.1038/s41541-017-0006-8
 49. Balke I., Zeltins A. (2020) Recent advances in the use of plant virus-like particles as vaccines. *Viruses*. **12**, 270.
doi: 10.3390/v12030270
 50. Chichester J.A., Green B.J., Jones R.M., Shoji Y., Miura K., Long C.A., Yusibov V. (2018) Safety and immunogenicity of a plant-produced Pfs25 virus-like particle as a transmission blocking vaccine against malaria: a phase I dose-escalation study in healthy adults. *Vaccine*. **36**, 5865–5871.
doi: 10.1016/j.vaccine.2018.08.33
 51. Chackerian B. (2010) Virus-like particle based vaccines for Alzheimer disease. *Hum. Vaccin.* **6**, 926–930.
doi: 10.4161/hv.6.11.12655
 52. Mohsen M.O., Bachmann M.F. (2022) Virus-like particle vaccinology, from bench to bedside. *Cell. Mol. Immunol.* **19**, 993–1011.
doi: 10.1038/s41423-022-00897-8
 53. Namdeo N., Arora R., Jha H. (2023) Biomedical application of advanced microbial approaches: nutraceuticals, biomedicine, and vaccine development. In: *Industrial Microbiology and Biotechnology: Emerging Concepts in Microbial Technology*. Ed. Verma P. Singapore: Springer, pp. 273–297.
doi: 10.1007/978-981-99-2816-3_9
 54. Ren J., Bell G., Coy D., Brunicardi F. (1997) Activation of human somatostatin receptor type 2 causes inhibition of cell growth in transfected HEK293 but not in transfected CHO cells *J. Surg. Res.* **71**, 13–18.
doi: 10.1006/jsre.1997.5097
 55. Donaldson B., Al-Barwani F., Young V., Scullion S., Ward V., Young S. (2015) Virus-like particles, a versatile subunit vaccine platform. In: *Subunit Vaccine Delivery. Advances in Delivery Science and Technology*. Eds Foged C., Rades T., Perrie Y., Hook S. New York: Springer. pp. 159–180.
doi: 10.1007/978-1-4939-1417-3_9
 56. Chang. G.-D., Chen C.-J., Lin C.-Y., Chen H.-C., Chen H. (2003) Improvement of glycosylation in insect cells with mammalian glycosyltransferases. *J. Biotechnol.* **102**, 61–71.
doi: 10.1016/S0168-1656(02)00364-4
 57. Glass P.J., White L.J., Ball J.M., Leparco-Goffart I., Hardy M.E., Estes M.K. (2000) Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein. *J. Virol.* **74**, 6581–6591.
doi: 10.1128/JVI.74.14.6581–6591.2000
 58. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. (2005) Magniffection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*. **23**, 2042–2048.
doi: 10.1016/j.vaccine.2005.01.006
 59. Sainsbury F., Lomonosoff G.P. (2008) Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant Physiol.* **148**, 1212–1218.
doi: 10.1104/pp.108.126284
 60. Nikitin N., Vasiliev Y., Kovalenko A., Ryabchevskaya E., Kondakova O., Evtushenko E., Karpova O. (2023) Plant viruses as adjuvants for next-generation vaccines and immunotherapy. *Vaccines* (Basel). **11**, 1372.
doi: 10.3390/vaccines11081372
 61. Zhang T., Breitbart M., Lee W.H., Run J.-Q., Wei C.L., Soh S.W.L., Hibberd M.L., Liu E.T., Rohwer F., Ruan Y. (2005) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol.* **4**, e3.
doi: 10.1371/journal.pbio.0040003
 62. Venkataraman S., Hefferon K. (2021) Application of plant viruses in biotechnology, medicine, and human health. *Viruses*. **13**, 1697.
doi: 10.3390/v13091697
 63. Yusibov V., Modelska A., Steplewski K., Agadjanyan M., Weiner D., Hooper D.C., Koprowski H. (1997) Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 5784–5788.
doi: 10.1073/pnas.94.11.5784
 64. Jones R.M., Chichester J.A., Mett V., Jaje J., Tottey S., Manceva S., Casta L.J., Gibbs S.K., Musiyuchuk K., Sham-loul M., Norikane J., Mett V., Streatfield S.J., van de Vegte-Bolmer M., Roeffen W., Sauerwein R.W., Yusibov V. (2013) A plant-produced Pfs25 VLP malaria vaccine candidate induces persistent transmission blocking antibodies against *Plasmodium falciparum* in immunized mice. *PLoS One*. **8**, e79538.
doi: 10.1371/journal.pone.0079538
 65. Yusibov V., Mett V., Mett V., Davidson C., Musiyuchuk K., Gilliam S., Farese A., Macvittie T., Mann D. (2005) Peptide-based candidate vaccine against respiratory syncytial virus. *Vaccine*. **23**, 2261–2265.
doi: 10.1016/j.vaccine.2005.01.039
 66. Zinkhan S., Ogrina A., Balke I., Resevica G., Zeltins A., de Brot S., Lipp C., Chang X., Zha L., Vogel M. (2021) The impact of size on particle drainage dynamics and antibody response. *J. Control Release*. **331**, 296–308.
doi: 10.1016/j.conrel.2021.01.012
 67. Pomwised R., Intamaso U., Teintze M., Young M., Pincus S.H. (2016) Coupling peptide antigens to virus-like

- particles or to protein carriers influences the Th1/Th2 polarity of the resulting immune response. *Vaccines* (Basel). **4**, 15. doi: 10.3390/vaccines4020015
68. Santoni M., Zampieri R., Avesani L. (2020) Plant virus nanoparticles for vaccine applications. *Curr. Protein Pept. Sci.* **21**, 344–356. doi: 10.2174/1389203721666200212100255
 69. Kalnciema I., Skrastina D., Ose V., Pumpens P., Zeltins A. (2012) Potato virus Y-like particles as a new carrier for the presentation of foreign protein stretches. *Mol. Biotechnol.* **52**, 129–139. doi: 10.1007/s12033-011-9480-9
 70. Ogrina A., Skrastina D., Balke I., Kalnciema I., Jansons J., Bachmann M.F., Zeltins A. (2022) Comparison of bacterial expression systems based on potato virus Y-like particles for vaccine generation. *Vaccines* (Basel). **10**, 485. doi: 10.3390/vaccines10040485
 71. Leclerc D., Rivest M., Babin C., López-Macias C., Savard P. (2013) A novel M2e based flu vaccine formulation for dogs. *PLoS One*. **8**, e77084. doi: 10.1371/journal.pone.0077084
 72. Hu H., Steinmetz N.F. (2021) Development of a virus-like particle-based anti-HER2 breast cancer vaccine. *Cancers*. **13**, 2909. doi: 10.3390/cancers13122909
 73. Denis J., Majeau N., Acosta-Ramirez E., Savard C., Bedard M.C., Simard S., Leclerc D. (2007) Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: evidence for the critical function of multimerization. *Virology*. **363**, 59–68. doi: 10.1016/j.virol.2007.01.011
 74. Mathieu C., Rioux G., Dumas M.C., Leclerc D. (2013) Induction of innate immunity in lungs with virus-like nanoparticles leads to protection against influenza and *Streptococcus pneumoniae* challenge. *Nanomedicine*. **9**, 839–848. doi: 10.1016/j.nano.2013.02.009
 75. Lebel M.È., Daudelin J.F., Chartrand K., Tarrab E., Kalinke U., Savard P., Lamarre A. (2014) Nanoparticle adjuvant sensing by TLR7 enhances CD8⁺ T cell-mediated protection from *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* **192**, 1071–1078. doi: 10.4049/jimmunol.1302030
 76. Palmer K.E., Benko A., Doucette S.A., Cameron T.I., Foster T., Hanley K.M., Christensen N.D. (2006) Protection of rabbits against cutaneous papillomavirus infection using recombinant tobacco mosaic virus containing L2 capsid epitopes. *Vaccine*. **24**, 5516–5525. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.04.058
 77. Zeltins A., West J., Zabel F., El Turabi A., Balke I., Haas S., Bachmann M.F. (2017) Incorporation of tetanus-epitope into virus-like particles achieves vaccine responses even in older recipients in models of psoriasis, Alzheimer's and cat allergy. *NPJ Vaccines*. **2**, 30. doi: 10.1038/s41541-017-0030-8
 78. Manuel-Cabrera C.A., Vallejo-Cardona A.A., Padilla-Camberos E., Hernández-Gutiérrez R., Herrera-Rodríguez S.E., Gutiérrez-Ortega A. (2016) Self-assembly of hexahistidine-tagged tobacco etch virus capsid protein into microfilaments that induce IgG2-specific response against a soluble porcine reproductive and respiratory syndrome virus chimeric protein. *Viol. J.* **13**(1), 196. doi: 10.1186/s12985-016-0651-y
 79. D'Aoust M.A., Couture M.M.J., Charland N., Trepanier S., Landry N., Ors F., Vézina L.P. (2010) The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol. J.* **8**, 607–619. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00496.x
 80. Pillet S., Racine T., Nfon C., Di Lenardo T.Z., Babiuk S., Ward B.J., Kobinger G.P., Landry N. (2015) Plant-derived H7 VLP vaccine elicits protective immune response against H7N9 influenza virus in mice and ferrets. *Vaccine*. **33**, 6282–6289. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.065
 81. Dennis S.J., Meyers A.E., Guthrie A.J., Hitzeroth I.I., Rybicki E.P. (2018) Immunogenicity of plant-produced African horse sickness virus-like particles: implications for a novel vaccine. *Plant Biotechnol. J.* **16**, 442–450. doi: 10.1111/pbi.12783
 82. Eidenberger L., Kogelmann B., Steinkellner H. (2023) Plant-based biopharmaceutical engineering. *Nat. Rev. Biotech.* **1**, 426–439. doi: 10.1038/s44222-023-00044-6
 83. Joung Y.H., Park S.H., Moon K.-B., Jeon J.-H., Cho H.-S., Kim H.-S. (2016) The last ten years of advancements in plant-derived recombinant vaccines against hepatitis B. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1715. doi: 10.3390/ijms17101715
 84. Pirahmadi S., Afzali S., Zargar M., Zakeri S., Mehrizi A.A. (2021) How can we develop an effective subunit vaccine to achieve successful malaria eradication? *Microb. Pathog.* **160**, 105203. doi: 10.1016/j.micpath.2021.105203
 85. Stander J., Mbewana S., Meyers A.E. (2022) Plant-derived human vaccines: recent developments. *BioDrugs*. **36**, 573–589. doi: 10.1007/s40259-022-00544-8
 86. Ward B.J.; Séguin A., Couillard J., Trépanier S., Landry N. (2021) Phase III: randomized observer-blind trial to evaluate lot-to-lot consistency of a new plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine in adults 18–49 years of age. *Lancet*. **396**, 1491–1503. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32014-6
 87. Ward B.J., Gobeil P., Séguin A., Atkins J., Boulay I., Charbonneau P.Y., Couture M., D'Aoust M.A., Dhaliwall J., Finkle C., Hager K., Mahmood A., Makarkov A., Cheng M.P., Pillet S., Schimke P., St-Martin S., Trépanier S., Landry N. (2021) Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19. *Nat. Med.* **27**, 1071–1078. doi: 10.3390/life13030617
 88. Hager K.J., Perez Marc G., Gobeil P., Diaz R.S., Heizer G., Llapur C., Makarkov A.I., Vasconcellos E., Pillet S., Riera F., Saxena P., Geller Wolff P., Bhutada K., Wallace G., Aazami H., Jones C.E., Polack F.P., Ferrara L., Atkins J., Boulay I., Dhaliwall J., Charland N., Couture M.M.J., Jiang-Wright J., Landry N., Lapointe S., Lorin A., Mahmood A., Moulton L.H., Pahmer E., Parent J., Séguin A., Tran L., Breuer T., Ceregido M.A., Koutsoukos M., Roman F., Namba J., D'Aoust M.A., Trepanier S., Kimura Y., Ward B.J.; CoVLP Study Team. (2022) Efficacy and safety of a recombinant plant-based adjuvanted COVID-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* **386**, 2084–2096. doi: 10.1056/NEJMoa2201300
 89. Royal J.M., Simpson C.A., McCormick A.A., Phillips A., Hume S., Morton J., Shepherd J., Oh Y., Swope K., De Beauchamp J.L., Webby R.J., Cross R.W., Borisevich V.,

- Geisbert T.W., Demarco J.K., Bratcher B., Haydon H., Pogue G.P. (2021) Development of a SARS-CoV-2 vaccine candidate using plant-based manufacturing and a tobacco mosaic virus-like nano-particle. *Vaccines* (Basel). **9**, 1347. doi: 10.3390/vaccines9111347
90. Demarco J.K., Royal J.M., Severson W.E., Gabbard J.D., Hume S., Morton J., Swope K., Simpson C.A., Shepherd J.W., Bratcher B., Palmer K.E., Pogue G.P. (2021) CoV-RBD121-NP vaccine candidate protects against symptomatic disease following SARS-CoV-2 challenge in K18-hACE2 mice and induces protective responses that prevent COVID-19-associated immunopathology. *Vaccines* (Basel). **9**, 1346. doi: 10.3390/vaccines9111346
 91. Kumar A.U., Kadiresen K., Gan W.C., Ling A.P.K. (2021) Current updates and research on plant-based vaccines for coronavirus disease 2019. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **10**, 13. doi: 10.7774/cevr.2021.10.1.13
 92. Yang M., Lai H., Sun H., Che Q. (2017) Virus-like particles that display Zika virus envelope protein domain III induce potent neutralizing immune responses in mice. *Sci. Rep.* **7**, 7679. doi: 10.1038/s41598-017-08247-9
 93. Langerak T., Mumtaz N., Koopmans M., Schoenmakers S., Rockx B. (2022) Comparative analysis of *in vitro* models to study antibody-dependent enhancement of Zika virus infection. *Viruses*. **14**, 2776. doi: 10.3390/v14122776
 94. Cabral-Miranda G., Lim S.M., Mohsen M.O., Pobelov I.V., Roesti E.S., Heath M.D., Skinner M.A., Kramer M.F., Martina B.E.E., Bachmann M.F. (2019) Zika virus-derived E-DIII protein displayed on immunologically optimized VLPs induces neutralizing antibodies without causing enhancement of Dengue virus infection. *Vaccines* (Basel). **7**, 72. doi: 10.3390/vaccines7030072
 95. Pang E.L., Peyret H., Ramirez A., Loh H.S., Lai K.S., Fang C.M., Rosenberg W.M., Lomonosoff G.P. (2019) Epitope presentation of dengue viral envelope glycoprotein domain III on hepatitis B core protein virus-like particles produced in *Nicotiana benthamiana*. *Front. Plant Sci.* **10**, 455. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00455>
 96. Ponndorf D., Meshcheriakova Y., Thuenemann E.C., Dobon Alonso A., Overman R., Holton N., Dowall S., Kennedy E., Stocks M., Lomonosoff G.P., Peyret H. (2021) Plant-made dengue virus-like particles produced by co-expression of structural and non-structural proteins induce a humoral immune response in mice. *Plant Biotechnol. J.* **19**, 745–756. doi: 10.1111/pbi.13501
 97. Asghar N., Melik W., Paulsen K.M., Pedersen B.N., Bø-Granquist E.G., Vikse R., Stuen S., Andersson S., Strid Å., Andreassen Å.K., Johansson M. (2022) Transient expression of *Flavivirus* structural proteins in *Nicotiana benthamiana*. *Vaccines* (Basel). **10**, 1667. doi: 10.3390/vaccines10101667
 98. Jääskeläinen A., Han X., Niedrig M., Vaheri A., Vapalahti O. (2003) Diagnosis of tick-borne encephalitis by a μ -capture immunoglobulin M-enzyme immunoassay based on secreted recombinant antigen produced in insect cells. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4336–4342. doi: 10.1128/JCM.41.9.4336-4342.2003
 99. Chen T.H., Hu C.C., Liao J.T., Lee Y.L., Huang Y.W., Lin N.S., Lin Y.L., Hsu Y.H. (2017) Production of Japanese encephalitis virus antigens in plants using bamboo mosaic virus-based vector. *Front. Microbiol.* **8**, 788. doi: 10.3389/fmicb.2017.00788
 100. Mackenzie J.S., Gubler D.J., Petersen L.R. (2004) Emerging *Flaviviruses*: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and Dengue viruses. *Nat. Med.* **10**, S98–S109. doi: <https://doi.org/10.1038/nm1144>
 101. He J., Lai H., Esqueda A., Chen Q. (2021) Plant-produced antigen displaying virus-like particles evokes potent antibody responses against West Nile virus in mice. *Vaccines* (Basel). **9**, 60. doi: 10.3390/vaccines9010060
 102. Chen Q. (2015) Plant-made vaccines against West Nile virus are potent, safe, and economically feasible. *Biotechnol. J.* **10**, 671–680. doi: 10.1002/biot.201400428
 103. Mohsen M.O., Speiser D.E., Knuth A., Bachmann M.F. (2020) Virus-like particles for vaccination against cancer. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **12**, e1579. doi: 10.1002/wnan.1579
 104. Shanmugaraj B., Malla A., Bulaon C.J.I., Phoolcharoen W., Phoolcharoen N. (2022) Harnessing the potential of plant expression system towards the production of vaccines for the prevention of human papillomavirus and cervical cancer. *Vaccines* (Basel). **10**, 2064. doi: 10.3390/vaccines10122064
 105. Kessans S.A., Linhart M.D., Matoba N., Mor T. (2013) Biological and biochemical characterization of HIV-1 Gag/dgp41 virus-like particles expressed in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnol. J.* **11**, 681–690. doi: 10.1111/pbi.12058
 106. Rozov S.M., Zagorskaya A.A., Konstantinov Y.M., Deineko E.V. (2023) Three parts of the plant genome: on the way to success in the production of recombinant proteins. *Plants* (Basel). **12**, 38. doi: 10.3390/plants12010038
 107. Dubey K.K., Luke G.A., Knox C., Kumar P., Pletschke B.I., Singh P.K., Shukla P. (2018) Vaccine and antibody production in plants: developments and computational tools. *Brief. Funct. Genomics.* **17**, 295–307. doi: 10.1093/bfpg/ely020
 108. Fernández-San Millán A., Ortigosa S.M., Hervás-Stubbs S., Corral-Martínez P., Seguí-Simarro J.M., Gaétan J., Coursaget P., Veramendi J. (2008) Human papillomavirus L1 protein expressed in tobacco chloroplasts self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Plant Biotechnol. J.* **6**, 427–441. doi: 10.1111/j.1467-7652.2008.00338.x
 109. Lenzi P., Scotti N., Alagna F., Tornesello M.L., Pompa A., Vitale A., Cardi T. (2008) Translational fusion of chloroplast-expressed human papillomavirus type 16 L1 capsid protein enhances antigen accumulation in transplastomic tobacco. *Transgenic Res.* **17**, 1091–1102. doi: 10.1007/s11248-008-9186-3
 110. Waheed M.T., Thönes N., Müller M., Hassan S.W., Raza N.M., Lössl E., Lössl A.G. (2011) Transplastomic expression of a modified human papillomavirus L1 protein leading to the assembly of capsomeres in tobacco: a step towards cost-effective second-generation vaccines. *Transgenic Res.* **20**, 271–282. doi: 10.1007/s11248-010-9415-4
 111. Scotti N., Alagna F., Ferraiolo E., Formisano G., Sannino L., Buonaguro L., De Stradis A., Vitale A., Monti L.,

- Grillo S., Buonaguro F.M., Cardi T. (2009) High-level expression of the HIV-1 Pr55^{gag} polyprotein in transgenic tobacco chloroplasts. *Planta*. **229**, 1109–1122. doi: 10.1007/s00425-009-0898-2
112. Kanagaraj A.P., Verma D., Daniell H. (2011) Expression of dengue-3 premembrane and envelope polyprotein in lettuce chloroplast. *Plant Mol. Biol.* **76**, 323–333. doi: 10.1007/s11103-011-9766-0
113. Daniell H., Rai V., Xiao Y. (2019) Cold chain and virus-free oral polio booster vaccine made in lettuce chloroplasts confers protection against all three poliovirus serotypes. *Plant Biotechnol. J.* **17**, 1357–1368. doi: 10.1111/pbi.13060
114. Nakahira Y., Mizuno K., Yamashita H., Tsuchikura M., Takeuchi K., Shiina T., Kawakami H. (2021) Mass production of virus-like particles using chloroplast genetic engineering for highly immunogenic oral vaccine against fish disease. *Front. Plant Sci.* **12**, 717952. doi: 10.3389/fpls.2021.717952
115. Muthamilselvan T., Kim J.S., Cheong G., Hwang I. (2019) Production of recombinant proteins through sequestration in chloroplasts: a strategy based on nuclear transformation and post-translational protein import. *Plant Cell Rep.* **38**, 825–833. doi: 10.1007/s00299-019-02431-z
116. Maclean J., Koekemoer M., Olivier A.J., Stewart D., Hitzeroth I.I., Rademacher T., Fischer R., Williamson A.L., Rybicki E.P. (2007) Optimization of human papillomavirus type 16 (HPV-16) L1 expression in plants: comparison of the suitability of different HPV-16 L1 gene variants and different cell-compartment localization. *J. Gen. Virol.* **88**, 1460–1469. doi: 10.1099/vir.0.82718-0
117. Muthamilselvan T., Khan M.R.I., Hwang I. (2023) Assembly of human papillomavirus 16 L1 protein in *Nicotiana benthamiana* chloroplasts into highly immunogenic virus-like particles. *J. Plant Biol.* **66**, 331–340. doi: 10.1007/s12374-023-09393-6
118. Park Y., Min K., Kim N.H., Kim J.H., Park M., Kang H., Sohn E.J., Lee S. (2021) Porcine circovirus 2 capsid protein produced in *N. benthamiana* forms virus-like particles that elicit production of virus-neutralizing antibodies in guinea pigs. *N. Biotechnol.* **63**, 29–36. doi: 10.1016/j.nbt.2021.02.005
119. Kogan M.J., Dalcol I., Gorostiza P., Lopez-Iglesias C., Pons R., Pons M., Sanz F., Giralt E. (2002) Supramolecular properties of the proline-rich gamma-zein N-terminal domain. *Biophys. J.* **83**, 1194–1204. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75243-0
120. Torrent M., Llop-Tous I., Ludevid M.D. (2009) Protein body induction: a new tool to produce and recover recombinant proteins in plants. In: *Recombinant Proteins from Plants: Methods and Protocols*. Eds Gomord V., Faye L. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 193–208. doi: 10.1007/978-1-59745-407-0_11
121. Torrent M., Llopart B., Lasserre-Ramassamy S., Llop-Tous I., Bastida M., Marzabal P., Westernholm-Parvinen A., Saloheimo M., Htietz P.B., Ludevid M.D. (2009) Eukaryotic protein production in designed storage organelles. *BMC Biol.* **7**, 5. doi: 10.1186/1741-7007-7-5
122. Whitehead M., Öhlschläger P., Almajhdi F.N., Alloza L., Marzábal P., Meyers A.E., Hitzeroth I.I., Rybicki E.P. (2014) Human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein bodies cause tumour regression in mice. *BMC Cancer*. **14**, 367. doi: 10.1186/1471-2407-14-367
123. Ximba P.T. (2021) Investigation of particulate HIV-1 Env vaccine candidates using Zera® and SpyTag/SpyCatcher technologies. PhD Thesis, Faculty of Health Sciences, Department of Clinical Laboratory Sciences, University of Cape Town, South Africa. <http://hdl.handle.net/11427/36730>
124. Conley A.J., Joensuu J.J., Jevnikar A.M., Menassa R., Brandle J.E. (2009) Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 562–573. doi: 10.1002/bit.22278
125. Han Y., Pan J., Ma Y., Zhou D., Xu W. (2022) Protein-based biomaterials for combating viral infections: current status and future prospects for development. *Biosafety Health*. **4**(2), 87–94. doi: 10.1016/j.bsheat.2022.03.005
126. Joensuu J.J., Conley A.J., Lienemann M., Brandle J.E., Linder M.B., Menassa R. (2010) Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* **152**, 622–633. doi: 10.1104/pp.109.149021
127. Rozov S.M., Deineko E.V. (2022) Increasing the efficiency of the accumulation of recombinant proteins in plant cells: the role of transport signal peptides. *Plants* (Basel). **11**, 2561. doi: 10.3390/plants11192561
128. Saberianfar R., Joensuu J.J., Conley A.J., Menassa R. (2015) Protein body formation in leaves of *Nicotiana benthamiana*: a concentration-dependent mechanism influenced by the presence of fusion tags. *Plant Biotechnol. J.* **13**, 927–937. doi: 10.1111/pbi.12329
129. Linder M.B., Qiao M., Laumen F., Selber K., Hyttiä T., Nakari-Setälä T., Penttilä M.E. (2004) Efficient purification of recombinant proteins using hydrophobins as tags in surfactant-based two-phase systems. *Biochemistry*. **43**, 11873–11882. doi: 10.1021/bi0488202

RECOMBINANT VLP VACCINES SYNTHESIZED IN PLANT EXPRESSION SYSTEMS: CURRENT UPDATES AND PROSPECTS

S. M. Rozov^{1, *}, E. V. Deineko^{1, **}

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: rozov@bionet.nsc.ru*

***e-mail: deineko@bionet.nsc.ru*

The development and creation of a new generation vaccines based on recombinant proteins that assemble into virus-like particles (VLPs), as well as recombinant proteins in the form of nanoparticles are promising directions in modern biotechnology. Due to their large size (20–200 nm) and a multiplicity of viral antigenic determinants on the surface, VLPs can stimulate strong humoral and cellular immune responses. The review considered the main types of VLPs, as well as the features and disadvantages of the main expression systems used for their biosynthesis. The main focus was on plant expression systems that ensure the biosynthesis of a target recombinant protein from a DNA matrix integrated into the nuclear or chloroplast genomes of a plant (stable expression) or from a matrix for temporary production of the target product (transient expression). Various approaches for increasing the yield of VLP-forming recombinant proteins, including fusion with a transit peptide that directed the protein into the chloroplast, were discussed. The possibility of accumulation of recombinant proteins expressed in plants and intended for creation of VLP-vaccines in another type of nanoparticles, protein bodies, using specific signal sequences was also considered.

Keywords: recombinant proteins, virus-like particles, plant expression systems, stable expression, transient expression, VLP vaccine

МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНОВ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК: *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR* ПРИ РАКЕ ЯИЧНИКОВ

© 2024 г. С. С. Лукина^а, А. М. Бурдённый^{а, *}, Е. А. Филиппова^а, Л. А. Урошлев^б, И. В. Пронина^а, Н. А. Иванова^а, М. В. Фридман^б, К. И. Жордания^с, Т. П. Казубская^с, Н. Е. Кушлинский^с, В. И. Логинов^{а, d, *}, Э. А. Брага^{а, d, **}

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

^бИнститут общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^сНациональный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 115478 Россия

^dМедико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115478 Россия

*e-mail: burdennyu@gmail.com

**e-mail: eleonora10_45@mail.ru

Поступила в редакцию 24.10.2023 г.

После доработки 20.11.2023 г.

Принята к публикации 23.11.2023 г.

Рак яичников развивается бессимптомно и не диагностируется вплоть до поздних стадий, что повышает уровень летальности от этого заболевания. Изучение механизмов регуляции генов с участием длинных некодирующих РНК (днРНК) и идентификация генов таких РНК, ингибируемых посредством метилирования промоторных участков, открывает новые перспективы в диагностике и терапии рака яичников. Методом метил-специфичной ПЦР в реальном времени определено изменение уровня метилирования группы генов днРНК (*PLUT*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR*) в 122 образцах. С применением непараметрического критерия Манна–Уитни показано статистически значимое ($p < 0.001$) повышение уровня метилирования этих пяти генов днРНК при раке яичников. Установлена статистически значимая ($p < 0.05$) корреляция уровня метилирования генов днРНК *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* со стадией опухолевого процесса, степенью дифференцировки и наличием метастазов. С применением ОТ-ПЦР в реальном времени выявлено снижение уровня экспрессии *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* и показана значимая корреляция метилирования с экспрессией *SNHG6* и *TINCR* ($r_s \leq -0.5$, $p < 0.001$). Таким образом, определены новые гены днРНК, которые можно рассматривать как потенциальные эпигенетические маркеры рака яичников.

Ключевые слова: рак яичников, длинные некодирующие РНК, гены, промоторные участки, метилирование, *PLUT*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR*

DOI: 10.31857/S0026898424030059, EDN: JCWWHN

ВВЕДЕНИЕ

Рак яичников (РЯ) — является одним из наиболее летальных злокачественных новообразований и причина ежегодной смерти более 200000 женщин в мире [1, 2]. РЯ развивается бессимптомно и не диагностируется вплоть до поздних стадий с обширным метастазированием и устойчивостью к химиотерапии. Кроме лимфогенного и гематогенного типов метастазирования, для РЯ характерна также диссеминация по брюшине с образованием асцита, что повышает уровень летальности. Для ранней диагностики РЯ необходимо знать механизмы и факторы, участвующие в развитии и прогрессии этого вида рака, а также его маркеры и терапевтические мишени.

Важную роль в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов и сигнальных путей в онкогенезе играют некодирующие

РНК (нкРНК) [3–5]. В число этих РНК входят длинные некодирующие РНК (днРНК) протяженностью более 200 нуклеотидов, которые взаимодействуют с ДНК, РНК или белками, образуют с ними сложные структуры и участвуют в ремоделировании хроматина, модуляции экспрессии генов и передаче сигналов [5–7].

В настоящее время проводится интенсивный функциональный анализ некодирующих областей генома и их транскриптов, в том числе регуляторных микроРНК и днРНК, а также эпигенетических модификаций, которые управляют регуляцией генома [8]. К таким модификациям относятся и aberrантное метилирование промоторных CpG-островков генов. Изучение участков дифференциального метилирования, способных влиять на изменения экспрессии гена, позволяет лучше понять механизмы регуляции генов, кодирующих

белки, микроРНК и днРНК [8, 9]. Так, гиперметилирование играет критическую роль в дерегуляции супрессорных и других функций ряда генов днРНК, таких как MEG3, TP53-TG1, HAND2-AS1 и др. [10–12].

Цель данной работы — найти новые гены днРНК, экспрессия которых в РЯ регулируется метилированием, и оценить возможную связь аберрантного метилирования этих генов с прогрессией и метастазированием РЯ.

С этой целью нами проведен отбор группы генов днРНК, содержащих, согласно базам данных (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>, <http://www.urogene.org/methprimer2/>), CpG-островки и дифференциально регулируемых в РЯ. В исследование вошли пять генов днРНК: *PLUT*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR*, отобранных также путем анализа базы данных GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>), согласно которой экспрессия этих генов снижена в серозной цистаденокарциноме яичника, доминирующем типе РЯ. Так, значимо снижена экспрессия как генов *SNHG1* и *SNHG12* ($p < 0.01$), так и генов *SNHG6* и *TINCR*. Уровень экспрессии *PLUT* мало изменяется в РЯ и также несколько снижается (по данным GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>)).

Кроме того, нами проведен пилотный биоинформатический скрининг данных полногеномного бисульфитного секвенирования генома РЯ из базы NCBI's Gene Expression Omnibus (NCBI GEO, a public archive and resource for gene

expression data). Был использован опыт GSE81228 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE81228>), который включал данные для 27 образцов РЯ. Далее с помощью языка программирования R были отобраны гены, метилирование которых выявлено в 70% и более наборов бисульфитных прочтений в опухолях РЯ, а в контрольных образцах — менее чем в 20%.

Согласно анализу данных NCBI GEO, гены *PLUT* и *SNHG12* относятся к генам, гиперметилированным при РЯ. Учитывая существенное снижение экспрессии генов днРНК *SNHG1*, *SNHG6* и *TINCR* при серозной цистаденокарциноме яичника (согласно данным GEPIA2), можно предположить участие эпигенетической модификации в дерегуляции экспрессии этих трех генов, имеющих CpG-островки. В итоге для экспериментального исследования были отобраны пять генов днРНК (*PLUT*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR*), предположительно гиперметилированных в РЯ.

Следует подчеркнуть практически полное отсутствие данных о роли метилирования ДНК этих генов в патогенезе РЯ, за исключением недавних работ о вовлеченности *SNHG12* и *TINCR* в эпигенетические механизмы [13, 14].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы РЯ собраны и морфологически охарактеризованы в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина

Таблица 1. Клинические и гистологические характеристики образцов первичного рака яичников

Клинико-гистологический параметр		Выборка	
		N = 122	N = 93
Гистологический тип	Серозная аденокарцинома	85	68
	Эндометриоидная аденокарцинома	15	12
	Другие гистологические типы	22	13
Стадия	I	26	24
	II	19	17
	III	68	50
	IV	9	2
Степень дифференцировки	G1	25	11
	G2	31	28
	G3	48	43
	Пограничные	18	11
Метастазирование	ЕСТЬ	79	56
	НЕТ	43	37
	N1	21	11
	M1	9	2
	Метастазы в большой сальник	61	42
	Диссеминация по брюшине	45	35
	Перитонеальные метастазы суммарно	69	50

Примечание. Гены *SNHG6* и *TINCR* анализировали в 122 образцах опухолей, а гены *PLUT*, *SNHG1*, *SNHG12* — в 93 образцах.

Минздрава России. Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности; получено информированное согласие больных. Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации [15]. Исследовали образцы РЯ, полученные от больных, которые до операции не получали лучевую, химио- или гормонотерапию. Все опухоли были классифицированы в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза и гистологически верифицированы на основании критериев классификации ВОЗ [16, 17]. Образцы с высоким содержанием опухолевых клеток (не менее 70–80%) отбирали с помощью дополнительного гистологического анализа микросрезов (3–5 мкм), окрашенных гематоксилин-эозином. Образцы тканей хранили при -70°C . Замороженную в жидком азоте ткань измельчали с помощью гомогенизатора-диспергатора T10 basic ULTRA-TURRAX (“IKA”, Китай).

В исследовании использовали 122 образца РЯ, 105 образцов парной гистологически неизменной ткани яичника и 48 макроскопических перитонеальных метастазов. Часть исследования выполнена на меньшей выборке из 93 образцов РЯ, 75 образцов парной гистологически неизменной ткани яичника и 29 перитонеальных метастазов. Клинико-морфологические характеристики образцов представлены в табл. 1. Выделение ДНК и РНК, получение кДНК проводили, как описано ранее [18].

Уровень метилирования генов днРНК анализировали с применением бисульфитной конверсии ДНК и количественной метил-специфичной ПЦР с детекцией в реальном времени (МС-ПЦР). Набор реактивов qPCRMix-HS SYBR использовали согласно рекомендациям фирмы (“Евроген”, Россия). Амплификацию проводили в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System (США) в соответствии с прилагаемым к прибору протоколом. Олигонуклеотиды и условия проведения ПЦР для генов днРНК приведены в табл. 2.

Таблица 2. Праймеры и условия МС-ПЦР, использованные в данной работе

Ген днРНК	M/U	Праймер, нуклеотидная последовательность	Длина, п.н.	$T_{\text{отж}}, ^{\circ}\text{C}$
<i>PLUT</i>	М	MF: CGGGGATTTGGTATTGTGTGGC	201	60
		MR: CTAACCTAACCTCTTAATACGACCAACCA		
	U	UF: TGTTGGAATGTGTATGGGTTTTGTAAAGTT	339	61
		UR: CACAAATACCTAACCTAACCTCTTAATACAACCA		
<i>SNHG1</i>	М	MF: CGGCGATCGAGGTTTTAGGA	210	60
		MR: ACTAACTCACCGACCGCATT		
	U	UF: TGGTGATTGAGGTTTTAGGA	210	55
		UR: ACTAACTCACCAACCACATT		
<i>SNHG6</i>	М	MF: TTGAGTTATCGCGTTCGGTTT	295	61
		MR: CTCTTCCGATACGCGACCC		
	U	UF: CTCTTCCAATACACAACCC	295	58
		UR: CAAAACCATAAACACCCTCC		
<i>SNHG12</i>	М	MF: CGCGTTTAGTAAAATTATATATTAGTGGAAGAGATAAG	239	60
		MR: CCCGACGCTAAACCCACGC		
	U	UF: TGTGTTTAGTAAAATTATATATTAGTGGAAGAGATAAG	245	56
		UR: TCAATACCCAACACTAAACCCACAC		
<i>TINCR</i>	М	MF: GCGGACGAGGCGTTGTTGTTAT	193	60
		MR: CGCTAACGAACAACAACACCGAAC		
	U	UF: GTGGATGAGGTGTTGTTGTTATTGTTGATT	194	60
		UR: TCACTAACAAACAACAACACCAAACCATC		

Примечание. MF/UF и MR/UR – прямые и обратные праймеры к метилированному/неметилированному аллелю соответственно. Олигонуклеотиды подобраны с использованием базы данных <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> и программы <http://www.urogene.org/methprimer2/> с проверкой в программе SeqBuilder Pro, которая входит в пакет программ Lasergene 17.1 компании DNASTAR (США).

Таблица 3. Праймеры, условия ПЦР и размеры продукта ПЦР трех днРНК и контрольного гена

РНК	Праймеры, нуклеотидная последовательность	$T_{отж}$, °C	Размер, п. н.
SNHG12	F: TCTGGTGCATCGAGGACTTCC R: AGCATGCTGTTGTTTCTACCTAA	60	157
SNHG6	F: GCGAGGTGCAAGAAAGCC R: TGCTGCATGCCACACTTGA	60	94
TINCR	F: TGACAGGGCCCAAGGGGAAGTATT R: TGTGGCCCAAGTCAAGGATACAT	60	152
B2M	F: TGAAGTGGTGCACAGCCCAAGATAG R: CAAATGCGGCATCTTCAAACCTC	60	81

Примечание. Праймеры подбирали в программе Beacon Designer (Premier Biosoft International) и с использованием PrimerSelect, Lasergene (<http://www.dnastar.com/t-primersselect.aspx>).

Результаты определения уровня метилирования анализировали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$, как описано нами ранее [18]. В качестве контрольного локуса использовали локус *ACTB*, полученный с помощью олигонуклеотидов, специфичных к конвертированной матрице. В качестве контроля для неметилированных аллелей использовали коммерческий препарат ДНК #G1471 (“Promega”, США). В качестве положительного контроля 100% метилирования использовали препарат ДНК #SD1131 (“Thermo Fisher Scientific”, США). Результаты метилирования оценивали с помощью индекса метилирования (ИМ) согласно [19, 20]. Значение ИМ рассчитывали для каждого образца в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System.

Уровни экспрессии четырех днРНК анализировали методом количественной ПЦР в реальном времени в системе Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System. Данные анализировали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ [18]. Изменение уровня днРНК менее чем в 2 раза ($|\Delta\Delta C_t| \leq 2$) принимали за отсутствие изменений. Праймеры для анализа уровня экспрессии трех днРНК и контрольного гена *B2M* приведены в табл. 3. Наличие продуктов ПЦР и их размер проверяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле с окрашиванием интеркалирующим красителем бромидом этидия.

Статистическая обработка. Полученные результаты анализировали с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 22 и в среде программирования R. Значимость различий между исследуемыми группами оценивали, используя непараметрический U тест Манна–Уитни для независимых выборок. Данные выражали в виде медианы, нижнего (Q1) и верхнего (Q3) квартилей. При анализе связи уровней метилирования со степенью злокачественности (дедифференцировки) применяли критерий Краскала–Уоллиса (для определения статистически значимых различий между медианами трех независимых групп: G1–G2–G3). Корреляции между изменениями уровней

метилирования и экспрессии оценивали с применением коэффициента корреляции Спирмена (r_s). Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Методом МС-ПЦР в реальном времени нами определен уровень метилирования пяти генов днРНК: *PLUT*, *SNHG1*, *SNHG12* в 93 образцах РЯ, *SNHG6* и *TINCR* — в 122 (см. табл. 1). С применением непараметрического критерия Манна–Уитни показано статистически высоко значимое ($p < 0.001$) повышение уровня метилирования всех пяти исследованных генов днРНК в опухолях. На рис. 1 представлены результаты сравнения уровней метилирования пяти генов днРНК.

С целью оценки связи гиперметилирования пяти генов с прогрессией РЯ сравнили уровни метилирования на III–IV и на I–II стадиях и установили статистически значимое ($p \leq 0.001$) повышение уровня метилирования генов *SNHG6* и *SNHG12* на более поздних клинических стадиях РЯ (рис. 2а). Установлено также статистически значимое ($p \leq 0.001$) повышение уровня метилирования генов *SNHG6* и *TINCR* с увеличением степени злокачественности (снижение дифференцировки) РЯ (рис. 2б).

Далее исследовали связь между уровнями метилирования генов днРНК и наличием метастазов (рис. 3).

Если учитывать метастазы всех типов, включая отдаленные гематогенные, лимфогенные и перитонеальные (сравнивали 79 образцов РЯ с метастазами и 43 образца без метастазов), то выявили значимые различия в метилировании генов днРНК *SNHG6* и *TINCR* (рис. 3а). Показана также связь метилирования генов *SNHG6* и *SNHG12* с метастазированием в региональные лимфатические узлы (рис. 3б). Кроме того, обнаружено снижение уровня метилирования гена *SNHG12* в 29 перитонеальных метастазах относительно парных первичных опухолей (рис. 3в).

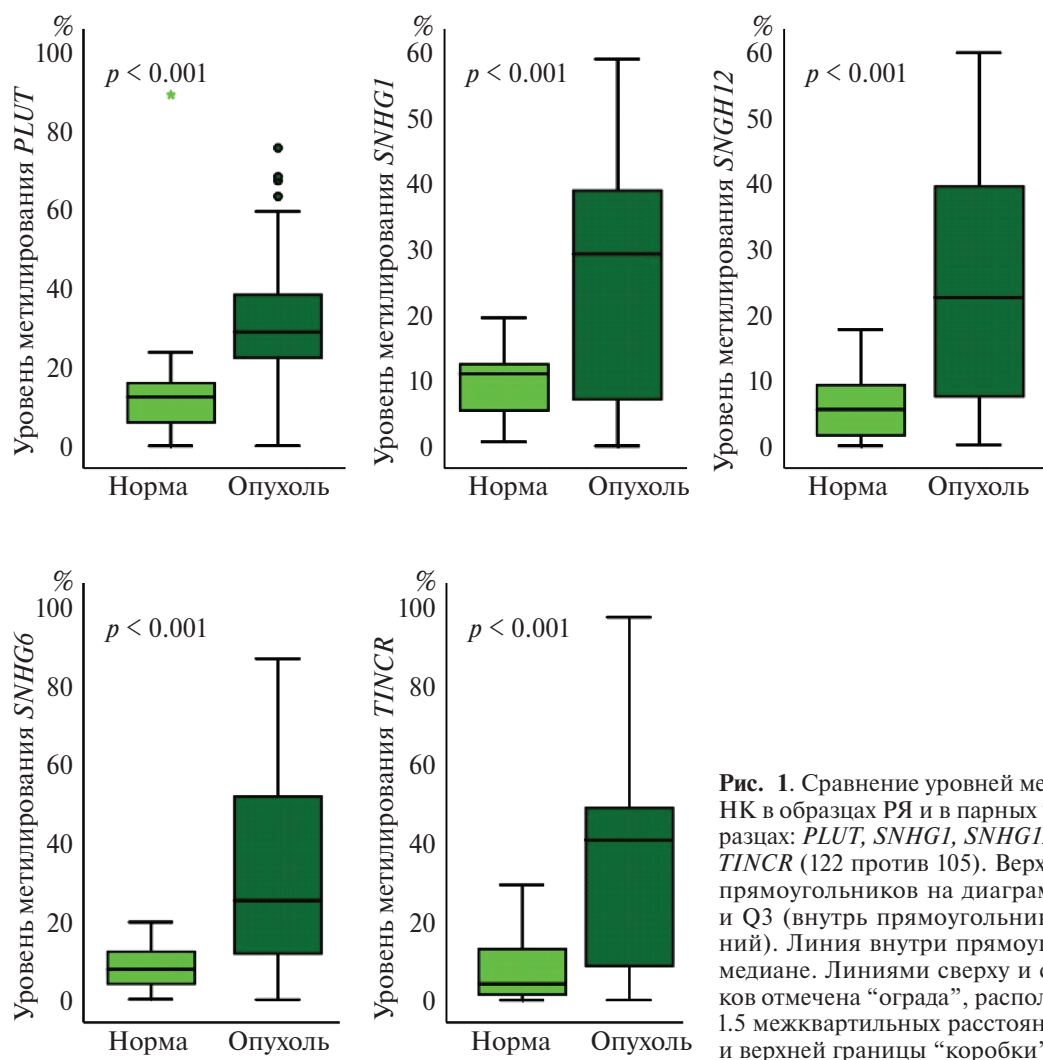


Рис. 1. Сравнение уровней метилирования генов днРНК в образцах РЯ и в парных условно нормальных образцах: *PLUT*, *SNHG1*, *SNHG12* (93 против 75), *SNHG6*, *TINCR* (122 против 105). Верхняя и нижняя границы прямоугольников на диаграммах соответствуют Q1 и Q3 (внутри прямоугольника попадает 50% значений). Линия внутри прямоугольника соответствует медиане. Линиями сверху и снизу от прямоугольников отмечена "ограда", расположенная на расстоянии 1.5 межквартильных расстояний (Q1–Q3) от нижней и верхней границы "коробки".

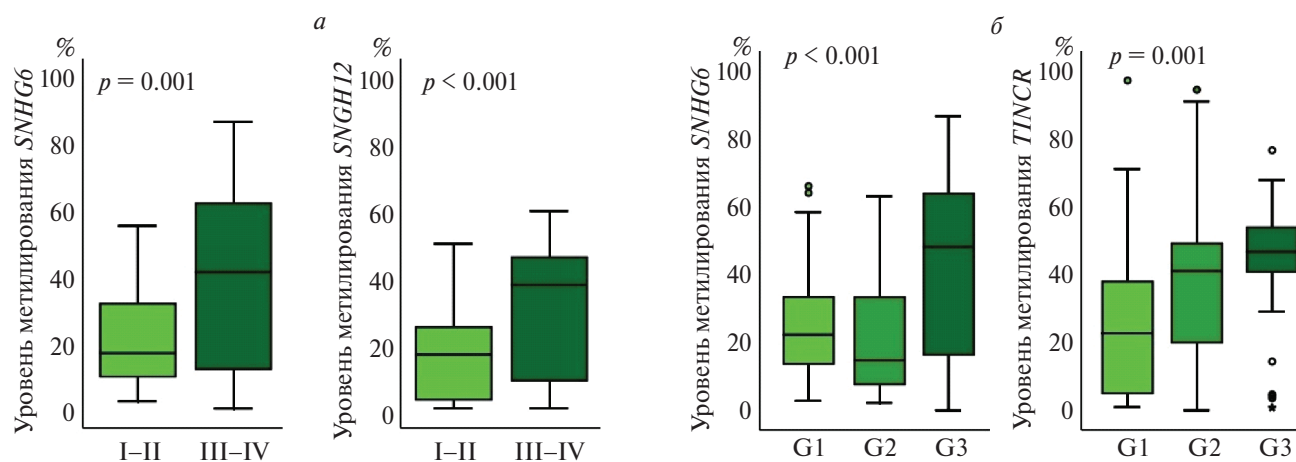


Рис. 2. Повышение уровня метилирования генов днРНК *SNHG6* и *SNHG12* на поздних стадиях РЯ (III, IV, 77 образцов) по сравнению с ранними стадиями РЯ (I–II, 45 образцов) (а); и генов днРНК *SNHG6* и *TINCR* по мере увеличения степени злокачественности (G1–G2–G3) (б); для сравнения трех групп применен непараметрический критерий Краскала–Уоллиса.

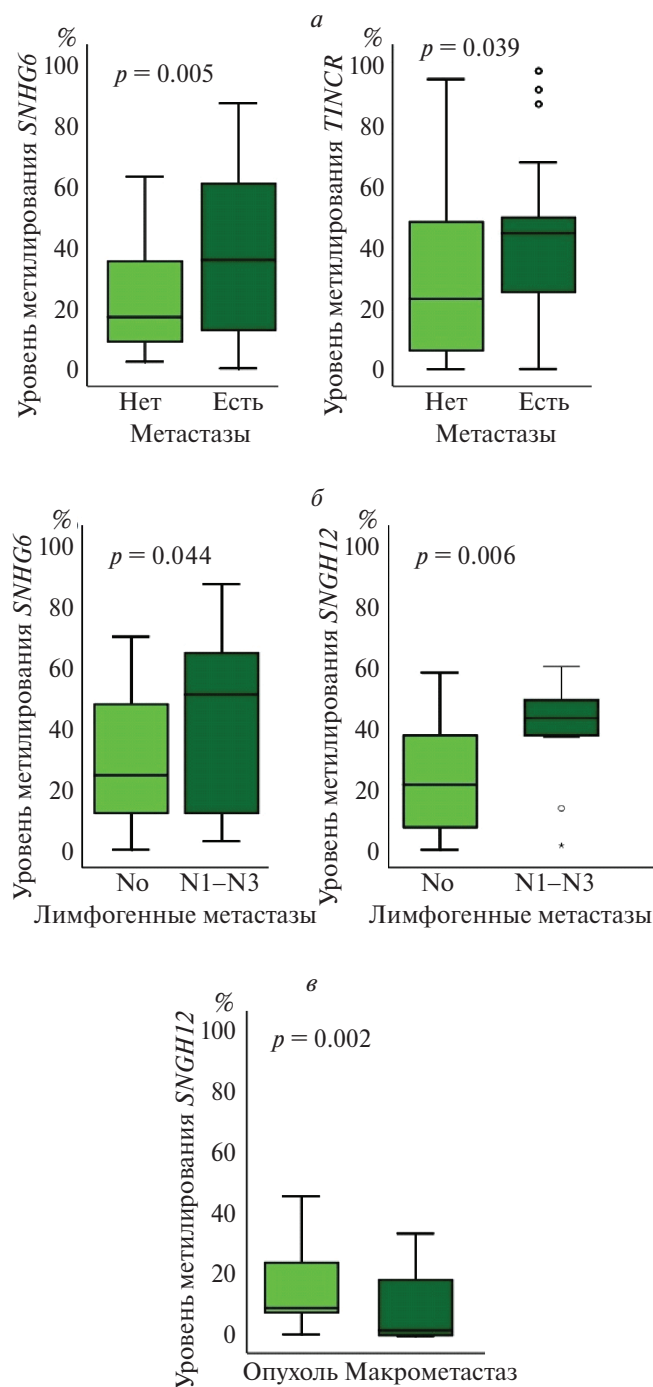


Рис. 3. Связь между повышением уровней метилирования генов днРНК *SNHG6* и *TINCR* в образцах первичного РЯ с наличием метастазов всех типов, включая отдаленные гематогенные, лимфогенные и перитонеальные (а), и генов *SNHG6* и *SNHG12* с наличием лимфогенных метастазов (б). Снижение уровня метилирования *SNHG12* в макроскопических перитонеальных метастазах относительно парных первичных опухолей (в). Применен непараметрический критерий Манна–Уитни.

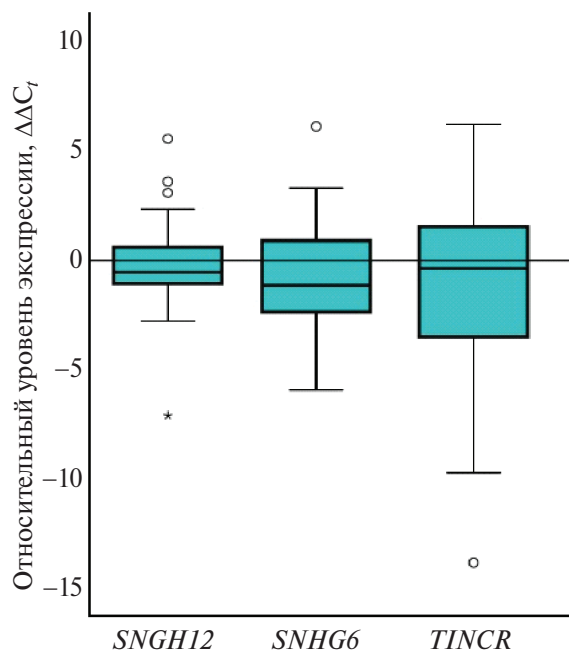


Рис. 4. Анализ уровней экспрессии генов днРНК *SNHG6*, *SNHG12* (30 парных образцов РЯ) и *TINCR* (69 парных образцов РЯ) методом количественной ПЦР.

Итак, три из пяти исследованных генов днРНК — *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* — связаны с прогрессией РЯ, включая клиническую стадию и степень злокачественности, а также метастазирование. Далее изучена возможная связь гиперметилования этих трех генов днРНК с изменением уровня их экспрессии. Изменения уровня экспрессии генов днРНК *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* представлены на рис. 4.

Установлено статистически значимое снижение уровня экспрессии гена *TINCR* ($p = 0.02$), marginally значимое — гена *SNHG6* ($p = 0.08$) и на уровне тенденции — гена *SNHG12* (9/30, 30% против 5/30, 17%).

С использованием коэффициента корреляции Спирмена (r_s) сопоставлены изменения уровней метилирования и экспрессии генов днРНК *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* в общих выборках образцов РЯ. Выявлена значимая отрицательная корреляция этих параметров генов *SNHG6* ($r_s = -0.66$, $p < 0.001$) и *TINCR* ($r_s = -0.49$, $p < 0.001$) (рис. 5).

Таким образом, ассоциация метилирования со снижением экспрессии наиболее убедительно показана для генов *SNHG6* и *TINCR*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данные, полученные нами при изучении aberrantного метилирования пяти генов днРНК (*PLUT*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR*), позволяют предполагать участие гиперметилования этих

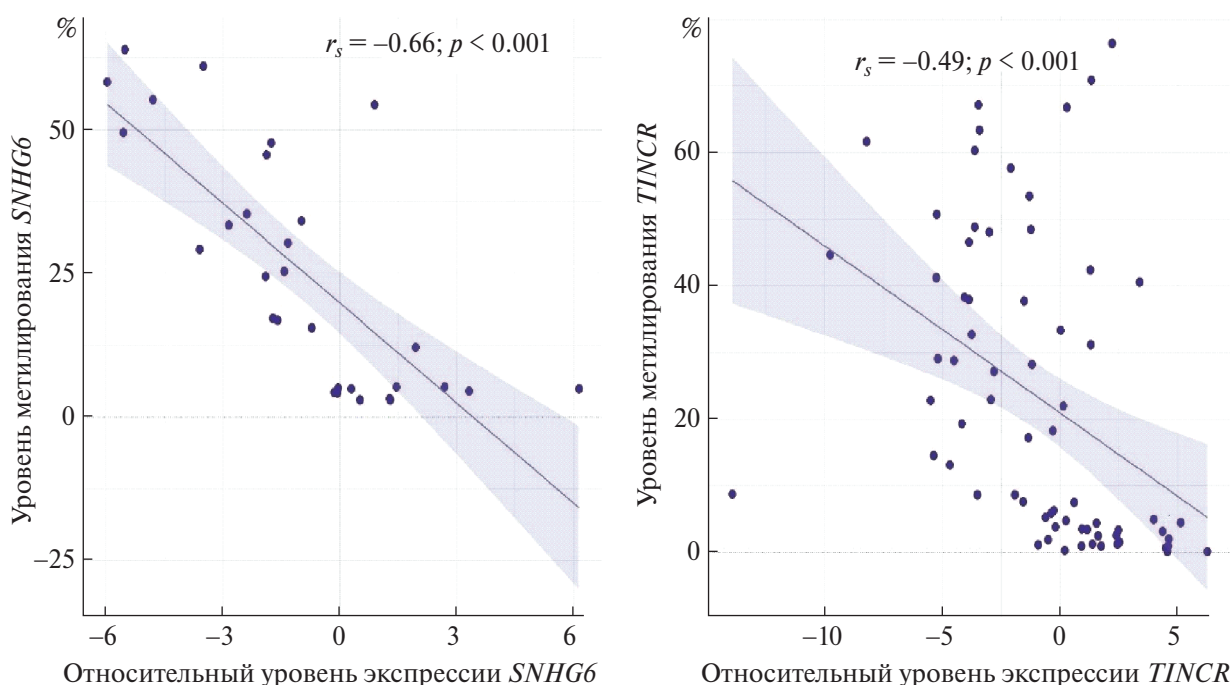


Рис. 5. Статистически значимая отрицательная корреляция между изменениями уровней метилирования и экспрессии генов днРНК *SNHG6* и *TINCR* в общих выборках образцов (30 и 69 соответственно) РЯ. Применен коэффициент корреляции Спирмена (r_s).

генов в возникновении и развитии РЯ. Следует подчеркнуть практически полное отсутствие публикаций, посвященных роли метилирования этих генов в патогенезе РЯ. Показана вовлеченность *SNHG12* в эпигенетические механизмы и развитие устойчивости РЯ к химиотерапии [13], а также представлены результаты предварительного изучения гиперметилования ряда генов днРНК, включая *TINCR*, проведенного нами на выборке из 40 образцов РЯ [14].

ДнРНК *PLUT/PDX1-AS1* (*PDX1* associated lncRNA, upregulator of transcription, *PLUTO*) регулирует экспрессию гена транскрипционного фактора *PDX1* (pancreatic and duodenal homeobox 1), участвующего в регуляции функций и идентичности β -клеток поджелудочной железы [21, 22]. Аномальное метилирование CpG-островков промоторного участка гена *PLUT* обнаружено в опухолях аденокарциномы легкого [23]. Гиперметилование гена *PLUT* в РЯ указывает на возможную роль aberrантного метилирования в механизмах возникновения и развития РЯ. Отсутствие, по нашим данным, связи метилирования гена *PLUT* с прогрессией РЯ позволяет предполагать вовлеченность этой эпигенетической модификации только на начальных этапах патогенеза РЯ.

SNHG1 (Small Nucleolar RNA Host Gene 1), *SNHG6* (Small Nucleolar RNA Host Gene 6) и *SNHG12* (Small Nucleolar RNA Host Gene 12) входят в семейство днРНК, образовавшихся из генов малых ядрышковых РНК [24]. В отличие от

малых ядрышковых РНК, происходящих из интронов, днРНК семейства *SNHG* содержат последовательности как интронов, так и экзонов.

Для днРНК *SNHG1*, *SNHG6* и *SNHG12* в РЯ характерны скорее проонкогенные, чем супрессорные функции [25–28]. Так, на клеточных линиях РЯ показано, что *SNHG6* участвует в эпителиально-мезенхимальном переходе, активируя ассоциированный с этим переходом белок YAP1 (Yes-associated protein 1) [27]. Причем сообщается также о повышенной экспрессии *SNHG1*, *SNHG6* и *SNHG12* в образцах РЯ [25–28]. Однако это противоречит данным ресурса GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>), согласно которым экспрессия этих днРНК снижена в опухолях яичников: *SNHG1* и *SNHG12* ($p < 0.01$), *SNHG6* ($p < 0.1$).

Данные о снижении уровня экспрессии генов *SNHG6* и *SNHG12* и о статистически значимой корреляции между уровнями метилирования и экспрессии гена днРНК *SNHG6* убедительно указывают на возможное участие метилирования в подавлении транскрипции данных генов и позволяют предположить, что днРНК *SNHG6* и *SNHG12* могут обладать супрессорной активностью при РЯ.

Полученные нами данные об ассоциации гиперметилования генов днРНК *SNHG6* и *SNHG12* с более поздней клинической стадией и метастазированием РЯ указывают на вовлеченность этих днРНК и модификаций их генов в прогрессию РЯ. Анализ макроскопических перитонеальных

метастазов выявил интересную особенность гена *SNHG12*. Оказалось, что если по мере прогрессии опухоли уровень метилирования этого гена повышается, то в самих перитонеальных метастазах уровень метилирования гена *SNHG12*, наоборот, снижается. Противоположную направленность изменений уровня метилирования генов днРНК *MEG3*, *SEMA3B-AS1* и микроРНК *miR-148a* в перитонеальных метастазах РЯ и в парных опухолях мы отмечали и ранее [14, 20]. Это может указывать на участие эпигенетических факторов в реверсии эпителиально-мезенхимального перехода в мезенхимально-эпителиальный, наблюдаемый в макроскопических метастазах [29, 30].

ДнРНК *TINCR* ((terminal/tissue) differentiation-induced non-coding RNA) участвует в контроле дифференцировки соматических клеток, в частности в контроле эпидермальной дифференцировки клеток человека и дифференцировки клеток бронхиального эпителия [31, 32]. Анализ интерактома РНК в масштабе генома показал, что *TINCR* взаимодействует с множеством мРНК, связанных с дифференцировкой посредством мотива “*TINCR*-бокс” из 25 нуклеотидов [30]. *TINCR* влияет на экспрессию важнейших регуляторов дифференцировки, таких как *SOX2*, *JAG1* и *HES1*, частично за счет связывания с белком *STAU1* [32]. Показано участие и других РНК-связывающих белков, таких как *IGF2BP3* (insulin-like growth factor 2 RNA-binding protein 3), в качестве посредников в регуляторных функциях *TINCR* [33].

Отмечено, что *TINCR* может действовать и как супрессор, и как онкоген в патогенезе опухолей разных нозологических форм [34]. Так, уровень экспрессии *TINCR* повышается при раке желудка, пищевода, мочевого пузыря и молочной железы, но он снижается при глиоме, ретинобластоме и раке простаты [34]. *TINCR* снижается также в образцах плоскоклеточного рака легкого, что согласуется со снижением дифференцировки, наблюдаемым при этом виде рака [31].

Согласно GEPIA2 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/>) и по нашим данным ($p = 0.02$), уровень транскрипции *TINCR* в РЯ снижен, поэтому можно предположить, что при РЯ днРНК *TINCR* действует как супрессор. В данной работе установлена также значимая обратная корреляция между уровнями метилирования и экспрессией ($r_s = -0.5$, $p < 0.001$), подтверждающая функциональную значимость метилирования гена *TINCR*.

Нами обнаружено повышение уровня метилирования гена *TINCR* при метастазировании ($p = 0.04$) и при снижении степени дифференцировки (G1-G2-G3, $p < 0.001$) клеток РЯ, что согласуется с данными о роли этой днРНК в контроле клеточной дифференцировки [31, 32].

Интересно, что *TINCR* – это РНК, выполняющая две функции: днРНК и мРНК, поскольку

в *TINCR* недавно обнаружена открытая рамка считывания, кодирующая убиквитинподобный микропротеин [35, 36], играющий супрессорную роль при плоскоклеточном раке легкого.

Необходимо подчеркнуть клиническое значение локусов, aberrантно метилируемых в опухолях и выявляемых как на основе белоккодирующих генов, так и на основе генов микроРНК и днРНК [37, 38]. Так, с помощью интегрированного эпигеномно-транскриптомного анализа в образцах рака легкого обнаружены восемь новых aberrантно метилированных драйверных генов и 13 aberrантно метилированных драйверных нкРНК, из которых пять микроРНК и восемь днРНК обладают диагностическим и терапевтическим потенциалом [38]. Возможности клинического применения генов днРНК широко исследуются. Показано, что гиперметилирование гена *PLUT*, обнаруживаемое в опухолях больных аденокарциномой легкого на ранних стадиях, может служить маркером риска ранних рецидивов [23]. Оказалось, что aberrантное метилирование гена *HOTAIR* можно использовать для прогнозирования устойчивости РЯ к химиотерапии карбоплатином [39]. Гиперметилирование промоторного района гена днРНК *LINC00473*, обнаруженное в ДНК плазмы больных колоректальным раком, предложено использовать для ранней неинвазивной диагностики этого вида рака [40]. Сравнение метилирования CpG-островков промоторных участков генов днРНК *H19* и *MALAT1* в периферической крови 150 больных раком желудка и 100 здоровых доноров показало, что уровень метилирования этих генов днРНК можно использовать для неинвазивной диагностики рака желудка [41].

Таким образом, нами получены данные, позволяющие предполагать вовлеченность гиперметилирования пяти генов днРНК *PLUT*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* в развитие РЯ, а генов *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* – в прогрессию РЯ, включая клиническую стадию, степень злокачественности и метастазирование. Нами изучена ассоциация гиперметилирования трех генов днРНК, связанных с прогрессией РЯ, с подавлением их экспрессии, обнаружено снижение экспрессии этих генов в РЯ и обратная корреляция между уровнями метилирования и экспрессии *SNHG6* и *TINCR*. Представленные здесь данные указывают на супрессорную роль днРНК *SNHG6*, *SNHG12* и *TINCR* в патогенезе РЯ, однако для проверки этих предположений необходимо проведение дальнейших исследований. Данные по гиперметилированию генов днРНК могут быть полезны при отборе новых биомаркеров или терапевтических мишеней при РЯ.

Работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (грант № 20-15-00368П).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим

стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Исследование одобрено Этическим комитетом Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии (протоколы заседаний № 4Б от 24.11.2020 и № 2 от 04.04.2023). От каждого из включенных в исследование участников получено информированное добровольное согласие. Все обследованные — совершеннолетние.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **71**(3), 209–249.
doi: 10.3322/caac.21660
2. (2022) Злокачественные новообразования в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Шахзадовой А.О. Москва: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 252 с.
3. Baek D., Villén J., Shin C., Camargo F.D., Gygi S.P., Bartel D.P. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. **455**(7209), 64–71.
doi: 10.1038/nature07242
4. Esteller M. (2011) Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **12**(12), 861–874.
doi: 10.1038/nrg3074
5. Буре И.В., Кузнецова Е.Б., Залетаев Д.В. (2018) Длинные некодирующие РНК и их роль в онкогенезе. *Молекуляр. биология*. **52**(6), 907–920.
doi: 10.1134/S0026893318060031
6. Zhang X., Wang W., Zhu W., Dong J., Cheng Y., Yin Z., Shen F. (2019) Mechanisms and functions of long non-coding RNAs at multiple regulatory levels. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(22), 5573.
doi: 10.3390/ijms20225573
7. Guttman M., Rinn J.L. (2012) Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature*. **482**(7385), 339–346.
doi: 10.1038/nature10887
8. Murtha M., Esteller M. (2016) Extraordinary cancer epigenomics: thinking outside the classical coding and promoter box. *Trends Cancer*. **2**(10), 572–584.
doi: 10.1016/j.trecan.2016.08.004
9. Moutinho C., Esteller M. (2017) MicroRNAs and epigenetics. *Adv. Cancer Res.* **135**, 189–220.
doi: 10.1016/bs.acr.2017.06.003
10. Sheng X., Li J., Yang L., Chen Z., Zhao Q., Tan L., Zhou Y., Li J. (2014) Promoter hypermethylation influences the suppressive role of maternally expressed 3, a long non-coding RNA, in the development of epithelial ovarian cancer. *Oncol. Rep.* **32**(1), 277–285.
doi: 10.3892/or.2014.3208
11. Diaz-Lagares A., Crujeiras A.B., Lopez-Serra P., Soler M., Setien F., Goyal A., Sandoval J., Hashimoto Y., Martinez-Cardús A., Gomez A., Heyn H., Moutinho C., Espada J., Vidal A., Paúles M., Galán M., Sala N., Akiyama Y., Martínez-Iniesta M., Farré L., Villanueva A., Gross M., Diederichs S., Guil S., Esteller M. (2016) Epigenetic inactivation of the p53-induced long noncoding RNA TP53 target 1 in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **113**(47), E7535–E7544.
doi: 10.1073/pnas.1608585113
12. Gokulnath P., de Cristofaro T., Manipur I., Di Palma T., Soriano A.A., Guarracino M.R., Zannini M. (2020) Long non-coding RNA HAND2-AS1 acts as a tumor suppressor in high-grade serous ovarian carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(11), 4059.
doi: 10.3390/ijms21114059
13. Abildgaard C., do Canto L.M., Rainho C.A., Marchi F.A., Calanca N., Waldstrøm M., Steffensen K.D., Rogatto S.R. (2022) The long non-coding RNA SNHG12 as a mediator of carboplatin resistance in ovarian cancer via epigenetic mechanisms. *Cancers* (Basel). **14**(7), 1664.
doi: 10.3390/cancers14071664
14. Бурденный А.М., Филиппова Е.А., Иванова Н.А., Лукина С.С., Пронина И.В., Логинов В.И., Фридман М.В., Казубская Т.П., Уткин Д.О., Брага Э.А., Кушлинский Н.Е. (2021) Гиперметилование генов новых длинных некодирующих РНК в опухолях яичников и метастазах: двойственный эффект. *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.* **171**(3), 370–374.
doi: 10.1007/s10517-021-05230-3
15. World Medical Association (2013) World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. **310**(20), 2191–2194.
doi: 10.1001/jama.2013.281053
16. (2017) *The TNM Classification of Malignant Tumours, 8th ed.* Eds Brierley J.D., Gospodarowicz M.K., Wittekind C. Oxford: Wiley-Blackwell.
17. (2014) *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, 4th ed.* Eds Kurman R.J., Carcangiu M.L., Herrington C.S., Young R.H. Lyon: IARC Press.
18. Pronina I.V., Loginov V.I., Burdennyy A.M., Fridman M.V., Senchenko V.N., Kazubskaya T.P., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. (2017) DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene*. **604**, 1–8.
doi: 10.1016/j.gene.2016.12.018
19. van Hoesel A.Q., Sato Y., Elashoff D.A., Turner R.R., Giuliano A.E., Shamonki J.M., Kuppen P.J., van de Velde C.J., Hoon D.S. (2013) Assessment of DNA methylation status in early stages of breast cancer development. *Br. J. Cancer*. **108**, 2033–2038.
doi: 10.1038/bjc.2013.136
20. Loginov V.I., Pronina I.V., Filippova E.A., Burdennyy A.M., Lukina S.S., Kazubskaya T.P., Uroshlev L.A., Fridman M.V., Brovkina O.I., Apanovich N.V., Karpukhin A.V., Stilidi I.S., Kushlinskii N.E., Dmitriev A.A., Braga E.A. (2022) Aberrant methylation of 20 miRNA genes specifically involved in various steps of ovarian carcinoma spread: from primary tumors to peritoneal macroscopic metastases. *Int. J. Mol. Sci.* **23**(3), 1300.
doi: 10.3390/ijms23031300
21. Ahlgren U., Jonsson J., Jonsson L., Simu K., Edlund H. (1998) Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl1*/

- Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev.* **12**(12), 1763–1768. doi: 10.1101/gad.12.12.1763
22. Ebrahim N., Shakirova K., Dashinimaev E. (2022) PDX1 is the cornerstone of pancreatic β -cell functions and identity. *Front. Mol. Biosci.* **9**, 1091757. doi: 10.3389/fmolb.2022.1091757
 23. Kim-Wanner S.Z., Assenov Y., Nair M.B., Weichenhan D., Benner A., Becker N., Landwehr K., Kuner R., Sultmann H., Esteller M., Koch I., Lindner M., Meister M., Thomas M., Bieg M., Klingmüller U., Schlesner M., Warth A., Brors B., Seifried E., Bönig H., Plass C., Risch A., Muley T. (2020) Genome-wide DNA methylation profiling in early stage I lung adenocarcinoma reveals predictive aberrant methylation in the promoter region of the long non-coding RNA *PLUT*: an exploratory study. *J. Thorac. Oncol.* **15**(8), 1338–1350. doi: 10.1016/j.jtho.2020.03.023
 24. Zimta A.A., Tigu A.B., Braicu C., Stefan C., Ionescu C., Berindan-Neagoe I. (2020) An emerging class of long non-coding RNA with oncogenic role arises from the snoRNA host genes. *Front. Oncol.* **10**, 389. doi: 10.3389/fonc.2020.00389
 25. Wang S., Jiang J., Wang Z., Xie Y., Wu X. (2017) Long non-coding RNA SNHG1 is an unfavorable prognostic factor and promotes cell proliferation and migration by Wnt/ β -catenin pathway in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **10**(9), 9284–9292.
 26. Wu Y., Zhu B., Yan Y., Bai S., Kang H., Zhang J., Ma W., Gao Y., Hui B., Li R., Zhang X., Ren J. (2021) Long non-coding RNA SNHG1 stimulates ovarian cancer progression by modulating expression of miR-454 and ZEB1. *Mol. Oncol.* **15**(5), 1584–1596. doi: 10.1002/1878-0261.12932
 27. Su M., Huang P., Li Q. (2023) Long noncoding RNA SNHG6 promotes the malignant phenotypes of ovarian cancer cells via miR-543/YAP1 pathway. *Heliyon.* **9**(5), e16291. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e16291
 28. Sun D., Fan X.H. (2019) LncRNA SNHG12 accelerates the progression of ovarian cancer via absorbing miRNA-129 to upregulate SOX4. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23**(6), 2345–2352. doi: 10.26355/eurev_201903_17378
 29. Tam W.L., Weinberg R.A. (2013) The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat. Med.* **19**(11), 1438–1449. doi: 10.1038/nm.3336
 30. Харченко Е.П., Соловьев И.А. (2016) Метастазирование и ранковая спячка. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена.* **5**(5), 72–77. <https://doi.org/10.17116/onkolog20165572-77>
 31. Kretz M., Siprashvili Z., Chu C., Webster D.E., Zehnder A., Qu K., Lee C.S., Flockhart R.J., Groff A.F., Chow J., Johnston D., Kim G.E., Spitale R.C., Flynn R.A., Zheng G.X., Aiyer S., Raj A., Rinn J.L., Chang H.Y., Khavari P.A. (2013) Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature.* **493**(7431), 231–235. doi: 10.1038/nature11661
 32. Omote N., Sakamoto K., Li Q., Schupp J.C., Adams T., Ahangari F., Chioccioli M., Deluliis G., Hashimoto N., Hasegawa Y., Kaminski N. (2021) Long noncoding RNA TINCR is a novel regulator of human bronchial epithelial cell differentiation state. *Physiol. Rep.* **9**(3), e14727. doi: 10.14814/phy2.14727
 33. Zheng Z.Q., Li Z.X., Guan J.L., Liu X., Li J.Y., Chen Y., Lin L., Kou J., Lv J.W., Zhang L.L., Zhou G.Q., Liu R.Q., Chen F., He X.J., Li Y.Q., Li F., Xu S.S., Ma J., Liu N., Sun Y. (2020) Long noncoding RNA TINCR-mediated regulation of acetyl-CoA metabolism promotes nasopharyngeal carcinoma progression and chemoresistance. *Cancer Res.* **80**(23), 5174–5188. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-3626
 34. Ghafouri-Fard S., Dashti S., Taheri M., Omrani M.D. (2020) TINCR: an lncRNA with dual functions in the carcinogenesis process. *Noncoding RNA Res.* **5**(3), 109–115. doi: 10.1016/j.ncrna.2020.06.003
 35. Eckhart L., Lachner J., Tschachler E., Rice R.H. (2020) TINCR is not a non-coding RNA but encodes a protein component of cornified epidermal keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **29**(4), 376–379. doi: 10.1111/exd.14083
 36. Morgado-Palacin L., Brown J.A., Martinez T.F., Garcia-Pedrero J.M., Forouhar F., Quinn S.A., Reglero C., Vaughan J., Heydari Y.H., Donaldson C., Rodriguez-Perales S., Allonca E., Granda-Diaz R., Fernandez A.F., Fraga M.F., Kim A.L., Santos-Juanes J., Owens D.M., Rodrigo J.P., Saghatelian A., Ferrando A.A. (2023) The TINCR ubiquitin-like microprotein is a tumor suppressor in squamous cell carcinoma. *Nat. Commun.* **14**(1), 1328. doi: 10.1038/s41467-023-36713-8
 37. Sigin V.O., Kalinkin A.I., Nikolaeva A.F., Ignatova E.O., Kuznetsova E.B., Chesnokova G.G., Litviakov N.V., Tsyganov M.M., Ibragimova M.K., Vinogradov I.I., Vinogradov M.I., Vinogradov I.Y., Zaletaev D.V., Nemtsova M.V., Kutsev S.I., Tanas A.S., Strelnikov V.V. (2023) DNA methylation and prospects for predicting the therapeutic effect of neoadjuvant chemotherapy for triple-negative and luminal B breast cancer. *Cancers (Basel).* **15**(5), 1630. doi: 10.3390/cancers15051630
 38. Sun X., Yi J., Yang J., Han Y., Qian X., Liu Y., Li J., Lu B., Zhang J., Pan X., Liu Y., Liang M., Chen E., Liu P., Lu Y. (2021) An integrated epigenomic-transcriptomic landscape of lung cancer reveals novel methylation driver genes of diagnostic and therapeutic relevance. *Theranostics.* **11**(11), 5346–5364. doi: 10.7150/thno.58385
 39. Teschendorff A.E., Lee S.H., Jones A., Fiegl H., Kalwa M., Wagner W., Chindera K., Evans I., Dubeau L., Orjalo A., Horlings H.M., Niederreiter L., Kaser A., Yang W., Goode E.L., Fridley B.L., Jenner R.G., Berns E.M., Wik E., Salvesen H.B., Wisman G.B., van der Zee A.G., Davidson B., Trope C.G., Lambrechts S., Vergote I., Calvert H., Jacobs I.J., Widschwendter M. (2015) HOTAIR and its surrogate DNA methylation signature indicate carboplatin resistance in ovarian cancer. *Genome Med.* **7**, 108. doi: 10.1186/s13073-015-0233-4
 40. Ruiz-Bañobre J., Rodriguez-Casanova A., Costa-Fraga N., Bao-Caamano A., Alvarez-Castro A., Carreras-Presas M., Brozos-Vazquez E., Vidal-Insua Y., Vazquez-Rivera F., Candamio-Folgar S., Mosquera-Presedo M., Lago-Lestón R.M., Muñelo-Romay L., Vázquez-Bueno J.Á., Sanz-Pamplona R., Moreno V., Goel A., Castillo L., Martín A.C., Arroyo R., Esteller M., Crujeiras A.B., López-López R., Díaz-Lagares A. (2022) Noninvasive early detection of colorectal cancer by hypermethylation of the

- LINC00473 promoter in plasma cell-free DNA. *Clin. Epigenetics*. **14**(1), 86.
doi: 10.1186/s13148-022-01302-x
41. Hu D., Lou X., Meng N., Li Z., Teng Y., Zou Y., Wang F. (2021) Peripheral blood-based DNA methylation of long non-coding RNA H19 and metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 promoters are potential non-invasive biomarkers for gastric cancer detection. *Cancer Control*. **28**, 10732748211043667.
doi: 10.1177/10732748211043667

METHYLATION OF LONG NON-CODING RNA GENES: *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR* IN OVARIAN CANCER

S. S. Lukina¹, A. M. Burdennyi^{1, *}, E. A. Filippova¹, L. A. Uroshlev², I. V. Pronina¹,
N. A. Ivanova¹, M. V. Fridman², K. I. Zhordania³, T. P. Kazubskaya³, N. E. Kushlinskii³,
V. I. Loginov^{1, 4}, E. A. Braga^{1, 4, **}

¹Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia

²Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Science, Moscow, 119991 Russia

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478 Russia

⁴Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia

*e-mail: burdennyi@gmail.com

**e-mail: eleonora10_45@mail.ru

Ovarian cancer (OC) develops asymptotically and is not diagnosed until advanced stages, which increases the mortality rate from this disease. In the diagnosis and treatment of OC, new prospects have been opened in studies of the gene regulation mechanisms involving long non-coding RNAs (lncRNAs) and identification of lncRNA genes inhibited by methylation of promoter regions. Using a set of 122 samples of primary OC tumors, by methylation specific real-time PCR, changes in the methylation level of a group of lncRNA genes were studied: *PLUT*, *SNHG1*, *SNHG6*, *SNHG12*, and *TINCR*. Using the nonparametric Mann–Whitney test, a statistically significant ($p < 0.001$) increase in the methylation level of these 5 lncRNA genes in tumors was shown. A statistically significant ($p < 0.05$) correlation was established between the level of methylation of the lncRNA genes *SNHG6*, *SNHG12* and *TINCR* with the stage of the tumor process, the histological grade and the presence of metastases. Using real-time RT-qPCR, a decrease in the expression level of the *SNHG6*, *SNHG12* and *TINCR* genes was observed and a significant correlation of methylation with the expression of *SNHG6* and *TINCR* was shown ($r_s \leq -0.5$, $p < 0.001$). Thus, new lncRNA genes representing potential epigenetic markers of ovarian cancer have been identified.

Keywords: methylation of promoter regions, long non-coding RNA genes, *SNHG6*, *SNHG12*, *TINCR*, ovarian cancer

ПРОФИЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ПРИ КОМОРБИДНОСТИ АНЕВРИЗМЫ И АТЕРОСКЛЕРОЗА ВОСХОДЯЩЕЙ АОРТЫ

© 2024 г. И. А. Гончарова^{а, *}, А. А. Зарубин^а, С. А. Шипулина^а, Ю. А. Королёва^а, Д. С. Панфилов^б, Б. Н. Козлов^б, М. С. Назаренко^а^аНаучно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия^бНаучно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634012 Россия

*e-mail: irina.goncharova@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 10.11.2023 г.

После доработки 05.12.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2023 г.

Атеросклероз и аневризма аорты — относительно частые патологические состояния, которые длительное время протекают бессимптомно и приводят к жизнеугрожающим и инвалидизирующим осложнениям. Представлены результаты анализа метилирования ДНК в различных участках восходящей аорты (дилатированном, в нерасширенной области и в атеросклеротической бляшке) у пациентов с аневризмой аорты. Метилирование ДНК определяли методом бисульфитного секвенирования ограниченных наборов геномных локусов (RRBS). Выявлены различия в уровне метилирования двух CpG-сайтов гена *NR2F1-AS1* ($|\Delta\beta| \geq 0.2$ и $FDR < 0.05$) в дилатированной и нормальной ткани аорты. В образцах атеросклеротических бляшек и тканях дилатированной/нормальной аорты обнаружено 586/480 дифференциально метилированных CpG-сайтов: в атеросклеротических бляшках гиперметилированы 323/234 и гипометилированы 263/246 CpG-сайтов. Дифференциально метилированные CpG-сайты локализованы в основном в интронах и межгенных регионах, 88.2% — в сайтах связывания факторов транскрипции, среди которых ZNF263, ZFP148, PATZ1, NRF1, TCF12, EGR1 связаны с патогенезом атеросклероза различных артерий, а ELK1, ETS1, KLF15 — с аневризмой аорты. Шестнадцать дифференциально метилированных CpG-сайтов локализованы в области генов *CMIP*, *RPH3AL*, *XRCC1*, *GATA5*, *EXD3*, *KCNC2*, *HIVEP3*, *ADCY9*, *CDCP2*, *FOLR1*, *WT1*, *MGMT*, *GAS2*, *CAI*, *PRSS16*, *ANK3*, белковые продукты которых вовлечены в развитие как расслоения аорты, так и атеросклероза сосудов различных бассейнов. Белковые продукты этих генов участвуют в различных биологических процессах, в том числе в развитии мезенхимы (GO:0060485, *FOLR1*, *WT1*, *GATA5*, *HIVEP3*, *KCNC2*) и регуляции метаболизма ДНК (GO:0051054, *MGMT*, *WT1*, *XRCC1*).

Ключевые слова: аневризма аорты, атеросклероз, метилирование ДНК, бисульфитное секвенирование

DOI: 10.31857/S0026898424030069, EDN: JCOUW

ВВЕДЕНИЕ

Атеросклероз и аневризма аорты длительное время протекают бессимптомно и являются относительно частыми патологическими состояниями, которые приводят к жизнеугрожающим и инвалидизирующим осложнениям. Коморбидность атеросклероза и аневризмы грудной аорты варьирует в широких пределах. Обе патологии имеют одни и те же факторы риска (артериальная гипертензия, курение, мужской пол, возраст), а также некоторые патогенетические механизмы. Атеросклероз считается одной из причин возникновения аневризмы и расслоения аорты, однако данные, поддерживающие это предположение, противоречивы.

С одной стороны, атеросклеротическое поражение грудной аорты нередко возникает при мультифокальном атеросклерозе, и 87.6% пациентов

с атеросклерозом аорты имеют атеросклеротическое поражение других сосудов, а степень атеросклероза аорты коррелирует с количеством пораженных сосудов при ишемической болезни сердца (ИБС) [1]. С другой стороны, получены некоторые свидетельства в пользу гипотезы о существовании обратной коморбидности между аневризмой восходящего отдела аорты и атеросклерозом сосудов других бассейнов, поскольку пациенты с аневризмой восходящего отдела аорты имеют более низкие общие показатели толщины комплекса интима-медиа сонных артерий [2] и характеризуются более низкими значениями кальцификации коронарных артерий по сравнению с лицами без сердечно-сосудистых заболеваний независимо от других факторов риска атеросклероза [3]. Более того, у пациентов с аневризмой грудной аорты реже регистрировались такие клинические осложнения

атеросклероза коронарных артерий, как ИБС и инфаркт миокарда [4].

Несиндромальные спорадические случаи аневризмы и расслоения грудной аорты и атеросклеротическое поражение артерий различных бассейнов сопровождаются разнообразными структурными изменениями генома лейкоцитов и клеток сосудов [5–8]. Около 10% пациентов с ранним спорадическим расслоением грудной аорты имеют патогенные варианты генов наследственных форм аневризмы, а у 28% пациентов зарегистрированы генетические варианты с неизвестной клинической значимостью [9]. Однако в большинстве случаев при аневризме грудной аорты, как и при атеросклеротических поражениях артерий, не выявлено специфических генетических вариантов, которые можно рассматривать как потенциальные маркеры заболевания. Одним из перспективных направлений поиска молекулярных маркеров данных патологий считается изучение эпигенетического профиля клеток аорты в регионах, различающихся степенью дилатации/расслоения, и сосудов других бассейнов при их атеросклеротическом поражении.

К настоящему времени показано, что уровень и рисунок метилирования ДНК в пораженных атеросклерозом сосудах отличается от этих параметров в нормальных тканях артерий [10, 11]. Эпигенетическим механизмам атерогенеза посвящены многочисленные исследования, тогда как особенности метилирования ДНК в тканях аорты при аневризме и расслоении ее восходящего отдела описаны в единичных работах. Установлены различия в профиле метилирования ДНК в тканях аорты пациентов с аневризмой аорты с различным строением аортального клапана, а также в тканях аорты с расслоением и дилатацией [12, 13]. Наиболее существенные различия выявлены в уровне метилирования гена *PTPN22*, белковый продукт которого вовлечен в сигнальный путь рецептора Т-клеток.

Chen Y. и соавт. сравнили метилирование ДНК в тканях грудной аорты (расслоение/интактная ткань) и выявили 589 дифференциально метилированных CpG-сайтов (ДМС) в генах сигнальных путей MAPK (митоген-активируемые протеинкиназы), TNF (фактор некроза опухолей), в генах, связанных с апоптозом, ангиогенезом, развитием сердца, ключевыми из которых являются гены *FAS*, *ANGPT2*, *DUSP6*, *FARP1* и *CARD6* [14].

Анализ метилирования ДНК эндотелиальных клеток у пациентов с дилатацией аорты и двусторонним аортальным клапаном выявил 681 кластер ДМС; при этом максимально различались уровни метилирования генов, продукты которых участвуют в эпителиально-мезенхимальном переходе и процессах развития [15].

Описаны попытки идентификации биомаркеров аортопатий, основанные на определении

специфичных для аорты паттернов метилирования внеклеточной ДНК, циркулирующей в сыворотке крови [16, 17]. Однако существенным ограничением этого подхода является низкая специфичность, обусловленная малым количеством метиломов аорты, полученных от пациентов и здоровых индивидов. К настоящему времени в доступной научной литературе нет работ, в которых анализируется профиль метилирования ДНК у пациентов с аневризмой аорты как в изолированной форме, так и в сочетании с ее атеросклеротическим поражением.

Таким образом, в настоящем исследовании изучен специфический профиль метилирования ДНК в различных участках восходящей аорты при коморбидности аневризмы и атеросклероза аорты.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследование включены пациенты с несиндромальными спорадическими формами аневризмы восходящей аорты. Всем пациентам проведено открытое хирургическое лечение в НИИ кардиологии г. Томска в период 2020–2023 гг. Интраоперационно проведено взятие биоптатов, соответствующих трем зонам восходящей аорты (дилатированная часть аорты в зоне максимального расширения; нерасширенный фрагмент из проксимальной части дуги аорты; атеросклеротическая бляшка, локализованная в дилатированной части аорты). Биоптаты помещали в RNAlater (“Termo Fisher Scientific”, США) и хранили при температуре -80°C .

Критериями включения пациентов в исследование были расширение восходящей аорты > 5.5 см без сочетанного поражения аортального клапана, расширение восходящей аорты > 4.5 см при выраженном стенозе аортального клапана или его недостаточности (2+ степень). Из исследования исключены пациенты с расслоением аорты, с ложными аневризмами аорты, а также пациенты, требующие повторных вмешательств на проксимальных отделах грудной аорты.

Уровень метилирования ДНК определен у шести пациентов с аневризмой аорты: у четырех из них в трех участках восходящей аорты (дилатированная часть, нерасширенная проксимальная часть дуги (нормальная ткань), атеросклеротическая бляшка, локализованная в дилатированной части); у двух пациентов в дилатированной части и нерасширенной проксимальной части дуги (нормальная ткань). Группа обследованных включала мужчин (возраст 48–64 г.) с аортальным клапаном нормального строения. У всех пациентов наблюдалась артериальная гипертензия, у трех — стенокардия, у четырех — ожирение, у одного пациента был сахарный диабет второго типа. Атеросклероз коронарных или сонных артерий (степень стеноза

больше 60%) выявлен у трех, в доклинической стадии (30%) — у двух пациентов. Атеросклеротические бляшки восходящей аорты находились на разных стадиях развития: стадия “липидных полос” (один пациент) и стадия фиброзных бляшек (три пациента).

Метилирование ДНК определяли с помощью бисульфитного секвенирования ограниченных наборов геномных локусов (RRBS). ДНК (100 мкг/образец) расщепляли рестриктазой *MspI* (“Сибэнзим”, Россия). Репарацию концов и поли(А)-последовательностей фрагментов осуществляли с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК NEBNext Ultra для Illumina с последующим лигированием метилированных адаптеров (IDT) и очисткой продукта. Далее проводили отбор фрагментов по размеру (150–500 п.н.) при помощи магнитных шариков (Agencourt AMPure XP, “Beckman Coulter”, США). Лигированную с адаптером и очищенную ДНК обрабатывали бисульфитом натрия (D5001 EZ DNA Methylation Kit) и амплифицировали с помощью ПЦП (NEBNext Q5U Master Mix, “NEB”, США) с использованием универсальных и индексных праймеров (NEBNext Multiplex Oligos для Illumina). Продукт ПЦП очищали на магнитных шариках (Agencourt AMPure XP). После контроля качества (Bioanalyzer 2100, “Agilent”) библиотеку RRBS секвенировали на приборе Illumina HiSeq1500 (2 × 150 п.н.).

Результаты RRBS-секвенирования обрабатывали с помощью DRAGEN Bio-IT v.3.9.5 (“Illumina”) и сопоставляли с нуклеотидными последовательностями генома человека (сборка GRCh38). Для оценки качества использовали программу MultiQC v.1.11. На один образец приходилось 51.9 [47.45; 63.6] млн прочтений. Дифференциальное метилирование ДНК анализировали с использованием пакетов methylKit (версия 1.26.0) и limma (версия 3.56.2). Минимальное покрытие — ×10. Для анализа сохраняли позиции, представленные минимум в двух образцах каждой группы. Дифференциально метилированными считали CpG-сайты с разницей среднего уровня метилирования между группами образцов $|\Delta\beta| \geq 0.2$ и $FDR < 0.05$. Аннотацию регуляторных элементов транскрипционных факторов (ТФ) и CpG-островков проводили в браузере UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>), а биологических процессов и функций белковых продуктов дифференциально метилированных генов (ДМГ) — в браузере UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

Анализ обогащения метаболических путей и биологических процессов, в которых задействованы белковые продукты ДМГ, выполнен в браузере Metascape (<https://metascape.org/gp>) с использованием следующих источников онтологий: KEGG Pathway, GO Biological Processes, Reactome Gene Sets, Canonical Pathways, CORUM, WikiPathways и PANTHER Pathway. Для проведения обогащения

использовали все гены, значимыми считали результаты при $p < 0.01$. Построение функциональных сетей белковых продуктов ДМГ выполнено в браузере STRING (<https://string-db.org/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В каждом из включенных в анализ образцов проанализировано 2322700 CpG-сайтов. Дифференциальное метилирование оценено путем попарного сравнения уровня метилирования каждого CpG-сайта в образцах (группах) тканей восходящей аорты (атеросклеротическая бляшка аорты/аневризма аорты (АБ/АА); аневризма аорты/нормальная ткань аорты (АА/НА); атеросклеротическая бляшка аорты/нормальная ткань аорты (АБ/НА)).

Сравнение групп АА и НА выявило 17 ДМС с разницей в уровне метилирования $\Delta\beta$ от 0.03 до 0.42. После установки фильтра $|\Delta\beta| \geq 0.2$ остаются два ДМС (chr5:93573113 и chr5:93573147, сборка GRCh38), локализованных в интронах гена длинной некодирующей РНК (днРНК) *NR2F1-AS1* в пределах CpG-островка (chr5:93570534–93573169). Оба эти сайта гипометилированы в дилатированной относительно нерасширенной части аорты. Средний уровень метилирования chr5:93573113 в дилатированной части аорты — $4.6 \pm 3.4\%$, в нерасширенной части — $34.9 \pm 7.6\%$, $\Delta\beta = -0.30$. Средний уровень метилирования chr5:93573147 в дилатированной — $10.1 \pm 4.1\%$, в нерасширенной части — $53.0 \pm 6.8\%$, $\Delta\beta = -0.43$. В целом в анализ включены 60 CpG-сайтов, локализованных в указанном CpG-островке (от chr5:93570861 до chr5:93573168). В дилатированной части аорты все эти сайты гипометилированы по сравнению с нерасширенной частью ($\Delta\beta$ от -0.19 до -0.43).

За последние годы показано, что днРНК регулируют экспрессию генов путем различных механизмов, модулируя развитие и прогрессию большого числа заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых [18]. В тканях аорты, пораженных при расслоении, выявлена aberrантная экспрессия днРНК, связанных с функционированием гладкомышечных клеток (ГМК) и деградацией внеклеточного матрикса [19]. В частности, *NR2F1-AS1* регулирует дифференцировку ГМК, модулируя уровень мРНК сократительных белков: сверхэкспрессия этой днРНК приводит к увеличению экспрессии маркеров сократительного фенотипа ГМК коронарных артерий [20]. Однако в тканях межпозвоночных дисков повышенная экспрессия *NR2F1-AS1* способствует апоптозу клеток студенистого ядра и деградации внеклеточного матрикса [21].

Нами показано, что при аневризме восходящей аорты уровень метилирования гена *NR2F1-AS1* в дилатированных тканях ниже, чем в нормальных, что косвенно может указывать на более высокую транскрипционную активность этого гена. Однако

Таблица 1. Локализация дифференциально метилированных CpG-сайтов (ДМС; $|\Delta\beta| \geq 0.2$) в клетках атеросклеротической бляшки аорты относительно дилатированной и нормальной тканей аорты

Локализация CpG-сайтов	Гиперметилированные ДМС, кол-во (%)		Гипометилированные ДМС, кол-во (%)	
	АБ/АА (323)	АБ/НА (234)	АБ/АА (263)	АБ/НА (246)
Экзон гена	25 (7.7)	10 (4.3)	10 (3.8)	19 (7.7)
Интрон гена	145 (44.9)	110 (47.0)	102 (38.7)	112 (45.5)
Межгенный регион	115 (35.6)	84 (35.9)	106 (40.3)	82 (33.3)
5'-UTR	4 (1.2)	2 (0.8)	1 (0.4) – <i>CNOT6</i> (chr5:180541732)	6 (2.4)
3'-UTR	3 (0.9)	5 (2.1)	7 (2.7)	2 (0.8)
“Выше” гена	12 (3.7)	3 (1.3)	5 (1.9)	7 (2.8)
“Ниже” гена	1 (0.3) – <i>MIR12118</i> chr5:173304804	4 (1.7)	4 (1.5)	4 (1.6)
Сайт сплайсинга	0	1 (0.4) – <i>PCYT2</i> , chr17:81906759	1 (0.4) – <i>PCYT2</i> , chr17:81906759	0
нкРНК, экзон	3 (0.9)	0	0	2 (0.8)
нкРНК, интрон	15 (4.6)	15 (6.4)	27 (10.3)	12 (4.9)
CpG-островок	36 (11.4)	5 (2.1)	15 (5.7)	5 (2.0)

Примечание. Дифференциальное метилирование оценено путем попарного сравнения уровня метилирования каждого CpG-сайта в образцах (группах) тканей (атеросклеротическая бляшка аорты/аневризма аорты (АБ/АА); атеросклеротическая бляшка аорты/нормальная ткань аорты (АБ/НА)).

для понимания механизмов связи между метилированием ДНК и экспрессией этой нкРНК необходимо детальное экспериментальное исследование уровня метилирования в области гена *NR2F1-AS1* и активности этой молекулы в клетках.

Выявлено 7508 CpG-сайтов, уровень метилирования которых различается в тканях атеросклеротически пораженной и дилатированной аорты (АБ/АА) ($\Delta\beta$ от 0.02 до 0.69). Более чем на 20% различаются 586 CpG-сайтов, из которых 323 гиперметилированы и 263 гипометилированы в клетках атеросклеротической бляшки по сравнению с дилатированной аортой (табл. 1). Основное количество как гипер-, так и гипометилированных ДМС локализовано в интронах генов и межгенных регионах (табл. 1). В экзонах генов атеросклеротической бляшки выявлено больше гиперметилированных CpG-сайтов (7.7% гиперметилированных и 3.8% гипометилированных; $p = 0.049$), а интроны генов некодирующих РНК (нкРНК) содержат больше гипометилированных CpG-сайтов (10.3% гипометилированных и 4.6% гиперметилированных; $p = 0.01$). Эти данные косвенно свидетельствуют в пользу активности нкРНК при формировании атеросклеротической бляшки аорты, что согласуется с результатами изучения роли этих регуляторных молекул в развитии атеросклероза сосудов различных бассейнов [22]. В атеросклеротических бляшках гиперметилированные ДМС чаще локализованы в CpG-островках (11.4% гиперметилированных, 5.7% гипометилированных; $p = 0.02$; табл. 1).

В клетках атеросклеротической бляшки аорты относительно нормальной ткани аорты (АБ/НА) выявлено 7189 CpG-сайтов с разницей в уровне метилирования $\Delta\beta$ от 0.01 до 0.6. К ДМС ($|\Delta\beta| \geq 0.2$) относятся 480 CpG-сайтов, из которых 234 гиперметилированы и 246 гипометилированы в атеросклеротических бляшках аорты. Локализация гипер- и гипометилированных CpG-сайтов в геноме клеток атеросклеротической бляшки не отличается от их распределения в нормальной ткани аорты (табл. 1).

Из всех ДМС, выявленных в настоящем исследовании, детально охарактеризованы CpG-сайты в генах, дифференциально метилированных в тканях грудной аорты при расслоении (*CMIP*, *RPH3AL*, *XRCC1*, *GATA5*, *EXD3*, *KCNC2*, *HIVEP3*, *ADCY9*) [13, 14] и в атеросклеротических бляшках коронарных (КА) и сонных (СА) артерий (*CDCP2*, *FOLR1*, *WT1*, *MGMT*, *GAS2*, *CA1*, *PRSS16*, *ANK3*) [10, 23] (рис. 1, табл. 2). (Далее эти гены определены как общие).

Показано, что основная масса ДМС (АБ/АА и АБ/НА) в общих генах локализована в интронах (8 из 17 (47%)) и межгенных регионах (7 (41.2%)) и только четыре (23.5%) – в пределах CpG-островков (табл. 2). Девять (52.9%) ДМС располагаются непосредственно внутри регуляторных элементов (промотор, энхансер, инсулятор) или на расстоянии менее 1000 п.н. от них. Пятнадцать (88.2%) локализованы в сайтах связывания ТФ. Среди этих ТФ чаще всего встречаются факторы типа ZNF (белки, участвующие в регуляции транскрипции многих генов, в опосредуемой убиквитином деградации

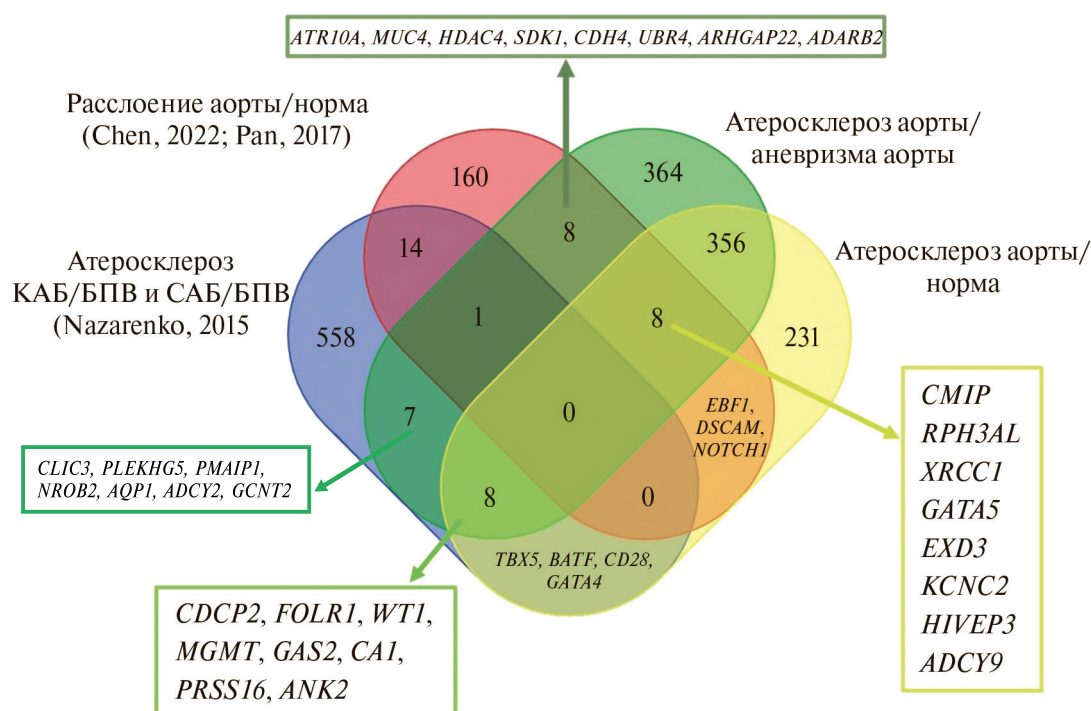


Рис. 1. Диаграмма Венна, показывающая общие ДМГ, выявленные в данной работе, при расслоении аорты относительно нормальной ткани аорты [13, 14], при атеросклерозе коронарных и сонных артерий относительно интактных сосудов [10, 23].

белков, передаче сигнала, репарации ДНК, миграции клеток) [24], из которых ZNF263 и ZFP148 являются репрессорами транскрипции и играют роль в формировании атеросклеротических поражений сонных артерий [25]. Кроме того, в патогенез атеросклероза различных артерий вовлечены такие ТФ, как PATZ1, NRF1, TCF12, EGR1 [25–28]; аневризмы аорты – ELK1, ETS1, KLF15 [29–31].

В атеросклеротической бляшке аорты 12 из 16 общих генов содержат CpG-сайты, гиперметилированные по сравнению с нормальной и дилатированной тканью аорты (табл. 2). Гипометилированные сайты локализованы в генах, белковые продукты которых вовлечены в репарацию ДНК (*XRCC1*), эмбриональное развитие (*CMIP*, *FOLR3/FOLR1*) и регуляцию экспрессии (*ANK3*) (табл. 2, табл. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/3/supp_Goncharova_rus.pdf).

CpG-сайты общих генов в сравниваемых исследованиях не перекрываются, поскольку метилирование ДНК в них определяли с помощью миточипов Illumina [10, 13, 14]. В настоящем исследовании непосредственно в последовательности гена (восемь сайтов в интронах, один в экзоне) локализовано 50% ДМС. Значительная часть CpG-сайтов в атеросклеротических бляшках аорты находится в межгенных регионах общих генов (табл. 2), тогда как в атеросклеротических бляшках коронарных и сонных артерий ДМС генов *CDCEP2*,

GAS2, *FOLR1*, *CA1*, *PRSS16* локализованы в 5'-нетранслируемой области (UTR), а *ANK3* – в промоторе [23, 32]. Вместе с тем в атеросклеротических бляшках аорты ДМС генов *CDCEP2*, *FOLR1* и *CA1* локализованы на расстоянии менее 5000 п.н. от ДМС в атеросклеротических бляшках коронарных и сонных артерий, а ДМС гена *WT1* при атеросклерозе всех исследованных сосудов находятся в одном и том же интроне.

Сравнение направленности метилирования CpG-сайтов общих генов, выявленной в настоящем исследовании, с данными по метилированию в тканях грудной аорты при расслоении показало, что ДМС генов *RPH3AL*, *EXD3*, *HIVEP3*, *KCNC2* характеризуются однонаправленными изменениями и гиперметилированием как в клетках атеросклеротических бляшек восходящей аорты (табл. 2), так и в тканях аорты при остром расслоении [14]. ДМС генов *GATA5*, *XRCC1*, *CMIP*, *ADCY9* имеют разнонаправленный уровень метилирования: CpG-сайты генов *GATA5* и *ADCY9* гиперметилированы в атеросклеротической бляшке аорты (табл. 2) и гипометилированы при ее расслоении, а CpG-сайты генов *XRCC1*, *CMIP* гипометилированы в бляшке аорты (табл. 2), но гиперметилированы при ее расслоении [13, 14].

Анализ направленности метилирования CpG-сайтов общих генов при атеросклерозе аорты, коронарных и сонных артерий выявил однонаправленные изменения уровня метилирования CpG-сайтов в генах *WT1*, *CDCEP2* и *GAS2*,

Таблица 2. Характеристика дифференциально метилированных CpG-сайтов, локализованных в области общих генов при расслоении аорты, атеросклерозе коронарных и сонных артерий*

Ген	CpG-сайт, локализация относительно генов (сборка GRCh38)	Промотор/ Энхансер	CpG-островов	Транскрипционный фактор	Средний уровень метилирования CpG-сайта (%) ± стандартное отклонение				Δβ	
					AB	AA	HA	AB/AA	AB/HA	
ДМГ общие в AB/AA, AB/HA* и при AA/HA**										
XRCC1	chr19:43558259, интронный	“Ниже” энхансера EN38E1956214 на 162 п.н.	Нет	Nrx2-1, ZNF135, ZNF263, ZNF460	75.1 ± 3.2	96.6 ± 2.4	95.5 ± 5.2	−0.22	−0.20	
	chr16:81668445, интронный	Энхансер EN38E1831623	Нет	ELF3, Ikzf3	63.2 ± 6.2	88.9 ± 4.4	93.0 ± 4.4	−0.26	−0.30	
	chr17:365276, межгенный	“Ниже” энхансера EN38E1838974 на 454 п.н	Нет	ZNF93	39.1 ± 3.8	1.6 ± 2.7	1.3 ± 2.3	0.38	0.38	
EXD3	chr9:137417745, интронный	Энхансер EN38E2737961	chr9:137416443–137418005	TFAP2B, TFAP2E	24.4 ± 5.6	1.9 ± 2.8	0.7 ± 1.6	0.23	0.24	
HIVEP3	chr1:41516477, интронный	“Ниже” EN38E1341057 на 43 п.н.; “выше” EN38E1341058 на 308 п.н.	“Ниже” chr1:41516118–41516372 на 105 п.н.	PRDM9	29.2 ± 4.7	1.0 ± 1.1	6.2 ± 5.6	0.28	0.23	
ATXN7L3B; KCNC2	chr12:74666990, межгенный	“Ниже” EN38E1624895 на 929 п.н	Нет	ZNF530, Zfx	23.6 ± 3.6	2.9 ± 4.1	1.8 ± 2.5	0.21	0.22	
GATA5	chr20:62476553 “выше” гена	“Выше” промотора EN38E2128120 на 277 п.н.; “выше” энхансера EN38E2128121 на 33 п.н.	chr20:62474274–62476841	–	37.5 ± 12.5	7.2 ± 4.7	4.9 ± 3.2	0.30	0.33	
ADCY9	chr16:4114079, экзонный	Энхансер EN38E1798054	Нет	ZNF454	24.1 ± 5.9	0.7 ± 1.5	1.8 ± 3.6	0.23	0.22	
ДМГ, общие в AB/AA, AB/HA** и при атеросклерозе КАБ/БПВ и САБ/БПВ***										
CDCP2; CYB5RL	chr1:54155575, межгенный	Нет	Нет	PATZ1, ZNF135, ZNF148, ZNF460, MAZ, SP5	21.8 ± 8.2	0	0	0.22	0.22	
FOLR3; FOLR1	chr11:72185020, межгенный	Нет	Нет	HIC2	49.8 ± 19.2	75.0 ± 12.5	73.7 ± 11.4	−0.25	−0.24	
IT1	chr11:32430820, интрон	Промотор	chr11:32430599–32431162	Nrf1, TCF12, ZNF610	28.2 ± 5.1	5.1 ± 2.9	3.9 ± 3.7	0.23	0.24	
LINC02667; MGMT	chr10:128961129, межгенный	“Ниже” инсулятора EN38E1510564 на 112 п.н.	Нет	FEV, ELK1, ETS1, FLI1, ETV4, ETV2, ETV5, ETV7	27.7 ± 2.7	2.2 ± 3.4	4.5 ± 5.3	0.26	0.23	
GAS2	chr11:22713003, интронный	Нет	Нет	ZBTB6	21.9 ± 23.1	1.2 ± 2.8	1.4 ± 2.8	0.21	0.21	
MIR3143; PRSS16	chr6:27225866, межгенный	Нет	Нет	Zfx, TFAP2A, EGR1, EGR3, CTCFL, PATZ1, KLF15, KLF16, ZNF281	21.9 ± 5.3	1.2 ± 2.7	0	0.21	0.22	
ANK3	chr10:60634817, интронный	Нет	Нет	TP73	71.4 ± 2.2	97.3 ± 2.7	98.9 ± 2.1	−0.26	−0.28	
CA1	chr8:85376555, интронный	Нет	Нет	ZNF460, ZNF135, ZNF148, MAZ, PATZ1, SP2, NKX2-1	24.3 ± 0.5	2.0 ± 3.3	0	0.22	0.24	

*Настоящее исследование.

**Данные [13, 14].

***Данные [10, 23].

Примечание. AB – атеросклеротическая бляшка аорты; AA – аневризма аорты; HA – нормальной ткани аорты; КАБ – атеросклеротические бляшки коронарных артерий; САБ – атеросклеротические бляшки сонных артерий; БПВ – большие подкожные вены нижних конечностей; Δβ – разница между средним уровнем метилирования CpG-сайта в сравниваемых группах.

гиперметилированных в атеросклеротических бляшках этих сосудов, а *MGMT* и *PRSS16* — в атеросклеротических бляшках сонных артерий и аорты (табл. 2) [23]. Выявлено разнонаправленное метилирование CpG-сайтов генов *ANK3*, *FOLR1* и *CA1* в бляшках аорты и коронарных/сонных артерий, где *ANK3*, *FOLR1* гиперметилированы в бляшках сонных артерий и гипометилированы в атеросклеротических бляшках аорты, а *CA1* гипометилирован в атеросклеротических бляшках сонных артерий и гиперметилирован в бляшках аорты (табл. 2) [10, 23].

Анализ сетей белковых продуктов, кодируемых общими генами, в браузере STRING показал, что они не объединяются одной функциональной сетью. Аннотация биологических процессов и молекулярных функций в браузере UniProt показала, что белки, кодируемые генами *RPH3AL*, *EXD3*, *HIVEP3*, *KCNC2*, *CA1*, вовлечены в связывание или трансмембранный транспорт ионов металлов (GO:0046872; GO:0071805; GO:0008270; табл. S1, см. Дополнительные материалы).

Известно, что метаболизм ионов металлов, в том числе калия и кальция, обеспечивает функционирование кальций-активируемых калиевых каналов, являющихся компонентом проводящей системы миокарда, нарушение которой приводит к развитию аритмии, фибрилляции предсердий, сердечной недостаточности и инфаркта миокарда [33]. При атеросклерозе грудной и брюшной аорты содержание ионов различных металлов, в том числе кальция и цинка, коррелирует со стадией атеросклеротического поражения сосуда [34]. Однако можно отметить, что в число общих ДМГ входят гены, белковые продукты которых вовлечены в регуляцию экспрессии генов (*GATA5*, *HIVEP3*, *WT1*, *ANK3*), в эмбриональное развитие (*CMIP*, *ADCY9*, *FOLR1*) и репарацию ДНК (*XRCC1*, *MGMT*).

Проведенный в браузере Metascape анализ обогащения метаболических путей и биологических процессов, в которые вовлечены белковые продукты ДМГ, показал, что основными процессами, в которых участвуют белковые продукты общих генов, являются развитие мезенхимы (GO:0060485, *FOLR1*, *WT1*, *GATA5*, *HIVEP3*, *KCNC2*) и регуляция метаболизма ДНК (GO:0051054, *MGMT*, *WT1*, *XRCC1*).

Как показано в ассоциативных и экспериментальных исследованиях, мутации, структурные полиморфизмы, изменение функциональной активности большинства общих генов или уровня кодируемых ими белков ассоциированы с развитием аневризмы аорты или ИБС. В частности, патогенные варианты в гене *GATA5* приводят к наследственным формам аневризмы грудной аорты [35]. Полиморфизм генов *XRCC1* и *CDCP2* ассоциирован с риском развития ИБС [36, 37].

Однонуклеотидные варианты (SNP) в генах *KCNC2* и *HIVEP3* связаны с уровнем артериального давления [38, 39], в генах *ADCY9* и *CMIP* — с уровнем и функционированием липопротеинов высокой плотности [40, 41], в гене *RPH3AL* — с уровнем триглицеридов, циркулирующих в сыворотке крови [42].

Изменение уровня белков *Wt1* и *Gas2* обнаружено в коронарных артериях или кардиомиоцитах экспериментальных животных при инфаркте миокарда [43–45]. Экспрессия гена *CA1* в клетках цельной крови изменяется при остром коронарном синдроме [46]. В доступной нам научной литературе отсутствуют данные о связи гена *ANK3* с развитием сердечно-сосудистых заболеваний. Однако анкирины являются важнейшими компонентами ионных каналов и сигнальных комплекс-транспортеров в сердечно-сосудистой системе [47], а *ANK3* и *LAMA2* маркируют один из двух различных фенотипов ГМК сонных артерий при атеросклерозе [48].

Вместе с тем ни один из генов, определенных ранее как ключевые ДМГ при расслоении аорты [12–14], а также как наиболее частые при различных сердечно-сосудистых заболеваниях [11], не входит в число ДМГ в изученных в настоящем исследовании участках аорты при аневризме. Причиной низкой воспроизводимости результатов различных исследований могут быть различия клеточного состава использованных участков сосудов, гетерогенность, обусловленная этнотерриториальными особенностями (стиль питания, распределение частот SNP-маркеров, воздействие внешнесредовых факторов), влияющими на метилирование ДНК, а также применение разных методов и технических платформ. Кроме того, в разных исследованиях, привлеченных нами к проведению сравнительного анализа, показано дифференциальное метилирование разных CpG-сайтов в одних и тех же генах, поэтому в настоящий момент не представляется возможным провести корректный сравнительный анализ, оценить характер и выявить особенности метилирования гена при различных патологических фенотипах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при аневризме аорты выявлено сходство профиля метилирования ДНК в дилатированной и нормальной тканях аорты, за исключением CpG-сайтов гена *NR2F1-AS1*. В клетках атеросклеротической бляшки аорты по сравнению с ее дилатированной и нормальной областями большее число гиперметилированных CpG-сайтов обнаружено в экзонах генов и CpG-островках, а большее число гипометилированных — в интронах генов нкРНК.

В атеросклеротической бляшке, в дилатированной и нормальной тканях аорты 52.9% ДМС располагаются непосредственно внутри регуляторных элементов (промотор, энхансер, инсулятор) или на расстоянии менее 1000 п.н. от них, а 88.2% локализованы в сайтах связывания ТФ, в том числе в ZNF263 и ZFP148 PATZ1, NRF1, TCF12, EGR1, вовлеченных в патогенез атеросклероза различных артерий, а ELK1, ETS1, KLF15 — аневризмы аорты.

Сравнительный анализ спектра ДМГ в атеросклеротических бляшках аорты и тканях аорты при ее аневризме/расслоении, а также в атеросклеротических бляшках коронарных и сонных артерий выявил общие гены (*CMIP, RPH3AL, XRCC1, GATA5, EXD3, KCNC2, HIVEP3, ADCY9, CDCP2, FOLR1, WT1, MGMT, GAS2, CA1, PRSS16, ANK3*), вовлеченные в развитие как расслоения аорты, так и атеросклероза сосудов различных бассейнов. Показано преимущественное гиперметилование ДМС общих генов в атеросклеротической бляшке по сравнению с дилатированными и нормальными участками аорты. Эти ДМС локализуются в интронах и межгенных регионах вблизи регуляторных элементов или в сайтах связывания ТФ. Белки, кодируемые общими генами, участвуют в широком спектре биологических процессов, в том числе в развитии мезенхимы (GO:0060485, *FOLR1, WT1, GATA5, HIVEP3, KCNC2*) и регуляции метаболизма ДНК (GO:0051054, *MGMT, WT1, XRCC1*).

Ограничением нашего исследования является невозможность введения поправки на клеточный состав в связи с низким и неоднородным покрытием участков генома, специфичных для типа клеток, которое наблюдается при анализе метилирования с помощью RRBS, что затрудняет использование классических алгоритмов деконволюции, построенных на основании данных метилоципов.

Вместе с тем следует отметить, что это первое исследование, в котором определен профиль метилирования ДНК у пациентов со спорадической формой аневризмы восходящего отдела грудной аорты — в трех ее участках с разной степенью поражения — в неповрежденном сосуде, дилатированной области и в атеросклеротической бляшке.

Работа получила финансовую поддержку Российского научного фонда (грант № 22-25-00701).

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От всех участников получено информированное письменное согласие на обследование. Исследование одобрено этическим комитетом Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского национального

исследовательского медицинского центра Российской академии наук (Регистрационный номер 191, протокол № 13 от 15.11.2021 г.).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kim H.Y., Kim C.J., Rho T.H., Youn H.J., Jin S.W., Rhim H.Y., Park J.W., Jeon H.K., Chae J.S., Kim J.H., Hong S.J., Choi K.B. (1999) Transesophageal echocardiographic detection of thoracic aortic plaque could noninvasively predict significant obstructive coronary artery disease. *Korean J. Intern. Med.* **14**(2), 20–26.
- Hung A., Zafar M., Mukherjee S., Tranquilli M., Scoutt L.M., Elefteriades J.A. (2012) Carotid intima-media thickness provides evidence that ascending aortic aneurysm protects against systemic atherosclerosis. *Cardiology.* **123**(2), 71–77.
- Achneck H., Modi B., Shaw C., Rizzo J., Albornoz G., Fusco D., Elefteriades J. (2005) Ascending thoracic aneurysms are associated with decreased systemic atherosclerosis. *Chest.* **128**(3), 1580–1586.
- Curtis A., Smith T., Ziganshin B.A., Elefteriades J.A. (2015) Ascending Aortic Proaneurysmal Genetic Mutations with Antiatherogenic Effects. *Int. J. Angiol.* **24**(3), 189–197.
- Prakash S.K., LeMaire S.A., Guo D.C., Russell L., Regalado E.S., Golabbakhsh H., Johnson R.J., Safi H.J., Estrella A.L., Coselli J.S., Bray M.S., Leal S.M., Milewicz D.M., Belmont J.W. (2010) Rare copy number variants disrupt genes regulating vascular smooth muscle cell adhesion and contractility in sporadic thoracic aortic aneurysms and dissections. *Am. J. Hum. Genet.* **87**(6), 743–756.
- Слепцов А.А., Назаренко М.С., Лебедев И.Н., Скрябин Н.А., Фролов А.В., Попов В.А., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С., Пузырев В.П. (2014) Соматическая вариабельность генома в тканях сосудистой стенки и лейкоцитах периферической крови при атеросклерозе. *Генетика.* **50**(8), 986–995.
- Prakash S., Kuang S.Q., GenTAC Registry Investigators, Regalado E., Guo D., Milewicz D. (2016) Recurrent rare genomic copy number variants and bicuspid aortic valve are enriched in early onset thoracic aortic aneurysms and dissections. *PLoS One.* **11**(4), e0153543.
- Overwater E., Marsili L., Baars M.J.H., Baas A.F., van de Beek I., Duffer E., van Hagen J.M., Hilhorst-Hofstee Y., Kempers M., Krapels I.P., Menke L.A., Verhagen J.M.A., Yeung K.K., Zwiijnenburg P.J.G., Groenink M., van Rijn P., Weiss M.M., Voorhoeve E., van Tintelen J.P., Houweling A.C., Maugeri A. (2018) Results of next-generation sequencing gene panel diagnostics including copy-number variation analysis in 810 patients suspected of heritable thoracic aortic disorders. *Hum. Mutat.* **39**(9), 1173–1192.
- Ostberg N.P., Zafar M.A., Ziganshin B.A., Elefteriades J.A. (2020) The genetics of thoracic aortic aneurysms and dissection: a clinical perspective. *Biomolecules.* **10**(2), 182.
- Nazarenko M.S., Markov A.V., Lebedev I.N., Freidin M.B., Sleptcov A.A., Koroleva I.A., Frolov A.V., Popov V.A., Barbarash O.L., Puzyrev V.P. (2015) A comparison of genome-wide DNA methylation patterns between different vascular tissues from patients with coronary heart disease. *PLoS One.* **10**(4), e0122601.

11. Krolevets M., Cate V.T., Prochaska J.H., Schulz A., Rapp S., Tenzer S., Andrade-Navarro M.A., Horvath S., Niehrs C., Wild P.S. (2023) DNA methylation and cardiovascular disease in humans: a systematic review and database of known CpG methylation sites. *Clin. Epigenet.* **15**(1), 56.
12. Shah A.A., Gregory S.G., Krupp D., Feng S., Dorogi A., Haynes C., Grass E., Lin S.S., Hauser E.R., Kraus W.E., Shah S.H., Hughes G.C. (2015) Epigenetic profiling identifies novel genes for ascending aortic aneurysm formation with bicuspid aortic valves. *Heart Surg. Forum.* **18**(4), E134–E139.
13. Pan S., Lai H., Shen Y., Breeze C., Beck S., Hong T., Wang C., Teschendorff A.E. (2017) DNA methylome analysis reveals distinct epigenetic patterns of ascending aortic dissection and bicuspid aortic valve. *Cardiovasc. Res.* **113**(6), 692–704.
14. Chen Y., Xu X., Chen Z., Huang B., Wang X., Fan X. (2022) DNA methylation alternation in Stanford-A acute aortic dissection. *BMC Cardiovasc. Disord.* **22**(1), 455.
15. Björck H.M., Du L., Pulignani S., Paloschi V., Lundströmer K., Kostina A.S., Österholm C., Malashicheva A., Kostareva A., Evangelista A., Teixidó-Tura G., Maleki S., Franco-Cereceda A., Eriksson P.; Mechanistic interrogation of bicuspid aortic valve associated aortopathy (MIBAVA) Leducq Consortium. (2018) Altered DNA methylation indicates an oscillatory flow mediated epithelial-to-mesenchymal transition signature in ascending aorta of patients with bicuspid aortic valve. *Sci. Rep.* **8**(1), 2777.
16. Liu P., Zhang J., Du D., Zhang D., Jin Z., Qiu W., Zhou X., Dong S., Zhou M., Zhao H., Zhang W., Ma J., Sun S., Fu W., Liu Y., Wang L. (2021) Altered DNA methylation pattern reveals epigenetic regulation of *Hox* genes in thoracic aortic dissection and serves as a biomarker in disease diagnosis. *Clin. Epigenet.* **13**(1), 124.
17. Maredia A., Guzzardi D., Aleinati M., Iqbal F., Khaira A., Madhu A., Wang X., Barker A.J., McCarthy P.M., Fedak P.W.M., Greenway S.C. (2021) Aorta-specific DNA methylation patterns in cell-free DNA from patients with bicuspid aortic valve-associated aortopathy. *Clin. Epigenet.* **13**(1), 147.
18. Zhang H., Liu B., Shi X., Sun X. (2021) Long noncoding RNAs: potential therapeutic targets in cardiocerebrovascular diseases. *Pharmacol. Ther.* **221**, 107744.
19. Sun J., Chen G., Jing Y., He X., Dong J., Zheng J., Zou M., Li H., Wang S., Sun Y., Liao W., Liao Y., Feng L., Bin J. (2018) LncRNA expression profile of human thoracic aortic dissection by high-throughput sequencing. *Cell Physiol. Biochem.* **46**(3), 1027–1041.
20. Lim Y.H., Ryu J., Kook H., Kim Y.K. (2020) Identification of long noncoding RNAs involved in differentiation and survival of vascular smooth muscle cells. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* **22**, 209–221.
21. Du L., Li X., Gao Q., Yuan P., Sun Y., Chen Y., Huang B., Deng Y., Wang B. (2022) LncRNA nuclear receptor subfamily 2 group F member 1 antisense RNA 1 (NR2F1-AS1) aggravates nucleus pulposus cell apoptosis and extracellular matrix degradation. *Bioengineered.* **13**(2), 2746–2762.
22. Fasolo F., Di Gregoli K., Maegdefessel L., Johnson J.L. (2019). Non-coding RNAs in cardiovascular cell biology and atherosclerosis. *Cardiovascular Res.* **115**(12), 1732–1756.
23. Назаренко М.С., Марков А.В., Королева Ю.А., Слепцов А.А., Казанцев А.Н., Барбараш О.Л., Пузырев В.П. (2021) Идентификация дифференциально метилированных генов, потенциально связанных с атеросклерозом у человека. *Росс. кардиологический журнал.* **10**, 42–48.
<https://doi.org/10.15829/1560-4071-2017-10-42-48>
24. Cassandri M., Smirnov A., Novelli F., Pitolli C., Agostini M., Malewicz M., Melino G., Raschellà G. (2017) Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discov.* **3**, 17071.
25. Dhaouadi N., Li J.Y., Feugier P., Gustin M.P., Dab H., Kacem K., Bricca G., Cerutti C. (2014) Computational identification of potential transcriptional regulators of TGF- β 1 in human atherosclerotic arteries. *Genomics.* **103**(5–6), 357–370.
26. Albrecht C., Preusch M.R., Hofmann G., Morris-Rosenfeld S., Blessing E., Rosenfeld M.E., Katus H.A., Bea F. (2010) Egr-1 deficiency in bone marrow-derived cells reduces atherosclerotic lesion formation in a hyperlipidaemic mouse model. *Cardiovasc. Res.* **86**(2), 321–329.
27. Karunakaran D., Thrush A.B., Nguyen M.A., Richards L., Geoffrion M., Singaravelu R., Ramphos E., Shangari P., Ouimet M., Pezacki J.P., Moore K.J., Perisic L., Maegdefessel L., Hedin U., Harper M.E., Rayner K.J. (2015) Macrophage mitochondrial energy status regulates cholesterol efflux and is enhanced by anti-mir33 in atherosclerosis. *Circ. Res.* **117**(3), 266–278.
28. Nurnberg S.T., Cheng K., Raiesdana A., Kundu R., Miller C.L., Kim J.B., Arora K., Carcamo-Oribe I., Xiong Y., Tellakula N., Nanda V., Murthy N., Boisvert W.A., Hedin U., Perisic L., Aldi S., Maegdefessel L., Pjanic M., Owens G.K., Tallquist M.D., Quertermous T. (2015) Coronary artery disease associated transcription factor TCF21 regulates smooth muscle precursor cells that contribute to the fibrous cap. *PLoS Genet.* **11**(5), e1005155.
29. Haldar S.M., Lu Y., Jeyaraj D., Kawanami D., Cui Y., Eapen S.J., Hao C., Li Y., Doughman Y.Q., Watanabe M., Shimizu K., Kuivaniemi H., Sadoshima J., Margulies K.B., Cappola T.P., Jain M.K. (2010) Klf15 deficiency is a molecular link between heart failure and aortic aneurysm formation. *Sci. Transl. Med.* **2**(26), 26ra26.
30. Branchetti E., Poggio P., Sainger R., Shang E., Grau J.B., Jackson B.M., Lai E.K., Parmacek M.S., Gorman R.C., Gorman J.H., Bavaria J.E., Ferrari G. (2013) Oxidative stress modulates vascular smooth muscle cell phenotype via CTGF in thoracic aortic aneurysm. *Cardiovasc. Res.* **100**(2), 316–324.
31. Freiholtz D., Bergman O., Pradhananga S., Lång K., Poujade F.A., Granath C., Olsson C., Franco-Cereceda A., Sahlén P., Eriksson P., Björck H.M. (2023) SPP1/osteopontin: a driver of fibrosis and inflammation in degenerative ascending aortic aneurysm? *J. Mol. Med. (Berl)*. **101**(10), 1323–1333.
32. Nassar L.R., Barber G.P., Benet-Pagès A., Casper J., Clawson H., Diekhans M., Fischer C., Gonzalez J.N., Hinrichs A.S., Lee B.T., Lee C.M., Muthuraman P., Nguy B., Pereira T., Nejad P., Perez G., Raney B.J., Schmelter D., Speir M.L., Wick B.D., Kent W.J. (2023) The UCSC Genome Browser database: 2023 update. *Nucl. Acids Res.* **51**(D1), D1188–D1195.
33. Weisbrod D. (2020) Small and intermediate calcium activated potassium channels in the heart: role and strategies in the treatment of cardiovascular diseases. *Front. Physiol.* **11**, 590534.

34. Kuzan A., Wujczyk M., Wiglusz R.J. (2021) The study of the aorta metallomics in the context of atherosclerosis. *Biomolecules*. **11**(7), 946.
35. Renard M., Francis C., Ghosh R., Scott A.F., Witmer P.D., Adès L.C., Andelfinger G.U., Arnaud P., Boileau C., Callewaert B.L., Guo D., Hanna N., Lindsay M.E., Morisaki H., Morisaki T., Pachter N., Robert L., Van Laer L., Dietz H.C., Loeys B.L., Milewicz D.M., De Backer J. (2018) Clinical validity of genes for heritable thoracic aortic aneurysm and dissection. *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**(6), 605–615.
36. Wild P.S., Zeller T., Schillert A., Szymczak S., Sinning C.R., Deiseroth A., Schnabel R.B., Lubos E., Keller T., Eleftheriadis M.S., Bickel C., Rupprecht H.J., Wilde S., Rossmann H., Diemert P., Cupples L.A., Perret C., Erdmann J., Stark K., Kleber M.E., Blankenberg S. (2011) A genome-wide association study identifies LIPA as a susceptibility gene for coronary artery disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **4**(4), 403–412.
37. Hoseini S.M., Bijanzadeh M., Seyedian S.M. (2021) A DNA repair pathway polymorphism (rs25487) and angiographically proven coronary artery patients in a population of Southern Iran. *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* **19**(1), 76–82.
38. Ehret G.B., Ferreira T., Chasman D.I., Jackson A.U., Schmidt E.M., Johnson T., Thorleifsson G., Luan J., Donnelly L.A., Kanoni S., Petersen A.K., Pihur V., Strawbridge R.J., Shungin D., Hughes M.F., Meirelles O., Kaakinen M., Bouatia-Naji N., Kristiansson K., Shah S., Munroe P.B. (2016) The genetics of blood pressure regulation and its target organs from association studies in 342415 individuals. *Nat. Genet.* **48**(10), 1171–1184.
39. Aragane Y., Higashino T., Kinoshita K., Ashenagar M.S., Higashino H. (2022) Hypertension-associated genes in the mesenteric artery of three spontaneously hypertensive rat substrains identified using a DNA array method. *Front. Biosci.* **27**(6), 191.
40. Niesor E.J., Benghozi R., Amouyel P., Ferdinand K.C., Schwartz G.G. (2015) Adenylyl cyclase 9 polymorphisms reveal potential link to HDL function and cardiovascular events in multiple pathologies: potential implications in sickle cell disease. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **29**(6), 563–572.
41. Sayols-Baixeras S., Hernáez A., Subirana I., Lluís-Ganel·la C., Muñoz D., Fitó M., Marrugat J., Elosua R. (2017) DNA methylation and high-density lipoprotein functionality – brief report: The REGICOR Study (Registre Gironi del Cor). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**(3), 567–569.
42. Rönn T., Perfilyev A., Jönsson J., Eriksson K.F., Jørgensen S.W., Bröns C., Gillberg L., Vaag A., Stener-Victorin E., Ling C. (2023) Circulating triglycerides are associated with human adipose tissue DNA methylation of genes linked to metabolic disease. *Hum. Mol. Genet.* **32**(11), 1875–1887.
43. Wagner K.D., Wagner N., Bondke A., Nafz B., Flemming B., Theres H., Scholz H. (2002) The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction. *FASEB J.* **16**(9), 1117–1119.
44. Fittipaldi S., Vasuri F., Degiovanni A., Pini R., Mauro R., Faggioli G., D'Errico-Grigioni A., Stella A., Pasquinelli G. (2014) Nestin and WT1 expression in atheromatous plaque neovessels: association with vulnerability. *Histol. Histo-pathol.* **29**(12), 1565–1573.
45. Cruz-Topete D., Oakley R.H., Cidlowski J.A. (2020) Glucocorticoid signaling and the aging heart. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **11**, 347.
46. Silbiger V.N., Luchessi A.D., Hirata R.D., Lima-Neto L.G., Cavichioli D., Carracedo A., Brión M., Dopazo J., García-García F., dos Santos E.S., Ramos R.F., Sampaio M.F., Armaganjian D., Sousa A.G., Hirata M.H. (2013) Novel genes detected by transcriptional profiling from whole-blood cells in patients with early onset of acute coronary syndrome. *Clin. Chim. Acta.* **421**, 184–190.
47. Hashemi S.M., Hund T.J., Mohler P.J. (2009) Cardiac ankyrins in health and disease. *J. Mol. Cell Cardiol.* **47**(2), 203–209.
48. Chou E.L., Lino Cardenas C.L., Chaffin M., Arduini A.D., Juric D., Stone J.R., LaMuraglia G.M., Eagleton M.J., Conrad M.F., Isselbacher E.M., Ellinor P.T., Lindsay M.E. (2021) Vascular smooth muscle cell phenotype switching in carotid atherosclerosis. *JVS Vasc. Sci.* **3**, 41–47.

DNA METHYLATION PROFILE IN COMORBIDITY OF ANEURYSM AND ATHEROSCLEROSIS OF THE ASCENDING AORTA

I. A. Goncharova^{1,*}, A. A. Zarubin¹, S. A. Shipulina¹, Iu. A. Koroleva¹,
D. S. Panfilov², B. N. Kozlov², M. S. Nazarenko¹

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

²*Research Institute of Cardiology, Tomsk National Research Medical Center,
Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634012 Russia*

*e-mail: irina.goncharova@medgenetics.ru

This study presents the results of DNA methylation analysis in different regions of the ascending aorta (dilated, non-dilated area, atherosclerotic plaque) in patients with aortic aneurysm. DNA methylation was analyzed by reduced representation bisulfite sequencing (RRBS). Differences in methylation levels between dilated and normal aortic tissues were detected for two CpG sites of the *NR2F1-AS1* gene ($|\Delta\beta| \geq 0.2$ and $FDR < 0.05$). Between atherosclerotic plaque samples and dilated/normal aortic tissues, 586/480 differentially methylated CpG sites (DMSs) were identified, among which 323/234 were hypermethylated and 263/246 were hypomethylated in atherosclerotic plaques. DMSs were located mainly in introns and intergenic regions, 88.2% in the binding sites of TFs, among which ZNF263, ZFP148, PATZ1, NRF1, TCF12, EGR1 play a role in the pathogenesis of atherosclerosis of various arteries, and ELK1, ETS1, KLF15 play a role in aortic aneurysms. Sixteen DMSs are located in the region of genes (*CMIP*, *RPH3AL*, *XRCC1*, *GATA5*, *EXD3*, *KCNC2*, *HIVEP3*, *ADCY9*, *CDCP2*, *FOLR1*, *WT1*, *MGMT*, *GAS2*, *CA1*, *PRSS16*, *ANK3*) whose protein products are involved in the development of both aortic dissection and atherosclerosis in different arterial circulation regions. The protein products of these genes are involved in a wide range of biological processes, including mesenchyme development (GO:0060485, *FOLR1*, *WT1*, *GATA5*, *HIVEP3*, *KCNC2*) and positive regulation of DNA metabolic process (GO:0051054, *MGMT*, *WT1*, *XRCC1*).

Keywords: aortic aneurysm, atherosclerosis, DNA methylation, RRBS

АНАЛИЗ ТРАНСКРИПТОМА КИШЕЧНИКА У ИМАГО *Drosophila melanogaster* С НОКДАУНОМ ГЕНА *Gagr*, ДОМЕСТИЦИРОВАННОГО ГЕНА *gag* ЭРРАНТИВИРУСОВ

© 2024 г. М. Л. Никитина^а, П. А. Миляева^а, И. В. Кузьмин^а, Л. Н. Нефедова^{а, *}

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

*e-mail: nefedova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 08.11.2023 г.

После доработки 01.12.2023 г.

Принята к публикации 07.12.2023 г.

В результате молекулярной доместикации гена *gag* эррантивировусов в геноме *Drosophila melanogaster* сформировался ген *Gagr*. Ранее самый высокий уровень транскрипции гена *Gagr* был выявлен в кишечнике, причем транскрипция наиболее эффективно индуцировалась у самок в ответ на добавление в корм персульфата аммония. В представленной работе изучен транскриптом кишечника самок с нокдауном гена *Gagr* во всех тканях в стандартных условиях и в условиях стресса, вызванного персульфатом аммония. Показано, что в кишечнике самок с нокдауном гена *Gagr* активированы гены антимикробных пептидов, контролируемых сигнальными путями Toll и Imd. Индукция стрессового ответа персульфатом аммония выявила нарушение работы сигнальных путей JAK/STAT и Jnk/MAPK и практически полное отсутствие активации работы путей ответа на стресс эндоплазматического ретикулума и несвернутых белков у особей с нокдауном гена *Gagr*. Полученные данные подтверждают важную роль гена *Gagr* в поддержании гомеостаза и в иммунном ответе.

Ключевые слова: доместикация, ретроэлементы, *gag*, *Drosophila*, стрессовый ответ

DOI: 10.31857/S0026898424030076, EDN: JCKOKP

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярная доместикация последовательностей мобильных элементов может играть значительную роль в образовании новых генов. Случаи молекулярной доместикации ретроэлементов и их последовательностей у беспозвоночных изучены значительно слабее, чем у позвоночных. У *Drosophila melanogaster* на текущий момент известны лишь два доместицированных гена ретроэлементов — *Gagr* (гомолог гена *gag* ретроэлемента группы *gypsy*) и *Iris* (гомолог гена *env* ретроэлемента группы *Sushi-ichi*) [1, 2].

У белка *Gagr* обнаружены следующие белковые партнеры: продукты генов *14-3-Zepsilon*, *Pdi*, *eIF3j*, *CG6013*, *CG3687* [3], четыре из которых (*14-3-Zepsilon*, *Pdi*, *eIF3j*, *CG6013*) имеют высококонсервативные функции у эукариот. Белок *14-3-Zepsilon* является многофункциональным регуляторным белком семейства 14-3-3, представители которого обнаружены у всех эукариот. Этот белок, как правило, служит адаптером для белок-белковых взаимодействий, обеспечивающим тесный контакт между взаимодействующими молекулами или ингибитором, подавляющим активность связанного белка [4]. *Pdi* (дисульфидизомераза) — консервативный редокс-чувствительный шаперон,

имеющийся, по-видимому, у большинства эукариот, чаще всего локализуется в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР). *Pdi* может быть задействован в стресс-зависимых каскадах, воспринимая изменение редокс-потенциала [5]. *eIF3j* является одной из субъединиц эукариотического фактора инициации трансляции 3, главная функция которого — обеспечение посадки малой субъединицы рибосомы на мРНК и привлечение других компонентов *eIF3* к малой субъединице рибосомы в нормальных условиях [6] и при IRES-зависимой трансляции (трансляция через сайт внутренней посадки рибосомы, Internal Ribosome Entry Site), которая происходит в условиях острого клеточного стресса [7]. Ген *CG6013* аннотирован в базах данных как ген с неизвестной функцией, имеющий гомологию с геном человека *CCDC124*. Таким образом, продукт гена *Gagr* в составе комплекса с его белковыми партнерами может быть вовлечен в стрессовый ответ [8].

Промотор *Gagr* у *D. melanogaster* содержит сайт связывания транскрипционного фактора кауак пути N-концевых киназ c-Jun, JNK, и два сайта связывания транскрипционного фактора STAT92E сигнального пути Janus-киназы (JAK) и транскрипционного фактора STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) пути JAK/STAT [9].

Экспрессия гена *Gagr* у *D. melanogaster* индуцируется у самок, но не у самцов, индуктором окислительного стресса — персульфатом аммония (APS). При этом также индуцируется экспрессия ряда других стресс-активируемых генов, в том числе *upd3* [9]. Ген *upd3* — один из трех генов цитокинов семейства Unpaired, запускающих путь JAK/STAT через рецептор Domeless [10]; экспрессия *upd3* у *D. melanogaster* индуцируется в ответ на стресс через каскад JNK [11, 12]. Таким образом, ген *Gagr*, по-видимому, интегрирован в регуляторную сеть стрессовых каскадов JAK/STAT и JNK.

С целью выявления сигнальных путей, в которых может быть задействован ген *Gagr*, в настоящей работе сравнили транскриптомы кишечника самок с нокдауном гена *Gagr* во всех тканях и в контрольной линии в стандартных условиях и при воздействии APS.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линии *Drosophila melanogaster* и условия культивирования. В работе использовали следующие линии *D. melanogaster*, полученные из Венского ресурсного центра (VDRС): контрольную линию w^{1118} , линию-драйвер Tub-GAL4 ($y[1]w[1118]; P\{w[+mC]=tubP-GAL4\}LL7 P\{ry[+t7.2]=neoFRT\}82B/TM6B, Tb[1]$), экспрессия *GAL4* у которого контролируется промотором гена тубулина; линию $v107457$, несущую конструкцию $P\{KK109908\}$ для экспрессии под контролем UAS дцРНК, интерферирующей мРНК гена *Gagr* (далее UAS-Gagr). Мух культивировали при температуре 25°C на стандартной питательной агаризованной среде. Для индукции интерференции самок линии UAS-Gagr скрещивали с самцами драйверной линии Tub-GAL4. Параллельно ставили контроль — самок линии w^{1118} скрещивали с самцами Tub-GAL4. Виргинных самок помещали в пробирки с самцами и оставляли при температуре 27°C на 3 дня. Отбор виргинных самок от скрещиваний Tub-GAL4×UAS-Gagr и Tub-GAL4 w^{1118} проводили в возрасте 1 день. Стресс индуцировали путем 24-часовой инкубации мух на среде с 0.1 М APS. В качестве контроля использовали самок, выращенных в стандартных условиях без добавления APS. РНК выделяли из кишечника, собранных после вскрытия самок в фосфатном буфере.

Секвенирование РНК и обработка данных. Выделение тотальной РНК проводили с помощью реактива ExtractRNA (“Евроген”, Россия). Все образцы получали в одном эксперименте в трех повторах; библиотеки готовили параллельно для каждого образца. Концентрацию и целостность РНК оценивали с помощью флуориметрического анализа на приборе Qubit 4 (“ThermoScientific”, США) и капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (“Agilent”, Германия) соответственно.

Библиотеки, специфичные для цепей, были приготовлены с помощью набора для подготовки библиотеки направленных РНК NEBNext Ultra II (“NEB”, США) и секвенированы (100 нуклеотидов, один конец) со средней глубиной 25 млн чтений на образец с помощью NovaSeq 6000 (“Illumina”, США). Считывания низкого качества и адаптер-ные последовательности удаляли (инструмент Trimmomatic, v0.36), затем считывания приводили в соответствие со сборкой первичного генома BDGP6. Подсчитывали уникально выровненные чтения известных экзонов каждого гена с использованием пакета R (среда R). Оценивали отклонение экспрессии каждого из референсных генов (*ppl*, *Tbp*, *Gapdh1*, *tub*, *RPL40*, *SdhA*) в образце, нормированной на значение экспрессии соответствующего гена в контрольной линии без воздействия APS. Отклонения для разных генов в среднем составили ± 0.3 . Анализ дифференциальной экспрессии выполнен с помощью пакета программ DESeq2 (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>). Дифференциально экспрессирующиеся гены, кодирующие белки, выявлены с порогом значимости $|\log_2 \text{Fold Change}|$ (далее LFC) не менее 0.6, $\text{Padj} < 0.05$. Тепловую карту и кластерный анализ транскриптомов проводили в сервисе SRPLOT (<https://www.bioinformatics.com.cn/srplot>). Сервис Metascape использовали для выявления категорий функционального обогащения дифференциально экспрессирующихся генов и построения кластеров функциональных категорий генов (<http://metascape.org>) [13]. Для анализа пересекающихся выборок генов строили диаграммы Венна (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Поиск обогащения по молекулярной функции, по внутриклеточной локализации и по биологическому процессу проводили с использованием GeneOntology Resource (<https://geneontology.org/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ транскриптомов кишечника самок с нокдауном гена Gagr и контрольных самок

По данным базы FlyBase (<https://flybase.org/>), ген *Gagr* транскрибируется на самом высоком уровне в тканях кишечника относительно других тканей (<https://flybase.org/reports/FBgn0036627#expression>), а по нашим данным, его транскрипция наиболее эффективно индуцируется в ответ на APS, но только у самок [9]. В наших экспериментах мы добавляли APS в корм, следовательно, пищеварительная система первая контактировала с APS и следовало ожидать ее наиболее сильный стрессовый ответ, поэтому для анализа транскриптома была выбрана ткань кишечника самок.

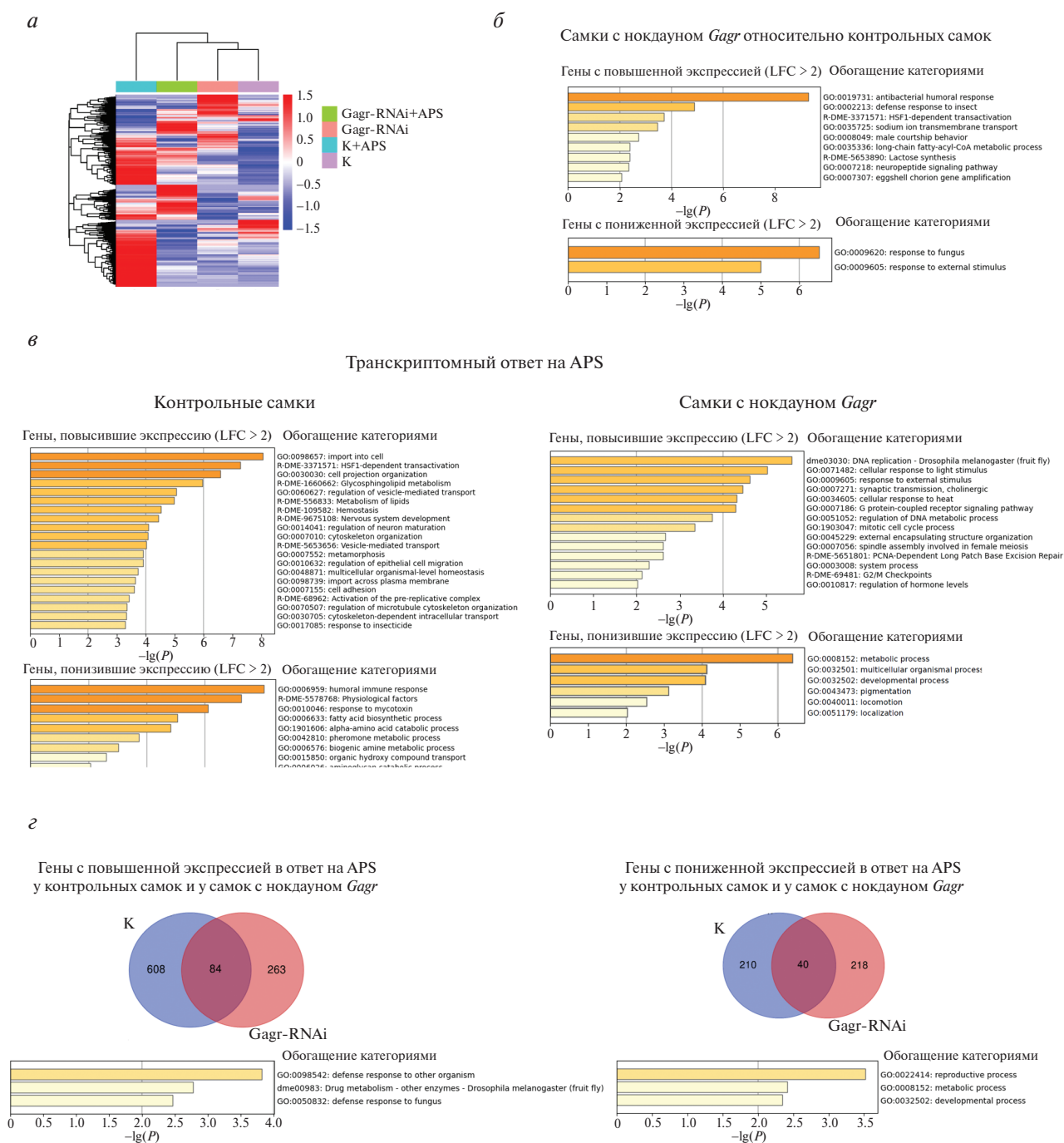


Рис. 1. Сравнительный анализ транскриптомов кишечника самок с нокдауном гена *GagR* и контрольных самок. **а** – Тепловая карта и кластерный анализ транскриптомов кишечника самок с нокдауном гена *GagR* и контрольных самок, культивированных в стандартных условиях и на среде с APS. **б** – Обогащение функциональными категориями генов с дифференциальной экспрессией ($|LFC| > 2$) в кишечнике самок с нокдауном гена *GagR* относительно контрольной линии. На шкале абсцисс приведено отрицательное значение десятичного логарифма P -value для данной категории. **в** – Обогащение функциональными категориями генов с повышенной и пониженной транскрипцией при стрессовом ответе ($|LFC| > 2$) у контрольных самок и самок с нокдауном гена *GagR*. **г** – Диаграммы Венна, показывающие количество общих генов, транскрипция которых изменилась при стрессовом ответе у контрольных самок (К) и самок с нокдауном *GagR* (GagR-RNAi), и их обогащение функциональными категориями.

На рис. 1а представлена тепловая карта и результаты кластерного анализа транскриптомов кишечника самок с нокдауном гена *Gagr* и контрольных самок, культивируемых в стандартных условиях и на среде с APS, полученные с использованием сервиса SRPLOT. Кластерный анализ показал, что по характеру транскрипции генов самки с нокдауном *Gagr* и контрольные самки ближе к друг другу в стандартных условиях, чем в стрессовых.

Сравнительный анализ транскриптомов кишечника самок с нокдауном гена *Gagr* и контрольных самок выявил более 6000 дифференциально экспрессирующихся генов, экспрессия которых различается более чем в 1.5 раза ($|LFC| > 0.6$, $P_{adj} < 0.05$). Поэтому далее мы анализировали обогащение функциональными категориями только тех генов, чья экспрессия различается с порогом $|LFC| > 2$. В стандартных условиях таких генов оказалось 423; уровень экспрессии 309 из них в кишечнике самок с нокдауном *Gagr* был как минимум в 4 раза выше, чем в кишечнике контрольных самок, а уровень экспрессии 114 из них в кишечнике самок с нокдауном *Gagr* был как минимум в 4 раза ниже, чем в кишечнике контрольных самок.

Обогащение функциональными категориями анализировали с помощью сервиса Metascape, использующего для обогащения ресурс Gene Ontology (GO) и базу биологических путей Reactome (<https://reactome.org>) для дрозофилы (R-DME) (рис. 1б). Обогащение GO показало, что гены с повышенным уровнем экспрессии в кишечнике самок с нокдауном *Gagr* относятся, в основном, к генам защитного ответа, но есть также категории генов метаболических процессов и сигнальных путей. Наиболее значимой, согласно значению *P*-value, является категория генов антибактериального гуморального ответа GO:0019731. К этой категории относятся 33 из 309 генов с повышенной экспрессией. Среди них обнаружены гены антимикробных пептидов *DptA*, *Dro*, *Drsl2*, *Drsl3*, *Drsl4*, *Listericin*, *CecC*, *Def*, *Mtk* (табл. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/3/supp_Nikitina_rus.zip). Анализ обогащения функциональными категориями генов в базе Reactome выявил две категории генов: R-DME-3371571 и R-DME65653890 — это гены, находящиеся под контролем транскрипционного фактора HSF1, отвечающего на тепловой шок (*Hsp23*, *Hsp68*, *Hsp70Ab*, *Hsp70Aa*, *Hsp70Bb*, *para*, *AttA*, *DptA*), и гены лизоцимов (*LysB*, *LysD*, *LysE*). Примечательно, что гены антимикробных пептидов находятся под контролем сигнальных путей Toll и Imd [14]. Это свидетельствует об активации путей Toll и Imd у мух с подавлением функции гена *Gagr*.

В число генов со сниженным уровнем экспрессии в кишечнике самок с нокдауном *Gagr* входят гены ответа на внешние стимулы (*GNBP-like3*, *Tsf1*, *Npc2e*, *BomS6*), гены профенолоксидаз (*PPO1* и *PPO2*),

участвующих в процессе меланизации, а также гены семейства *Turandot* (*TotA* и *TotX*), чья экспрессия контролируется сигнальным путем JAK/STAT [15] (табл. S2, см. Дополнительные материалы).

Таким образом, нокдаун гена *Gagr* приводит к изменению характера экспрессии генов, связанных со стрессовым ответом и находящихся под контролем разных сигнальных путей, что свидетельствует о том, что функция гена *Gagr* влияет на функционирование сигнальных каскадов.

Далее мы проанализировали транскриптомный ответ тканей кишечника контрольных самок на стресс. С этой целью сравнили уровни транскрипции генов в кишечнике самок при стрессовом ответе и тех же генов вне стресса. Всего выявлено 946 генов, транскрипция которых изменилась в 4 раза и более. Экспрессия 696 из них повысилась. Эти гены обогащены функциональными категориями, связанными с импортом в клетку, с HSF1-зависимой трансактивацией, метаболизмом липидов, развитием нервной системы и др. (рис. 1в, табл. S3, см. Дополнительные материалы). При этом экспрессия 250 генов в кишечнике контрольных самок снизилась в условиях стресса. Среди основных категорий — гены иммунного ответа и метаболических процессов (табл. S4, см. Дополнительные материалы).

В кишечнике самок с нокдауном *Gagr* выявлено 605 генов, транскрипция которых в ответ на стресс изменилась в 4 раза и более. Из них повысилась экспрессия 347 генов, что примерно в 2 раза меньше, чем у контрольных самок. Примечательно, что эти гены обогащены некоторыми другими функциональными категориями, в том числе связанными с контролем клеточного цикла (рис. 1в, табл. S5, см. Дополнительные материалы). Выявлено снижение экспрессии 258 генов. Их функция связана, главным образом, с метаболическими процессами (табл. S6, см. Дополнительные материалы).

Среди генов с повышенной экспрессией в кишечнике контрольных самок и самок с нокдауном *Gagr* выявлено всего 84 общих гена; это по большей части гены защитного ответа и метаболизма (рис. 1з). Общие гены (40) с пониженной экспрессией, выявленные в кишечнике контрольных самок и самок с нокдауном *Gagr*, обогащены функциональными категориями, имеющими отношение к репродуктивным процессам, развитию и метаболическим процессам (рис. 1з).

Таким образом, и категории генов, и сами гены, дифференциально экспрессирующиеся при стрессовом ответе в кишечнике самок с нокдауном гена *Gagr* и в кишечнике самок контрольной линии, довольно сильно отличаются, свидетельствуя о том, что нарушение функции гена *Gagr* кардинально меняет транскриптомный ответ на стресс. В стандартных условиях выключение гена *Gagr* приводит к повышению экспрессии генов стрессового ответа.

Гены с повышенной экспрессией у контрольных самок,
но не у самок с нокдауном *Gagr*

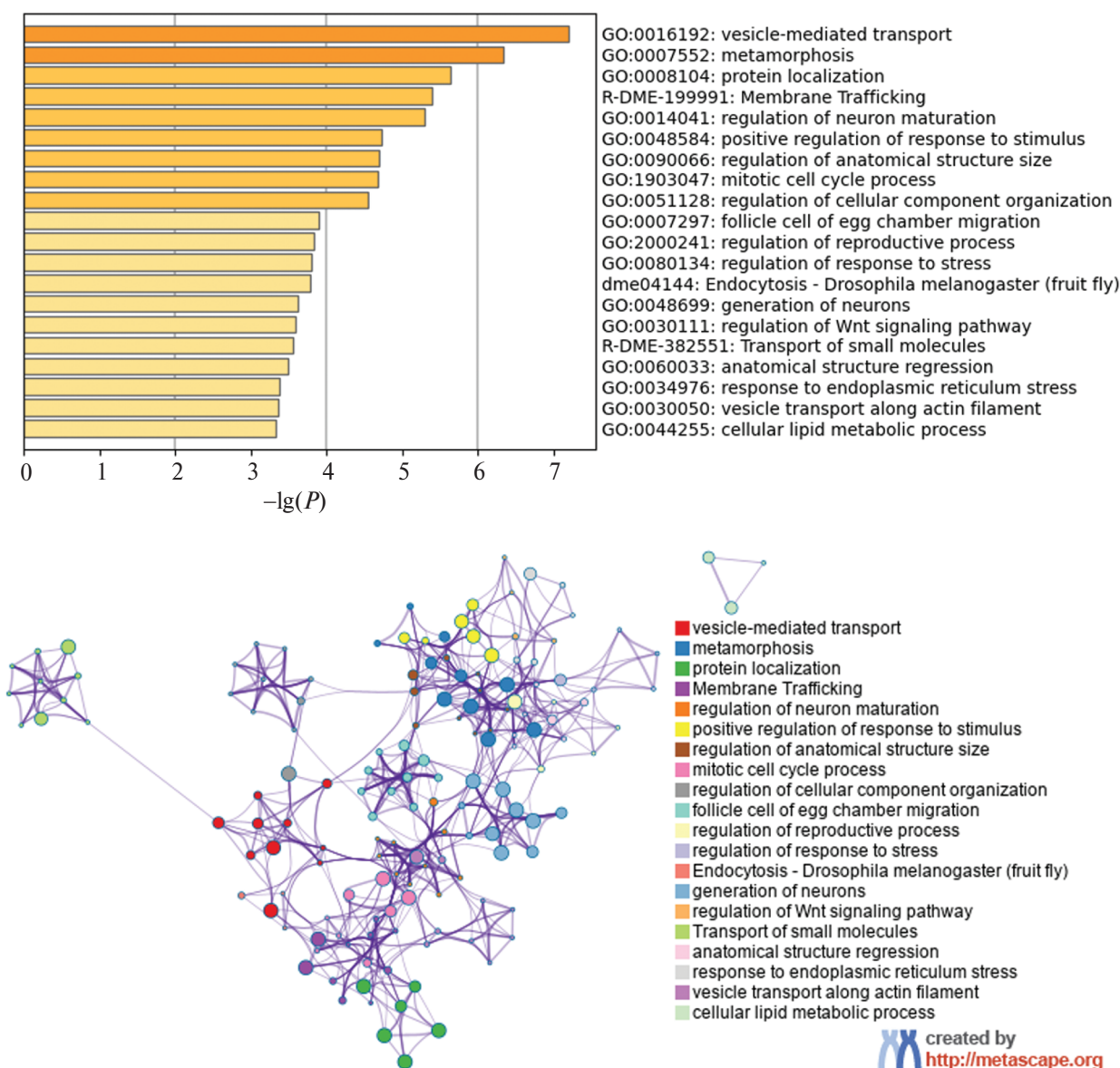


Рис. 2. Обогащение функциональными категориями генов с повышенной транскрипцией ($LFC > 2$) в кишечнике контрольных самок и не изменившими или понизившими транскрипцию в кишечнике самок с нокдауном *Gagr* ($LFC < 0.5$). Под диаграммой показана кластерная сеть функциональных категорий генов, построенная в программе Metascape (пояснения в тексте).

Однако в стрессовых условиях активация генов происходит в гораздо меньшей степени в линии с нокдауном, чем в контрольной линии.

Далее мы решили выяснить, какие гены активируются при стрессовом ответе в кишечнике самок контрольной линии и не активируются в кишечнике самок с нокдауном *Gagr*. Для этого мы сначала определили число генов, транскрипция которых повысилась более чем в 4 раза в кишечнике контрольных самок, и генов, не отреагировавших индукцией транскрипции или снижением экспрессии

в кишечнике самок с нокдауном *Gagr* ($LFC < 0.5$) (рис. 2a). Таких генов оказалось всего 208. Из них 41 ген относится к категории генов, чьи функции связаны с везикулярным транспортом, 43 гена — с метаморфозом, 45 генов — с локализацией белков, 21 ген — с регуляцией созревания нейронов, 27 генов — с мембранным транспортом, 30 генов — с позитивной регуляцией ответа на стимулы (рис. 2a, табл. S7, см. Дополнительные материалы).

Сервис Metascape предлагает визуализацию функционального обогащения генов, позволяющую

Таблица 1. Обогащение генов, транскрипция которых повысилась более чем в 2 раза ($LFC > 2$) в кишечнике контрольных самок и не изменилась или понизилась в кишечнике самок с нокдауном *Gagr* ($LFC < 0.5$), биологическими процессами, молекулярными функциями и клеточной локализацией (согласно Gene Ontology)

Биологический процесс (категория GO)	Обогащение (FE)	P-значение	FDR
Везикулярный транспорт вдоль актиновых филаментов	20.33	7.78E-04	4.73E-02
Негативная регуляция полимеризации микротрубочек	19.36	1.13E-04	1.18E-02
Позитивная регуляция ремоделирования нейронов	19.36	1.13E-04	1.15E-02
Позитивная регуляция ответа на ранение	13.55	6.57E-05	8.45E-03
Позитивная регуляция эндоцитоза	8.95	2.50E-05	4.03E-03
Позитивная регуляция GTPазной активности	8.09	1.28E-05	2.62E-03
Морфогенез конечностей	5.89	7.69E-04	4.78E-02
Миграция пограничных клеток фолликула	5.77	1.19E-04	1.19E-02
Регуляция сигнального пути Wnt	5.59	1.46E-04	1.32E-02
Стрессовый ответ эндоплазматического ретикулула	5.52	4.09E-04	2.98E-02
Регуляция сигнальной трансдукции малыми GTPазами	5.45	4.36E-04	3.10E-02
Эндоцитоз	5.15	7.10E-06	1.68E-03
Регуляция репродуктивных процессов	5.12	1.05E-04	1.17E-02
Регуляция размера клеток	5.07	2.73E-04	2.11E-02
Регуляция развития нервно-мышечных контактов	4.56	5.33E-04	3.58E-02
Транспорт везикул аппарата Гольджи	4.18	4.40E-04	3.09E-02
Митотический цикл	3.85	1.43E-05	2.41E-03
Регуляция катаболических процессов	3.03	5.14E-04	3.48E-02
Липидные метаболические процессы	2.79	2.88E-04	2.19E-02
Позитивная регуляция сигнальной трансдукции	2.67	4.54E-04	3.13E-02
Транспорт белков	2.61	5.71E-04	3.80E-02
Развитие нейронов	2.59	8.73E-05	1.02E-02
Регуляция процессов в многоклеточном организме	2.34	5.95E-04	3.93E-02
Сигнальная трансдукция	2.11	1.05E-04	1.14E-02
Ответ на внешние стимулы	2.11	2.02E-04	1.70E-02
Молекулярная функция (категория GO)	Обогащение (FE)	P-значение	FDR
Двигательная активность цитоскелета	7.82	1.90E-04	2.09E-02
Связывание малых GTPаз	6.84	1.37E-06	8.15E-04
Активация GTPаз	5.65	3.58E-04	3.55E-02
Гидролиз АТФ	4.21	4.62E-05	7.24E-03
Связывание липидов	3.37	5.92E-04	5.04E-02
Связывание АТФ	2.98	3.80E-07	1.13E-03
Киназная активность	2.78	4.50E-04	4.33E-02
Клеточная локализация (категория GO)	Обогащение (FE)	P-значение	FDR
Аппарат Гольджи	8.47	1.27E-04	1.62E-02
Апикальная часть клетки	4.42	2.97E-05	5.43E-03
Цитоплазматические везикулы	2.61	3.85E-04	2.90E-02
Клеточные контакты	2.57	3.09E-04	2.63E-02
Цитозоль	2.21	2.78E-05	5.93E-03
Плазматическая мембрана	1.83	6.36E-04	4.28E-02

Примечание. GO – категория генов, согласно базе Gene Ontology. FE, Fold Enrichment – соотношение частоты категории генов в исследуемой выборке и в референсном наборе. FDR, False Discovery Rate – средняя доля ложных отклонений гипотез среди всех отклонений.

показать, что эти гены соответствуют кластерной сети категорий (рис. 2), каждая из которых представлена кругами одного цвета, а отдельный круг соответствует подкатегории. Размер круга пропорционален количеству генов, попадающих в эту подкатегорию. Круги соединяются связями, если гены, попадающие в круг, обнаруживаются не в одной, а в нескольких категориях или подкатегориях. На рис. 2 видно, что практически все категории (19 из 20) объединены между собой функционально.

Мы предположили, что гены, транскрипция которых в кишечнике контрольных самок повысилась более чем в 4 раза, гены, транскрипция которых не индуцировалась или снизилась в кишечнике самок с нокдауном *Gagr*, могут не только участвовать в определенных биологических процессах, но также иметь общие молекулярные функции и клеточную локализацию. Поэтому далее с помощью сервиса Gene Ontology мы провели обогащение этой группы генов (табл. 1). Полученные данные подтверждают, что функция гена *Gagr* связана с процессами, лежащими в основе регуляции основополагающих внутриклеточных гомеостатических процессов.

*Анализ транскрипционного ответа генов
сигнальных путей на стресс, вызванный
персульфатом аммония*

Далее мы сравнили транскрипцию генов, входящих в основные сигнальные каскады, активация которых сопряжена со стрессовым ответом. Прежде всего нас интересовали пути JNK/MAPK и JAK/STAT, так как в промоторе гена *Gagr* содержатся сайты связывания транскрипционных факторов *kaayk* и *STAT92E*, вовлеченных в эти пути, и *Gagr*, вероятно, является эффектором этих путей [9]. Кроме того, нас интересовали гены, активируемые при ЭПР-стрессе и сопровождающем его стрессе несвернутых белков — UPR-стрессе, поскольку среди партнеров белка *Gagr* есть белки, локализованные в ЭПР и, возможно, задействованные в стрессовом ответе [8].

Путь JNK представляет собой каскад киназ, активирующийся под влиянием самых различных стимулов (радиация, повреждения ДНК, высокие температуры, присутствие окислителей, бактериальных или вирусных макромолекул, некоторых цитокинов) [16, 17]. Элементы каскада представлены первичными, вторичными и третичными киназами. Первичные киназы (JNKKK) воспринимают специфические сигналы, вызванные ограниченным спектром факторов стресса, и локализуются в определенном компартменте клетки (ядро, митохондрии, цитозоль и др.), где подвергаются фосфорилированию. Активированные JNKKK, в свою очередь, фосфорилируют вторичные киназы (JNKK), являющиеся первым интегрирующим звеном пути JNK. Третичные киназы (JNK)

принимают сигнал от JNKK и фосфорилируют белки-мишени, в частности транскрипционные факторы. Таким образом, JNK-путь объединяет отдельные стресс-сигналы в единый поток, направленный на изменение транскрипционного профиля клетки, определяющий целостный ответ на стрессовую ситуацию. У *D. melanogaster* JNK-каскад включает относительно небольшое число компонентов (по сравнению с позвоночными): несколько первичных киназ (*Ask1*, *Tak1* и др.), пару вторичных (*Her* и *Mkk4*) и единственную третичную (*Bsk*). Основными мишенями *Bsk* являются транскрипционные факторы семейства AP-1 (*Jre* и *Kay*) [16].

Сигнальный путь митоген-активированной протеинкиназы p38 — еще один важный механизм генерализованного клеточного ответа на стресс. Как и JNK-каскад, путь MAPK составляют первичные, вторичные и третичные киназы, осуществляющие передачу стресс-сигналов разной природы из разных компартментов клетки или извне. Мишенями пути MAPK являются транскрипционные факторы, циклинзависимые киназы, факторы роста, а также белки, способствующие или противодействующие апоптозу [18]. У *D. melanogaster* путь MAPK (p38) представлен тремя киназами (p38a, p38b и p38c), он активируется в ответ на экзогенные (патогены, окислители) и эндогенные (метаболиты) стимулы. Функционирование киназ MAPK и JNK частично сопряжено (за счет регуляции одними и теми же фосфатазами), но спектр их мишеней различается.

Сигнальный каскад JAK/STAT играет важную роль в онтогенезе (регулирует рост, пролиферацию и морфогенез), а также активируется в ответ на бактериальные или вирусные инфекции [19, 20]. Предполагается, что в стрессовых реакциях путь JAK/STAT преимущественно способствует регенеративной пролиферации (в отличие от неоднозначных эффектов путей JNK и MAPK) [21]. У *D. melanogaster* путь JAK/STAT представлен рецептором (*Domeless*), активирующими его лигандами (цитокинами *Upd1–3*), Janus-киназой (*Hopscotch*) и транскрипционным фактором (*STAT92E*). Рецептор, связывая лиганд *Upd*, димеризуется и перифосфорилирует киназу, которая затем переносит фосфат на STAT. Фосфорилированный STAT также димеризуется и транспортируется в ядро, где регулирует транскрипцию генов-мишеней [20].

UPR-ответ — это реакция клетки на накопление чужеродных (например, вирусных) или неправильно уложенных собственных белков в ЭПР (ЭПР-стресс). У *D. melanogaster* и других животных известны три сенсора ЭПР-стресса (*Ire1*, *PERK* и *Atf6*) и три каскада, через которые реализуется UPR [22, 23]. *Ire1* представляет собой фермент, встроенный в мембрану ЭПР и обладающий двумя видами активности — киназной и эндонуклеазной. Благодаря последней *Ire1* может выступать в роли нестандартного фактора сплайсинга ряда мРНК,

а Контрольные самки

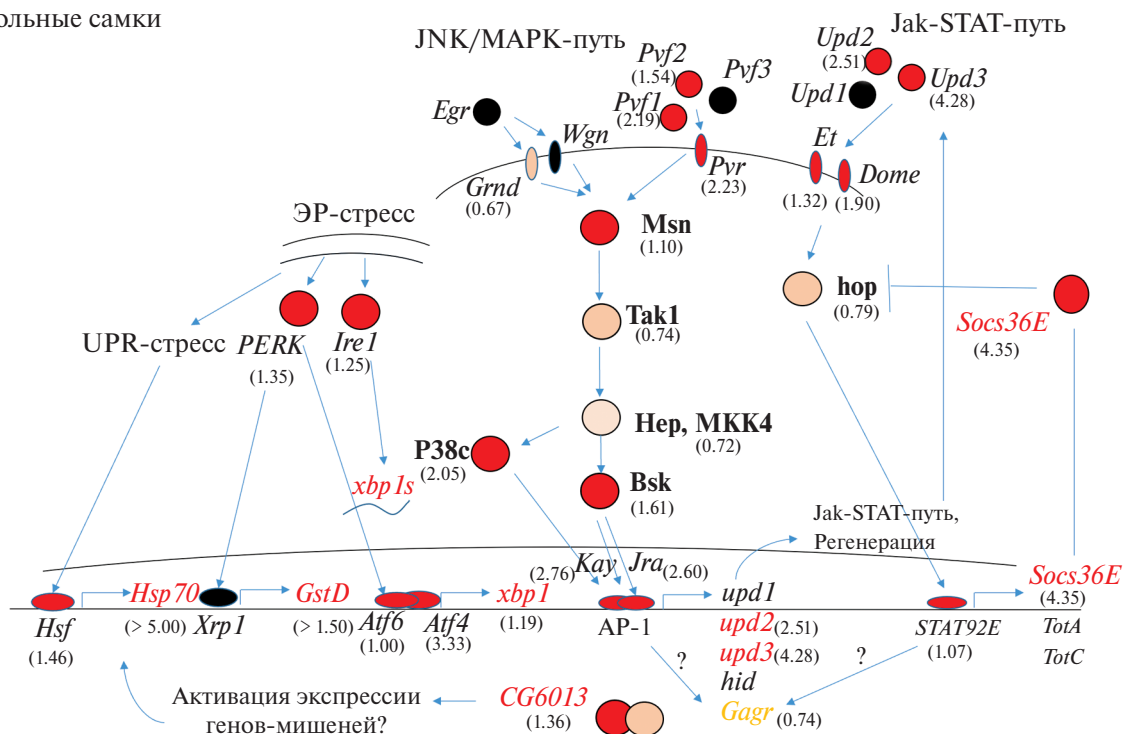
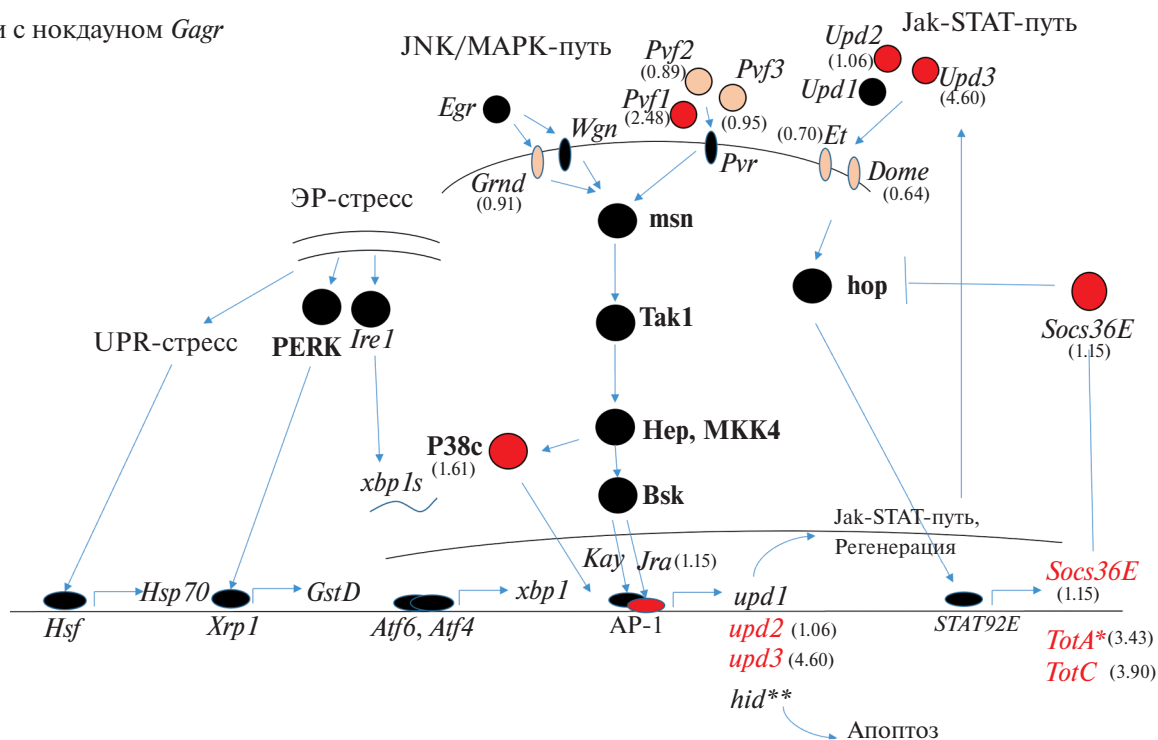
б Самки с нокдауном *Gagr*

Рис. 3. Транскрипционный ответ генов сигнальных путей JNK/MAPK, JAK/STAT и ЭПР-стресса в ответ на воздействие персульфата аммония в кишечнике контрольных самок (а) и самок с нокдауном *Gagr* (б). Для построения схем сигнальных путей использованы данные из работ [20] и [23]. Красным показаны гены, транскрипция которых повысилась более чем в 2 раза. Розовым выделены гены, чья экспрессия повысилась в 1.5–2 раза. В скобках около генов приведено значение LFC, жирным выделены киназы; *xbp1s* – сплайсированная форма *xbp1*. **TotA* – экспрессия этого гена у особей с нокдауном ниже, чем в контроле, но индуцируется при стрессовом ответе; ***hid* – экспрессия этого гена у особей с нокдауном *Gagr* выше, чем в контроле, и не индуцируется при стрессовом ответе.

в число которых входит транскрипт гена *xbp1*, не транслирующийся в функциональный белок. При ЭПР-стрессе Ire1 осуществляет сплайсинг этого транскрипта; процессированная таким образом мРНК транслируется в функциональный белок Xbp1, являющийся транскрипционным фактором, контролирующим транскрипцию стресс-специфических генов [24]. Сигнальный путь Ire1 не только важен при стрессовых состояниях, но и необходим для правильного развития и функционирования тканей, постоянно контактирующих с потенциальными факторами стресса (например, кишечник, жировое тело у личинок и фоторецепторы) [23]. Другая киназа, PERK, при ЭПР-стрессе фосфорилирует фактор инициации трансляции eIF2 α (доставляющий инициаторные тРНК к малой субъединице рибосомы), ингибируя его и тем самым подавляя трансляцию в целом. С другой стороны, это событие позволяет осуществить трансляцию ряда стресс-специфических регуляторов в отсутствие конкуренции [25]. Atf6 — это транскрипционный фактор, встроенный в мембрану ЭПР. При возникновении стрессовой ситуации Atf6 покидает ЭПР и транспортируется в аппарат Гольджи, где частично расщепляется. После этого “усеченный” Atf6 переносится в ядро, где активирует транскрипцию стресс-специфических генов.

Анализируя транскриптомный ответ на стресс, вызванный APS в кишечнике контрольных самок, мы обнаружили, что гены сигнальных путей, регулирующие активность продуктов которых осуществляется путем модификаций киназами, может также регулироваться при стрессовом ответе на уровне транскрипции (рис. 3а). Транскрипция очень многих генов проанализированных нами сигнальных путей активировалась при стрессовом ответе на APS. Среди активированных генов JNK/MAPK-пути были гены гуморальных факторов Pvf1 и Pvf2 и их мембранных рецепторов Grindewald (Grnd) и Pvr, киназ Msn, Tak1, MKK4, Bsk и MAP-киназы p38c; гены конечных мишеней JNK-сигналинга, транскрипционных факторов семейства AP-1 — jra и kau; генов мишеней JNK-каскада — цитокинов Upd2 и Upd3. Таким образом, JNK-каскад регулируется на уровне экспрессии его компонентов в ответ на APS.

Воздействие APS приводит также к активации экспрессии целого ряда генов компонентов сигнального каскада JAK/STAT в контрольной линии: гуморальных факторов Upd2 и Upd3 и их мембранного рецептора Dome; негативного регулятора рецептора Et (eye transformer); транскрипционного фактора пути JAK/STAT — STAT92E; мишеней JAK/STAT каскада — генов антимикробных пептидов TotA и TotC и негативного регулятора каскада Socs36E. Таким образом, JAK/STAT-каскад регулируется также на уровне транскрипции его отдельных компонентов в ответ на APS.

Нами показано, что воздействие APS приводит к ЭПР- и UPR-стрессу у мух контрольной линии. При этом наблюдается активация транскрипции гена киназы PERK, гена *xbp1*, генов транскрипционных факторов Atf4 и Atf6, Hsf1. Мы не обнаружили изменения экспрессии гена транскрипционного фактора Xgr1, однако наблюдали активацию транскрипции мишеней путей ЭПР- и UPR-стресса: генов семейства *Hsp70* и семейства *GstD*. Следует отметить, что, как недавно показано, гены глутатион-S-трансфераз семейства *GstD* — одни из наиболее значительно индуцируемых генов-мишеней UPR-стресса у дрозофилы. Среди генов этой группы наиболее значительно повышается активность гена *GstD1*, и эта индукция зависит от PERK и Xgr1 [26].

Изучение стрессового ответа транскриптома у особей с нокдауном *Gagr* не выявило активации транскрипции генов, характерной для контрольной линии (рис. 3б). Отметим, что в отсутствие стресса у особей с нокдауном активирован иммунный ответ, опосредованный активацией сигнальных путей Toll и Imd (рис. 1). Однако в условиях реального стресса дальнейшей активации транскрипции большинства генов иммунного ответа не происходит.

Поскольку активация белков, участвующих в сигнальных путях, происходит в результате их фосфорилирования и чаще всего не связана с активацией транскрипции, об активности сигнальных путей лучше всего судить по уровню транскрипции генов-мишеней. Анализируя транскрипцию генов-мишеней, мы сделали вывод, что у особей с нокдауном *Gagr* активирован путь JAK/STAT и не работают пути ответа на ЭПР-стресс и UPR-стресс. Про путь JNK однозначного вывода сделать нельзя, так как у мух с нокдауном *Gagr* активирована транскрипция отдельных генов-мишеней (*upd2*, *upd3*).

Проанализировав уровни транскрипции генов белков-партнеров *Gagr* при стрессовом ответе, мы обратили внимание на повышение транскрипции только одного из генов белков-партнеров с неизвестной функцией, *CG6013*, в кишечнике контрольных самок, но не особей с нокдауном *Gagr*. Это означает, что активация этого гена может зависеть от уровня транскрипции гена *Gagr*.

Согласно данным базы Flybase, ген *CG6013* (гомолог гена человека *CCDC124*) предположительно является коактиватором транскрипции, активным в ядре. Белок CG6013 имеет все типичные особенности белка CCDC124 (N-концевой ДНК/РНК-связывающий домен, C-концевой HMG-бокс, потенциально функциональные NLS и NES). У дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* продукт ортоголичного *CG6013* гена, известный как Oxl1, действует как кофактор транскрипционного фактора Pap1 семейства bZIP в сигнальном пути

Pap1/Oxs1 [27]. Этот путь активируется в ответ на стресс дисульфидных связей. Функционально Oxs1 предположительно ведет себя как кофактор Pap1, усиливающий его активность и изменяющий его специфичность (позволяя активировать новые гены-мишени) [27, 28].

Белок CCDC124 обладает мРНК-связывающей активностью [29]. Более того, экспериментально показано связывание CCDC124 с комплексом белков ADARB1, PRKRA, EFTUD2 и U1 (ADARB1 — фермент, редактирующий мРНК, PRKRA — киназа, активируемая дцРНК, а EFTUD2 и U1 являются компонентами сплайсосомы) [30], а также взаимодействие этого белка с большой субъединицей рибосомы, экспортином-1 и рибосомоспецифической киназой (как у *S. cerevisiae*) [31]. Эти данные могут указывать на тесную связь CCDC124 с аппаратом трансляции. Учитывая гомологию с Oxs1, можно предположить, что функции CCDC124 связаны со стрессзависимой (ре)активацией аппарата трансляции. Известно, что CCDC124 локализован на элементах цитоскелета (актиновые филаменты), на центриолях и в цитоплазме [32, 33]. Изучение механизма, посредством которого белок CCDC124 участвует в восстановлении трансляции после стресса, показало, что CCDC124 соединяет сайты декодирования малой субъединицы с центром активации ГТРАЗЫ большой субъединицы [34]. Таким образом, CCDC124 способствует быстрой реактивации трансляции стабилизируя компетентное к рециркуляции состояние неактивных рибосом.

Учитывая сходство белка CG6013 *D. melanogaster* как с Oxs1 дрожжей, так и с CCDC124 человека, можно предположить, что CG6013 участвует в сигнальном пути, аналогичном Pap1/Oxs1. У *D. melanogaster* этот путь, вероятно, включает рибосомы и аппарат, ответственный за синтез белка в ЭПР. Можно предположить, что белок CG6013 является важной сигнальной молекулой, циркулирующей между аппаратом трансляции и ядром. В ядре его функциями могут быть активация или подавление экспрессии некоторых генов путем модуляции активности транскрипционных факторов (возможно, Jra или Kau), связывание транскриптов этих генов, их процессинг и экспорт. Возможные функции, связанные с трансляцией, включают направление транскриптов в ЭПР, инициацию (вместе с Gagr и eIF3j) неканонического IRES-зависимого пути трансляции и реактивацию покоящихся рибосом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе филогенеза рода *Drosophila* ген *Gagr*, возникший в результате доместикации гена *gag*, претерпел существенные изменения: регуляция промоторной области гена усложнилась, а его белковый продукт приобрел трансмембранный домен.

Итогом этих преобразований стало включение гена *Gagr* в сигнальные пути. По-видимому, белок Gagr *D. melanogaster* закорен в мембране ЭПР и может служить белком-адаптером, координирующим взаимодействие своих партнеров. Анализ транскриптома кишечника самок с нокдауном гена *Gagr* выявил плеiotропность функции Gagr. Выключение гена *Gagr* приводит к значительному изменению архитектуры транскриптома. В стрессовых условиях в отсутствие этого гена не происходит активация путей ЭПР- и UPR-стресса, а также снижается эффективность работы сигнальных путей JNK/MAPK и JAK/STAT. Белок Gagr может относиться к белкам домашнего хозяйства, модулирующим активность коактиваторов транскрипции, таких как CG6013 с неизвестной функцией, гомолог CCDC124 человека. По-видимому, Gagr играет важную роль в процессах индивидуального развития, в том числе нервной системы, регулируя процессы пролиферации. В условиях стресса он может опосредовать IRES-зависимую трансляцию и способствовать активации процессов регенерации. Эти гипотезы требуют дальнейшей экспериментальной проверки.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (№ 22-24-00305).

В соответствии с пунктом 3 главы 1 Директивы 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, требования биоэтики не распространяются на объект данного исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Malik H.S., Henikoff S. (2005) Positive selection of *Iris*, a retroviral *envelope*-derived host gene in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* **1**(4), e44.
2. Nefedova L.N., Kuzmin I.V., Makhnovskii P.A., Kim A.I. (2014) Domesticated retroviral *GAG* gene in *Drosophila*: new functions for an old gene. *Virology*. **450–451**, 196.
3. Guruharsha K.G., Rual J.-F., Zhai B., Mintseris J., Vaidya P., Vaidya N., Beekman C., Wong C., Rhee D.Y., Cenaj O., McKillip E., Shah S., Stapleton M., Wan K.H., Yu C., Parsa B., Carlson J.W., Chen X., Kapadia B., VijayRaghavan K., Gygi S.P., Celniker S.E., Obar R.A., Artavanis-Tsakonas S. (2011) A protein complex network of *Drosophila melanogaster*. *Cell*. **147**, 690–703.
4. Parua P.K., Young E.T. (2014) Binding and transcriptional regulation by 14-3-3 (Bmh) proteins requires residues outside of the canonical motif. *Eukaryot. Cell*. **13**, 21–30.
5. Moretti A.I.S., Laurindo F.R.M. (2017) Protein disulfide isomerases: redox connections in and out of the endoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* **617**, 106–119.
6. Fraser C.S., Lee J.Y., Mayeur G.L., Bushell M., Doudna J.A., Hershey J.W. (2004) The j-subunit of human translation initiation factor eIF3 is required for the stable binding

- of eIF3 and its subcomplexes to 40 S ribosomal subunits *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **279**, 8946–8956.
7. Majzoub K., Hafirassou M.L., Meignin C., Goto A., Marzi S., Fedorova A., Verdier Y., Vinh J., Hoffmann J.A., Martin F., Baumert T.F., Schuster C., Imler J.L. (2014) RACK1 controls IRES-mediated translation of viruses. *Cell*. **159**, 1086–1095.
 8. Nefedova L., Gigin A., Kim A. (2022) Domesticated LTR-retrotransposon *gag*-related gene (*Gagr*) as a member of the stress response network in *Drosophila*. *Life*. **12**, 364.
 9. Makhnovskii P., Balakireva Y., Nefedova L., Lavrenov A., Kuzmin I., Kim A. (2020) Domesticated *gag* gene of *Drosophila* LTR retrotransposons is involved in response to oxidative stress. *Genes*. **11**, 396.
 10. Bunker B.D., Nellimoottil T.T., Boileau R.M., Classen A.K., Bilder D. (2015) The transcriptional response to tumorigenic polarity loss in *Drosophila*. *Elife*. **4**, e03189.
 11. Dostert C., Jouanguy E., Irving P., Troxler L., Galiana-Arnoux D., Hetru C., Homann J.A., Imler J.L. (2005) The JAK/STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nat. Immunol.* **6**, 946–953.
 12. Paradkar P.N., Trinidad L., Voysey R., Duchemin J.-B., Walker P.J. (2012) Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the JAK/STAT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**, 18915–18920.
 13. Zhou Y., Zhou B., Pache L., Chang M., Khodabakhshi A.H., Tanaseichuk O., Benner C., Chanda S.K. (2019) Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat. Commun.* **10**(1), 1523.
 14. Lee J.H., Cho K.S., Lee J., Yoo J., Lee J., Chung J. (2001) Dipterin-like protein: an immune response gene regulated by the anti-bacterial gene induction pathway in *Drosophila*. *Gene*. **271**(2), 233–238.
 15. Agaisse H., Petersen U.M., Boutros M., Mathey-Prevot B., Perrimon N. (2003) Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev. Cell*. **5**(3), 441–450.
 16. Biteau B., Karpac J., Hwangbo D., Jasper H. (2011) Regulation of *Drosophila* lifespan by JNK signaling. *Exp. Gerontol.* **46**(5), 349.
 17. Johnson G.L., Nakamura K. (2007) The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim. Biophys. Acta*. **1773**(8), 1341.
 18. Belozero V.E., Lin Z.-Y., Gingras A.-C., McDermott J.C., Michael Siu K.W. (2012) High resolution protein interaction map of the *Drosophila melanogaster* p38 mitogen-activated protein kinases reveals limited functional redundancy. *Mol. Cell. Biol.* **32**(18), 3695.
 19. Amoyel M., Anderson A.M., Bach E.A. (2014) JAK/STAT pathway dysregulation in tumors: a *Drosophila* perspective. *Semin. Cell Dev. Biol.* **28**, 96.
 20. Kingsolver M.B., Huang Z., Hardy R.W. (2013) Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. *J. Mol. Biol.* **425**(24), 4921.
 21. La Fortezza M., Schenk M., Cosolo A., Kolybaba A., Grass I., Classen A.-K. (2016) JAK/STAT signalling mediates cell survival in response to tissue stress. *Development*. **143**(16), 2907.
 22. Ryoo H.D., Domingos P.M., Kang M.-J., Steller H. (2007) Unfolded protein response in a *Drosophila* model for retinal degeneration. *EMBO J.* **26**(1), 242.
 23. Ryoo H.D. (2015) *Drosophila* as a model for unfolded protein response research. *BMB Rep.* **48**(8), 445.
 24. Hollien J., Weissman J.S. (2006) Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science*. **313**(5783), 104.
 25. Hewes R.S., Schaefer A.M., Taghert P.H. (2000) The cryptochrome gene (ATF4) encodes multiple basic-leucine zipper proteins controlling molting and metamorphosis in *Drosophila*. *Genetics*. **155**(4), 1711.
 26. Brown B., Finnegan S.M., Roach D., Vasudevan D., Ryoo H.D. (2021) The transcription factor Xrp1 is required for PERK-mediated antioxidant gene induction in *Drosophila*. *eLife*. **10**, e74047.
 27. He Y., Chen Y., Song W., Zhu L., Dong Z., Ow D.W. (2017) A Pap1–Oxsl signaling pathway for disulfide stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucl. Acids Res.* **45**, 106–114.
 28. Kudo N., Taoka H., Toda T., Horinouchi S. (1999) A novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in the fission yeast transcription factor Pap1. *J. Biol. Chem.* **274**, 15151–15158.
 29. Li S., Wang L., Fu B., Berman M.A., Diallo A., Dorf M.E. (2014) TRIM65 regulates microRNA activity by ubiquitination of TNRC6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, 6970–6975.
 30. Malinová A., Cvačková Z., Matějů D., Hořejší Z., Abéza C., Vandermoere F., Bertrand E., Staněk D., Verheggen C. (2017) Assembly of the U5 snRNP component PRPF8 is controlled by the HSP90/R2TP chaperones. *J. Cell Biol.* **216**, 1579–1596.
 31. Kırılı K., Karaca S., Dehne H.J., Samwer M., Pan K.T., Lenz C., Urlaub H., Görlich D. (2015) A deep proteomics perspective on CRM1-mediated nuclear export and nucleocytoplasmic partitioning. *Elife*. **4**, e11466.
 32. Telkoparan P., Erkek S., Yaman E., Alotaibi H., Bayık D., Tazebay U.H. (2013) Coiled-coil domain containing protein 124 is a novel centrosome and midbody protein that interacts with the Ras-guanine nucleotide exchange factor 1B and is involved in cytokinesis. *PLoS One*. **8**, e69289.
 33. Castello A., Fischer B., Eichelbaum K., Horos R., Beckmann B.M., Strein C., Davey N.E., Humphreys D.T., Preiss T., Steinmetz L.M., Krijgsvelde J., Hentze M.W. (2012) Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell*. **149**, 1393–1406.
 34. Wells J.N., Buschauer R., Mackens-Kiani T., Best K., Kratzat H., Berninghausen O., Becker T., Gilbert W., Cheng J., Beckmann R. (2020) Structure and function of yeast Lso2 and human CCDC124 bound to hibernating ribosomes. *PLoS Biol.* **18**(7), e3000780.

STUDY OF THE GUT TRANSCRIPTOMIC RESPONSE IN *Drosophila melanogaster* WITH KNOCKDOWN OF THE *Gagr*, DOMESTICATED *gag* GENE OF ERRANTIVIRUSES

M. L. Nikitina¹, P. A. Milyaeva¹, I. V. Kuzmin¹, L. N. Nefedova^{1, *}

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

*e-mail: nefedova@mail.bio.msu.ru

As a result of molecular domestication of the *gag* gene of errantiviruses, the *Gagr* gene was formed in the genome of *Drosophila melanogaster*. It has previously been shown that the *Gagr* gene is transcribed at the highest level in gut tissues relative to other tissues, and its transcription is most effectively induced in females in response to ammonium persulfate added to the diet. In the present work, the gut transcriptome of females with knockdown of the *Gagr* gene was studied in all tissues under standard conditions and under stress conditions caused by ammonium persulfate. It was revealed that in females with knockdown of the *Gagr* gene, the genes of antimicrobial peptides controlled by the Toll and Imd signaling pathways are activated in the gut. Induction of a stress response by ammonium persulfate revealed disruption of the JAK/STAT and JNK/MAPK signaling pathways and an almost complete absence of activation of the ER-stress and UPR-stress pathways in the *Gagr* gene mutant. The data obtained confirm the important role of the *Gagr* gene in maintaining the homeostasis and the immune response.

Keywords: domestication, retroelements, *gag*, *Drosophila*, stress response

УЧАСТИЕ БЕЛКОВ КОМПЛЕКСА CPSF В ПОЛИАДЕНИЛИРОВАНИИ ТРАНСКРИПТОВ, СЧИТЫВАЕМЫХ РНК-ПОЛИМЕРАЗой III С SINE

© 2024 г. И. Г. Устьянцев^{а, *}, О. Р. Бородулина^а, Д. А. Крамеров^{а, **}^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: ustian@mail.ru

**e-mail: kramеров@eimb.ru

Поступила в редакцию 19.10.2023 г.

После доработки 16.11.2023 г.

Принята к публикации 22.11.2023 г.

SINE — мобильные генетические элементы многоклеточных эукариот, возникавшие в ходе эволюции из различных тРНК, а также из 5S рРНК и 7SL РНК. Подобно генам этих РНК, SINE транскрибируются РНК-полимеразой III. Транскрипты некоторых SINE млекопитающих обладают уникальной для транскриптов РНК-полимеразы III способностью подвергаться AAUAAA-зависимому полиаденилированию. Несмотря на определенное сходство с каноническим полиаденилированием мРНК (транскриптов РНК-полимеразы II), эти процессы имеют, по-видимому, и существенные различия. В данной работе оценена важность белков комплекса CPSF, образованного субкомплексом mPSF и mCF и направляющего полиаденилирование мРНК, для полиаденилирования транскриптов SINE. В клетках HeLa при помощи siРНК проводили нокдаун компонентов CPSF, после чего клетки трансфицировали плазмидными конструкциями, содержащими SINE. Методом нозерн-гибридизации оценивали снижение эффективности полиаденилирования транскриптов SINE в результате нокдауна того или иного белка. Оказалось, что такие компоненты CPSF, как Wdr33 и CPSF30, вносят вклад в полиаденилирование транскриптов SINE, тогда как нокдаун CPSF100, CPSF73 и симплекина не снижает полиаденилирование этих транскриптов. Wdr33 и CPSF30, наряду с исследованными нами ранее CPSF160 и Fip1, входят в состав субкомплекса mPSF, ответственного за полиаденилирование мРНК. Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о важности всех белков mPSF для полиаденилирования транскриптов SINE. В то же время CPSF100, CPSF73 и симплекин, образующие субкомплекс mCF, ответственны за разрезание пре-мРНК, поэтому их неучастие в полиаденилировании транскриптов SINE представляется вполне естественным.

Ключевые слова: SINE, ретротранспозоны, некодирующие РНК, РНК-полимераза III, полиаденилирование, факторы полиаденилирования, нокдаун, млекопитающие

DOI: 10.31857/S0026898424030083, EDN: JCHEYF

ВВЕДЕНИЕ

Полиаденилирование — это процесс нематричного синтеза поли(А) на 3'-конце РНК. Существует несколько типов поли- или олигоаденилирования РНК. Наиболее важным в жизнедеятельности клетки и, как следствие, наиболее хорошо изученным

является каноническое полиаденилирование, которому подвергаются пре-мРНК и большинство других транскриптов, генерируемых РНК-полимеразой II (см. обзоры [1–4]). Оно также называется AAUAAA-зависимым, поскольку для него критически важен главный сигнал полиаденилирования (PAS), гексануклеотид AAUAAA (или, реже, один из его минорных вариантов) в 3'-нетранслируемой области пре-мРНК. Такое полиаденилирование осуществляется в ядре непосредственно после разрезания пре-мРНК в сайте, расположенном на 20–30 нуклеотидов ниже PAS. Вместе эти два события называются 3'-процессингом. Разрезание РНК приводит к замедлению транскрипции гена РНК-полимеразой II, а затем и к ее полной остановке [2]. Важную роль в описываемых событиях играет и сама РНК-полимераза II, так как с ее большой субъединицей связаны белковые факторы, осуществляющие 3'-процессинг. Основным белком, направляющим оба процесса, является

Сокращения: CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor) — фактор специфичности разрезания и полиаденилирования; mCF (mammalian Cleavage Factor) — фактор разрезания у млекопитающих; mPSF (mammalian Polyadenylation Specificity Factor) — фактор специфичности полиаденилирования у млекопитающих; CFIm (Cleavage Factor I mammalian) — фактор разрезания I у млекопитающих; CPE (Cytoplasmic Polyadenylation Element) — элемент цитоплазматического полиаденилирования; DSE (Downstream Sequence Element) — нижерасположенный элемент; USE — вышерасположенный элемент; PAS (Polyadenylation Signal) — сигнал полиаденилирования; SINE (Short Interspersed Elements) — короткие, рассеянные по геному элементы; siРНК — малая интерферирующая РНК.

мультисубъединичный комплекс CPSF [5]. В последнее время стало ясно, что этот комплекс подразделяется на два субкомплекса [6]. Первый, mCF, отвечает за разрезание пре-мРНК и состоит из трех субъединиц: симплекина (symplekin), CPSF73 и CPSF100. Второй, mPSF, способствует полиаденилированию и объединяет субъединицы CPSF160, CPSF30, Wdr33 и Fip1 [7]. Помимо CPSF, полиаденилирование и разрезание помогают осуществлять и другие факторы, все вместе объединяемые в комплекс 3'-процессинга. Это CStF, взаимодействующий с последовательностями, лежащими ниже сайта разрезания (DSE), наибольшая субъединица РНК-полимеразы II, а также CFIm и CFIIIm [5]. CFIm связывается с определенными последовательностями (USE), лежащими выше сайта разрезания и PAS, и наряду с mPSF способствует полиаденилированию [8]. Нужно отметить, что USE играют роль вспомогательного элемента и имеются только у половины мРНК человека [9]. Вместе CFIm и mPSF обеспечивают работу ключевого компонента комплекса 3'-процессинга, поли(А)-полимеразы, позволяя ей осуществлять процессивный синтез поли(А)-хвоста на 3'-конце свежеразрезанной пре-мРНК [2].

Значение канонического полиаденилирования заключается в увеличении времени жизни мРНК в клетке; кроме того, поли(А)-хвост способствует экспорту мРНК из ядра, а также циклизации мРНК при трансляции, обеспечивая ее реинициацию [5, 10]. Длина поли(А)-хвоста служит регуляторным механизмом, причем, как это ни странно, более длинные (свыше 100 остатков) хвосты представлены у более редких и короткоживущих мРНК [11]. Помимо канонического, существуют и другие виды полиаденилирования. Ближе всего к каноническому стоит, вероятно, полиаденилирование с участием особой поли(А)-полимеразы STAR-PAP вместо обычных. Этот тип полиаденилирования примечателен иным нуклеотидным составом USE и DSE, а также отсутствием участия в нем комплекса CFIm. Его проходят мРНК, транскрибируемые с генов, связанных с ответом на окислительный стресс и апоптозом [12, 13]. Цитоплазматическое полиаденилирование — еще один тип неканонического полиаденилирования. мРНК, претерпевающие его, сначала деаденилируются, а затем запасаются в таком виде в цитоплазме. Для повторного полиаденилирования, т.е. для подготовки этих мРНК к трансляции, привлекается белок CREB, связывающий последовательность CRE. Поли(А)-полимераза в данном случае также особая, неканоническая — RAPD4. Тем не менее для цитоплазматического полиаденилирования требуется комплекс CPSF и, возможно, CFIm [14, 15].

В описанных процессах так или иначе участвуют транскрипты РНК-полимеразы II, прежде всего мРНК (однако многие длинные некодирующие РНК, синтезируемые этой полимеразой, также

полиаденилируются). В большинстве своем перечисленные типы полиаденилирования направлены на продление времени жизни транскрипта в клетке. Для транскриптов других РНК-полимераз известны другие типы полиаденилирования (обычно олигоаденилирования), приводящие, напротив, к деградации транскриптов [1, 16]. В нашей лаборатории описан еще один неканонический тип полиаденилирования, которому подвергаются РНК, синтезируемые не РНК-полимеразой II, а РНК-полимеразой III. Речь идет о транскриптах некоторых SINE млекопитающих [17].

SINE — это небольшие (сотни нуклеотидов) мобильные генетические элементы, не кодирующие собственные белки [18]. SINE называют также короткими ретропозонами, так как их жизненный цикл включает стадию РНК. РНК SINE подвергается обратной транскрипции, которая осуществляется ферментом, закодированным в одном из мобильных генетических элементов класса LINE. Синтезированная таким образом ДНК оказывается встроенной в новый сайт генома. Транскрипты всех разновидностей SINE синтезируются РНК-полимеразой III, поскольку SINE происходят от коротких клеточных РНК, также транскрибируемых полимеразой III, — тРНК, 5S рРНК или 7SL РНК. Сходство с этими РНК прослеживается в 5'-концевой части SINE, называемой головой. Эта часть несет внутренний промотор РНК-полимеразы III, соответствующий типу клеточной РНК, который дал начало данному семейству SINE. Происходящий от тРНК или от 7SL РНК промотор состоит из двух боксов (А и В), разделенных последовательностью длиной 30–40 п.н. За головой SINE следует его тело — последовательность, специфичная для каждого семейства SINE, а затем А-богатый хвост. Большое количество остатков А в хвосте SINE необходимо для взаимодействия РНК с обратной транскриптазой LINE-партнера, L1, и тем самым для успешной ретропозиции.

SINE присущи большинству высших эукариот и часто составляют заметную долю их геномов — они содержат сотни тысяч копий этих мобильных элементов. Большое разнообразие SINE наблюдается у млекопитающих — распространение одного семейства SINE во многих случаях ограничивается одним отрядом млекопитающих [19, 20]. Наиболее известен и хорошо изучен SINE Alu, происходящий от 7SL рРНК, характерный для приматов, включая человека [21]. Однако большинство SINE млекопитающих происходят от тРНК. Среди таких SINE есть особая группа, примечательная строением хвостовой части. В этой части SINE содержится один или несколько гексануклеотидов AATAAA (т.е. PAS), а также терминатор транскрипции РНК-полимеразы III — последовательность, содержащая более трех остатков Т подряд. Эти особенности позволяют выделить подобные SINE в особый

класс T^+ (семейства таких SINE возникли независимо друг от друга, как и большинство SINE в целом). Другие SINE причисляются к классу T^- ; терминация транскрипции последних происходит на случайных олиго(T) в 3'-фланкирующих последовательностях [22]. Уникальной особенностью T^+ SINE, описанной в нашей лаборатории, является их способность полиаденилироваться AAUAAA-зависимым путем подобно пре-мРНК. В ранних опытах нами показано, что инактивация PAS путем замены T на C (AACAAA) приводит к прекращению полиаденилирования транскриптов SINE. На нозерн-блоте это проявлялось в исчезновении гетерогенной по длине фракции, расположенной выше полосы, соответствующей неполиаденилированному транскрипту SINE [17]. Полиаденилирование транскриптов SINE существенно удлиняет время жизни этих РНК в клетках [17, 23, 24]. Кроме того, наличие длинного поли(А)-хвоста у транскриптов SINE играет, видимо, решающую роль в их обратной транскрипции ферментом, кодируемым LINE-1 [21, 25–27].

Мы установили, что гексануклеотид AAUAAA необходим, но не достаточен для полиаденилирования транскриптов SINE. Кроме него требуются две вспомогательные последовательности (аналоги USE): район β , лежащий ниже бокса В промотора, и район τ , предшествующий А-богату хвосту. Инактивация одной из этих последовательностей в различных T^+ SINE посредством протяженных замен или делеций ослабляла полиаденилирование транскриптов, а обеих сразу — почти полностью прекращала его; удаление других участков SINE практически не влияло на эффективность полиаденилирования [24, 28]. Для более тщательного исследования мы выбрали два T^+ SINE — B2 из генома мыши и Ves из генома летучей мыши — с несхожими районами β и τ , и в результате идентифицировали β - и τ -сигналы, т.е. участки β - и τ -районов, непосредственно обеспечивающие полиаденилирование транскриптов этих SINE [29]. Кроме того, в отдельных опытах также использовали T^+ SINE Ege из генома лошади [28]. В B2 β -сигнал представлен последовательностью ACCACATgg, в Ves — caaGGGCATGTa, а τ -сигнал в B2 — GCTACagTGTACTTACAT (заглавными жирными буквами выделены наиболее важные для функции сигналов нуклеотиды, строчными буквами — наименее важные). У Ves τ -сигнал представлен полипиримидиновой последовательностью длиной около 50 п.н; в нескольких других семействах T^+ SINE район τ также образован длинным полипиримидиновым мотивом [28]. Предлагается, что с β - и τ -сигналами в транскриптах SINE связываются гипотетические белки X и Y, способствуя рекрутированию полиаденилирующего комплекса [28]. При помощи нокдауна мы выяснили, что τ -сигнал в транскрипте B2 способствует полиаденилированию благодаря взаимодействию

с белком CFIm25 [29]. Сайтом связывания CFIm25 в пре-мРНК является последовательность UGUAN ($N = A > U > G, C$) [8], присутствующая и в составе τ -сигнала B2. Другими словами, в случае B2 функцию белка Y выполняет CFIm-25, видимо, находящийся в комплексе с другой субъединицей, CFIm68. Используя нокдаун, мы также показали, что поли(А)-полимераза PAP (α или γ), как и компоненты комплекса CPSF — белки Fip1 и CPSF160, критически важны для полиаденилирования транскриптов Ves и B2 [29]. В представленной работе мы исследовали влияние нокдауна остальных компонентов комплекса CPSF, в том числе субкомплекса mCF, отвечающего за разрезание молекул пре-мРНК, на полиаденилирование транскриптов SINE. Кроме того, мы попытались выяснить, не участвуют ли в полиаденилировании, подобно CFIm25, несколько белков, потенциально способных взаимодействовать с β - или τ -сигналами определенного типа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазмидные конструкции. Все использованные в работе конструкции клонированы в плазмиде pGEM-T и описаны нами ранее. В качестве обозначений конструкций с SINE класса T^+ (Ves, B2 и Ege) дикого типа [17, 28] использованы названия SINE с буквой T на конце, например Ves-T. Кроме того, тестировали конструкции SINE Ves и B2 с удаленными из них районами β и τ (Ves- $\Delta\beta$, Ves- $\Delta\tau$, B2- $\Delta\beta$ и B2- $\Delta\tau$). Они описаны в [29] (третья) и [28] (остальные) соответственно, как Ves- $\Delta 7intb$, Ves- $\Delta 52$, B2- $\Delta 12$ и B2-30_45. В качестве B2, лишённого района β , использовали химерный SINE Sor/B2, также описанный в [28] и представляющий собой SINE Sor (класс T^-) из генома землеройки с присоединенной к нему 3'-концевой частью B2, содержащей район τ , PAS и терминатор транскрипции. Нуклеотидные последовательности всех конструкций на основе B2, Ves и Sor представлены на рис. S1 в Дополнительных материалах, см. на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/3/supp_Ustyantsev_rus.pdf. Плазмидные ДНК для трансфекции клеток выделяли с помощью набора Plasmid Midi Kit ("Qiagen", Германия).

Культивирование клеток, нокдаун, трансфекция, выделение РНК и белков. Клетки HeLa растили на чашках Петри ($d = 60$ мм) в 5 мл среды DMEM с 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS) до плотности покрытия 50–60%. К 5.8 мкл раствора siРНК против исследуемого белка (приобретены у "Santa Cruz Biotechnology", США; табл. S1 Дополнительных материалов) либо к контрольной siРНК (не подавляющей экспрессию клеточных белков, далее обозначены как Контроль, К) с концентрацией 10 мкМ добавляли 300 мкл среды OptiMem. К 17.5 мкл реагента Lipofectamine RNAiMax ("Thermo Fisher Scientific", США) также

добавляли 300 мкл среды OptiMem, после чего два полученных раствора объединяли и инкубировали в течение 5 мин. Полученную смесь добавляли в чашки с клетками. Кроме того, к части чашек не добавляли никаких реактивов (далее – “без siРНК”; необходимо подчеркнуть, что липофектамин в эти чашки также не добавляли). По мере достижения клетками покрытия, близкого к 100%, рассевали каждую чашку на две. Через 3 суток клетки с двух чашек с каждой siРНК лизировали для анализа белков с помощью Вестерн-блоттинга. (Эти процедуры подробно описаны ранее [29]; антитела ко всем изучаемым белкам приобретены у “Santa Cruz Biotechnology”, см. табл. S2 в Дополнительных материалах). Оставшиеся чашки в тот же день трансфицировали плазмидами с той или иной конструкцией SINE с помощью реактива TurboFect согласно протоколу производителя (“Thermo Fisher Scientific”). Для трансфекции клеток на одной чашке использовали 5 мкг плазмиды, несущей SINE, и 10 мкл TurboFect. Спустя сутки, используя гуанидинотиоцианатный метод [30], выделяли суммарную клеточную РНК, которую очищали от следов ДНК, обрабатывая ее ДНКазой I [28, 29].

Нозерн-блот-анализ. Клеточную РНК (10 мкг) подвергали электрофорезу в 6%-ном ПААГ с 7 М мочевиной и переносили на нейлоновую мембрану (“GVS”, Италия) с помощью полусухого электроблоттинга. Мечение гибридационных зондов для детекции транскриптов SINE осуществляли с помощью ПЦР в присутствии $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ (“Фосфор”, Россия), как описано ранее [28]. Мембрану с иммобилизованной РНК инкубировали с зондом в гибридационном растворе при 42°C в течение ночи, после чего отмывали при 42°C в течение 1 ч согласно [17, 28]. Для получения изображения и количественной оценки радиоактивности гибридационных сигналов мембрану сканировали в фосфоимиджере (Image Analyzer Typhoon FLA 9000, “GE Healthcare Biosciences”, Швеция). Распределение радиоактивных сигналов рассчитывали при помощи программы OptiQuant 3.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе использовали ранее клонированные в плазмидах SINE Ves, B2 и Ege (из генома лошади) дикого типа, а также варианты Ves и B2 с инактивированными сигналами β и τ . В качестве B2 без района β использовали также гибридный SINE Sor/B2, представляющий собой T⁻ SINE Sor, к которому присоединена 3'-часть B2 с районом τ , PAS и терминатором. Клетки человека HeLa трансфицировали siРНК против одного из исследуемых белков, либо siРНК, не подавляющей экспрессию никаких белков (“Контроль”), либо оставляли нетрансфицированными (без siРНК на рисунках). Через 3 суток часть клеток лизировали для анализа белков, а остальные трансфицировали

упомянутыми плазмидами с различными вариантами SINE и еще через сутки выделяли клеточную РНК, которую разделяли в ПААГ и проводили нозерн-гибридизацию с радиоактивно меченным зондом, комплементарным последовательности того или иного SINE. Результаты вестерн-блоттингов и количественная оценка эффективности нокдауна белков представлены на рис. 1. Радиоавтографы, полученные в результате нозерн-гибридизации, приведены на рис. 2. На каждой из дорожек видна полоса, соответствующая первичному неполиаденилированному транскрипту SINE, а выше – гетерогенные по длине РНК, представляющие собой полиаденилированные транскрипты SINE. Отношение интенсивности измеряемого при помощи фосфоимиджера радиоактивного сигнала полиаденилированных транскриптов к суммарной интенсивности полиаденилированных и неполиаденилированных транскриптов отражает эффективность полиаденилирования. Если нокдаун какого-либо белка влияет на эту эффективность, то должно наблюдаться значимое снижение доли полиаденилированных транскриптов.

Диаграммы на рис. 3 показывают количественные оценки влияния нокдауна белков на полиаденилирование транскриптов SINE. Нокдаун CPSF30 и Wdr33 приводил приблизительно к двукратному по сравнению с контролем снижению эффективности полиаденилирования транскриптов конструкций на основе SINE B2 или Ves (рис. 3а). Таким образом, белки CPSF30 и Wdr33, как и два других (CPSF160 и Fip1) тестируемых нами ранее компонента субкомплекса mPSF [29], необходимы для полиаденилирования транскриптов SINE, генерируемых РНК-полимеразой III. Отметим, что именно CPSF30 и Wdr33 непосредственно взаимодействуют с AAUAAA в молекулах мРНК [31, 32].

Менее вероятным представляется участие в полиаденилировании транскриптов SINE компонентов субкомплекса mCF. Несмотря на то, что его активность связана с разрезанием мРНК, а не с ее полиаденилированием, независимая от mCF работа mPSF в клетках пока не была описана [6]. Нами обнаружено, что нокдаун ни одного из компонентов mCF (CPSF100, CPSF73 и симплекина) не снижает значимо уровень полиаденилирования транскриптов исследованных вариантов SINE (рис. 2 и 3б). Таким образом, показано, что субкомплекс mCF не участвует в полиаденилировании транскриптов SINE, синтезируемых РНК-полимеразой III. Один из результатов описанного опыта был неожиданным и даже “аномальным”: при нокдауне CPSF73 наблюдалось существенное и статистически значимое повышение уровня полиаденилирования транскриптов SINE B2, лишенных района τ (рис. 3б, конструкция B2- $\Delta\tau$). Видимо, здесь имеет место какой-то не прямой эффект нокдауна

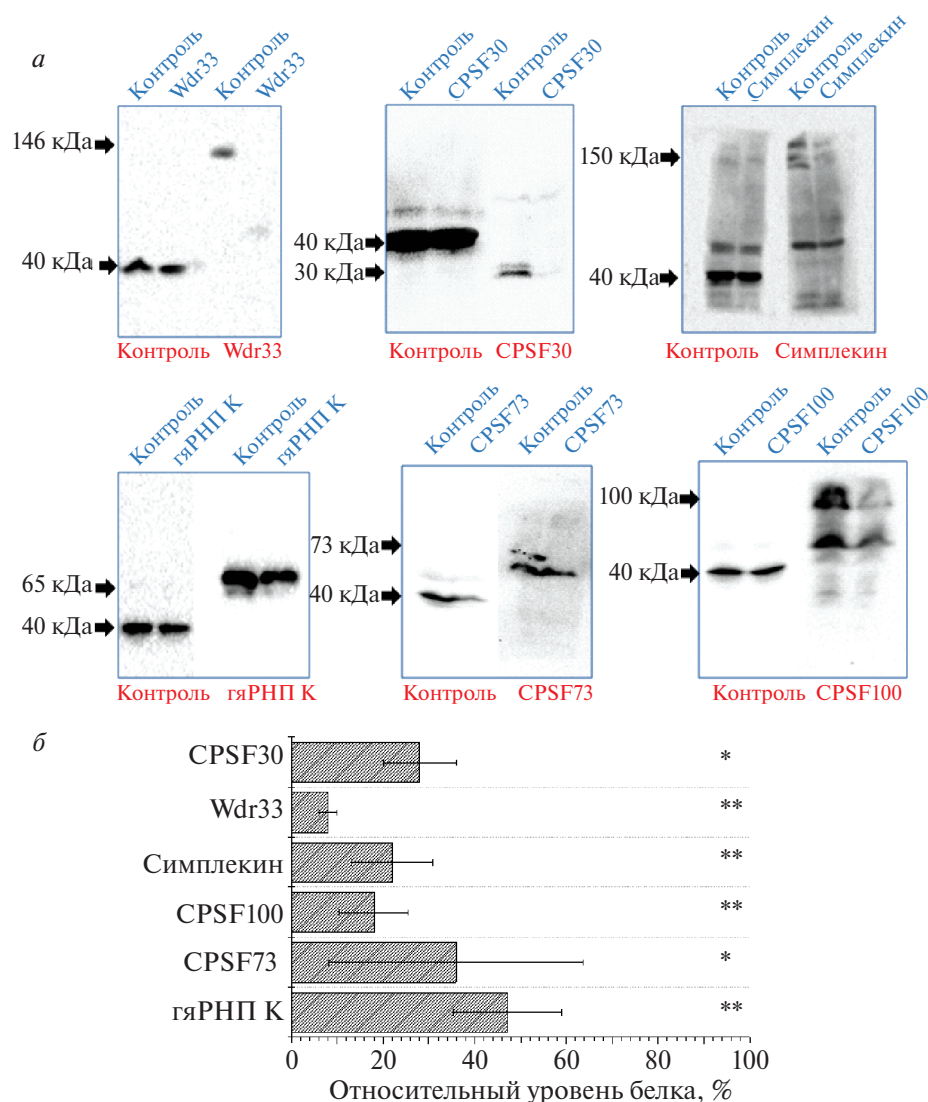


Рис. 1. Снижение уровня экспрессии белков в результате их нокдауна. *а* — Детекция белков с помощью вестерн-блоттинга. Над дорожками указаны siРНК, которыми обрабатывали клетки HeLa. Снизу приведены названия детектируемых белков: слева — контрольный белок гяРНП Е2 с массой 40 кДа, справа — белок, подвергаемый нокдауну. *б* — Снижение уровня белка в клетках, обработанных специфическими siРНК относительно его уровня в клетках, обработанных контрольной siРНК (сделана поправка на экспрессию контрольного белка, гяРНП Е2, в обоих образцах). Проведено не менее трех опытов с нокдауном каждого из белков, показано стандартное отклонение; * и ** — $p < 0.05$ и < 0.01 соответственно (t -критерий).

CPSF73. К сожалению, внутренне непротиворечивой гипотезы, объясняющей этот результат, нам найти не удалось.

Варианты 3'-процессинга, в которые mPSF вовлечен без участия mCF, ранее не были описаны; это указывает на уникальность изучаемого нами явления — полиаденилирования транскриптов РНК-полимеразы III. При этом известен обратный пример: mCF без участия mPSF осуществляет 3'-процессинг гистоновых пре-мРНК, которые, как известно, не полиаденилируются [33]. В таблице 1 рассмотрены некоторые процессы, в которых принимают участие те или иные факторы 3'-процессинга. Видно, что полиаденилирование транскриптов SINE,

возможно, более других напоминает канонический процесс, а его своеобразие заключается в том, что в него не вовлечен субкомплекс mCF.

В последней части работы мы попытались обнаружить гипотетические белки X и Y, которые могли бы, взаимодействуя с β - или τ -сигналами транскриптов SINE, стимулировать их полиаденилирование. Планировалось использовать подход, который позволил нам выявить участие CFIm25 в полиаденилировании транскриптов SINE B2: сначала мы обнаружили сайт узнавания этого белка (UGUA) в его τ -районе [28], а затем с помощью нокдауна CFIm25 показали снижение уровня полиаденилирования транскриптов B2 [29].

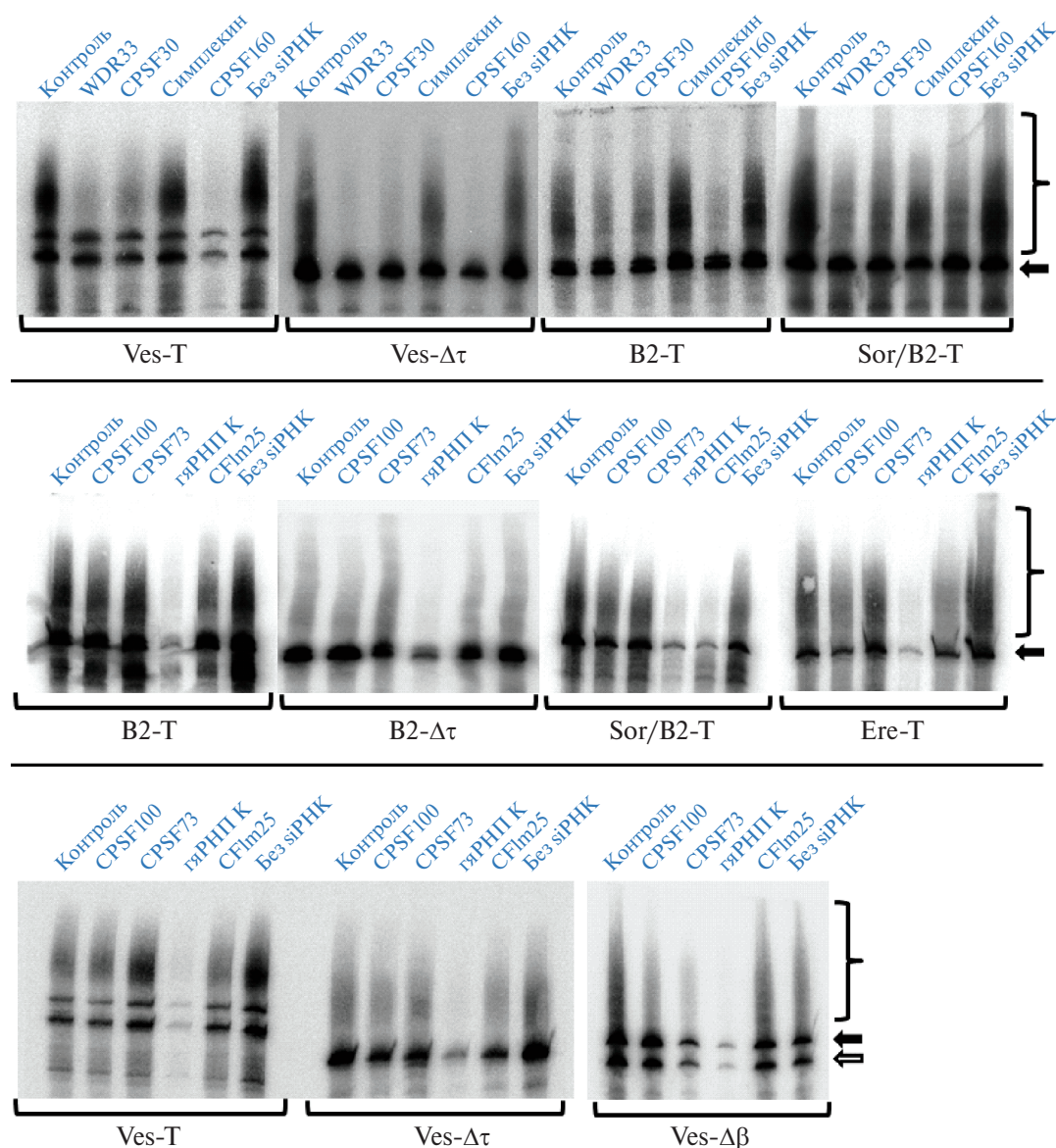


Рис. 2. Влияние нокдауна белков на полиаденилирование транскриптов SINE. Нозерн-блот-анализ РНК, выделенных из клеток HeLa, обработанных сначала siРНК (над дорожками указано, какими именно: контрольными (“Контроль”), против CPSF30, Wdr33, симплекина, CPSF100, CPSF73, гЯРНП К, CFIm25, CPSF160 или оставшихся необработанными (“Без siРНК”) в течение 72 ч, а затем трансфицированных различными конструкциями на основе SINE Ves, B2 или Ere (их названия указаны под сериями дорожек). Нокдаун CPSF160 или CFIm25 проведен в качестве положительного контроля на снижение полиаденилирования транскриптов. Черными стрелками помечены первичные транскрипты, а фигурными скобками – полиаденилированные транскрипты; белая стрелка указывает на характерный для Ves укороченный транскрипт, образующийся вследствие терминации транскрипции на неоптимальном терминаторе и не способный к полиаденилированию. Одна из дорожек на правом нижнем блоке – гЯРНП К (48) – соответствует опыту, в котором трансфекция плазмидами проведена спустя 48 ч после начала обработки клеток siРНК к гЯРНП К. Время обработки сокращено с целью уменьшения цитотоксического действия данных siРНК.

Мы воспользовались масштабным исследованием, в котором получены данные о сайтах узнавания большого числа РНК-связывающих белков [34]. Были отобраны несколько белков, чьи сайты узнавания (указаны в скобках) напоминали β - или τ -сигналы: гЯРНП L и гЯРНП К (AC-богатые последовательности, схожие с частью β -сигнала B2),

гЯРНП E1 и гЯРНП E2 (полипиримидиновые мотивы, достаточно сходные с τ -районом Ves) и RbFox1 (GCAUG, часть β -сигнала Ves). Отметим, что, в отличие от CFIm25, не описано участие ни одного из этих пяти белков в каких-либо видах полиаденилирования РНК. К сожалению, большинство опытов по обработке клеток специфичными siРНК

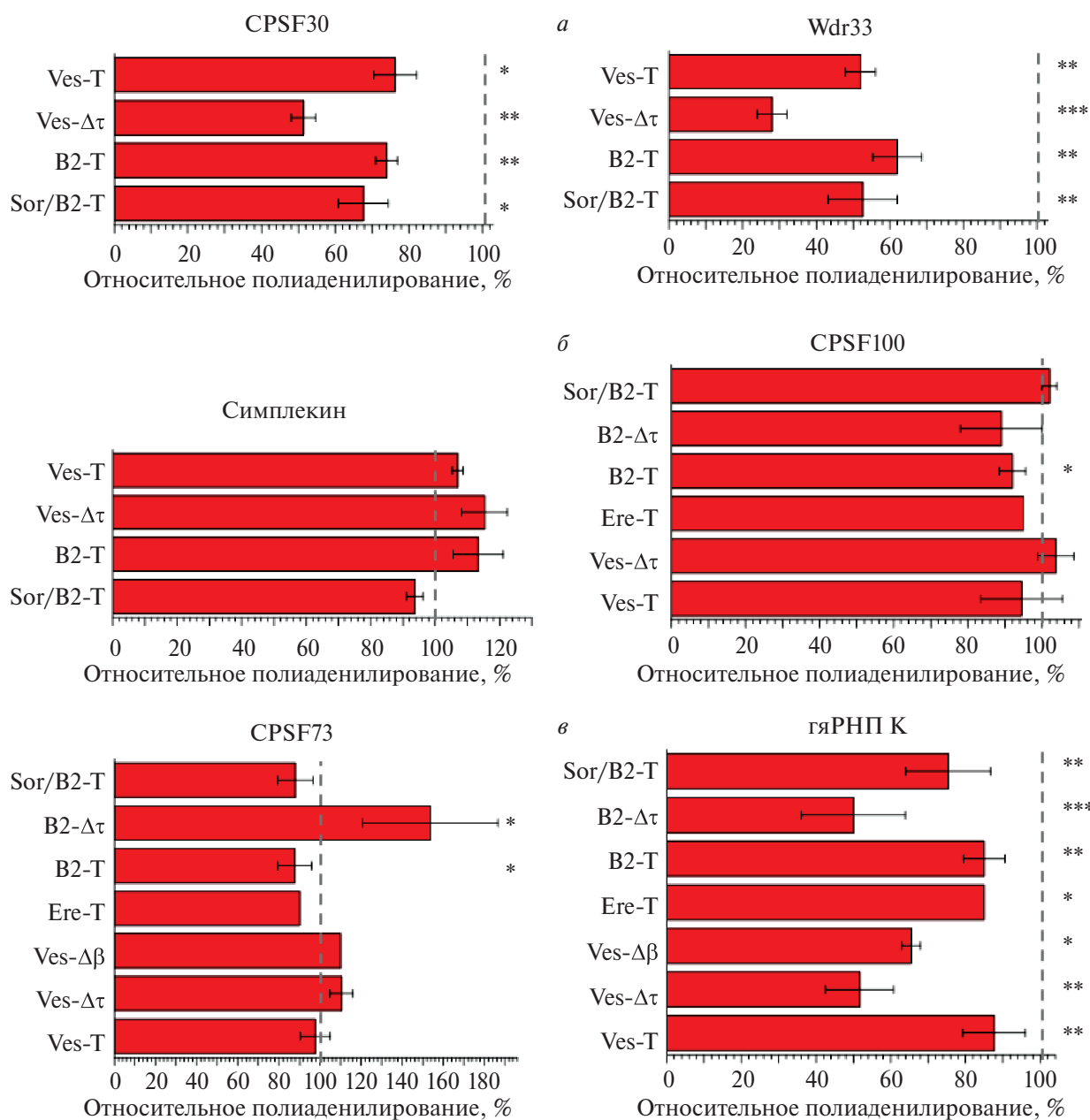


Рис. 3. Диаграммы, иллюстрирующие количественное влияние нокдауна различных белков на полиаденилирование транскриптов конструкций SINE B2, Ves и Ere, содержащих только τ -сигнал ($-\Delta\beta$), только β -сигнал ($-\Delta\tau$) или оба сигнала ($-T$, дикий тип). Показан средний уровень полиаденилирования транскриптов каждой конструкции (названия указаны слева от диаграммы) в клетках, трансфицированных специфическими siРНК, относительно уровня полиаденилирования в клетках, обработанных контрольной siРНК (этот уровень принят за 100% и отмечен вертикальной пунктирной линией). Стандартное отклонение получено по результатам трех опытов; *, ** и *** — $p < 0.05$, < 0.01 и < 0.001 соответственно (t -критерий). **а** — Компоненты субкомплекса mPSF: CPSF30 и Wdr33. **б** — Компоненты субкомплекса mCF: симплектин, CPSF100 и CPSF73. **в** — Белок гЯРНК К.

оказались неудачными — либо не был достигнут достаточно эффективный нокдаун белков, либо, напротив, нокдаун вызывал столь сильное подавление роста и деления клеток, что дальнейшая работа (трансфекция плазмидами) становилась практически невыполнимой. По схожим причинам мы не смогли протестировать большую субъединицу

субкомплекса CFIm, CFIm68, в нашем предыдущем исследовании [29].

Исключением оказался белок гЯРНК К — его нокдаун ухудшал рост клеток, хотя и существенно, но в допустимых пределах. Проведено несколько опытов, позволивших получить статистически значимые результаты (рис. 2 и рис. 3в). Наибольший

Таблица 1. Сравнение некоторых типов полиаденилирования и/или 3'-процессинга мРНК (пре-мРНК), включая канонические, с полиаденилированием транскриптов T⁺ SINE, синтезируемых РНК-полимеразой III

3'-Процессинг и/или полиаденилирование	РНК-полимераза, осуществляющая транскрипцию	Сопряженность с транскрипцией	Участие белковых факторов			
			РАР α и γ	CFIm	mPSF	mCF
Канонические полиаденилирование и 3'-процессинг пре-мРНК	II	Да	Да	Да	Да	Да
Полиаденилирование пре-мРНК с участием STAR-РАР	II	Да	Нет	Нет	Да	Да
3'-Процессинг пре-мРНК гистонов	II	Да	Нет	Нет	Нет	Да
Цитоплазматическое полиаденилирование мРНК	Нет	Нет (после транскрипции)	Нет ¹	Воз-можно	Да	Да
Полиаденилирование транскриптов T ⁺ SINE	III	Видимо, нет (после транскрипции)	Да	Да ²	Да	Нет

¹Цитоплазматическое полиаденилирование осуществляется ферментом PAPD4.

²Верно для B2 и, возможно, для некоторых других T⁺ SINE.

спад полиаденилирования (до ~50% от контро-ля) наблюдался для конструкций SINE, в которых имеется сигнал β, но отсутствует район τ — как в случае Ves, так и в случае B2. Меньшим был спад, до 65–75%, в случае конструкций SINE, лишен-ных района β: Ves-Δβ и Sor/B2. Наконец, нокда-ун гяРНП К слабо влиял на полиаденилирование

транскриптов SINE дикого типа (Ves, B2, а также Ere), которое составило около 90% от контроля. Исходно мы ожидали, что нокдаун гяРНП К вы-зовет наиболее существенное падение полиадени-лирования транскриптов конструкций B2, несущих только β-сигнал, так как именно он обладает опре-деленным сходством с сайтом узнавания гяРНП К.

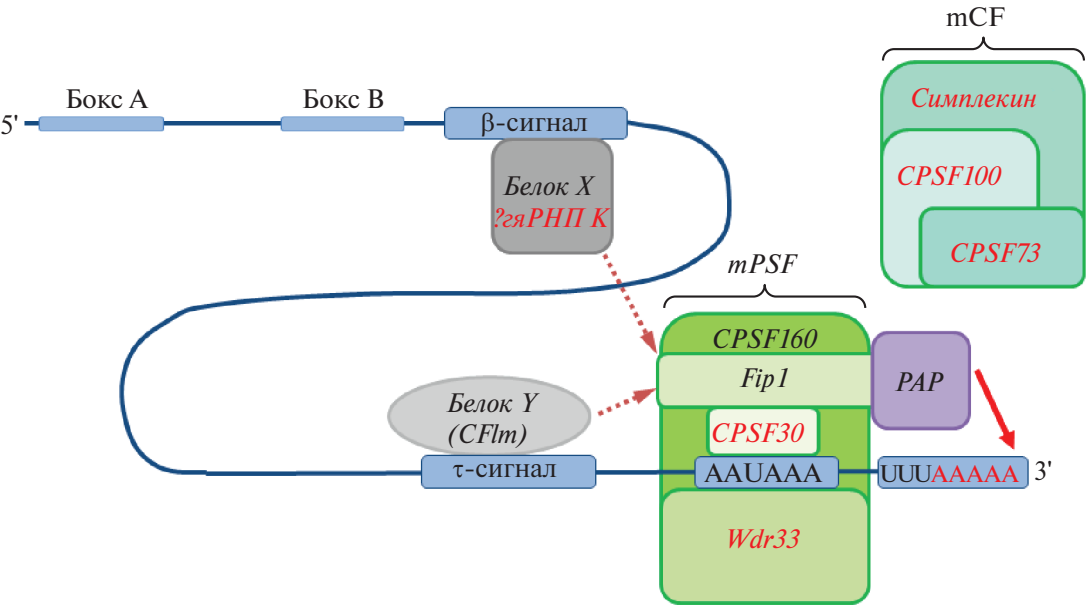


Рис. 4. Схема полиаденилирования транскрипта SINE, синтезированного РНК-полимеразой III. Названия бел-ков даны курсивом: черным показаны белки, нокдаун которых проведен в нашем предыдущем исследовании [29], красным — белки, экспрессия которых подавлялась в данном исследовании. Субкомплекс mPSF комплекса CPSF взаимодействует с сигналом полиаденилирования AAUAAA за счет субъединиц Wdr33 и CPSF30. Белок Y (CFIm25 в случае SINE B2) связывается с τ-сигналом, стимулируя полиаденилирование, осуществляемое поли(А)-полиме-разой (РАР). Предполагается, что гипотетический белок X, связавшись с β-сигналом, также стимулирует полиаде-нилирование; в случае B2, а также Ves, этим белком может быть гяРНП К. Субкомплекс mCF, ответственный за разрезание пре-мРНК, в полиаденилировании транскрипта SINE не участвует.

Однако снижение полиаденилирования под воздействием нокдауна оказалось более распространенным — оно проявлялось и на B2 без β -сигнала (конструкция Sor/B2-T), и особенно на конструкциях Ves, несущих лишь один из сигналов (Ves- $\Delta\beta$ и Ves- $\Delta\tau$). Таким образом, гЯРНП К может влиять на полиаденилирование транскриптов SINE, но, вероятно, несколько иным образом, чем мы первоначально представляли, поэтому окончательные выводы из полученных результатов пока сделать трудно. гЯРНП К вовлечен во многие процессы в клеточном ядре, поскольку он ассоциирован с пре-мРНК и выполняет функцию стыковочной платформы (а docking platform), собирающей сигналы метаболических путей белков и нуклеиновых кислот [35, 36]. При столь широком объеме функций гЯРНП К легко представить, что его нокдаун каким-то образом косвенно влияет и на полиаденилирование транскриптов SINE.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На рис. 4 итог наших исследований представлен в виде схемы, иллюстрирующей полиаденилирование транскриптов SINE класса T⁺. Субкомплекс mPSF в полном составе (Wdr33, CPSF30, CPSF160 и Fip1) участвует в полиаденилировании, связываясь с последовательностью AAUAAA в хвосте транскрипта SINE и обеспечивая работу поли(А)-полимеразы. Субкомплекс mCF (симплектин, CPSF100 и CPSF73) не участвует в полиаденилировании транскрипта SINE. Вспомогательные белки X и Y связываются с сигналами β и τ и взаимодействуют с mPSF, стимулируя его работу. В случае SINE B2 белком Y является CFIm, тогда как природа белка X остается неясной, но вполне возможно, что это гЯРНП К — как для транскриптов B2, так и Ves. Выявление белков-кандидатов, способных взаимодействовать с β - и τ -сигналами транскриптов SINE, и последующая проверка их с помощью нокдауна представляет собой сложную задачу, если только нет очевидных аналогий с полиаденилированием мРНК, как в случае CFIm25 и его сайта связывания UGUA. Скорее всего, для окончательного решения таких задач потребуется использование иных методов, дополняющих нокдаун белков. Однако в любом случае, результаты этого исследования заметно углубляют наши представления о полиаденилировании транскриптов SINE, синтезируемых РНК-полимеразой III, и еще раз демонстрируют уникальность данного процесса на фоне других вариантов полиаденилирования РНК.

Авторы благодарны Д.В. Стасенко за техническую помощь.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 19-14-00327).

В данной работе отсутствуют исследования, выполненные с использованием человека или животных.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Устьянцев И.Г., Голубчикова Ю.С., Бородулина О.Р., Крамеров Д.А. (2017) Каноническое и неканоническое полиаденилирование РНК. *Молекуляр. биология*. **51**, 262–273. doi: 10.1134/S0026893317010186
2. Sun Y., Hamilton K., Tong L. (2020) Recent molecular insights into canonical pre-mRNA 3'-end processing. *Transcription*. **11**, 83–96.
3. Liu J., Lu X., Zhang S., Yuan L., Sun Y. (2022) Molecular insights into mRNA polyadenylation and deadenylation. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 10985.
4. Boreikaite V., Passmore L.A. (2023) 3'-End processing of eukaryotic mRNA: machinery, regulation, and impact on gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* **92**, 199–225.
5. Proudfoot N.J. (2011) Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes Dev.* **25**, 1770–1782.
6. Gutierrez P.A., Wei J., Sun Y., Tong L. (2022) Molecular basis for the recognition of the AUUAAA polyadenylation signal by mPSF. *RNA*. **28**, 1534–1541.
7. Zhang Y., Sun Y., Shi Y., Walz T., Tong L. (2020) Structural insights into the human pre-mRNA 3'-end processing machinery. *Mol. Cell*. **77**, 800–809.e806.
8. Yang Q., Gilmartin G.M., Doublié S. (2010) Structural basis of UGUA recognition by the Nudix protein CFI(m)25 and implications for a regulatory role in mRNA 3' processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 10062–10067.
9. Zhu Y., Wang X., Forouzmand E., Jeong J., Qiao F., Sowd G.A., Engelman A.N., Xie X., Hertel K.J., Shi Y. (2018) Molecular mechanisms for CFIm-mediated regulation of mRNA alternative polyadenylation. *Mol. Cell*. **69**, 62–74.e64.
10. Sachs A., Wahle E. (1993) Poly(A) tail metabolism and function in eucaryotes. *J. Biol. Chem.* **268**, 22955–22958.
11. Nicholson A.L., Pasquinelli A.E. (2019) Tales of detailed poly(A) tails. *Trends Cell Biol.* **29**, 191–200.
12. Neve J., Patel R., Wang Z., Louey A., Furger A.M. (2017) Cleavage and polyadenylation: ending the message expands gene regulation. *RNA Biol.* **14**, 865–890.
13. Laishram R.S. (2014) Poly(A) polymerase (PAP) diversity in gene expression — star-PAP vs canonical PAP. *FEBS Lett.* **588**, 2185–2197.
14. Charlesworth A., Meijer H.A., de Moor C.H. (2013) Specificity factors in cytoplasmic polyadenylation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. **4**, 437–461.
15. Norbury C.J. (2013) Cytoplasmic RNA: a case of the tail wagging the dog. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 643–653.
16. Татосян К.А., Устьянцев И.Г., Крамеров Д.А. (2020) Дегградация РНК в эукариотических клетках. *Молекуляр. биология*. **54**, 542–561. doi: 10.1134/S0026893320040159

17. Borodulina O.R., Kramerov D.A. (2008) Transcripts synthesized by RNA polymerase III can be polyadenylated in an AAUAAA-dependent manner. *RNA*. **14**, 1865–1873.
18. Kramerov D.A., Vassetzky N.S. (2011) SINEs. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. **2**, 772–786.
19. Kramerov D.A., Vassetzky N.S. (2011) Origin and evolution of SINEs in eukaryotic genomes. *Heredity*. (Edinb). **107**, 487–495.
20. Vassetzky N.S., Kramerov D.A. (2013) SINEBase: a database and tool for SINE analysis. *Nucl. Acids Res.* **41**, D83–D89.
21. Deininger P. (2011) Alu elements: know the SINEs. *Genome Biol.* **12**, 236.
22. Borodulina O.R., Kramerov D.A. (2001) Short interspersed elements (SINEs) from insectivores. Two classes of mammalian SINEs distinguished by A-rich tail structure. *Mamm. Genome*. **12**, 779–786.
23. Устьянцев И.Г., Татосян К.А., Стасенко Д.В., Кочанова Н.Ю., Бородулина О.Р., Крамеров Д.А. (2017) Полиаденилирование транскриптов, считываемых РНК-полимеразой III с SINE, значительно удлиняет время их жизни в клетке. *Молекуляр. биология*. **54**, 78–86. doi: 10.1134/S0026893319040150
24. Borodulina O.R., Ustyantsev I.G., Kramerov D.A. (2023) SINEs as potential expression cassettes: impact of deletions and insertions on polyadenylation and lifetime of B2 and Ves SINE transcripts generated by RNA polymerase III. *Int. J. Mol. Sci.* **24**(19), 14600.
25. Dewannieux M., Heidmann T. (2005) Role of poly(A) tail length in Alu retrotransposition. *Genomics*. **86**, 378–381.
26. 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.
27. Kosushkin S.A., Ustyantsev I.G., Borodulina O.R., Vassetzky N.S., Kramerov D.A. (2022) Tail wags dog's SINE: retropositional mechanisms of can SINE depend on its a-tail structure. *Biology* (Basel). **11**(10), 1403.
28. Borodulina O.R., Golubchikova J.S., Ustyantsev I.G., Kramerov D.A. (2016) Polyadenylation of RNA transcribed from mammalian SINEs by RNA polymerase III: complex requirements for nucleotide sequences. *Biochim. Biophys. Acta*. **1859**, 355–365.
29. Ustyantsev I.G., Borodulina O.R., Kramerov D.A. (2021) Identification of nucleotide sequences and some proteins involved in polyadenylation of RNA transcribed by Pol III from SINEs. *RNA Biol.* **18**, 1475–1488.
30. Chomczynski P., Sacchi N. (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* **1**, 581–585.
31. Clerici M., Faini M., Muckenfuss L.M., Aebersold R., Jinek M. (2018) Structural basis of AAUAAA polyadenylation signal recognition by the human CPSF complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **25**, 135–138.
32. Sun Y., Zhang Y., Hamilton K., Manley J.L., Shi Y., Walz T., Tong L. (2018) Molecular basis for the recognition of the human AAUAAA polyadenylation signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **115**, E1419–E1428.
33. Shi Y., Manley J.L. (2015) The end of the message: multiple protein-RNA interactions define the mRNA polyadenylation site. *Genes Dev.* **29**, 889–897.
34. Ray D., Kazan H., Cook K.B., Weirauch M.T., Najafabadi H.S., Li X., Gueroussov S., Albu M., Zheng H., Yang A., Na H., Irimia M., Matzat L.H., Dale R.K., Smith S.A., Yarosh C.A., Kelly S.M., Nabet B., Mecnas D., Li W., Laishram R.S., Qiao M., Lipshitz H.D., Piano F., Corbett A.H., Carstens R.P., Frey B.J., Anderson R.A., Lynch K.W., Penalva L.O., Lei E.P., Fraser A.G., Blencowe B.J., Morris Q.D., Hughes T.R. (2013) A compendium of RNA-binding motifs for decoding gene regulation. *Nature*. **499**, 172–177.
35. Mikula M., Bomsztyk K., Goryca K., Chojnowski K., Ostrowski J. (2013) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K genome-wide binding survey reveals its role in regulating 3'-end RNA processing and transcription termination at the early growth response 1 (EGR1) gene through XRN2 exonuclease. *J. Biol. Chem.* **288**, 24788–24798.
36. Wang Z., Qiu H., He J., Liu L., Xue W., Fox A., Tickner J., Xu J. (2020) The emerging roles of hnRNPK. *J. Cell Physiol.* **235**, 1995–2008.

PARTICIPATION OF PROTEINS OF THE CPSF COMPLEX IN POLYADENYLATION OF TRANSCRIPTS READ BY RNA POLYMERASE III FROM SINES

I. G. Ustyantsev¹, O. R. Borodulina¹, D. A. Kramerov^{1, *}

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

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

SINEs are mobile genetic elements of multicellular eukaryotes that arose during evolution from various tRNAs, as well as from 5S rRNA and 7SL RNA. Like the genes of these RNAs, SINEs are transcribed by RNA polymerase III. Transcripts of some mammalian SINEs have the ability to AAUAA-dependent polyadenylation that is unique for transcriptions generated by RNA polymerase III. Despite a certain similarity with canonical polyadenylation of mRNAs (transcripts of RNA polymerase II), these processes apparently differ significantly. The purpose of this work is to evaluate how important for polyadenylation of SINE transcripts are proteins of the CPSF complex formed by mPSF and mCF subcomplexes which directs mRNA polyadenylation. In HeLa cells, siRNA knockdowns of the CPSF components were carried out, after which the cells were transfected with plasmid constructs containing SINEs. A decrease of polyadenylation of the SINE transcripts as a result of the knockdown of the proteins was evaluated by Northern-hybridization. It turned out that the CPSF components, such as WDR33 and CPSF30, contributed to the polyadenylation of SINE transcriptions, while the knockdown of CPSF100, CPSF73 and symplekin did not reduce the polyadenylation of these transcripts. Wdr33 and CPSF30, along with the CPSF160 and Fip1 previously studied, are components of the subcomplex mPSF responsible for mRNA polyadenylation. Thus, the available data suggest the importance of all mPSF proteins for SINE transcriptions. At the same time, the CPSF100, CPSF73, and symplekin, forming the subcomplex mCF, are responsible for the cleavage of pre-mRNA, therefore, their non-participation in the polyadenylation of SINE transcriptions seems quite natural.

Keywords: SINE, retrotransposons, non-coding RNA, RNA polymerase III, polyadenylation, polyadenylation factors, knockdown, Mammalia

БЕЛОК Paip2 *Drosophila melanogaster* СВЯЗЫВАЕТСЯ С БЕЛКОМ ENY2 И ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С КОМПЛЕКСОМ TREX-2 В СОСТАВЕ мРНК-ЧАСТИЦ ГИСТОНОВ

© 2024 г. М. М. Куршакова^{а, *}, А. Н. Краснов^б, Е. Н. Набировкина^б, С. Г. Георгиева^а

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

^бИнститут биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*e-mail: kursha@mail.ru

Поступила в редакцию 17.11.2023 г.

После доработки 24.12.2023 г.

Принята к публикации 08.01.2024 г.

Белок ENY2 — эволюционно консервативный мультифункциональный белок, входящий в состав нескольких комплексов, регулирующих различные этапы экспрессии генов. ENY2 входит в состав комплекса TREX-2, необходимого для экспорта большей части мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры у многих эукариот. Широкий спектр функций ENY2 позволяет предположить, что он может ассоциироваться и с другими белковыми факторами или комплексами. С целью поиска белков, взаимодействующих с ENY2, проведен скрининг кДНК-библиотеки в дрожжевой двугибридной системе. В результате найдено взаимодействие ENY2 с РНК-связывающим белком Paip2. Paip2 непосредственно связывается с ENY2 *in vitro* и взаимодействует с ENY2 *in vivo* на молекулярном и генетическом уровне. Paip2 способен ассоциировать с ENY2-содержащим комплексом TREX-2. Paip2 присутствует в локусе кластера генов гистонов, Paip2 и ENY2 совместно обнаружены в тельцах гистонов (histone locus body, HLB) — ядерных структурах, в которых происходит скоординированная транскрипция и процессинг мРНК гистонов. Paip2 вместе с ENY2 и другими белками комплекса TREX-2 ассоциирован с матричными рибонуклеопротеиновыми частицами (мРНК-частицами) гистонов. Нокдаун мРНК Paip2 приводит к уменьшению связывания субъединиц TREX-2 с мРНК гистонов. Таким образом, Paip2 можно считать новым белком-партнером ENY2 в составе комплекса TREX-2, который участвует в связывании TREX-2 с мРНК-частицами гистонов.

Ключевые слова: Paip2, ENY2, TREX-2, Xmas-2, HLB, ядерное тельце, гены гистонов, мРНК гистонов

DOI: 10.31857/S0026898424030095, EDN: JCDFNO

ВВЕДЕНИЕ

Экспрессия генов включает этапы инициации транскрипции, синтеза и процессинга мРНК, образования зрелой мРНК-содержащей рибонуклеопротеиновой частицы (мРНК-частицы), экспорта мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры, трансляции в цитоплазме. Белок ENY2 (transcription and export complex 2 subunit) — эволюционно консервативный мультифункциональный

белок, участвующий в экспрессии генов на разных этапах [1, 2]. Белок ENY2 *Drosophila melanogaster*, также называемый e(y)2, как и его гомологи, — субъединица эволюционно консервативного ядерного комплекса TREX-2 (transcription and export complex 2), необходимого для экспорта большей части мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры у различных эукариот [3–8]. В составе TREX-2-комплекса человека ENY2 в двух копиях связывается с белком Xmas-2 — платформой для сборки комплекса [6]. TREX-2 взаимодействует с мРНК, ассоциирует с ядерными порами, а нокдаун его компонентов приводит к накоплению мРНК в ядре [9]. Нами был выделен совместный комплекс TREX-2 *Drosophila melanogaster* с белками комплекса инициации репликации (origin replication complex, ORC) и показано, что субъединицы ORC TREX-2-зависимым образом взаимодействуют с мРНК-частицами и участвуют в связывании рецептора экспорта NXF1 с мРНК [10]. В работах нашей группы и других исследователей было показано, что ENY2 также служит компонентом и других ядерных комплексов. ENY2 у многих

Сокращения: AD (activator domain) — активаторный домен; BD (DNA-binding domain) — ДНК-связывающий домен; CBP (cap-binding proteins) — кэпсвязывающие белки; CPRG (chlorophenol red-β-D-galactopyranoside) — хлорфеноло красный-β-D-галактопиранозид; DUB-модуль (deubiquitination module) — деубиквитинирующий модуль; HLB (histone locus body) — тельца гистонов; ORC (origin replication complex) — комплекс инициации репликации; PABP (poly(A)-binding protein) — поли(А)-связывающий белок; RIP (RNA immunoprecipitation) — иммунопреципитация РНК-частиц; мРНК-частица — мРНК-содержащая рибонуклеопротеиновая частица; S2 TL — тотальный лизат S2-клеток; ЯЭ — ядерный эмбриональный экстракт.

эукариот входит в состав деубиквитинирующего модуля (DUB модуль) транскрипционного ко-активаторного ацетилтрансферазного комплекса SAGA [4, 11, 12], ENY2 модулирует деубиквитинирующую активность комплекса [13]. DUB-модуль SAGA необходим для удаления моноубиквитина с остатка Lys120 гистона H2B на хроматине кодирующей части генов [13]. В состав DUB-модуля входят также белки Sgf11, Nonstop, причем ENY2 непосредственно связан с Sgf11 [11, 14]. С вовлеченностью в деубиквитинирование H2B, по-видимому, связано участие гомолога ENY2 у дрожжей, белка Sus1, в негативной регуляции длины теломер [15]. ENY2 также ассоциирован с комплексом ТНО (transcription and export complex), участвуя в его связывании с мРНК-частицами в ходе элонгации транскрипции [16]. ENY2 в составе TREX-2 связывается с белком Sgf11, который взаимодействует с комплексом кэпсвязывающих белков (cap-binding proteins, CBP) на 5'-конце мРНК [17].

Таким образом, ENY2 входит в состав нескольких комплексов, регулирующих различные стадии экспрессии генов. Широкий спектр функций ENY2 позволяет предположить, что этот белок взаимодействует и с другими белковыми факторами или комплексами. С целью идентифицировать новые белки-партнеры ENY2 мы провели скрининг кДНК-библиотеки из эмбрионов *D. melanogaster* в дрожжевой двугибридной системе и обнаружили взаимодействие ENY2 с РНК-связывающим белком Paip2.

PAIP2 (poly(A)-binding protein interacting protein 2) — специфичный для многоклеточных организмов белок, который впервые был описан как негативный регулятор трансляции [18]. PAIP2 взаимодействует непосредственно с поли(А)-связывающим белком РАВР [19]. Ассоциация PAIP2 с РАВР ингибирует связывание РАВР с поли(А)-последовательностями мРНК, а также нарушает взаимодействие РАВР с фактором eIF4G, что приводит к снижению интенсивности трансляции [20, 21], а также предотвращает терминацию трансляции мРНК [22]. PAIP2 может оказывать негативное влияние на трансляцию мРНК, лишенных поли(А)-последовательности [23]. Помимо участия в регуляции трансляции PAIP2 также играет роль в поддержании стабильности мРНК. Так, связываясь с 3'-нетранслируемой областью (3' UTR) мРНК VEGF, PAIP2 стабилизирует молекулу мРНК [24], а связываясь с 3'-UTR мРНК GLUT5, изменяет скорость ее распада [25]. Взаимодействие PAIP2 с мРНК Per1 и Per2 приводит к увеличению скорости их деградации в клетках нервной системы [26].

В геноме человека идентифицировано два паралога PAIP2: PAIP2A и PAIP2B [27], а в геноме *D. melanogaster* — один ген, Paip2, кодирующий белок с расчетной молекулярной массой 14 кДа. Как и его аналоги у млекопитающих, белок Paip2

D. melanogaster экспрессируется во многих тканях, взаимодействует с РАВР в цитоплазме и ингибирует связывание РАВР с поли(А)-последовательностями мРНК. Повышенная экспрессия Paip2 в пролиферирующих клетках крыловых дисков приводит к уменьшению размеров дисков из-за снижения числа клеток [28]. Ранее показано, что у *D. melanogaster* Paip2 присутствует не только в цитоплазме, но и в ядрах клеток различных тканей [29]. Paip2 детектируют в ряде локусов на политенных хромосомах из ядер клеток слюнных желез, в основном в междисках и пуфах. Paip2 РНК-зависимым образом привлекается на хроматин в промоторные области активно транскрибируемых генов. Paip2 связывается с мРНК вблизи 5'-конца синтезирующихся транскриптов и ассоциирует с белком CBP80 — компонентом кэпсвязывающего комплекса CBP [30].

Целью данной работы было исследование найденного нами взаимодействие Paip2 *D. melanogaster* с ENY2. Показано, что Paip2 — функционально важный белок-партнер ENY2, взаимодействующий с ENY2-содержащим комплексом TREX-2. Обнаружено, что Paip2 присутствуют в локусе кластера генов гистонов на политенных хромосомах; Paip2 и ENY2 колокализуются в ядерном тельце HLB (histone locus body), с которым ассоциирован хроматин кластера и где происходит скоординированная с S-фазой активация транскрипции и процессинга мРНК около 100 копий репликативно-зависимых генов гистонов [31]. Продemonстрировано, что Paip2 вместе с субъединицами TREX-2 взаимодействует с мРНК-частицами, содержащими мРНК гистонов. Снижение уровня экспрессии Paip2 приводит к уменьшению связывания комплекса TREX-2 с мРНК гистонов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дрожжевая двугибридная система. Использовали двугибридную систему MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 2 (“Clontech”, США). Нуклеотидную последовательность, кодирующую полно-размерный белок ENY2, клонировали в одной рамке считывания с последовательностью ДНК-связывающего домена (DNA-binding domain, BD) LexA в плазмиде pBTM117с. Эту конструкцию использовали для скрининга кДНК-библиотеки, полученной из эмбрионов *D. melanogaster* и содержащей 10⁷ клонов в одной рамке считывания с последовательностью активаторного домена (activator domain, AD) GAL4 в плазмиде pACT2. Для скрининга использовали штамм Lc40с *Saccharomyces cerevisiae*. Ложнопозитивные клоны отсеивали по протоколу производителя. Экспрессию репортерного гена *LacZ* оценивали по активности кодируемой им β-галактозидазы в реакции расщепления субстрата (chlorophenol red-β-D-galactopyranoside, CPRG) в жидкой культуре по протоколу производителя. За

единицу активности (ед.) β -галактозидазы (GLb) принимали количество фермента, которое гидролизует 1 мкМ CPRG до хлорофенолового красного (chlorophenol red) и D-галактозы за 1 мин на 1 клетку. Для расчета использовали формулу ("Clontech"):

$$[\text{GLb}] (\text{ед.}) = 10^3 \cdot \text{OD}_{578} / (t \cdot V \cdot \text{OD}_{600}),$$

где t — время инкубации, мин; $V = 0.1 \cdot C$ — объем, мл (здесь: $C = 5$ мл); OD_{578} и OD_{600} — оптическая плотность раствора при длине волны 578 и 600 нм соответственно.

Генетическое скрещивание дрозофилы. Мутантная линия #13029 *Drosophila melanogaster* с генотипом $y[1]w[67c23]; P[y/+mDint2]w[BR.E.BR.] = SUPor-P\} KG03704ry[506]$, содержащая инсерцию транспозона *KG03704* в промоторной области гена *Paip2*, была получена из коллекции Bloomington *Drosophila* Stock Center (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>). Мутантная линия $y[1]w[1]e(y)2[u1]/FM4$, несущая гипоморфную мутацию $e(y)2[u1]$ в гене, кодирующем белок ENY2, была описана ранее [32]. Для изучения взаимодействия *Paip2* и $e(y)2$ самок линии $y[1]w[1]e(y)2[u1]/FM4$ скрещивали с самцами линии #13029. Рассчитывали процент самцов с аномальной морфологией абдоминальных сегментов 9 и 10 в скрещиваниях и исходной линии $y[1]w[1]e(y)2[u1]/FM4$. Генетические скрещивания проводили при 25°C в трех повторах. Исследовали не менее 150 особей каждого генотипа.

Соосаждение рекомбинантных белков на глутатион-сефарозе. Нуклеотидная последовательность, кодирующая полноразмерный белок *Paip2*, была клонирована в одной рамке считывания с последовательностью гена глутатионтрансферазы (GST) в плазмиде pGEX5x-1. После экспрессии в *Escherichia coli* штамм BL21(DE3), 50–100 мкг рекомбинантных белков GST-*Paip2* или GST осаждали на глутатион-сефарозе 4B ("Sigma", США) и инкубировали со 100–200 мкг аффинно очищенного рекомбинантного белка ENY2-His₆.

Антитела. Использовали ранее полученные и охарактеризованные нами аффинно очищенные поликлональные кроличьи антитела к белкам ENY2 [32], Xmas-2 [4], PCID2 [33] и мышинные моноклональные антитела M2 к FLAG-эпиту ("Sigma"). Поликлональные антитела к *Paip2* получали от кроликов и мышей, иммунизированных аффинно очищенным белком, экспрессированным в векторе pET22b в безлактозной системе. Антитела очищали методом аффинной хроматографии с использованием конъюгированного с BrCN-активированной сефарозой 4B ("Sigma") *Paip2*. Моноклональные антитела к ламину Dm0 были получены из Developmental Studies Hybridoma Bank, созданного под эгидой NICHD и поддерживаемого The University of Iowa, Department of Biological Sciences (США).

Экстракты клеточных культур и эмбрионов дрозофилы. Ядерный экстракт (ЯЭ) из 0–12-часовых эмбрионов *D. melanogaster* получали с использованием 0.42 М раствора сульфата аммония, как описано ранее [34]. Клетки *D. melanogaster* линии Schneider 2 (S2) культивировали при 25°C в среде Schneider's Insect Medium ("Sigma"), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота ("HyClone", США). Тотальный лизат S2 клеток (S2 ТЛ) выделяли и проводили реакции коиммунопреципитации, как описано ранее [32].

Для осаждения РНП-частиц антителами (RNA immunoprecipitation, RIP) белки S2-клеток разделяли на ядерную и цитоплазматическую фракции в буфере, содержащем 40 мМ HEPES, pH 7.8, 2.5 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl, 1 мМ DTT и ингибиторы протеаз ("Roche", Швейцария). Для лизиса ядер использовали раствор WLB (10 мМ HEPES, pH 7.0, 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 25 мМ EDTA, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10% глицерин). Перед иммунопреципитацией экстракт обрабатывали 0.6 U/мл ДНКзы I.

Трансфекция клеток S2. Кодирующую полноразмерный белок *Paip2* нуклеотидную последовательность, в одной рамке считывания с тремя FLAG-эпитопами на N-конце, клонировали в вектор pAc5.1/V5-His ("Invitrogen", США). Трансфекцию S2-клеток проводили с использованием MACSfectin Reagent ("Miltenyi Biotec", Германия) по протоколу производителя.

Иммуноокрашивание политенных хромосом. Иммуноокрашивание политенных хромосом из ядер клеток слюнных желез личинок *D. melanogaster* проводили по методике J. Platero с соавт. [35]. Использовали аффинно очищенные кроличьи антитела к *Paip2*. В качестве вторичных использовали ослиные антитела против IgG кролика, конъюгированные с флуоресцентным красителем Cy3 ("Amersham", США). Хроматин окрашивали DAPI ("Sigma").

Иммуноокрашивание клеток S2. Клетки помещали на покровные стекла, дважды промывали PBS, 10 мин фиксировали в 3.7%-ном растворе параформальдегида, 5 мин пермеабилizовали в 0.2%-ном Triton X-100, 10 мин блокировали в 3%-ной суспензии сухого молока (все растворы готовили на PBS). Препараты инкубировали с аффинно очищенными мышинными антителами к *Paip2* и кроличьими антителами к ENY2. В качестве вторичных использовали ослиные антитела против IgG мыши, конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 ("Thermo Fisher Scientific", США), и ослиные антитела против IgG кролика, конъюгированные с флуоресцентным красителем Cy3 ("Amersham"). Антитела разводили в 3%-ной суспензии сухого молока в PBS и инкубировали с образцами в течение 60 мин при комнатной температуре. После инкубации как с первичными,

так и вторичными антителами клетки трижды промывали PBS (5 мин каждая промывка). Ядра клеток окрашивали DAPI. Препараты помещали в Vectashield Mounting Medium (“Vector Laboratories”, США) и анализировали на конфокальном микроскопе TCS SP2 или флуоресцентном микроскопе DMR/HC5 (“Leica Microsystems Inc.”, Германия) с объективом HCX PZ Fluotar $\times 100/1.3$. Результаты регистрировали с помощью цифровой камеры Leica DC350 F.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH-гибридизация). FISH-гибридизацию РНК проводили, как ранее [4], с использованием Су3-меченого олиго-dT-зонда длиной 50 п.н. Для совмещенной с иммуноокрашиванием FISH-гибридизации с ДНК-зондом сначала проводили фиксацию и пермеабиллизацию S2-клеток, как при иммуноокрашивании. Клетки инкубировали в растворе 50%-ного формамида в буфере $2\times$ SSC в течение 5 мин при 95°C и затем в течение 5 мин при 4°C . После этого проводили дегидратацию клеток, последовательно промывая их 70, 90 и 100%-ным этанолом при 4°C . К дегидратированным клеткам добавляли гибридизационную смесь с биотинилированным ДНК-зондом. В качестве матрицы для получения зонда использовали последовательность гена *His3*, которую амплифицировали методом ПЦР, и вносили метку биотинилированного dUTP, используя для этого Biotin-Nick Translation Mix (“Roche”). Биотинилированную ДНК денатурировали в 25%-ном формамиде при 95°C в течение 5 мин и проводили гибридизацию в следующем буфере: $2\times$ SSC, 25% формамид, 10% декстрансульфат, 1 мг/мл дрожжевая тРНК, 0.5 мг/мл оцДНК — при 37°C в течение 18 ч. Не связавшийся с клетками зонд удаляли промыванием в растворе 50%-ного формамида в буфере $2\times$ SSC при 45°C , а затем в $0.1\times$ SSC при 55°C . Клетки инкубировали в блокирующем реагенте в течение 30 мин, а затем 60 мин с кроличьими антителами к Paip2. Детекцию FISH-сигнала *His3* проводили при помощи авидина, конъюгированного с флуоресцентным красителем Texas Red (“Invitrogen”), и меченных биотином моноклональных мышиных антител к авидину (“Vector Laboratories”). После трехкратного повторения обеих стадий на последнем этапе для детекции сигнала Paip2 использовали вторичные антитела против IgG кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 488. Ядра клеток окрашивали DAPI. Препараты помещали в среду Vectashield Mounting Medium (“Vector Laboratories”) и анализировали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP2.

РНК-интерференция. РНК-интерференцию в S2-клетках проводили по опубликованному протоколу [36] с использованием 10–20 мкг дцРНК на 1×10^6 клеток. дцРНК синтезировали с помощью набора для транскрипции Transcript Aid T7 High Yield (“Thermo Fisher Scientific”) с ПЦР-продуктов, содержащих промотор для T7 РНК-полимеразы.

Экспрессию генов оценивали с помощью количественной ПЦР и иммуноблотинга. В качестве отрицательного контроля использовали дцРНК, соответствующую фрагменту мРНК зеленого флуоресцентного белка (GFP). Для синтеза ПЦР-продуктов использовали следующие олигонуклеотидные праймеры:

Paip2: 5'-GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCTCTTCAACAACA-3' и

5'-GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGGCTTTATGAGGCAGGG-3';

e(y)2: 5'-GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGCACTTCCGGCGCAGTTGATC-3' и 5'-GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGGATTTCGTCCTCTGGCTCA-3';

xmas-2: 5'-GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGACCTGCACCGTAAG-3' и

5'-GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGTTGTAGTTCATAG-3';

gfp: 5'-CGACTCACTATAGGGAGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGC-3' и

5'-CGACTCACTATAGGGAGAGATGCCGTTCTTCTGCTTGTCG-3'.

Иммунопреципитация мРНК-частиц. Иммунное соосаждение мРНК-частиц гистонов и контрольных генов (RIP-анализ) проводили, как описано ранее [37], без использования каких-либо сшивающих реагентов. Лизат ядер S2-клеток инкубировали в течение 1 ч при 4°C с антителами, связанными с protein(A)-сефарозой, в буфере NT2 (50 мМ Трис-HCl, pH 7.4, 150 мМ NaCl, 1 мМ MgCl_2 , 0.05% NP-40), содержащем 40 U/мл RiboLock (“Thermo Fisher Scientific”), 1% BSA и 1 мг/мл оцДНК. Сефарозу промывали буфером NT2, обрабатывали протеиназой К (“Thermo Fisher Scientific”), затем реактивом TRI Reagent (“Thermo Fisher Scientific”) для выделения РНК. РНК осаждали, обрабатывали ДНКазой I, синтезировали кДНК с использованием обратной транскриптазы RevertAid (“Thermo Fisher Scientific”). Обратную транскрипцию проводили с рассеянной затравкой. Уровни мРНК гистонов и контрольных генов определяли методом количественной ПЦР с использованием олигонуклеотидов к кодирующим частям генов гистонов; для *His2A*: 5'-GCTGAGGTTCTCGAGTTGGCT-3' и 5'-ATTGTGACGCCGGAGAGCAG-3'. Каждый эксперимент проводили в трех повторах. Данные представляли как среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Paip2 взаимодействует с ENY2 в дрожжевой двугибридной системе

С целью найти белки, взаимодействующие с ENY2, был проведен скрининг кДНК-библиотеки *D. melanogaster* в дрожжевой двугибридной системе MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 2 ("Clontech"). Последовательность, кодирующая ENY2, была клонирована в одной рамке считывания с последовательностью, кодирующей BD-домен фактора LexA. Эту конструкцию использовали для скрининга кДНК-библиотеки, содержащей 10^7 клонов в одной рамке считывания с последовательностью домена AD фактора GAL4. При связывании белков в двугибридной системе слитые с ними аминокислотные последовательности AD и BD также взаимодействуют и происходит активация транскрипции репортерных генов *LacZ* и *His3*. Ложнопозитивные клоны отсеивали по протоколу производителя ("Clontech"). Уровень активации репортерного гена *LacZ* оценивали по β -галактозидазной активности на субстрате CPRG. Было отобрано 12 положительных клонов и определена первичная структура их ДНК. Один из клонов содержал последовательность, кодирующую участок домена цинковых пальцев белка Su(Hw). Ранее мы подтвердили взаимодействие ENY2 и Su(Hw) в клетках *D. melanogaster* и показали его функциональное значение для барьерной и энхансерблокирующей функций *gypsy*-инсулятора [38]. Один из наиболее эффективно взаимодействовавших с ENY2 клонов кодировал последовательность белка Paip2 (рис. 1а). При переклонировании нуклеотидных последовательностей ENY2 и Paip2 таким образом, чтобы ENY2 был слит с AD GAL4, а Paip2 с BD LexA, взаимодействие сохранялось на таком же высоком уровне. В качестве отрицательного контроля использовали показатель активации *LacZ* для не взаимодействующего с ENY2 фрагмента белка Su(Hw) (363–597 а.о.). Таким образом, Paip2 и ENY2 связывались в дрожжевой двугибридной системе независимо от того, с каким доменом, AD или BD, был слит каждый из белков.

Paip2 связывается с ENY2 in vitro

Результаты, полученные в двугибридном скрининге, подтверждены в экспериментах по коиммунопреципитации рекомбинантных белков Paip2 и ENY2. Нуклеотидную последовательность, кодирующую полноразмерный белок Paip2, клонировали в одной рамке считывания с GST-тегом. Рекомбинантный белок GST-Paip2 осаждали на глутатион-сефарозе, которую затем инкубировали с очищенным рекомбинантным белком ENY2-His₆. ENY2-His₆ связывался с сефарозой, конъюгированной с GST-Paip2, но не с GST-содержащей сефарозой (рис. 1б). На основании этих данных

можно сделать вывод о том, что Paip2 непосредственно связывается с ENY2.

Paip2 взаимодействует с ENY2 in vivo на молекулярном и генетическом уровне

С целью подтвердить взаимодействие Paip2 и ENY2 в системе *in vivo* мы получили и охарактеризовали антитела к Paip2 (рис. 1в). Антитела узнавали белок Paip2 как в тотальном лизате S2-клеток, так и в ядерном экстракте из эмбрионов *D. melanogaster* в виде двух близких по молекулярной массе форм — около 25 кДа. Вероятно, полоса Paip2 с меньшей электрофоретической подвижностью представляет собой модифицированный вариант белка. Ранее Z. Kachaev с соавт. [29], используя другие антитела к Paip2, детектировали такие же две формы белка в клетках *D. melanogaster*.

Взаимодействие Paip2 с ENY2 исследовали в экспериментах по коиммунопреципитации. Из литературы известно, что Paip2 локализуется как в ядре, так и в цитоплазме клеток, а белок ENY2 — преимущественно в ядре, где он концентрируется на ядерных порах [4]. Учитывая эти данные, для коиммунопреципитации мы использовали ядерный экстракт из эмбрионов дрозофилы (рис. 1г). Антитела к Paip2 и антитела к ENY2 осаждали соответствующие белки. ENY2 соосаждался в виде двух форм с молекулярной массой около 11 и 22 кДа, что отражает способность этого белка к димеризации. Антитела к Paip2 соосаждали ENY2, антитела к ENY2 — часть присутствующего в экстракте Paip2. На блоте две формы белка Paip2 детектировали под легкой цепью антител.

С целью более убедительно продемонстрировать взаимодействие исследуемых белков в S2-клетках мы создали генетическую конструкцию для сверхэкспрессии полноразмерного белка Paip2 с FLAG-эпитопом — Paip2-FLAG. Антитела к ENY2 эффективно соосаждали Paip2-FLAG из лизатов трансформированных S2-клеток (рис. 1д). Таким образом, Paip2 и ENY2 не только способны связываться *in vitro*, но и взаимодействуют в клетках *D. melanogaster*.

Взаимодействие Paip2 и ENY2 исследовано и генетическими методами на уровне целого организма *D. melanogaster*. Для этого использовали охарактеризованную нами ранее линию *D. melanogaster*, несущую гипоморфную мутацию *e(y)2[u1]* в гене *e(y)2*, расположенном на X-хромосоме и кодирующем белок ENY2 [32]. При этой мутации наблюдалось падение уровня экспрессии ENY2 в 4 раза. Гемизиготные самцы *e(y)2[u1]/Y* имели близкую к нормальной выживаемость (90%), но у 10% была нарушена морфология последних (9 и 10) абдоминальных сегментов. Гетерозиготных самок *D. melanogaster* с генотипом *e(y)2[u1]/FM4* скрещивали с самцами линии #13029, гомозиготными по мутации *KG03704* в гене *Paip2*, и затем анализировали

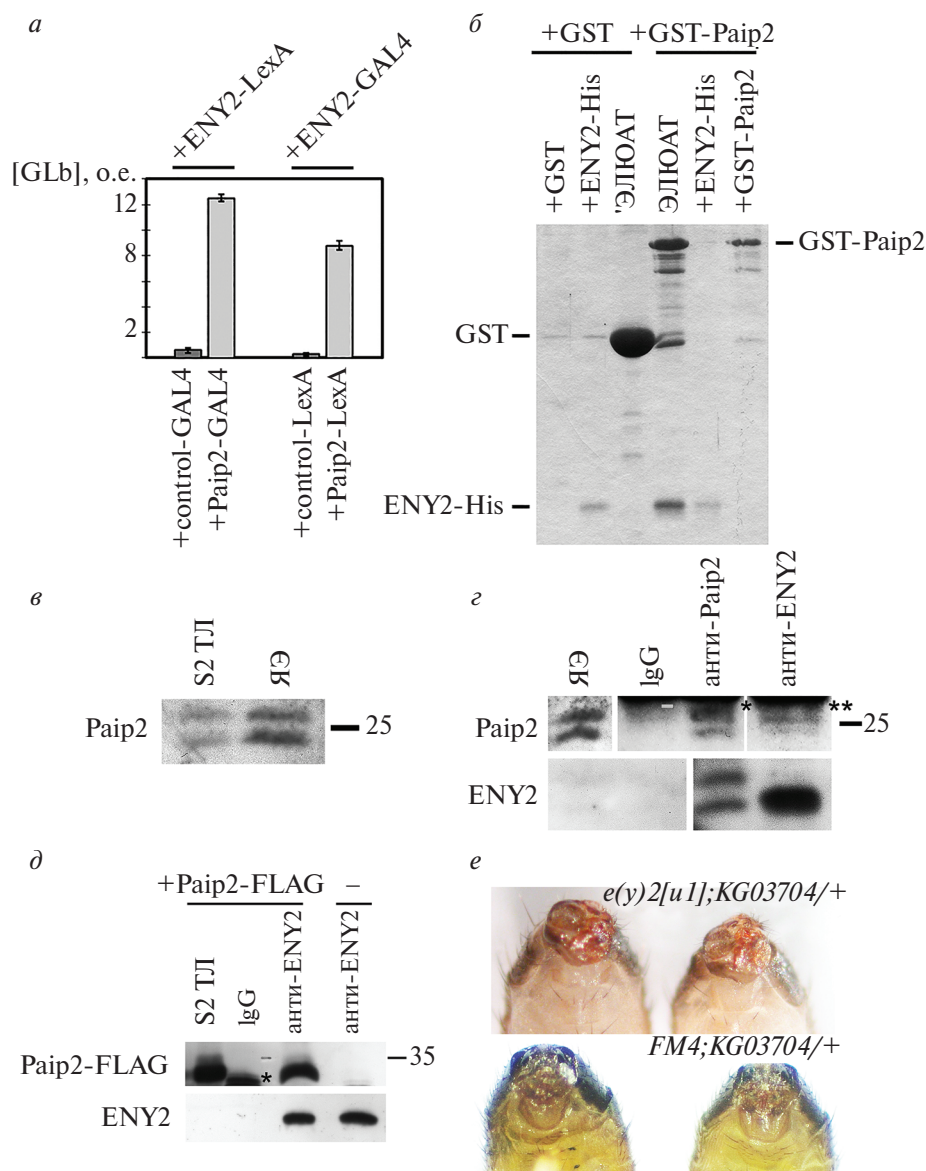


Рис. 1. Белки Paip2 и ENY2 взаимодействуют друг с другом. *а* – Активация репортерного гена *LacZ* при добавлении субстрата β -галактозидазы CPRG. Результаты представлены в виде относительных единиц активности (о.е.) β -галактозидазы [GLb] (рассчитаны как частное от деления полученных значений активности (е.а.) на общий множитель) для дрожжей, котрансформированных векторами, кодирующими ENY2-LexA и Paip2-GAL4, ENY2-LexA и control-GAL4, а также ENY2-GAL4 и Paip2-LexA, ENY2-GAL4 и control-LexA. *б* – Связывание аффинно очищенных рекомбинантных белков GST-Paip2 и ENY2-His₆ на глутатион-сефарозе. В качестве отрицательного контроля использован белок GST. *в* – Анализ специфичности антител. Иммуноблоттинг белков тотального лизата S2-клеток (S2 TЛ) и ядерного экстракта (ЯЭ) из эмбрионов *D. melanogaster* с использованием антител кролика к Paip2. *г* – Анализ взаимодействия Paip2 с ENY2. Иммуноблоттинг белков, осажденных из тотальных лизатов S2-клеток антителами к Paip2 и ENY2, с использованием одноименных антител. Полосы, соответствующие легким цепям антител к Paip2 и ENY2, отмечены звездочками (* и ** соответственно). *д* – Анализ взаимодействия Paip2-FLAG и ENY2. Иммуноблоттинг белков, осажденных антителами к ENY2 из лизатов S2-клеток со сверхэкспрессией Paip2-FLAG с использованием антител к FLAG-эпиту и ENY2. *е* – Анализ взаимодействия Paip2 и ENY2 на генетическом уровне. Представлены фотографии абдоминальных сегментов самцов *D. melanogaster* с генотипом *e(y)2[u1];KG03704/+* (нарушенная морфология) и контрольных самцов с генотипом *FM4;KG03704/+* (нормальная морфология).

фенотип всех самцов первой генерации (F1). У самцов, гемизиготных по мутации *e(y)2[u1]* и гетерозиготных по мутации *KG03704*, была в 4 раза (до 40%) повышена частота встречаемости мутантного фенотипа — морфологически измененных абдоминальных сегментов, — характерного для линии *e(y)2[u1]*; при этом у самцов *FM4;KG03704/+* этот фенотип не встречался (рис. 1е). Таким образом, взаимодействие *Paip2* и *ENY2 in vivo* подтверждено генетическими методами, на основании чего можно сделать вывод, что белки *Paip2* и *ENY2* вместе участвуют в общем биологическом процессе в ходе развития дрозофилы.

*Paip2 взаимодействует с белками
ENY2-содержащего комплекса TREX-2*

Известно, что *Paip2* — РНК-связывающий белок, который взаимодействует с белками СВР80 [30], РABP в составе мРНК-частиц как в ядре [28], так и в цитоплазме. В связи с этим интересно было проверить взаимодействие *Paip2* с *ENY2*-содержащим РНК-связывающим ядерным комплексом TREX-2, в состав которого также входят белки *Xmas-2* и *PCID2* [33, 38]. Проведена коиммунопреципитация белков из тотальных лизатов S2-клеток с использованием антител к *Paip2* и к субъединицам *ENY2*, *Xmas-2* и *PCID2* комплекса TREX-2 (рис. 2а). Все антитела осаждали одноименные белки, что подтверждает их специфичность. Антитела к *Paip2* осаждали две формы белка с молекулярной массой ~25 кДа и соосаждали *ENY2*, также в виде двух форм, и небольшую часть *Xmas-2*. По результатам электрофоретического разделения продуктов коиммунопреципитации и последующего иммуноблоттинга полоса, соответствующая форме *Paip2* с большей электрофоретической подвижностью, совпадала с легкой цепью антител, а форму *Paip2* с меньшей подвижностью детектировали немного выше. Антитела к *Xmas-2* частично соосаждали белки *Paip2* и *ENY2*. Антитела к *PCID2* и *Paip2* малоэффективно соосаждали друг друга. Таким образом, *Paip2* взаимодействует с TREX-2 комплексом, преимущественно связываясь с *ENY2* и *Xmas-2*. *Paip2*, по-видимому, ассоциирован только с небольшой долей TREX-2-комплексов в S2-клетках.

*Нокдаун Paip2 не влияет на общий экспорт
мРНК из ядра в цитоплазму*

Комплекс TREX-2 необходим для экспорта большей части мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры: при снижении экспрессии его субъединиц *Xmas-2*, *ENY2* в клетках посредством РНК-интерференции происходит накопление мРНК в ядре [4]. Так как *Paip2* взаимодействует с субъединицами TREX-2, мы исследовали возможное участие *Paip2* в экспорте мРНК. С этой целью провели нокдаун *Paip2* в S2-клетках, используя технологию РНК-интерференции

(рис. 2б), и оценили его эффект на экспорт общей мРНК методом FISH-гибридизации РНК с Су3-меченым олиго-dT-зондом (рис. 2в). В контрольных клетках большую часть мРНК детектировали в цитоплазме. В клетках, где в качестве положительного контроля проводили нокдаун *Xmas-2* или *ENY2*, мРНК задерживалась в ядрах, то есть происходило нарушение общего экспорта мРНК. Нокдаун *Paip2* не приводил к накоплению мРНК в ядрах, что свидетельствует о том, что *Paip2* не является необходимым для экспорта большей части мРНК из ядра.

*Paip2 и ENY2 локализуются в локусе кластера
репликативнозависимых генов гистонов
на полигенных хромосомах и в HLB*

С целью поиска генов, потенциально регулируемых *Paip2*, исследовано распределение этого белка на полигенных хромосомах из ядер клеток слюнных желез личинок *D. melanogaster*. Ранее выявлено, что *Paip2* присутствует на полигенных хромосомах в ограниченном числе локусов [29], в то время как *ENY2* обнаружен в большей части эухроматиновых участков на всем протяжении полигенных хромосом [38]. Мы зарегистрировали сигнал *Paip2* в характерно расположенном локусе кластера репликативнозависимых генов гистонов: в 39D—39E участке хромосомы 2L, находящемся вблизи хромоцентра (рис. 3а). *ENY2* также присутствует в этом локусе [38]. У многоклеточных репликативнозависимые гены гистонов сгруппированы в кластер, состоящий из тандемных повторов, в геноме *D. melanogaster* их около 100 [31]. Каждый повтор содержит по одной копии каждого из генов гистонов: *His1*, *His2A*, *His2B*, *His3*, *His4*, — а их транскрипция идет с двух разнонаправленных промоторов, расположенных между генами *His2A* и *His2B* (*His2A/His2B*-промотор) и между *His3* и *His4* (*His3/His4*-промотор).

Затем мы исследовали распределение *Paip2* и *ENY2* в S2-клетках, используя совместное иммуноокрашивание клеток соответствующими антителами. *Paip2*, как и ожидалось, локализовался как в цитоплазме, так и в ядрах клеток (рис. 3б, верхняя панель). *ENY2*, как было показано ранее [4], сконцентрирован на ядерных порах, что соответствует ассоциированным с ядерными порами TREX-2-комплексам. Окрашивание антителами к *Paip2* не выявляло ярких сигналов на ядерной оболочке, хотя точечные сигналы *Paip2* детектировали в области ядерных пор. В ядре регистрировали яркий сигнал *Paip2*, напоминающий внутриядерное тельце. Антитела к *ENY2* также окрашивали точечные области в ядре, с паттерном, характерным для внутриядерного распределения транскрипционных факторов (рис. 3б, нижняя панель). При наложении микрофотографий анти-*Paip2* и анти-*ENY2* наблюдаемый яркий сигнал *Paip2*

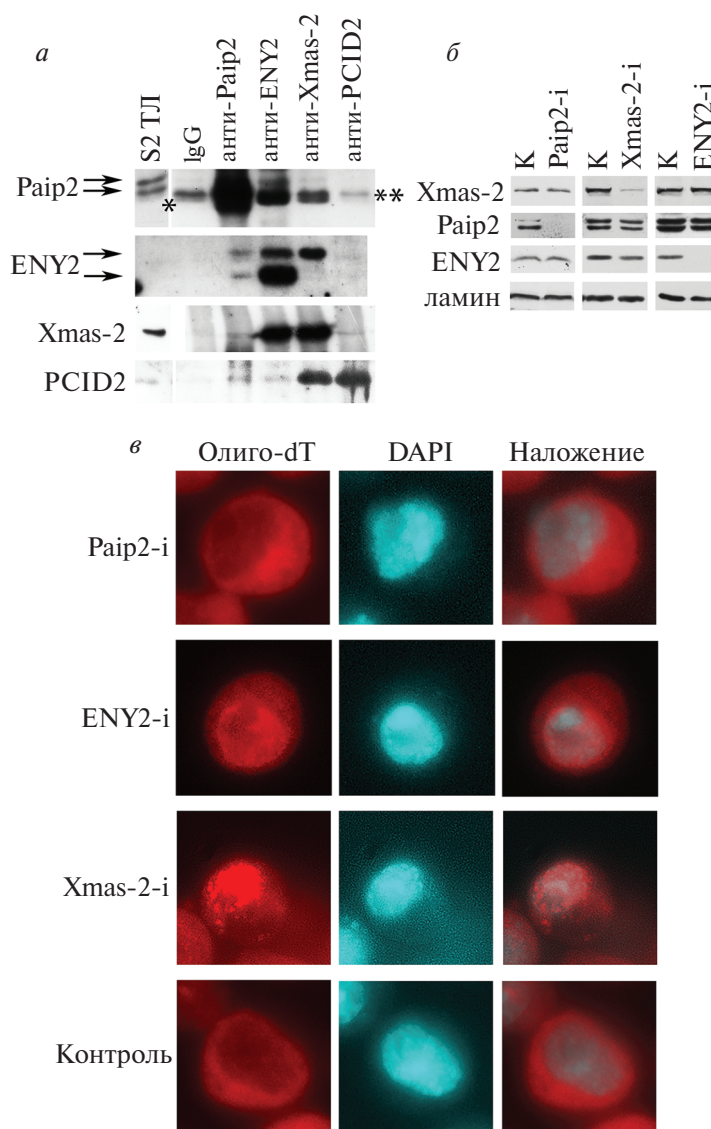


Рис. 2. Paip2 взаимодействует с белковым комплексом TREX-2. *а* – Иммуноблоттинг белков, осажденных из лизатов S2-клеток антителами к Paip2 и к субъединицам ENY2, Xmas-2 и PCID2 комплекса TREX-2. Указаны детектируемые белки. Полосы, соответствующие сигналам от легких цепей антител, отмечены по краям блота звездочками: *слева и **справа. *б* – Иммуноблоттинг лизатов S2-клеток с нокдауном Paip2, Xmas-2, ENY2 в результате РНК-интерференции (Paip2-i, Xmas-2-i, ENY2-i соответственно) и контрольной РНК-интерференции с дцРНК к мРНК GFP (К) с использованием антител к одноименным белкам. В качестве выравнивающего контроля использовали окрашивание антителами к ламину Dm0. *в* – Распределение мРНК в S2-клетках при нокдауне Paip2, ENY2, Xmas-2 в результате РНК-интерференции (Paip2-i, ENY2-i, Xmas-2-i соответственно) и контрольных клетках с РНК-интерференцией с дцРНК к мРНК GFP (контроль). FISH-гибридизацию РНК S2-клеток проводили с Cy3-меченым oligo-dT-зондом. Ядра клеток окрашены DAPI.

совпадал с одним из ярких сигналов ENY2 в ядре, то есть в этой области ядра эти два белка находятся вместе.

В связи с тем, что Paip2 детектировали в локусе кластера репликативнозависимых генов гистонов на политенных хромосомах, мы предположили, что наблюдаемый в ядрах яркий точечный сигнал Paip2 соответствует HLB. HLB представляет собой ядерное тельце, которое ассоциировано с хроматином кластера репликативнозависимых генов гистонов

и содержит специфические факторы, необходимые для скоординированных с S-фазой процессов транскрипции и процессинга мРНК гистонов [31]. При совместном использовании двух технологий: иммуноокрашивании S2-клеток антителами к Paip2 и FISH-гибридизации с ДНК-зондом к последовательности гена *His3* (рис. 3*в*) – яркий точечный внутриядерный сигнал Paip2 совпадал с *His3* FISH-сигналом. Следовательно, окрашиваемое антителами к Paip2 ядерное тельце представляет собой HLB. Таким образом, показано, что Paip2

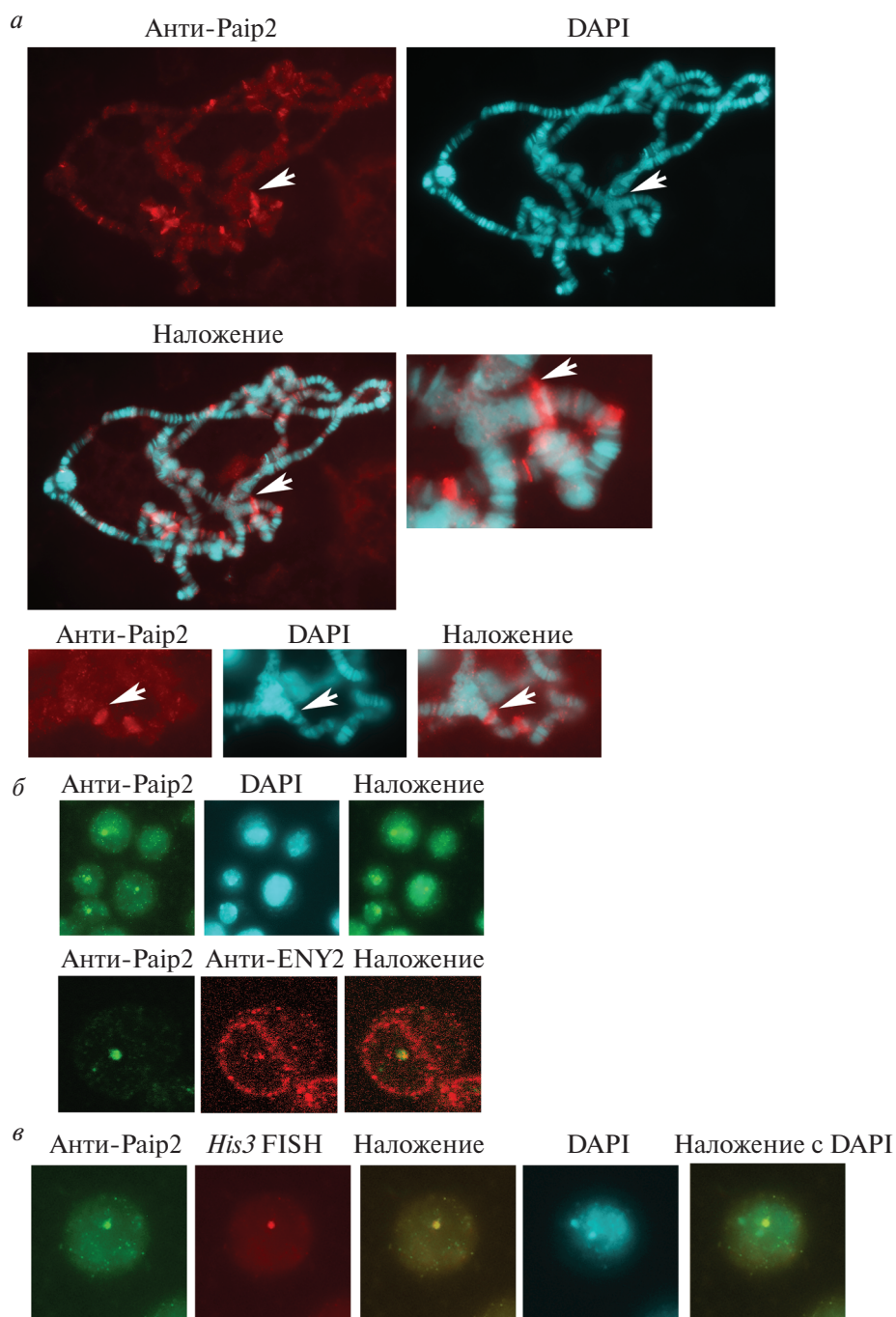


Рис. 3. Paip2 и ENY2 локализуются в локусе кластера репликативнозависимых генов гистонов. *a* – Иммуноокрашивание политенных хромосом из ядер слюнных желез личинок *D. melanogaster* с использованием антител к Paip2. Для окрашивания ДНК использовали DAPI. Локус кластера репликативнозависимых генов гистонов указан стрелкой. Приведено увеличенное изображение окрашенного локуса. *б* – Иммуноокрашивание S2-клеток с использованием в качестве первичных мышиных антител к Paip2 и кроличьих антител к ENY2. Ядра клеток окрашены DAPI. *в* – FISH-гибридизация S2-клеток с *His3*-зондом, совмещенная с иммуноокрашиванием антителами к Paip2. Ядра клеток окрашены DAPI.

локализуется в локусе кластера генов гистонов на политенных хромосомах и в HLB. Белок ENY2 также детектировали в этом локусе и в HLB.

Paip2 и TREX-2 ассоциированы с мРНК-частицами гистонов

На основании полученных результатов можно предположить, что Paip2 способен связываться с ENY2-содержащим комплексом TREX-2 и также вовлечен в регуляцию кластера генов гистонов. Недавно нами показано [39], что TREX-2 ассоциирован с мРНК-частицами гистонов и участвует в экспорте мРНК гистонов из ядра. Учитывая эти данные и РНК-связывающие свойства Paip2, мы исследовали взаимодействие Paip2 с мРНК-частицами гистонов. Для анализа использовали метод RIP с антителами к Paip2 и к субъединицам Xmas-2, PCID2, ENY2 комплекса TREX-2. Антитела к Paip2, наряду с антителами к белкам TREX-2, соосаждали мРНК гистонов. На рис. 4а представлены результаты для мРНК гистона H2A. Таким образом, белок Paip2 может ассоциировать с мРНК-частицами гистонов. Ранее показано, что Paip2 также взаимодействует с СБР-комплексом [30] и, по нашим данным, соосаждается с белком Sgf11, который совместно с ENY2 связывается с СБР [17]. Из литературы известно, что Sgf11—СБР входит в состав мРНК-частиц на ранних этапах элонгации транскрипции, а комплекс TREX-2 связывается с мРНК на более поздних, предшествующих экспорту мРНК из ядра, этапах созревания [16]. Следовательно, мРНК-частицы гистонов, осажденные антителами к Paip2, могут представлять смесь различных типов мРНК-частиц: ранних и поздних.

С целью понять, совместно ли Paip2 и TREX-2 привлекаются на мРНК гистонов, был проведен RIP-анализ с антителами к Paip2 и субъединицам TREX-2 при нокдауне Paip2 в S2-клетках (рис. 4б). Как видно из рис. 4в, при нокдауне Paip2 количество Paip2, Xmas-2, PCID2, ENY2, ассоциированных с мРНК гистонов, уменьшалось примерно в 2 раза. Аналогично при нокдауне Xmas-2, структурообразующей субъединицы комплекса TREX-2, количество Paip2, связанного с мРНК гистонов, снижалось примерно в 2 раза (рис. 4г); при этом уменьшалось и количество ассоциированных с мРНК гистонов компонентов TREX-2: как самого Xmas-2, так и ENY2. Таким образом, как нокдаун Paip2, так и нокдаун Xmas-2 приводят к снижению содержания белка Paip2 и субъединиц TREX-2 в мРНК-частицах гистонов. На основании этих данных можно предположить, что Paip2 и TREX-2-комплекс ассоциируют с мРНК-частицами гистонов кооперативным образом. Paip2 может опосредовать взаимодействие TREX-2 с мРНК гистонов, а TREX-2 — стабилизировать взаимодействие Paip2 с мРНК гистонов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенного нами поиска белков, связывающихся с ENY2 *D. melanogaster*, в дрожжевой двугибридной системе найден новый партнер ENY2 — белок Paip2. Paip2 непосредственно связывается с ENY2 и вместе с ним вовлечен в общий процесс в ходе развития дрозофилы. Кроме того, Paip2 взаимодействует с некоторой частью ENY2-содержащих TREX-2-комплексов в клетках *D. melanogaster*. Показано, что при этом Paip2 не влияет на экспорт большей части мРНК и присутствует на политенных хромосомах в ограниченном числе локусов. Учитывая, что комплекс TREX-2 участвует в экспорте основной части мРНК из ядра в цитоплазму, мы предполагаем, что Paip2 в ядре взаимодействует с TREX-2 в регуляции экспорта ограниченного набора мРНК, кодируемых определенными генами.

Белок Paip2 *D. melanogaster* котранскрипционно входит в состав мРНК-частиц и ассоциирован с СБР80, РНК-зависимо привлекаясь на хроматин генов *hsp70*, *DHR3*, *DHR4* и участвуя в регуляции инициации транскрипции и ранней элонгации [29, 30]. Ранее нами показано, что ENY2 через взаимодействие с Sgf11 непосредственно связывается с белком СБР80, ассоциированным с 5'-кэпированным концом мРНК, и участвует в привлечении TREX-2 в мРНК-частицы [17]. Можно предположить, что в ходе созревания мРНК-частиц белок Paip2 взаимодействует как с ENY2-связывающим комплексом СБР—Sgf11, так и с ENY2-содержащим TREX-2. Через ENY2—Sgf11 Paip2 ассоциирует с мРНК-частицей гистонов на раннем этапе элонгации транскрипции, котранскрипционно связываясь с СБР-комплексом на 5'-конце РНК. На более позднем этапе созревания мРНК-частицы Paip2 может участвовать в привлечении комплекса TREX-2 на мРНК [17].

Ранее показано, что TREX-2 необходим для экспорта большинства поли(А)-содержащих мРНК [9], но недавно мы показали, что общий комплекс TREX-2—ORC также ассоциирован с единственными неполиаденилируемыми мРНК в клетке — мРНК, которые кодируются репликативнозависимыми генами гистонов [39]. Белки комплекса TREX-2—ORC связываются с мРНК гистона H3 в 3'-концевой части кодирующей области. Нокдаун Xmas-2, Ogc3, субъединиц TREX-2—ORC, участвующих в связывании с мРНК-частицами основного рецептора экспорта NXF1 [10], вызывает нарушения экспорта мРНК гистонов только в небольшой части клеток. Это можно объяснить тем, что в экспорте мРНК гистонов участвуют альтернативные адаптеры NXF1: SR (serine rich)-белки 9G8 и SRp20 [40] и основной экспортный адаптер ALYREF [41]. Мы обнаружили, что Paip2 наряду с ENY2 присутствует на хроматине в локусе кластера генов гистонов и локализуется в HLB, регулируя экспрессию кластера. Paip2 вместе

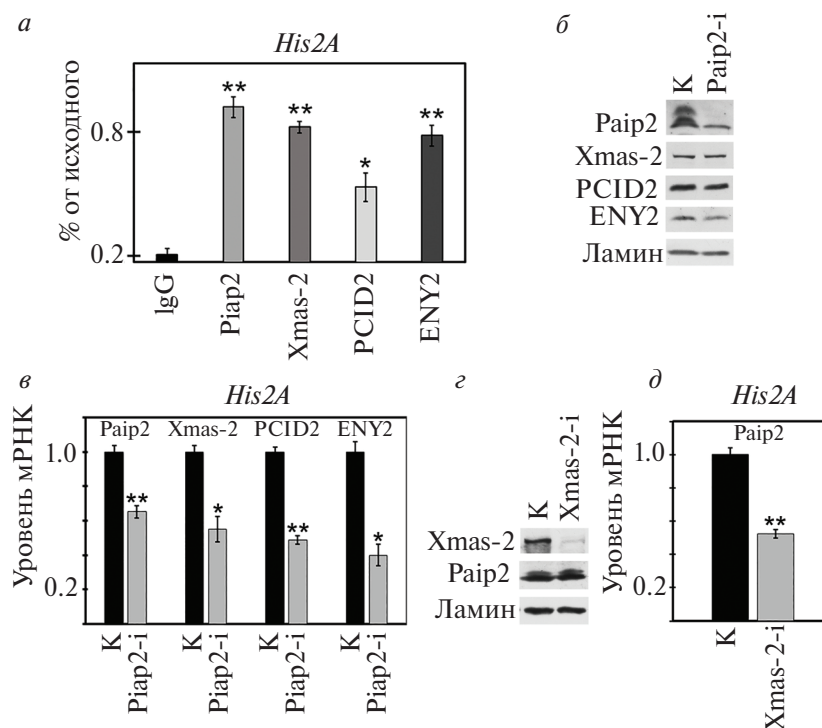


Рис. 4. Белок Paip2 ассоциирован с мРНК-частицами гистонов. *а* – Результаты иммунопреципитации мРНК *His2A* из ядерной фракции S2-клеток антителами к Paip2 и субъединицам Xmas-2, PCID2, ENY2 комплекса TREX-2. В качестве отрицательного контроля использованы IgG кролика. Результаты иммунопреципитации РНК (RIP) представлены в процентах от исходного количества. *б* – Иммуноблотинг лизатов S2-клеток с нокдауном Paip2 (Paip2-i), а также GFP в качестве отрицательного контроля (К). Используются антитела к Paip2, Xmas-2, PCID2 и ENY2. В качестве внутреннего контроля использовано окрашивание антителами к ламину Dm0. *в* – Результаты иммунопреципитации мРНК *His2A* антителами к Paip2, Xmas-2, PCID2, ENY2 при нокдауне Paip2. Представлены уровни мРНК *His2A*, осаждаемой антителами из экстрактов с нокдауном Paip2 (Paip2-i), нормализованные относительно уровня мРНК *His2A*, осаждаемой из экстрактов с нокдауном GFP, принятого за единицу (К). *г* – Иммуноблотинг лизатов S2-клеток с нокдауном Xmas-2 (Xmas-2-i) и нокдауном GFP в качестве отрицательного контроля (К) с использованием антител к Xmas-2 и Paip2. В качестве внутреннего контроля использовано окрашивание антителами к ламину Dm0. *д* – Результаты иммунопреципитации мРНК-частиц гена *His2A* антителами к Paip2 при нокдауне Xmas-2. Представлены уровни мРНК *His2A*, осаждаемой антителами из экстрактов с нокдауном Xmas-2 (Xmas-2-i), нормализованные относительно уровня мРНК *His2A*, осаждаемой из экстрактов с нокдауном GFP, принятого за единицу (К). Все данные на графиках представлены как среднее значение $\pm$ SD; для сравнения данных контроля и эксперимента использован *t*-критерий Стьюдента; **p*-value < 0.05, ***p*-value < 0.01.

с субъединицами комплекса TREX-2 ассоциирует с мРНК-частицами гистонов. Нокдаун Paip2 приводит к уменьшению связывания TREX-2 с мРНК гистонов и, следовательно, может вызывать нарушение ее экспорта из ядра и тем самым влиять на уровень гистонов в цитоплазме. Экспрессия генов гистонов четко коррелирует с репликацией ДНК. Даже незначительные изменения в синтезе гистонов приводят к повреждениям ДНК, нарушениям клеточного цикла и пролиферации клеток [31].

Недавно показано, что у человека экспрессия ENY2 значительно повышена при различных онкологических заболеваниях, таких как рак яичника [42] и гепатоцеллюлярная карцинома [43]. Повышенная экспрессия ENY2 может способствовать пролиферации, миграции и инвазии клеток рака молочной железы [43, 44]. ENY2 проявляет двойственную роль при различных видах злокачественных опухолей, в одних случаях способствуя,

а в других замедляя их развитие. ENY2 может служить потенциальным диагностическим и прогностическим биомаркером течения заболевания [45]. Интересно, что у человека PAIP2 также вовлечен в пролиферацию и дифференцировку клеток [28]. Экспрессия PAIP2 повышена в тканях и в клетках рака молочной железы. PAIP2, как и ENY2, способствует пролиферации и инвазии клеток рака молочной железы, причем уровень экспрессии обоих белков увеличивается по мере развития опухоли [46]. Также было показано, что экспрессия главного кластера генов гистонов значительно повышена в модели прогрессии рака молочной железы на основе клеток MCF10A человека [47]. Выявленное нами взаимодействие между ENY2 и Paip2 *D. melanogaster*, эволюционная консервативность системы регуляции экспрессии репликативнозависимых генов гистонов [31], повышенная экспрессия кластера гистоновых генов в клетках рака молочной железы,

схожие паттерны экспрессии ENY2 и PAIP2 в клетках рака молочной железы позволяют предположить, что в клетках человека ENY2 и PAIP2 также могут совместно участвовать в регуляции экспрессии генов гистонов. Возможно, что в клетках рака молочной железы повышенная экспрессия ENY2 и PAIP2 способствует увеличению экспорта мРНК гистонов из ядра. Это приводит к повышенному синтезу гистонов, что необходимо для активной пролиферации клеток.

Дрожжевой двугибридный скрининг, эксперименты по *in vitro* связыванию белков были выполнены при поддержке гранта РНФ № 20-14-00269 (Краснов А.Н.), все остальные эксперименты были выполнены при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-24-00721 (Куршакова М.М.).

В соответствии с п. 3 главы 1 Директивы 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, требования биоэтики не распространяются на объект данного исследования (*Drosophila melanogaster*). Антитела от кроликов и мышей получены нами в виварии Института биологии гена Российской академии наук, имеющем все необходимые сертификаты для проведения работ с животными. При проведении иммунизации были соблюдены все этические нормы работы с животными.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kopytova D.V., Krasnov A.N., Orlova A.V., Gurskiy D. Ya., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. (2010) ENY2: couple, triple...more? *Cell Cycle*. **9**, 479–481.
- Galán A., Rodríguez-Navarro S. (2012) Sus1/ENY2: a multitasking protein in eukaryotic gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **47**, 556–568.
- Fischer T. (2002) The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. *EMBO J.* **21**, 5843–5852.
- Kurshakova M.M., Krasnov A.N., Kopytova D.V., Shidlovskii Y.V., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Spohner D., Schultz P., Tora L., Georgieva S.G. (2007) SAGA and a novel *Drosophila* export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC. *EMBO J.* **26**, 4956–4965.
- Lu Q., Tang X., Tian G., Wang F., Liu K., Nguyen V., Kohalmi S.E., Keller W.A., Tsang E.W., Harada J.J., Rothstein S.J., Cui Y. (2009) Arabidopsis homolog of the yeast TREX-2 mRNA export complex: components and anchoring nucleoporin: TREX-2 mRNA export complex. *Plant J.* **61**, 259–270.
- Jani D., Lutz S., Hurt E., Laskey R.A., Stewart M., Wickramasinghe V.O. (2012) Functional and structural characterization of the mammalian TREX-2 complex that links transcription with nuclear messenger RNA export. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4562–4573.
- Ellisdon A.M., Dimitrova L., Hurt E., Stewart M. (2012) Structural basis for the assembly and nucleic acid binding of the TREX-2 transcription-export complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 328–336.
- Wickramasinghe V.O., Stewart M., Laskey R.A. (2010) GANP enhances the efficiency of mRNA nuclear export in mammalian cells. *Nucleus*. **1**, 393–396.
- Stewart M. (2019) Structure and function of the TREX-2 complex. *Subcell. Biochem.* **93**, 461–470. doi: 10.1007/978-3-030-28151-9_15
- Kopytova D., Popova V., Kurshakova M., Shidlovskii Y., Nabirochkina E., Brechalov A., Georgiev G., Georgieva S. (2016) ORC interacts with THSC/TREX-2 and its subunits promote Nxf1 association with mRNP and mRNA export in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* **44**, 4920–4933.
- Zhao Y., Lang G., Ito S., Bonnet J., Metzger E., Sawat-subashi S., Suzuki E., Le Guezennec X., Stunnenberg H.G., Krasnov A., Georgieva S.G., Schüle R., Takeyama K., Kato S., Tora L., Devys D. (2008) A TIFC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, co-activates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol. Cell.* **29**, 92–101.
- Pfah A., Bruckmann A., Nazet J., Merkl R., Grasser K.D. (2018) The adaptor protein ENY2 is a component of the deubiquitination module of the *Arabidopsis* SAGA transcriptional co-activator complex but not of the TREX-2 complex. *J. Mol. Biol.* **430**, 1479–1494.
- Atanassov B.S., Mohan R.D., Lan X., Kuang X., Lu Y., Lin K., McIvor E., Li W., Zhang Y., Florens L., Byrum S.D., Mackintosh S.G., Calhoun-Davis T., Koutelou E., Wang L., Tang D.G., Tackett A.J., Washburn M.P., Workman J.L., Dent S.Y. (2016) ATXN7L3 and ENY2 coordinate activity of multiple H2B deubiquitinases important for cellular proliferation and tumor growth. *Mol. Cell.* **62**, 558–571.
- Ellisdon A.M., Jani D., Köhler A., Hurt E., Stewart M. (2010) Structural basis for the interaction between yeast Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase (SAGA) complex components Sgf11 and Sus1. *J. Biol. Chem.* **285**, 3850–3856.
- Galán A., García-Oliver E., Nuño-Cabanes C., Rubinstein L., Kupiec M., Rodríguez-Navarro S. (2018) The evolutionarily conserved factor Sus1/ENY2 plays a role in telomere length maintenance. *Curr. Genet.* **64**, 635–644.
- Kopytova D.V., Orlova A.V., Krasnov A.N., Gurskiy D. Ya., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Shidlovskii Y.V., Georgieva S.G. (2010) Multifunctional factor ENY2 is associated with the THO complex and promotes its recruitment onto nascent mRNA. *Genes Dev.* **24**, 86–96.
- Gurskiy D., Orlova A., Vorobyeva N., Nabirochkina E., Krasnov A., Shidlovskii Y., Georgieva S., Kopytova D. (2012) The DUBm subunit Sgf11 is required for mRNA export and interacts with Cbp80 in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10689–10700.
- Khaleghpour K., Svitkin Y.V., Craig A.W., DeMaria C.T., Deo R.C., Burley S.K., Sonenberg N. (2001) Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Mol. Cell.* **7**, 205–216.
- Kozlov G., De Crescenzo G., Lim N.S., Siddiqui N., Fantus D., Kahvejian A., Trempe J.F., Elias D., Ekiel I., Sonenberg N., O'Connor-McCourt M., Gehring K. (2004) Structural basis of ligand recognition by PABC, a highly specific peptide-binding domain found in poly(A)-binding protein and a HECT ubiquitin ligase. *EMBO J.* **23**, 272–281.
- Khaleghpour K., Kahvejian A., De Crescenzo G., Roy G., Svitkin Y.V., Imataka H., O'Connor-McCourt M., Sonenberg N. (2001) Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5200–5213.

21. Karim M.M., Svitkin Y.V., Kahvejian A., De Crescenzo G., Costa-Mattioli M., Sonenberg N. (2006) A mechanism of translational repression by competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) binding protein (PABP) binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 9494–9499.
22. Ivanov A., Shuvalova E., Egorova T., Shuvalov A., Sokolova E., Bizyaev N., Shatsky I., Terenin I., Alkalaeva E. (2019) Polyadenylate-binding protein-interacting proteins PAIP1 and PAIP2 affect translation termination. *J. Biol. Chem.* **294**, 8630–8639.
23. Polacek C., Friebe P., Harris E. (2009) Poly(A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *J. Gen. Virol.* **90**, 687–692.
24. Onesto C., Berra E., Grépin R., Pagès G. (2004) Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *J. Biol. Chem.* **279**, 34217–34226.
25. Gouyon F., Onesto C., Dalet V., Pages G., Leturque A., Brot-Laroche E. (2003) Fructose modulates GLUT5 mRNA stability in differentiated Caco-2 cells: role of cAMP-signaling pathway and PABP (polyadenylated-binding protein)-interacting protein (Paip) 2. *Biochem. J.* **375**, 167–174.
26. Alvarez-Saavedra M., Antoun G., Yanagiya A., Oliva-Hernandez R., Cornejo-Palma D., Perez-Iratxeta C., Sonenberg N., Cheng H.-Y.M. (2011) miRNA-132 orchestrates chromatin remodeling and translational control of the circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 731–751.
27. Berlanga J.J., Baass A., Sonenberg N. (2006) Regulation of poly(A) binding protein function in translation: characterization of the Paip2 homolog, Paip2B. *RNA*. **12**, 1556–1568.
28. Roy G., Miron M., Khaleghpour K., Lasko P., Sonenberg N. (2004) The *Drosophila* poly(A) binding protein-interacting protein, dPaip2, is a novel effector of cell growth. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1143–1154.
29. Kachaev Z.M., Lebedeva L.A., Kozlov E.N., Toropygin I.Y., Schedl P., Shidlovskii Y.V. (2018) Paip2 is localized to active promoters and loaded onto nascent mRNA in *Drosophila*. *Cell Cycle*. **17**, 1708–1720.
30. Kachaev Z.M., Lebedeva L.A., Shaposhnikov A.V., Moresco J.J., Yates J.R., Schedl P., Shidlovskii Y.V. (2019) Paip2 cooperates with Cbp80 at an active promoter and participates in RNA polymerase II phosphorylation in *Drosophila*. *FEBS Lett.* **593**, 1102–1112.
31. Duronio R.J., Marzluff W.F. (2017) Coordinating cell cycle-regulated histone gene expression through assembly and function of the Histone Locus Body. *RNA Biol.* **14**, 726–738.
32. Georgieva S., Nabirochkina E., Dilworth F.J., Eickhoff H., Becker P., Tora L., Georgiev P., Soldatov A. (2001) The novel transcription factor e(y)2 interacts with TAF_{II}40 and potentiates transcription activation on chromatin templates. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5223–5231.
33. Glukhova A.A., Kurshakova M.M., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Kopytova D.V. (2021) PCID2, a subunit of the *Drosophila* TREX-2 nuclear export complex, is essential for both mRNA nuclear export and its subsequent cytoplasmic trafficking. *RNA Biol.* **18**, 1969–1980.
34. MacAlpine D.M., Rodríguez H.K., Bell S.P. (2004) Coordination of replication and transcription along a *Drosophila* chromosome. *Genes Dev.* **18**, 3094–3105.
35. Platero J.S., Sharp E.J., Adler P.N., Eissenberg J.C. (1996) *In vivo* assay for protein-protein interactions using *Drosophila* chromosomes. *Chromosoma*. **104**, 393–404.
36. Clemens J.C., Worby C.A., Simonson-Leff N., Muda M., Maehama T., Hemmings B.A., Dixon J.E. (2000) Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 6499–6503.
37. Baroni T.E., Chittur S.V., George A.D., Tenenbaum S.A. (2008) Advances in RIP-chip analysis: RNA-binding protein immunoprecipitation-microarray profiling. *Methods Mol. Biol.* **419**, 93–108.
doi: 10.1007/978-1-59745-033-1_6
38. Kurshakova M., Maksimenko O., Golovnin A., Pulina M., Georgieva S., Georgiev P., Krasnov A. (2007) Evolutionarily conserved E(y)2/Sus1 protein is essential for the barrier activity of Su(Hw)-dependent insulators in *Drosophila*. *Mol. Cell.* **27**, 332–338.
39. Kurshakova M.M., Yakusheva Y.A., Georgieva S.G. (2024) TREX-2-ORC complex of *D. melanogaster* participates in nuclear export of histone mRNA. *Dokl. Biochem. Biophys.* **514**, 11–15.
<https://doi.org/10.1134/S160767292370059X>
40. Huang Y., Steitz J.A. (2001) Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol. Cell.* **7**, 899–905.
41. Fan J., Wang K., Du X., Wang J., Chen S., Wang Y., Shi M., Zhang L., Wu X., Zheng D., Wang C., Wang L., Tian B., Li G., Zhou Y., Cheng H. (2019) ALYREF links 3'-end processing to nuclear export of non-polyadenylated mRNAs. *EMBO J.* **38**, e99910.
42. De Marco C., Zoppoli P., Rinaldo N., Morganello S., Morrello M., Zuccalà V., Carriero M.V., Malanga D., Chirillo R., Bruni P., Malzoni C., Di Vizio D., Venturella R., Zullo F., Rizzuto A., Ceccarelli M., Ciliberto G., Viglietto G. (2021) Genome-wide analysis of copy number alterations led to the characterisation of PDCD10 as oncogene in ovarian cancer. *Transl. Oncol.* **14**, 101013.
43. Li J.-H., Tao Y.F., Shen C.H., Li R.D., Wang Z., Xing H., Ma E.S., Xue H.Y., Zhang Q.B., Ma Z.Y., Wang Z.X. (2022) Integrated multi-omics analysis identifies ENY2 as a predictor of recurrence and a regulator of telomere maintenance in hepatocellular carcinoma. *Front. Oncol.* **12**, 939948.
44. Xie G., Yang H., Ma D., Sun Y., Chen H., Hu X., Jiang Y., Shao Z. (2019) Integration of whole-genome sequencing and functional screening identifies a prognostic signature for lung metastasis in triple-negative breast cancer. *Int. J. Cancer.* **145**, 2850–2860.
45. Chen Q., Shi X., Bao Y., Sun G., Wu S., Chen Y. (2023) An integrative analysis of enhancer of yellow 2 homolog (ENY2) as a molecular biomarker in pan-cancer. *Funct. Integr. Genomics.* **23**, 72.
46. Wang C., Jiang X., Qi J., Xu J., Yang G., Mi C. (2022) PAIP2 is a potential diagnostic and prognostic biomarker of breast cancer and is associated with immune infiltration. *Front. Genet.* **13**, 1009056.
47. Fritz A.J., Ghule P.N., Boyd J.R., Tye C.E., Page N.A., Hong D., Shirley D.J., Weinheimer A.S., Barutcu A.R., Gerrard D.L., Fietze S., van Wijnen A.J., Zaidi S.K., Imbalzano A.N., Lian J.B., Stein J.L., Stein G.S. (2018) Intracellular and higher-order chromatin organization of the major histone gene cluster in breast cancer. *J. Cell. Physiol.* **233**, 1278–1290.

Paip2 PROTEIN OF *Drosophila melanogaster* BINDS ENY2 PROTEIN AND INTERACTS WITH TREX-2 COMPLEX IN HISTONE mRNP PARTICLES

M. M. Kurshakova^{1, *}, A. N. Krasnov², E. N. Nabirochkina², S. G. Georgieva¹

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

²Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: kursha@mail.ru

ENY2 is an evolutionarily conserved multifunctional protein that is a member of several complexes regulating different stages of gene expression. ENY2 is a subunit of the TREX-2 complex, which is necessary for the export of bulk mRNA from the nucleus to the cytoplasm through the nuclear pores in many eukaryotes. The wide range of ENY2 functions suggests that it may also associate with other protein factors or complexes. Aiming to search for proteins that interact with ENY2, a cDNA library was screened in a yeast two-hybrid system. As a result, ENY2 was found to interact with the RNA-binding protein Paip2. Paip2 directly binds to ENY2 *in vitro* and interacts with ENY2 *in vivo* at the molecular and genetic level. Paip2 is capable to associate with the ENY2-containing TREX-2 complex. We found that Paip2 protein is present at the histone gene cluster locus, both Paip2 and ENY2 are detected at the histone locus body (HLB), a nuclear structure where coordinated histone mRNA transcription and processing take place. Paip2 and the subunits of the TREX-2 complex associate with histone mRNP particles. RNA-interference knockdown of Paip2 results in decreased binding of TREX-2 subunits to histone mRNPs. Thus, Paip2 is a new partner protein of ENY2 within the TREX-2 complex and participates in TREX-2 binding to histone mRNPs.

Keywords: Paip2, ENY2, TREX-2, Xmas-2, HLB, nuclear body, histone genes, histone mRNA

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 575.826

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ArdA К РАЗЛИЧНЫМ СИСТЕМАМ РЕСТРИКЦИИ МОДИФИКАЦИИ I ТИПА

© 2024 г. А. А. Кудрявцева^а, А. В. Власов^{а, б, с}, Е. В. Зиновьев^а, Д. Д. Яновская^д, А. А. Уткина^а,
С. М. Расторгуев^е, И. В. Манухов^{а, б, *}

^аМосковский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Московская обл., 141707 Россия

^бРосбиотех, Москва, 125080 Россия

^сОбъединенный институт ядерных исследований, Дубна, Московская обл., 141980 Россия

^дСколковский институт науки и технологий, 143028 Россия

^еРоссийский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова, Москва, 117997 Россия

*e-mail: manukhovi@mail.ru

Поступила в редакцию 11.11.2023 г.

После доработки 06.12.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2023 г.

ДНК-мимикрирующие антирестриктазы ArdA способны ингибировать системы рестрикции-модификации первого типа (RMI), связываясь с их комплексами вместо ДНК. Однако специфичность белков ArdA в отношении сайтов метилирования ДНК, узнаваемых комплексами RMI, не изучена, т.е. не установлено, может ли ArdA мимикрировать под конкретный сайт ДНК. В настоящей работе нами клонированы гены *ardA* трех грамположительных бактерий (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas monteilii* и *Xanthomonas* sp.) и охарактеризована их антирестрикционная активность против трех RMI систем *Escherichia coli*, имеющих разные сайты узнавания/метилования ДНК. Показано, что исследуемые белки ArdA, несмотря на сходство их предсказанной пространственной структуры, обладают существенной специфичностью к различным RMI-системам. Полученные результаты могут свидетельствовать о способности ДНК-миметиков имитировать определенные сайты ДНК.

Ключевые слова: антирестрикция, RMI, ArdA, ДНК-мимикрия

DOI: 10.31857/S0026898424030107, EDN: JCEPFL

ВВЕДЕНИЕ

Широко распространенные гены белков ArdA встречаются как в плаزمиде (в основном конъюгативных), так и в хромосоме бактерий [1]. Белки семейства ArdA подавляют активность систем рестрикции-модификации I типа (RMI) [2], они относятся к ДНК-миметикам, т.е. структурно и электростатически имитируют В-форму ДНК и за счет этого функционируют как конкурентные ингибиторы ферментов рестрикции [3, 4]. Влияние аминокислотной последовательности ДНК-мимикрирующих белков на способность к антирестрикции довольно подробно изучена на примере генов *ardA* и *ocr* [4–7]. В основном выявлено влияние отрицательно заряженных аминокислот (мимикрирующих под сахарофосфатный остов ДНК) и интерфэйс [6] димеризации антирестриктазы.

Специфичность генов *ardA* трех разных бактерий в отношении трех RMI-систем изучена нами в гетерологичной системе *Escherichia coli*.

В работе использовали три гомолога ArdA грамположительных бактерий, имеющие схожий фактор и отличающиеся от “классических” ArdA (как из конъюгативной плазмиды pKM101 [8] или транспозона Tn916 [3]) дополнительной вставкой на С-конце. Гены исследованных белков ArdA, как и гены ряда других гомологичных белков ArdA грамположительных бактерий, локализованы в хромосоме бактерий (например, у *Bifidobacterium bifidum* [9] или *Pseudomonas putida*, причем аминокислотная последовательность ArdA *P. putida* полностью совпадает с ArdA_{Pm}, согласно базе данных NCBI).

Исследованные RM-системы различаются сайтами узнавания/метилования, поэтому возможность ингибировать все три RMI-системы каждым из трех белков ArdA с равной эффективностью означала бы отсутствие специфичности по отношению к сайту узнавания на ДНК. И, напротив, наличие такой специфичности означало бы способность белков ArdA преимущественно ингибировать ферменты, узнающие конкретный сайт на ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы и условия культивирования. Штамм *E. coli* TG1 (K-12 glnV44 thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5(rK-mK-) F' [traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15]) использовали для клонирования генов *ardA* и размножения фага λ.

Штаммы *Agrobacterium tumefaciens* B-8833, *P. monteilii* B-4116 и *Xanthomonas* sp. B-6725 использовали в качестве доноров генов *ardA*. Все штаммы получены из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов.

Клонирование генов. Гены, аннотированные как *ardA*, были клонированы из ДНК бактерий *A. tumefaciens*, *P. monteilii* и *Xanthomonas* sp. и получили названия *ardA_At*, *ardA_Pm* и *ardA_Xs* соответственно. Перечисленные гены клонировали по липким Т-концам в коммерческий вектор pKAN-T ("Евроген", Россия) и экспрессировали под промотором P_{lac} . В результате получили плазмиды pArdA_At, pArdA_Pm и pArdA_Xs.

Оценка антирестрикционной активности. С целью проверки антирестрикционной активности генов *ardA_At*, *ardA_Pm* и *ardA_Xs* против трех RMI грамотрицательных бактерий – EcoKI, EcoAI и EcoR124II – проводили посев немодифицированного фага λ₀ на три типа клеток штамма TG1: бесплазмидные; с плазмидами, несущими гены RMI-систем; с плазмидами, несущими гены RMI и гены *ardA_At*, *ardA_Pm* и *ardA_Xs* (табл. 1). Посев фага и подсчет эффективности посева фага (ЕОР) проводили согласно [10].

Моделирование. Моделирование комплекса S-субъединицы каждой из EcoKI RMI-системы с димером антирестрикционного белка ArdA_Xs выполнено с помощью локальной версии программы ColabFold v1.5.3 [11–13] с параметрами num-seeds 5 и num-recycle 3. Из полученных в результате моделирования 25 структур для дальнейшего анализа отобрали структуры, имеющие наибольшее количество очков (rank 1). Качество моделей, предсказанных AlphaFold с приведением pLDDT score, представлено на рис. S1 (см. Дополнительные

материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/3/supp_Kudryavtseva_rus.pdf).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Аминокислотные последовательности белков ArdA_At, ArdA_Pm, ArdA_Xs были выровнены с использованием сервиса MView на сайте EMBL-EBI с последовательностью первого открытого белка ArdA, кодируемого конъюгативной плазмидой pKM101 (ArdA_pKM101)), кристаллическая структура которого известна [3]. Результаты выравнивания представлены на рис. 1.

Структуры ArdA_At, ArdA_Pm, ArdA_Xs смоделированы в программе AlphaFold. Далее с помощью PyMOL v1.9 выполнено выравнивание полученных структур с известной структурой ArdA_Tn916 (PDB2W82) [3] (рис. 2).

Как видно из рис. 1 и 2, формфакторы предсказанных структур практически полностью совпадают, несмотря на малое количество идентичных аминокислот (не более 21%).

Для оценки антирестрикционной активности генов *ardA_At*, *ardA_Pm* и *ardA_Xs* клетки *E. coli* TG1 трансформировали плазмидами, перечисленными в табл. 1, и проводили посев немодифицированного фага λ₀. На рис. 3 представлены результаты посева фага, посчитанные как $EOP = Y/X$, где Y – число негативных фаговых колоний на чашке с исследуемым штаммом; X – число негативных фаговых колоний на чашке с *E. coli* TG1.

На рис. 3 представлена эффективность посева немодифицированного фага λ₀ на клетки *E. coli* TG1, содержащие плазмиды, несущие гены рестрикции, а также гены рестрикции и антирестрикции. Из рис. 3 видно, что присутствие гена *ardA_Xs* подавляет работу RMI-систем EcoKI и EcoR124II, но не влияет на EcoAI. Стоит отметить, что из трех исследованных генов только *ardA_Xs* оказался активным против EcoR124II. Напротив, *ardA_Pm* с примерно равной эффективностью ингибирует RMI-системы EcoKI и EcoAI, но не EcoR124II. Ген *ardA_At* подавляет рестрикционную активность

Таблица 1. Плазмиды, использованные в работе

Плаزمида	Описание	Источник
pACYCEcoKI	Вектор pACYC184, содержащий гены, определяющие синтез IA RMI-системы EcoKI. См [†] .	[11]
pAM35	Вектор pACYC184, содержащий гены, определяющие синтез IB RMI-системы EcoAI. См [†] .	[11]
pKF650	Вектор pACYC184, содержащий гены, определяющие синтез IC RMI-системы EcoR124II. См [†] .	[12]
pArdA_At	Вектор pKAN-T, содержащий ген <i>ardA_At</i> . Km [†] .	Эта работа
pArdA_Pm	Вектор pKAN-T, содержащий ген <i>ardA_Pm</i> . Km [†] .	Эта работа
pArdA_Xs	Вектор pKAN-T, содержащий ген <i>ardA_Xs</i> . Km [†] .	Эта работа

Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей, кодируемых генами *ardA* конъюгативной плазмиды pKM101, транспозона Tn916, *A. tumefaciens*, *P. monteilii* и *Xanthomonas* sp. (-) – отсутствие гомологичной аминокислоты, значение Cov показывает процент покрытия каждой последовательности, pid – содержание (%) идентичных аминокислот.



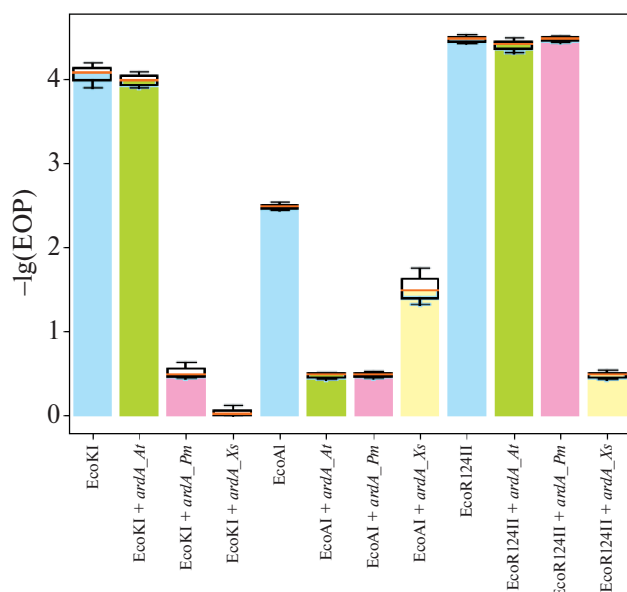


Рис. 3. Эффективность посева немодифицированного фага λ на клетки *E. coli* TG1, содержащие плазмиды, несущие гены рестрикции и гены рестрикции и антирестрикции: EcoKI-pACYCEcoKI; EcoKI + *ardA_At* – pACYCEcoKI, pArdA_At; EcoKI + *ardA_Pm* – pACYCEcoKI, pArdA_Pm; EcoKI + *ardA_Xs* – pACYCEcoKI, pArdA_Xs; EcoAI – pAM35; EcoAI + *ardA_At* – pAM35, pArdA_At; EcoAI + *ardA_Pm* – pAM35, pArdA_Pm; EcoAI + *ardA_Xs* – pAM35, pArdA_Xs; EcoR124II – pKF650; EcoR124II + *ardA_At* – pKF650 + pArdA_At; EcoR124II + *ardA_Pm* – pKF650 + pArdA_Pm; EcoR124II + *ardA_Xs* – pKF650 + pArdA_Xs.

лишь системы EcoAI. Таким образом, можно заключить, что продукты генов *ardA* проявляют избирательность по отношению к ингибируемым ферментам рестрикции-модификации.

Чтобы подтвердить наблюдаемый эффект специфичности, мы сравнили эффективность антирестрикторного эффекта против двух RMI-систем EcoR124I и EcoR124II, которые имеют идентичные субъединицы HsdM/R и практически идентичные субъединицы HsdS, но отличаются сайтами узнавания на ДНК: GAA(N)6RTCG для EcoR124I и GAA(N)7RTCG для EcoR124II [17]. Результаты посевов неметилированного фага λ на клетки, содержащие RMI-систему EcoR124I (плазмиды pEcoR124I[18]) и EcoR124II, представлены на рис. 4.

Из рис. 4 видно, что все исследованные гены снижают рестрикторный эффект EcoR124I, однако в отличие от EcoR124II присутствие гена *ardA_Xs* оказывает более сильное действие на систему EcoR124II. Ввиду того, что RMI-системы EcoR124I и EcoR124II существенно различаются лишь расстоянием между двумя доменами, распознающими ДНК в субъединице HsdS, можно предположить

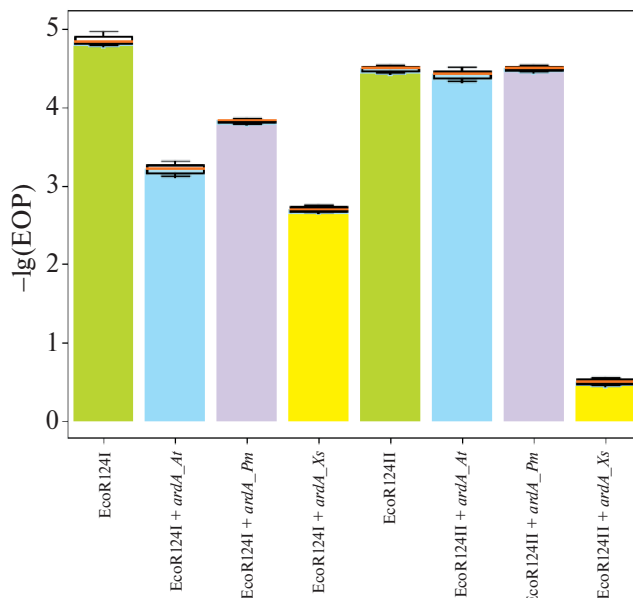


Рис. 4. Эффективность посева немодифицированного фага λ на клетки *E. coli* TG1, содержащие плазмиды, несущие гены рестрикции и гены рестрикции и антирестрикции: EcoR124I – pEcoR124I; EcoR124I + *ardA_At* – pEcoR124I + pArdA_At; EcoR124I + *ardA_Pm* – pEcoR124I + pArdA_Pm; EcoR124I + *ardA_Xs* – pEcoR124I + pArdA_Xs; EcoR124II – pKF650; EcoR124II + *ardA_At* – pKF650 + pArdA_At; EcoR124II + *ardA_Pm* – pKF650 + pArdA_Pm; EcoR124II + *ardA_Xs* – pKF650 + pArdA_Xs.

существование специфичности различных вариантов белка ArdA к архитектуре ДНК-распознающего домена субъединицы HsdS.

Поскольку наилучший результат антирестрикции получен для пары EcoKI с ArdA-Xs, далее провели моделирование комплекса этих белков с помощью программы AlphaFold (рис. 5).

Выполнено выравнивание в PyMOL v.1.9 структуры комплекса S-субъединицы рестриктазы EcoKI и димера антирестриктазы ArdA_Xs со структурой полного комплекса EcoKI-ДНК (PDB5YBB) [19]. Из структуры (PDB5YBB) для выравнивания использована только S-субъединица с ДНК.

Выравнивание структур выявило возможные межбелковые контакты в местах наибольшего сближения S-субъединицы комплекса EcoKI с ДНК. Так, например, вероятными местами контактов и образования водородных связей являются аминокислотные остатки I42 и S43 S-субъединицы комплекса EcoKI и E169 ArdA_Xs (рис. 5б), рассматриваемые как потенциальная причина ингибирования рестрикторной активности EcoKI и предотвращения ее связывания с ДНК (рис. 5б). Также в “симметричном” участке S-субъединицы

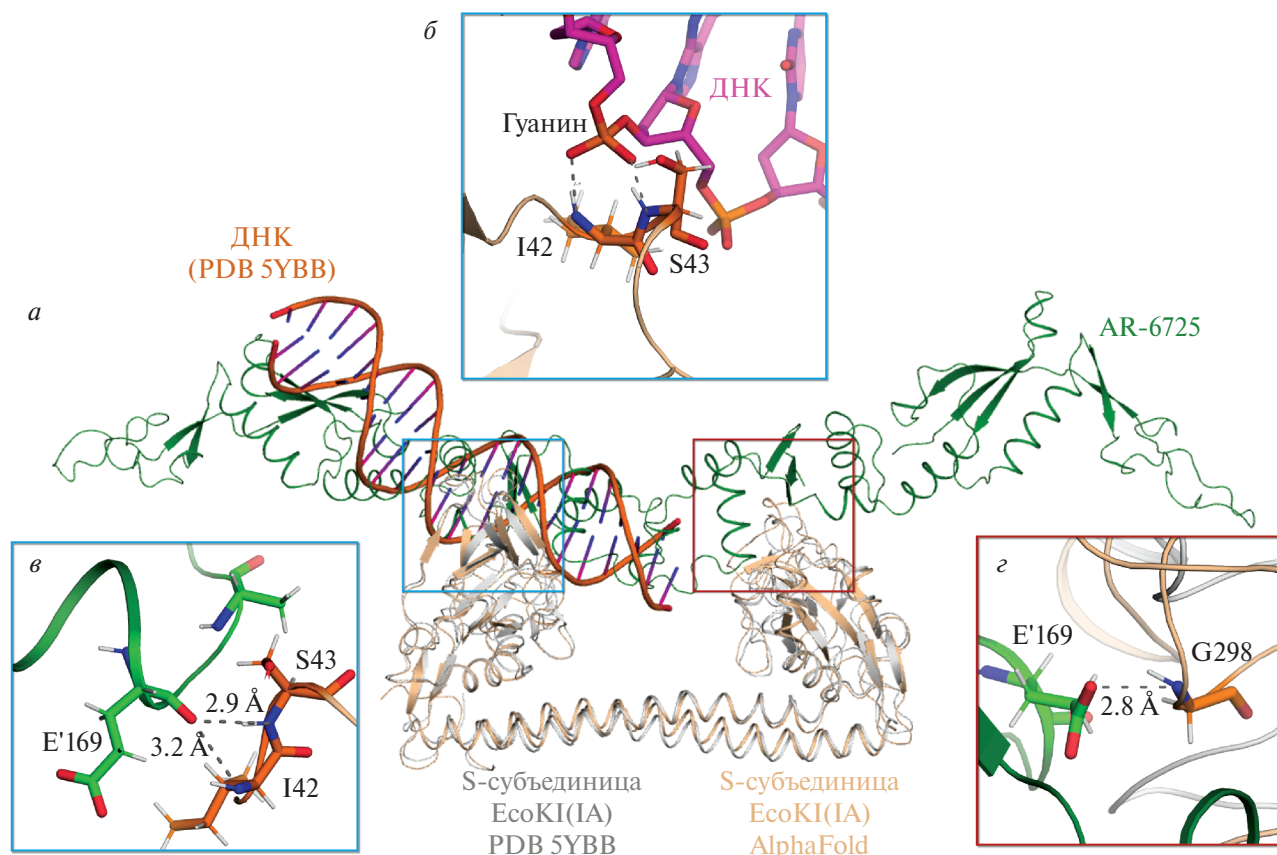


Рис. 5. Выравнивание структуры комплекса S-субъединицы EcoKI с димером ArdA_Xs со структурой PDB (5YBB): S-субъединицей комплекса EcoKI, связанной с фрагментом ДНК. *а* – Общий вид выравнивания (зеленым цветом показаны ArdA_Xs; желтым – S-субъединица EcoKI, полученная в AlphaFold; серым – S-субъединица EcoKI из PDB (5YBB)). *б* – Возможная схема межбелковых контактов ArdA_Xs и S-субъединицы комплекса EcoKI в сравнении с PDB-структурой комплекса белок-ДНК. *в* – Те же контакты ArdA_Xs и S-субъединицы EcoKI (смоделированной в AlphaFold) без наложения PDB-структуры комплекса белок-ДНК. *г* – Предположительная схема межбелковых контактов ArdA_Xs и S-субъединицы комплекса EcoKI на другом, симметричном, участке S-субъединицы.

местом контакта являются предположительно G298 S-субъединицы комплекса EcoKI и E169 второй ArdA_Xs (рис. 5г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что ДНК-миметики способны специфично ингибировать различные ДНК-связывающие белки. Например, Ugi (*Bacillus subtilis*) ингибирует фермент урацил-ДНК-гликозилазу [20], DinI (*E. coli*) взаимодействует с белком RecA [21], HI1450 (*Haemophilus influenzae*) формирует комплекс с белком Nu-α, конкурируя с ДНК [22]. В целом способность ДНК-мимикрирующих белков специфично ингибировать различные ДНК-связывающие белки делает их перспективным инструментом для регуляции ряда внутриклеточных процессов, в том числе экспрессии генов. В обзоре [1] рассмотрены такие прикладные аспекты применения ДНК-мимикрирующих белков, как ингибирование горизонтального переноса генов лекарственной устойчивости, исследование структуры комплексов

с ДНК-связывающими белками (за счет стабилизации подвижных участков), модуляция активности специфических групп ДНК-зависимых ферментов, увеличение эффективности трансформации бактерий немодифицированной ДНК и, наконец, в медицинских приложениях как для диагностики, так и терапии (например, для ингибирования в клетке специфических ферментов и соответствующих биохимических процессов).

Нами показана способность трех генов *ardA* ингибировать различные RMI-системы с разной эффективностью. Это может объясняться лишь структурными различиями исследуемых белков ArdA. Учитывая, что формфактор предсказанных структур ArdA белков практически полностью совпадает (рис. 2), можно предположить существование небольших специфических структурных различий, способных мимикрировать под конкретный сайт узнавания RMI-системы.

Результаты исследования специфичности белков ArdA к RMI-системам EcoR124I и EcoR124II, различающихся только сайтами узнавания, представленные на рис. 4, свидетельствуют о существенном

вкладе этого компонента (небольших структурных различий) в эффект антирестрикции. Следует отметить, что разница в ингибировании RMI-систем EcoR124I и EcoR124II несколько меньше, чем при проверке менее схожих друг с другом комплексов EcoKI, EcoR124II и EcoAI. Этот факт означает, что субъединицы HsdS RMI-систем не только обладают разной специфичностью к ДНК, но имеют и структурные отличия, которые могут быть причиной специфичности взаимодействия с ArdA. Большинство сайт-специфичных ферментов способны сайт-неспецифично связывать ДНК, поэтому разумно предположить, что с эволюционной точки зрения мимикрия антирестрикторных белков под конкретный ДНК-сайт может быть проигрышной стратегией, однако это скорее философский спор о том, что лучше: узкий, но высококласный специалист, или широкопрофильный универсал, являющийся, однако, дилетантом в каком-то конкретном случае. Возможно, эволюция некоторых автономно реплицирующихся генетических элементов, имеющих узкий спектр хозяев, происходит по первому сценарию, что приводит к возникновению антирестрикторных белков, оптимальным образом приспособленных к ДНК-распознающим доменам определенных RM-систем.

Моделирование пространственной структуры комплекса EcoKI и димера белка ArdA_Xs позволило предсказать аминокислотные остатки, участвующие в обеспечении этой специфичности. AlphaFold довольно неплохо показывает себя в предсказании белок-белковых взаимодействий и в связке с молекулярной динамикой может использоваться для предсказания белок-белковых взаимодействий. Исходя из результатов моделирования комплекса EcoKI и димера белка ArdA_Xs, остаток глутамата E169 у ArdA_Xs можно рассматривать как кандидат на связывание с S-субъединицей EcoKI. В дальнейшем стоит проверить влияние мутации E169 на связывание EcoKI с ArdA_Xs. Отметим, что E169 представлен у обоих антирестрикторных белков — ArdA_pKM101 и ArdA_Xs, эффективно работающих против EcoKI (рис. 3) [23].

В заключение следует отметить, что полученные данные дают представление о перспективности использования генов типа *ardA* в качестве основы для дизайна белков, специфически ингибирующих ДНК-связывающие регуляторы.

Работа КАА и УАА по проверке антирестрикторной активности генов *ardA* выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-00027). Работа МИВ по написанию и редактированию рукописи выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FSMF-2023-0010).

Работа ЯДД по работе с EcoR124I RMI-системой выполнена при поддержке гранта Министерства Науки и Высшего Образования (№ 075-10-2021-114).

Работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Завильгельский Г.Б., Расторгуев С.М. (2007) ДНК-мимикрия белков как эффективный механизм регуляции активности ДНК-зависимых ферментов. *Биохимия*. **72**(9), 1125–1132.
2. Котова В.Ю., Завильгельский Г.Б., Белогуров А.А. (1988) Ослабление рестрикции I-го типа в присутствии плазмид группы IncI. Общая характеристика и молекулярное клонирование гена *ard*. *Молекуляр. биология*. **22**(1), 270–276.
3. McMahon S.A., Roberts G.A., Johnson K.A., Cooper L.P., Liu H., White J.H., Carter L.G., Sanghvi B., Oke M., Walkinshaw M.D., Blakely G.W., Naismith J.H., Dryden D.T.F. (2009) Extensive DNA mimicry by the ArdA anti-restriction protein and its role in the spread of antibiotic resistance. *Nucl. Acids Res* **37**(15), 4887–4897.
4. Roberts G.A., Stephanou A.S., Kanwar N., Dawson A., Cooper L.P., Chen K., Nutley M., Cooper A., Blakely G.W., Dryden D.T.F. (2012) Exploring the DNA mimicry of the Ocr protein of phage T7. *Nucl. Acids Res* **40**(16), 8129–8143.
5. Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю. (2014) Антирестрикторная активность мономерной и димерной форм белка Ocr T7. *Молекуляр. биология*. **48**(1), 176–184.
6. Расторгуев С.М., Завильгельский Г.Б. (2003) Роль антирестрикторного мотива в функциональной активности антирестрикторного белка ArdA pKM101 (IncN). *Генетика*. **39**(2), 286–292.
7. Stephanou A.S., Roberts G.A., Tock M.R., Pritchard E.H., Turkington R., Nutley M., Cooper A., Dryden D.T.F. (2009) A mutational analysis of DNA mimicry by *ocr*, the gene 0.3 antirestriction protein of bacteriophage T7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**(1), 129–132.
8. Belogurov A.A., Yussifov T.N., Kotova V.U., Zavilgelsky G.B. (1985) The novel gene(s) *ARD* of plasmid pKM101: alleviation of EcoK restriction. *MGG Mol. Gen. Genet.* **198**, 509–513.
9. Gladysheva-Azgari M.V., Sharko F.S., Evteeva M.A., Kuvyrchenkova A.P., Boulygina E.S., Tsygankova S.V., Slobodova N.V., Pustovoi K.S., Melkina O.E., Nedoluzhko A.V., Korzhenkov A.A., Kudryavtseva A.A., Utkina A.A., Manukhov I.V., Rastorguev S.M., Zavilgelsky G.B. (2023) *ArdA* genes from pKM101 and from *B. bifidum* chromosome have a different range of regulated genes. *Heliyon*. **9**(12), e22986.
10. Kudryavtseva A.A., Cséfalvay E., Gnuchikh E.Y., Yanovskaya D.D., Skutel M.A., Isaev A.B., Bazhenov S.V., Utkina A.A., Manukhov I.V. (2023) Broadness and specificity: ArdB, ArdA, and Ocr against various restriction-modification systems. *Front. Microbiol.* **14**, 1133144. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1133144>
11. Кудрявцева А.А., Алехин В.А., Лебедева М.Д., Cséfalvay E., Weiserova M., Манухов И.В. (2023) Активность антирестрикторного белка ArdB в отношении эндонуклеазы EcoAI 2023. *Молекуляр. биология*. **57**(1), 101–105.
12. Patel J., Taylor I., Dutta C.F., Kneale G., Firman K. (1992) High-level expression of the cloned genes encoding the

- subunits of and intact DNA methyltransferase, MEcoR124. *Gene*. **112**(1), 21–27.
13. Mirdita M., Schütze K., Moriwaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M. (2022) ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Meth.* **19**(6), 679–682.
 14. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Židek A., Potapenko A., Bridgland A., Meyer C., Kohl S.A.A., Ballard A.J., Cowie A., Romera-Paredes B., Nikolov S., Jain R., Adler J., Back T., Petersen S., Reiman D., Clancy E., Zielinski M., Steinegger M., Pacholska M., Berghammer T., Bodenstein S., Silver D., Vinyals O., Senior A.W., Kavukcuoglu K., Kohli P., Hassabis D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. **596**(7873), 583–589.
 15. Evans R., O'Neill M., Pritzel A., Antropova N., Senior A., Green T., Židek A., Bates R., Blackwell S., Yim J., Ronneberger O., Bodenstein S., Zielinski M., Bridgland A., Potapenko A., Cowie A., Tunyasuvunakool K., Jain R., Clancy E., Kohli P., Jumper J., Hassabis D. (2022) Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034>
 16. Belogurov A.A., Delver E.P., Rodzevich O.V. (1993) Plasmid pKM101 encodes two nonhomologous antirestriction proteins (ArdA and ArdB) whose expression is controlled by homologous regulatory sequences. *J. Bacteriol.* **175**(15), 4843–4850.
 17. Price C., Lingner J., Bickle T.A., Firman K., Glover S.W. (1989) Basis for changes in DNA recognition by the EcoR124 and EcoR124 3 type I DNA restriction and modification enzymes. *J. Mol. Biol.* **205**, 115–125.
 18. Skutel M., Andriianov A., Zavialova M., Kirsanova M., Shodunke O., Zorin E., Golovshchinskii A., Severinov K., Isaev A. (2023) T5-like phage BF23 evades host-mediated DNA restriction and methylation. *microLife*. **4**, uqad044.
 19. Liu Y.P., Tang Q., Zhang J.Z., Tian L.F., Gao P., Yan X.X. (2017) Structural basis underlying complex assembly and conformational transition of the type I R-M system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**(42), 11151–11156.
 20. Mol C.D., Arvai A.S., Sanderson R.J., Slupphaug G., Kavli B., Krokan H.E., Mosbaugh D.W., Tainer J.A. (1995) Crystal structure of human uracil-DNA glycosylase in complex with a protein inhibitor: protein mimicry of DNA. *Cell*. **82**(5), 701–708.
 21. Ramirez B.E., Bax A., Voloshin O.N., Camerini-Otero R.D. (2000) Solution structure of DinI provides insight into its mode of RecA inactivation. *Protein Sci.* **9**(11), 2161–2169.
 22. Parsons L.M., Liu F., Orban J. (2009) HU- α binds to the putative double-stranded DNA mimic H1450 from *Haemophilus influenzae*. *Protein Sci.* **14**(6), 1684–1687.
 23. Belogurov A.A., Delver E.P., Rodzevich O.V. (1992) IncN plasmid pKM101 and IncII plasmid ColIb-P9 encode homologous antirestriction proteins in their leading regions. *J. Bacteriol.* **174**(15), 5079–5085.

ArdA Protein Specificity to Type I Restriction–Modification Systems

A. A. Kudryavtseva¹, A. V. Vlasov^{1, 2, 3}, E. V. Zinovev¹, D. D. Yanovskaya⁴, A. A. Utkina¹, S. M. Rastorguev⁵, I. V. Manukhov^{1, 2, *}

¹Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
Dolgoprudny, Moscow Region, 141707 Russia

²Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Moscow, 125080 Russia

³Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, 141980 Russia

⁴Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 143028 Russia

⁵Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: manukhovi@mail.ru

ArdA are DNA-mimic proteins which inhibit type I restriction-modification (RMI) systems by binding to them instead of DNA. The question of specificity to DNA methylation sites recognized by RMI complexes remains to be answered: is ArdA able to mimic a specific DNA site? In this work, we cloned *ardA* genes from three Gram-positive bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas monteilii* and *Xanthomonas* sp. Antirestriction abilities of these genes were tested against three RMI systems of *Escherichia coli*, differing in DNA recognition/methylation sites. It was shown that despite the similarity of predicted structures of the studied ArdA proteins, they have significant specificity for three RMI systems. The results obtained may indicate the ability of DNA-mimetics to imitate specific DNA sites.

Keywords: antirestriction, RMI, ArdA, DNA-mimicry

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.2:577.113.4

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МИКРОЧИПЫ НА АЛЮМИНИЕВОЙ ПОДЛОЖКЕ С ЯЧЕЙКАМИ ИЗ ЩЕТОЧНЫХ ПОЛИМЕРОВ

© 2024 г. И. Ю. Шишкин^а, Г. Ф. Штылев^а, В. Е. Барский^а, С. А. Лапа^а,
О. А. Заседателева^а, В. Е. Кузнецова^а, В. Е. Шершов^а,
В. А. Василисков^а, С. А. Поляков^а, А. С. Заседателев^а, А. В. Чудинов^{а, *}

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

*e-mail: chud@eimb.ru

Поступила в редакцию 29.11.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 11.12.2023 г.

Представлен способ изготовления биологических микрочипов на алюминиевой подложке с гидрофильными ячейками из щеточных сополимеров с формированием матрицы ячеек методом фотолитографии. Поверхность алюминиевых подложек предварительно покрывали тонким, прочным, умеренно гидрофобным слоем перекрестно-сшитого полимера для исключения контакта с поверхностью алюминия компонентов, используемых при анализе нуклеиновых кислот. Алюминиевые подложки биочипов обладают высокой теплопроводностью и малой теплоемкостью, что актуально для мультиплексного ПЦР-анализа на чипе. В ячейках биочипа ковалентно иммобилизовали олигонуклеотидные зонды. Сохранение гибридизационной активности иммобилизованных ДНК-зондов показано в гибридизационном анализе с синтетической ДНК-мишенью, представляющей собой участок экзона 7 гена *ABO* человека. Представленные методы могут использоваться при разработке технологии параллельного множественного экспресс-микроанализа нуклеиновых кислот “лаборатория на чипе” для выявления соматических и инфекционных заболеваний человека

Ключевые слова: биочипы, щеточные полимеры, иммобилизация олигонуклеотидов, гибридизационный анализ ДНК

DOI: 10.31857/S0026898424030114, EDN: JCDJL

ВВЕДЕНИЕ

Анализ нуклеиновых кислот, занимающий важное место в клинко-диагностических исследованиях, включает как прямое определение последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК методом секвенирования, так и методы, основанные на взаимодействии исследуемой молекулы ДНК с другими молекулами ДНК с заданными характеристиками.

Анализ связывания нуклеиновых кислот с матрицей иммобилизованных на твердой подложке ДНК-зондов был предложен одновременно несколькими исследовательскими группами, в том числе и группой российских ученых под руководством А.Д. Мирзабекова, и получил название метода биочипов [1], или “microarray” в англоязычном варианте. Амплификация минимального количества анализируемого генетического материала методом ПЦР с одновременным флуоресцентным маркированием, последующий гибридизационный анализ продуктов ПЦР на микроматрицах олигонуклеотидных зондов и микроскопическая флуоресцентная цифровая регистрация результатов гибридизационного анализа стали мощным

инструментом молекулярной биологии и медицины [2, 3]. Предварительная амплификация ДНК в отдельной пробирке с последующим гибридизационным анализом на биочипе потенциально опасны перекрестной контаминацией, что осложняет выполнение анализа и препятствует широкому практическому использованию метода. Ведутся активные исследования и разработки в области аналитических систем на основе микрочипов, связанные с переводом методологии ПЦР, особенно ПЦР в реальном времени, в формат микрочипов. Поиску решений для реализации мультиплексной ПЦР на биочипе посвящен ряд публикаций [4–7].

Ранее нами был продемонстрирован вариант твердофазной ПЦР с праймерами, иммобилизованными в ячейках биочипа с регистрацией результатов удлинения праймеров (primer extension) по встраиванию флуоресцентно меченных нуклеотидов [8–10].

Иммобилизация праймеров в перекрестно-сшитых гидрогелевых ячейках затрудняет диффузию ДНК-полимеразы и анализируемой ДНК-мишени к иммобилизованным праймерам. Низкая теплопроводность стеклянной подложки ограничивает

использование мультиплексной ПЦР, проводимой в гидрогелевых ячейках на предметном стекле.

Для эффективной амплификации ДНК подложка чипа должна обладать высокой теплопроводностью и малой теплоемкостью. Чувствительность и специфичность ПЦР на чипе зависят от концентрации праймеров, иммобилизованных в ячейках чипа, сохранности их свойств и пространственной доступности для взаимодействия с компонентами реакционной ПЦР-смеси. При этом иммобилизованные олигонуклеотиды должны быть устойчивы в кипящей воде и не утрачивать гибридизационную активность.

В настоящей работе описывается изготовление бичипов с ячейками из гидрофильных щеточных полимеров, закрепленных одним концом на поверхности подложки. Ячейки из щеточных полимеров получали фотоиндуцированной радикальной полимеризацией “от поверхности” подложки при УФ-облучении через фотомаску методом фотолитографии. Подложкой служит алюминиевая фольга с поверхностью, герметизированной прочным полимерным покрытием. В ячейках биочипа ковалентно иммобилизовали олигонуклеотидные зонды. Работоспособность биочипа показана в гибридационном анализе с синтетической ДНК-мишенью, представляющей собой участок экзона 7 гена *ABO* человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В работе использовали фольгу из алюминиевого сплава марки АД (ГОСТ 618–2014) толщиной 100 мкм с неполированной поверхностью (Россия). Содержание алюминия в сплаве не менее 99.45%. Лист фольги нарезали на части размером 25 × 75 мм и использовали поштучно.

Поливинилацетат (ПВАц) марки М=100, ТУ 2215-001-98514529-2007, Россия. Моющее средство Ultrasonol, 11-Alkalisch (“Carl Roth” Art. 5354.1, Германия). 20 × SSPE-буфер (“Sigma” Art. S2015, США). ТЕ-буфер pH 8.0 (“Thermo Fisher Scientific”, Art. AM9849, США).

Все растворители и исходные реагенты аналитического качества получены из коммерческих источников и использовались без дополнительной очистки.

Оборудование. Ультразвуковая баня Elmasonic S30 (Германия), мульти-ротатор Multi Bio RS-24 (“Biosan”, Латвия), сушильный шкаф СНОЛ-3 (“ТермИКС”, Россия), шейкер с нагревом Heating thermoshaker MHR13 (“Hettich”, Германия), робот-манипулятор QArray (“Genetix”, Великобритания), микроскоп Levenhuk Discovery Artisan 32 (Россия), аспиратор FTA-1 (“Biosan”).

Двухканальный портативный анализатор флуоресцентного изображения [11]: канал флуоресценции

красителя Cy5 с лазерным возбуждением при 650 нм, запирающим фильтром 690 ± 40 нм (“Semrock”, США); канал флуоресценции красителя Cy3 с лазерным возбуждением при 535 нм, запирающим фильтром 580 ± 27 нм (“Semrock”) и цифровой ПЗС камерой (ООО “БИОЧИП-ИМБ”, Россия).

Флуоресцентные изображения анализировали с помощью программы ImaGeWare “БИОЧИП-ИМБ”.

Подготовка поверхности алюминиевых подложек. Поверхность подложки для удаления возможных загрязнений последовательно промывали: ацетоном в ультразвуковой бане в течение 10 мин (1); струей деионизированной воды в течение 1 мин (2); 2%-ным раствором моющего средства в деионизированной воде в течение 1 ч (3); промывали струей деионизированной воды в течение 1 мин (4); ацетоном в ультразвуковой бане в течение 10 мин (5). Подготовленные подложки сушили на открытом воздухе в течение 30 мин и хранили в эксикаторе до использования.

Модификация поверхности алюминиевых подложек 3-аминопропилтриэтоксисилоном (АПТЭС). Поверхности алюминиевых подложек поштучно обрабатывали в закрытой пробирке из полипропилена, содержащей 40 мл раствора АПТЭС. Предварительно вымытые подложки погружали в 16%-ный (об/об) раствор АПТЭС в толуоле и выдерживали в течение 16 ч при комнатной температуре. Затем подложки промывали толуолом в ультразвуковой бане в течение 10 мин, ацетоном в ультразвуковой бане в течение 10 мин, сушили на открытом воздухе в течение 30 мин, хранили в эксикаторе до использования.

Активный флуоресцентный краситель. Краситель Cy5, его активное производное, пара-нитрофениловый эфир красителя Cy5-pNP, и аминоксодержащий краситель Cy5-NH₂ синтезировали согласно [12].

Флуоресцентное маркирование аминокрупп на алюминийевой подложке по связыванию с красителем Cy5. Наличие активных групп на подложке проверяли, используя окрашивание красителем Cy5. С этой целью на подложке формировали разборную камеру объемом 35 мкл с площадью подложки в камере 50 мм². В камеру вносили 35 мкл раствора активированного красителя Cy5-pNP с концентрацией 1 нмоль/мкл и диизопропилэтиламина (DIPEA) с концентрацией 60 нмоль/мкл в диметилсульфоксиде (DMSO) и инкубировали при комнатной температуре в течение 16 ч. После окончания реакции раствор удаляли, камеру разбирали, подложки промывали струей деионизированной воды, 50%-ным раствором ацетонитрила в 50 мм триэтиламонийгидрокарбонате (pH 7.5) в ультразвуковой бане (10 мин), струей деионизированной воды, сушили струей воздуха при комнатной температуре. Хранили в холодильнике при 5°C до использования.

Приготовление растворов поливинилацетата. В пробирку с раствором бензофенона в метилэтилкетоне добавляли ПВАц М-100, пробирку закрывали и помещали в мультиротатор. Смесь перемешивали при 30–40 об/мин в течение 3 ч при комнатной температуре. Все работы с бензофеноном проводили с защитой от прямого солнечного света. Хранили при комнатной температуре.

Первое полимерное покрытие поверхности подложки. Подложки с аминированной поверхностью (Al-NH_2) покрывали раствором 2%-ного ПВАц и 1%-ного бензофенона в метилэтилкетоне при вращении (2400 об/мин, 2 мин) и сушили на воздухе в течение 1 ч. Для покрытия поверхности подложки раствором полимера при вращении использовали установку на основе мини-центрифуги с дисковым ротором, снабженным зажимами для подложек, который вращался в закрытом кожухе. Полимерное покрытие закрепляли прогревом при 100°C в сушильном шкафу в течение 1 ч, затем облучали УФ-светом с $\lambda = 254$ нм в течение 1 ч. Облучение проводили бактерицидными лампами Philips TUV TL-D15W SLV с максимумом излучения 254 нм. Расстояние от колбы лампы до подложки 5 см. Получали алюминиевую подложку с поливинилацетатным покрытием (Al-ПВАц).

Модификация поверхности алюминиевой подложки, получение ячеек из щеточных полимеров. Подложку с Al-ПВАц покрывали вторым слоем раствора 1%-ного ПВАц и 0.5%-ного бензофенона в метилэтилкетоне при вращении со скоростью 2400 об/мин в течение 2 мин, сушили на открытом воздухе в течение 10 мин. Затем подложку помещали горизонтально в держатель, сверху на рабочую область помещали рамку, вырезанную из тетрафторэтилена толщиной 10 мкм, внутрь рамки вносили раствор акриловой кислоты и акриламида в деионизированной воде, сверху накладывали фотомаску и плотно зажимали в держателе. Рамка из тетрафторэтилена является кольцевым спейсером, определяющим расстояние от подложки до фотомаски, и формирует камеру высотой 10 мкм. Количество раствора, вносимого внутрь рамки, и накрывание сверху фотомаской обеспечивают отсутствие пузырей воздуха в камере. Фотомаска накладывается рабочей поверхностью вниз, чтобы препятствовать аберрации света при облучении. Фотомаска изготовлена на кварцевом стекле размером 25 × 75 мм и толщиной 1 мм со светонепроницаемым хромовым покрытием с прозрачными квадратными ячейками размером 200 × 200 мкм с шагом 600 мкм.

Камеру с раствором мономеров через фотомаску облучали УФ-светом с помощью осветителя ОИ-18А с кварцевой ртутной лампой ДРК-120 в течение 10 мин. Расстояние от осветителя до фотомаски составляло 10 см. После окончания облучения камеру разбирали, подложки поочередно

промывали струей деионизированной воды в течение 1 мин, промывали на шейкере при комнатной температуре ацетоном в течение 10 мин и при 65°C деионизированной водой в течение 3 ч. Сушили струей воздуха при комнатной температуре.

Активация карбоксильных групп ячеек со щеточными полимерами. На подложке формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере 50 мм². Готовили активирующий раствор N-гидроксисукцинимид (0.1 М) и EDC [1-этил-3(3-диметиламинопропил)карбодиимид-гидрохлорид] (0.2 М) в 0.1 М буферном растворе MES [(2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота)] pH 5.0 при охлаждении на льду. В камеру вносили 35 мкл свежеприготовленного активирующего раствора. Реакцию вели в термостате при 37°C в течение 5 ч. После окончания реакции камеру разбирали, подложки промывали струей буфера MES pH 5.0, затем фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) pH 7.2, содержащим 1% Твин 20, в течение 10 мин. Подложки сушили струей воздуха при комнатной температуре. Хранили в холодильнике при температуре 5°C до использования.

Флуоресцентное маркирование карбоксильных групп в ячейках из щеточных полимеров на алюминиевой подложке красителем Cy5. На подложке с ячейками из щеточных полимеров с активированными карбоксильными группами формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере 50 мм². Площадь разборной камеры ограничивает только часть площади матрицы полученных ранее ячеек. Камеру позиционировали на подложке с неизменными заданными координатами относительно границ подложки с помощью держателя. В камеру вносили 35 мкл раствора аминоксодержащего красителя Cy5-NH₂ с концентрацией 1 нмоль/мкл и DIPEA с концентрацией 60 нмоль/мкл в DMSO и инкубировали при комнатной температуре в течение 16 ч. После окончания реакции раствор удаляли, камеру разбирали, подложки промывали струей деионизированной воды, 50%-ным раствором ацетонитрила в 50 мм триэтиламмонийгидрокарбонате (pH 7.5) на шейкере в течение 30 мин при комнатной температуре, струей деионизированной воды, сушили струей воздуха при комнатной температуре.

Синтез ДНК-зондов и синтетической ДНК-мишени. В качестве модели использовали синтетическую ДНК-мишень, соответствующую участку последовательности экзона 7 гена ABO человека (GenBank: NM_020469.3), который детерминирует серологический фенотип группы крови ABO. ДНК-зонды и синтетическую ДНК-мишень синтезировали по стандартной фосфорамидитной технологии с реагентами “Glen Research” (США) и последующей очисткой ВЭЖХ. Зонды № 268 (5'-NH₂-GCG ACC ACG TGG GC—Cy3—3') и № 269 (5'-NH₂-GCG ACC ATG TGG GC—Cy3—3') содержали на 5'-конце

С6-аминомодификатор, а на 3'-конце краситель Су3. Синтетическая модельная ДНК-мишень № 273: (5'-GCC CAC GTG GTC GC—Су5—3') содержала на 3'-конце краситель Су5. ДНК-мишень № 273 образует совершенный дуплекс с зондом № 268, а с зондом № 269 несовершенный, с заменой одного нуклеотида (подчеркнуты). Структура красителя Су3 и его активного производного Су3-pNP представлена на рис. 2.

Иммобилизация олигонуклеотидных зондов, маркированных красителем Су3, в ячейках из щеточных полимеров на алюминиевой подложке (рис. 5з). Растворы ДНК-зондов с С6-аминомодификатором на 5'-конце с концентрацией 1 нмоль/мкл в 0.1 М карбонатном буфере (рН 9.0), содержащем 10% формамида и 5% глицерина, наносили роботом-манипулятором с иглой диаметром 200 мкм в ячейки с активированными карбоксильными группами по заданной раскладке чипа. Затем подложки инкубировали в герметичной камере с повышенной влажностью в течение 12 ч при 4°C и дополнительно 4 ч при 25°C. Влажность в камере поддерживали смесью вода/глицерин в соотношении 1/7. После окончания реакции подложки промывали струей деионизированной воды, дистиллированной водой, промывали в 50%-ным ацетонитрилом в 0.05 М триэтиламонийгидрокарбонате (рН 8.0) в течение 30 мин при комнатной температуре на шейкере при 300 об/мин и деионизированной водой. Затем подложки выдерживали в 0.1 М растворе этаноламина в течение 1 ч при комнатной температуре для блокирования остаточных активных карбоксильных групп, многократно промывали деионизированной водой, капли жидкости с поверхности удаляли струей воздуха, сушили при комнатной температуре в течение 4 ч.

Гибридизация ДНК-мишени в ячейках из щеточных полимеров (рис. 5д). На подложке формировали разборную камеру объемом 35 мкл, площадь подложки в камере 50 мм². Готовили раствор ДНК-мишени в буфере SSPE с формамидом. Состав гибридизационного раствора: синтетическая ДНК-мишень 2 пмоль/мкл — 2 мкл; формамид 10 мкл; 20 × SSPE — 12 мкл; MgCl₂ 50 мМ — 0.8 мкл; вода без нуклеаз — 15.2 мкл. В камеру вносили 35 мкл раствора ДНК-мишени в гибридизационном растворе. Гибридизацию проводили в течение 16 ч при 37°C. После окончания реакции раствор удаляли аспиратором, в камеру вносили, а затем удаляли аспиратором 6 × SSPE (3 раза по 35 мкл). Камеру разбирали, подложку промывали 6 × SSPE, сушили струей воздуха при комнатной температуре.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы сообщали о разработке биочипа с ячейками из щеточных полимеров на подложке из пленочного полиэтилентерефталата (ПЭТ).

Ячейки получали фотоиницируемой радикальной полимеризацией с переносом атомов, идущей “от поверхности” подложки. Для анализа ДНК методом гибридизации с иммобилизованными в ячейках ДНК-зондами вполне подходят подложки из ПЭТ [14]. Полимерные подложки, в том числе и из ПЭТ, плохо подходят для проведения мультиплексной ПЦР на чипе. Полимерные материалы обладают низкой теплопроводностью и высокой теплоемкостью, что ограничивает скорость термощиклирования и может приводить к неравномерному распределению температур в камере чипа с матрицей ячеек на подложке и, соответственно, будет негативно влиять на результаты ПЦР.

Для ПЦР на чипе хорошо подходят подложки из кремния [15]. Кремний обладает высокой теплопроводностью и низкой теплоемкостью. Получение якорных групп для иммобилизации молекулярных зондов на кремниевых подложках хорошо отработано. Но кремний дорог для одноразового использования, а многократное использование чипов в ПЦР-приложениях осложняется возможной перекрестной контаминацией.

Металлические подложки, прежде всего из алюминия, хорошо подходят по параметрам высокой теплопроводности и низкой теплоемкости. У алюминия теплопроводность даже выше, чем у кремния, а теплоемкость лишь незначительно уступает кремнию.

Но при контакте с алюминиевой поверхностью компоненты ПЦР сорбируются, ДНК начинает разлагаться, а полимеразы дезактивируются. Поверхность алюминиевой подложки, на которой будет проводиться анализ ДНК, нужно герметизировать, чтобы исключить контакт компонентов ПЦР с алюминиевой поверхностью. Поверхность нужно покрыть тонкой герметичной полимерной пленкой. Полимерные материалы не сорбируют и не разлагают компоненты ПЦР, не ингибируют полимеразы. Полимерные покрытия толщиной в несколько сотен нанометров не влияют на теплоемкость и теплопроводность алюминиевой подложки.

Для прочного связывания с полимерным покрытием на поверхность алюминия нужно привить якорные химические группы. Поверхность алюминия в атмосферных условиях всегда покрыта оксидом алюминия. Оксид алюминия — это неорганический полимер, в котором атомы алюминия соединены кислородными мостиками, и имеются гидроксильные группы, связанные с атомами алюминия. Химические свойства гидроксильных групп оксида алюминия на поверхности металлического алюминия близки свойствам на поверхности стекла. Поэтому, используя химические методы модификации поверхности силикатных материалов, можно получить на поверхности алюминия якорные группы для дальнейшей модификации подложки. Модификация поверхности кремния, кварца, стекла, полисилоксанов реакцией с АПТЕС

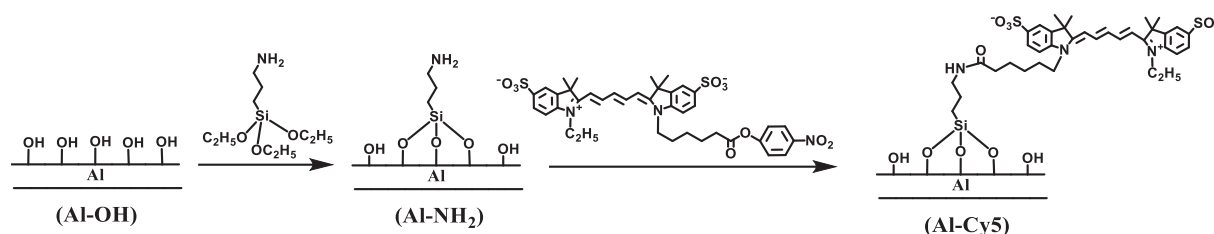


Рис. 1. Схема аминирования и флуоресцентного маркирования поверхности алюминиевой подложки.

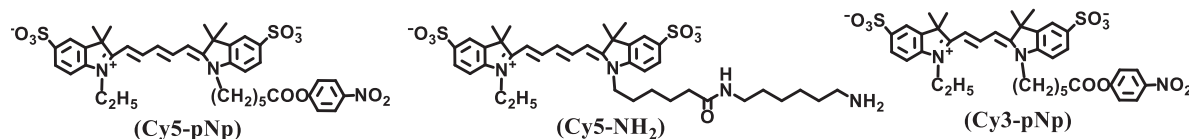


Рис. 2. Структуры флуоресцентных красителей Cy5-pNP, Cy5-NH₂ и Cy3-pNP.

является ключевой стартовой реакцией для последующей функционализации этих материалов. Эту же реакцию используют и для модификации оксида алюминия на поверхности металлического алюминия. Так, для увеличения реактивности оксида алюминия поверхность алюминия обрабатывали кислородной плазмой [16], а также предварительно электрохимически анодировали, а затем прививали аминогруппы реакцией с АПТЕС [17].

В нашей работе стояла задача получения на поверхности якорных аминогрупп для связывания с массивом полимерного покрытия, высокая плотность аминогрупп при этом не обязательна. На поверхности алюминиевой подложки свежий оксид алюминия с гидроксильными группами получали методом травления водным слабощелочным

(pH 11) раствором моющего средства. В результате получали алюминиевые подложки с легким матовым налетом оксида алюминия (рис. 1 (Al-OH)). Затем подложки обрабатывали раствором АПТЕС в толуоле методом погружения в раствор. Получали подложки с аминированной поверхностью, рис. 1 (Al-NH₂).

Наличие привитых аминогрупп, их концентрацию и распределение по поверхности алюминиевой подложки анализировали по связыванию с активным пара-нитрофениловым эфиром индикаторного красителя Cy5-pNP (рис. 1). Структура красителя представлена на рис. 2.

Для измерения флуоресцентных сигналов использовали метод цифровой флуоресцентной

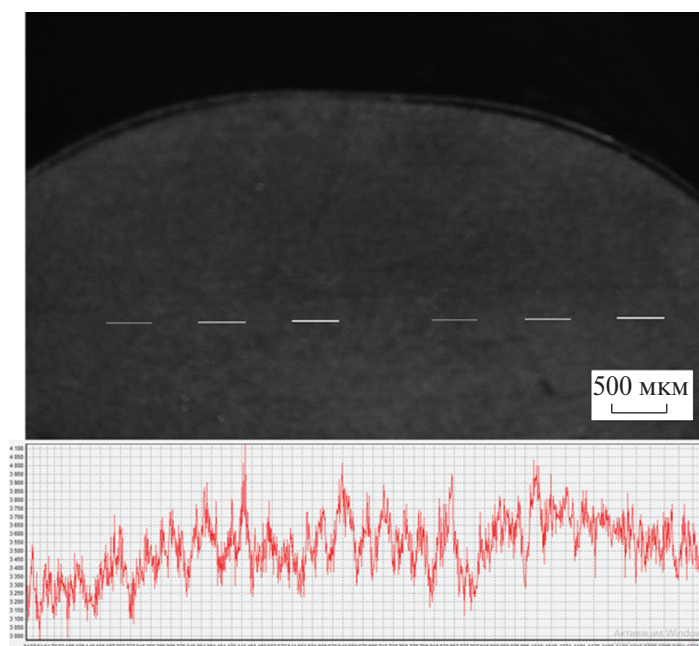


Рис. 3. Микрофотография алюминиевой подложки в свете флуоресценции красителя Cy5 при выдержке 100 мс после модификации поверхности 3-аминопропилтриэтоксисилоном (АПТЭС) и маркирования флуоресцентным красителем Cy5. Показан график распределения сигналов вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении.

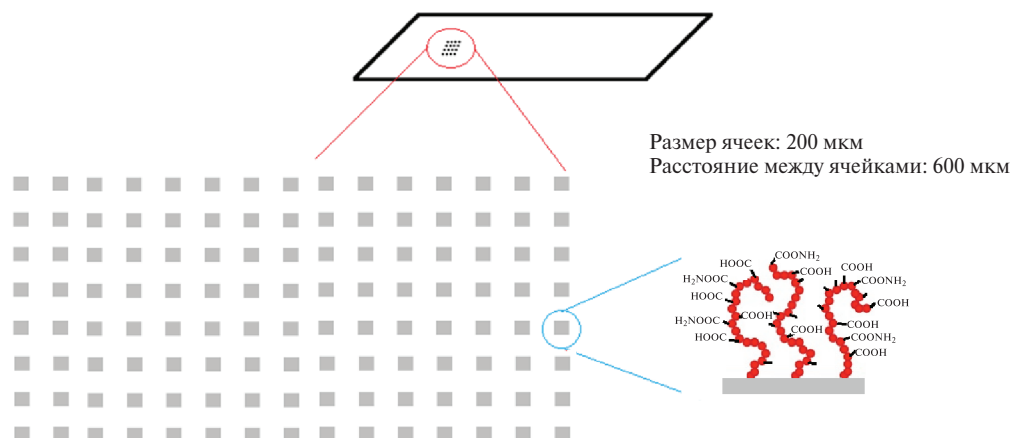


Рис. 4. Схема расположения ячеек на подложке биочипа после УФ-полимеризации через фотомаску.

микроскопии с регистрацией интенсивности сигналов в свете флуоресценции красителя Су5. Флуоресцентная картина представлена на рис. 3.

Для количественной оценки концентрации молекул красителя, связавшихся с поверхностью подложки, был изготовлен калибровочный чип с ячейками, содержащими краситель Су5 с пошаговой убывающей концентрацией молекул красителя на единицу поверхности. Измерения интенсивности флуоресценции подложек с ячейками, содержащими известную концентрацию красителя на единицу поверхности, показали, что флуоресцентный сигнал в 10000 относительных единиц (о.е.) при выдержке 100 мс соответствует концентрации Су5 8.44 пмоль/см².

Флуоресцентные сигналы при выдержке 100 мс вдоль проведенной линии на рис. 3 колеблются от 3000 до 4300 о.е. С учетом темнового тока, сорбции красителя на поверхности и нулевой линии детектора изображения вычисленная концентрация красителя на поверхности алюминиевой подложки колеблется от 2.3 пмоль/см² в центре до 1.2 пмоль/см² по краям зоны регистрации при среднем значении 1.85 пмоль/см². Снижение интенсивности флуоресценции по краям зоны регистрации связано с неравномерностью освещения поля зрения регистрирующего прибора.

Молекулы красителя связываются с химически доступными аминогруппами в стехиометрическом соотношении 1 : 1. Концентрацию аминогрупп на поверхности алюминиевой подложки принимали равной концентрации красителя, связавшегося с аминогруппами. Погрешность, связанную с концентрационным тушением флуоресценции красителя, в данном случае не учитывали.

Влияние концентрации АПТЕС на концентрацию аминогрупп на поверхности алюминиевой подложки. При постоянном времени реакции АПТЕС с алюминиевой подложкой, равном 16 ч, концентрация аминогрупп на поверхности алюминия увеличивается с пошаговым увеличением концентрации

АПТЕС и достигает максимального значения 2.3 пмоль/см² в присутствии 16% АПТЕС. Дальнейшее пошаговое увеличение концентрации АПТЕС вплоть до 32% не приводит к изменению содержания аминогрупп на поверхности алюминия.

Полимерное покрытие. Полимерное покрытие поверхности подложки должно быть плотным и водонепроницаемым, прочно держаться на алюминиевой поверхности со слоем оксида алюминия. При этом химические свойства покрытия должны позволять ковалентную иммобилизацию ДНК-зондов. Описаны методы покрытия поверхности квантовых точек, магнитных частиц и других наночастиц гидрофильными полимерами для придания им биосовместимости и устойчивости в коллоидном состоянии [19]. Гидрофильные покрытия не обеспечивают герметизацию покрываемой поверхности.

Мы использовали покрытие из умеренно гидрофобного водонерастворимого полимера, ПВАц. Бензофенон использовали в качестве фотоинициатора радикальной полимеризации мономеров и реагента, сшивающего полимерные макромолекулы ПВАц в трехмерную сетку при УФ-облучении [20, 21].

Покрытие делали двухслойным, первый слой предназначен для герметизации поверхности алюминия, второй — для прививки к поверхности щеточных полимеров.

Для первого слоя поверхность подложек покрывали тонким ровным слоем раствора, содержащим 2% ПВАц и 1% бензофенона в метилэтилкетоне, методом “покрытия при вращении” (spin coating). После испарения растворителя на поверхности подложки остается тонкий слой ПВАц. Полимерное покрытие закрепляли на подложке прогреванием с последующим УФ-облучением. При УФ-облучении “массива” ПВАц происходит перекрестное сшивание молекул ПВАц в трехмерную сетку и связывание с аминогруппами на поверхности подложки. Получали подложки с покрытием,

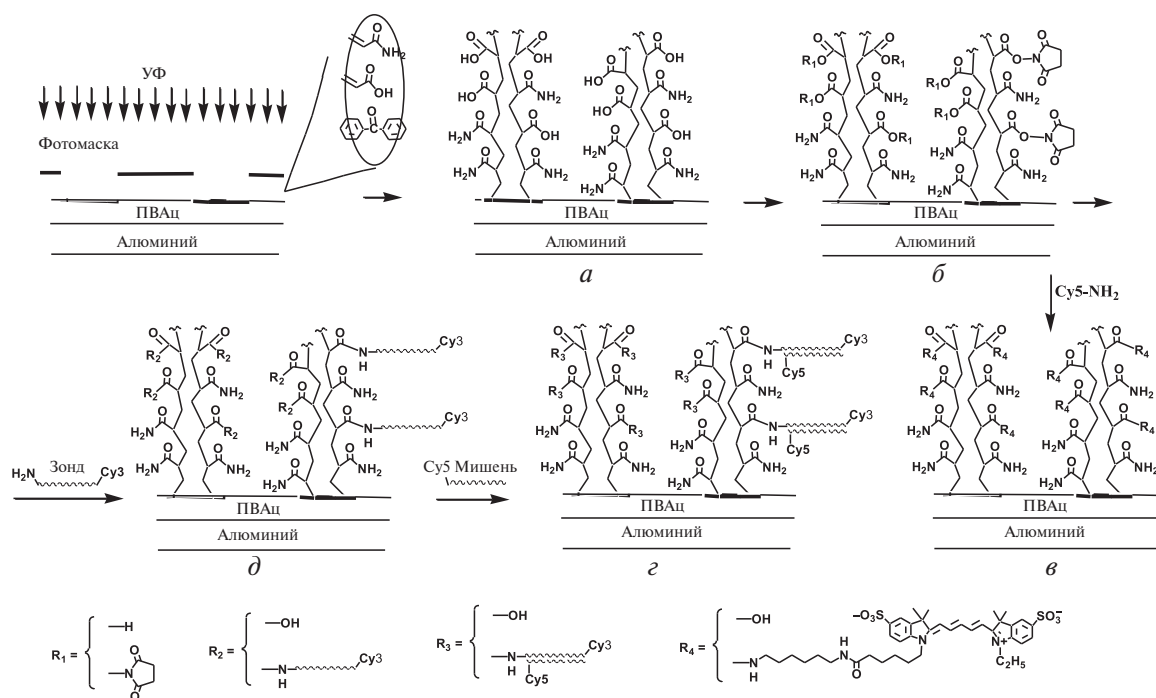


Рис. 5. Схема получения ячеек из щеточных полимеров на поверхности алюминиевой подложки (а), активации карбоксильных групп (б), флуоресцентного маркирования карбоксильных групп (в), иммобилизации олигонуклеотидных зондов (г) и гибридизации с ДНК-мишенью (д).

которое не растворяется в органических растворителях, не отслаивается в воде при 100°C и практически не флуоресцирует в оптическом диапазоне красителей Cy3 и Cy5.

Получение на алюминиевой подложке ячеек из щеточных полимеров. Для получения второго слоя поверхность подложек покрывали тонким слоем раствора, содержащего 1% ПВАц и 0.5% бензофенона в метилэтилкетоне, методом покрытия при вращении. Второй слой сушили только на воздухе. Назначение второго покрытия — прививка щеточных полимеров [22]. Подложки с двухслойным нанесением ПВАц использовали для получения ячеек из щеточных полимеров методом фотоиндуцированной радикальной полимеризации “от поверхности” подложки.

В нашей работе для получения ячеек из щеточных полимеров на подложке с помощью кольцевого спейсера и крышки формировали реакционную камеру. Крышкой в данном случае была поверхность фотомаски. В камеру вносили раствор акриловой кислоты и акриламида в деионизированной воде. Облучали УФ-светом через фотомаску в течение 10 мин. После отмывки от несвязавшихся компонентов получали матрицу ячеек из щеточных полимеров (рис. 4, 5а).

При микроскопическом контроле на поверхности подложки в отраженном видимом свете видны светлые ячейки на темном фоне (рис. 6). При смачивании подложки водой с последующим удалением капель воды центрифугированием видно, что на

гидрофобной подложке находятся гидрофильные ячейки одинакового размера с четко очерченными краями с координатами, соответствующими ячейкам фотомаски.

Полимерное покрытие и ячейки не растворяются и не отслаиваются от подложки при нагревании в деионизированной воде и в ТЕ (Трис-EDTA)-буфере (pH 8.0, 95°C) в течение 2 ч.

Активация карбоксильных групп ячеек со щеточными полимерами. Карбоксильные группы щеточных полимеров переводили в активные N-гидроксисукцинимидные эфиры. Реакцию проводили с N-гидроксисукцинимидом и водорастворимым карбодиимидом EDC в MES-буфере при pH 5.0 (рис. 5б). Получали подложки с ячейками из щеточных полимеров с активированными карбоксильными группами (рис. 5б).

Флуоресцентное маркирование карбоксильных групп в ячейках из щеточных полимеров на алюминиевой подложке красителем Cy5 (рис. 5в). Условия получения ячеек со щеточными полимерами и активацию карбоксильных групп оптимизировали по связыванию с красителем **Cy5-NH₂**. При микроскопическом контроле в отраженном видимом свете видно, что все ячейки сохраняются на своих местах, картина аналогична представленной на рис. 6. На рис. 7 показаны ячейки из щеточных полимеров на поверхности алюминиевой подложки в свете флуоресценции красителя Cy5 после активации карбоксильных групп и присоединения красителя **Cy5-NH₂**. Показан график распределения сигналов

вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении. Видно, что ячейки на чипе достаточно однородные. Однородность ячеек сохраняется также от чипа к чипу.

На выдержке 10 мс среднее значение флуоресцентного сигнала после вычета фона составляет 20600 о.е., фоновое значение 1400 о.е. Отношение сигнал/фон (контрастность) равно 15.7. Этому значению при данной выдержке соответствует концентрация карбоксильных групп 170 пмоль/см². Ранее на поверхности полиэтилентерефталатных ПЭТ-подложек методом щелочного травления удалось получить карбоксильные группы с концентрацией только 8 пмоль/см² [23].

Подбор условий иммобилизации ДНК-зондов в ячейках из щеточных полимеров. Мы использовали двухэтапное изготовление матрицы ДНК-зондов. Первый этап включает получение гидрофильных ячеек одного размера с четкими границами, регулярно расположенными на гидрофобной поверхности подложки с высокой емкостью ковалентного связывания ДНК-зондов. При этом между ячейками имеется гидрофобная поверхность с низкой неспецифической сорбцией нуклеиновых кислот. Второй этап включает микрокапельное нанесение индивидуальных ДНК-зондов в заранее сформированные ячейки, по координатам ячеек, с раскладкой ДНК-зондов по заданной программе.

Для точного позиционирования микрокапельного нанесения робот-манипулятор дополнительно оснастили видеокамерой и управляющим

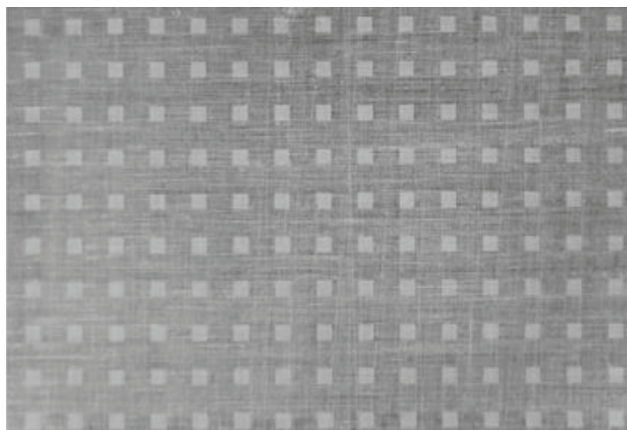


Рис. 6. Микроскопическое изображение ячеек из щеточных полимеров на поверхности алюминиевой подложки в отраженном видимом свете. Ячейки размером 200×200 мкм с шагом 600 мкм.

программным обеспечением. Игла робота-манипулятора забирает из емкости микрокаплю раствора ДНК-зонда и переносит ее в ячейку. Раствор всасывается гидрофильной ячейкой и не растекается по гидрофобной поверхности. Для предотвращения высыхания в раствор добавляли глицерин. В растворах ДНК-зонды могут образовывать внутримолекулярные и межмолекулярные структуры, которые влияют на их химические свойства. Добавление в раствор хаотропных реагентов и поверхностно активных веществ снижает такое взаимодействие. На рис. 8 и 9 представлено изображение ячеек микрочипа в свете флуоресценции красителей Cu_3 ,

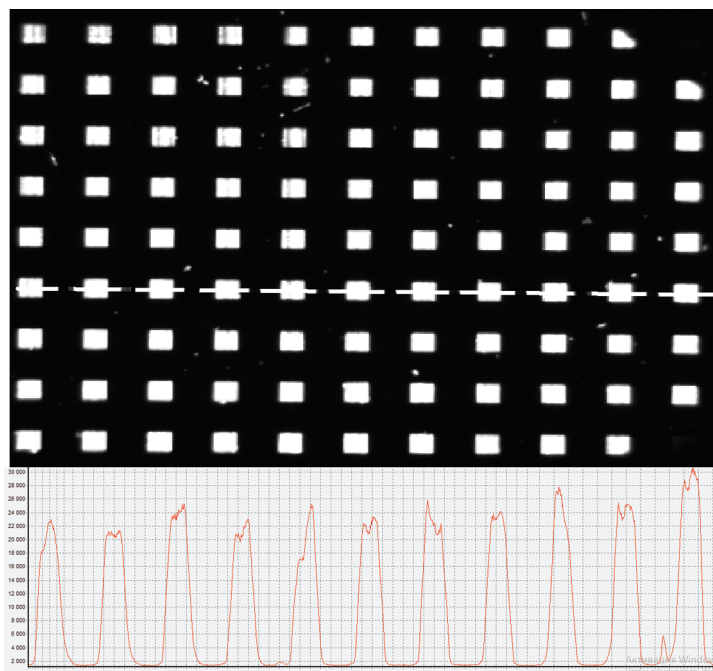


Рис. 7. Картина флуоресценции ячеек из щеточных полимеров на поверхности алюминиевой подложки в свете флуоресценции красителя Cu_5 при выдержке 10 мс после активации карбоксильных групп и присоединения красителя $\text{Cu}_5\text{-NH}_2$. Показан график распределения сигналов вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении.

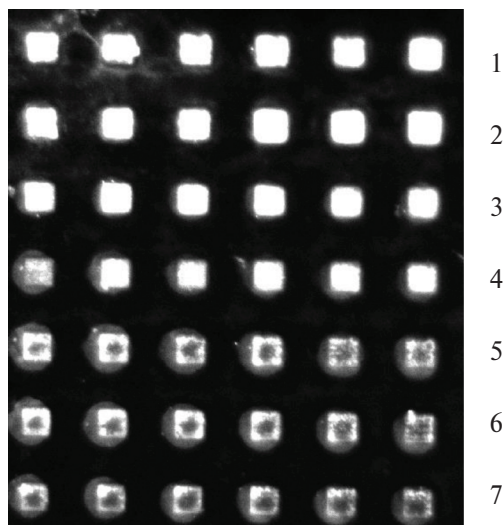


Рис. 8. Картина флуоресценции ячеек чипа на канале СуЗ с иммобилизованными ДНК-зондами при микрокапельном нанесении растворов, содержащих различные хаотропные реагенты. Выдержка 100 мс. Буфер карбонатный, pH 9.0, 5% глицерина. 1 – 10% формамида; 2 – 20% формамида; 3 – 10% DMSO; 4 – 20% DMSO; 5 – 0.01% Твин 20; 6 – 0.1% Твин 20; 7 – без добавок.

связанных с ДНК-зондами, иммобилизованными при микрокапельном нанесении растворов, содержащих различные хаотропные реагенты (рис. 8), или растворов, содержащих различные концентрации глицерина (рис. 9). Видно, что иммобилизация ДНК-зондов в ячейках из щеточных полимеров существенно зависит от состава раствора.

Флуоресцентный контроль результатов иммобилизации ДНК-зондов в ячейках чипа позволил оптимизировать pH, температуру, время реакции, а также влажность камеры, в которой идет инкубация. Оптимальный состав раствора для нанесения ДНК-зондов в ячейки и ковалентной иммобилизации в ней: карбонатный буфер (pH 9.0), содержащий 5% глицерина и 10% формамида. При инкубации в сухой атмосфере ячейки высыхают, в избыточно влажной – происходит конденсация влаги в ячейках, и раствор растекается. Оптимальной является инкубация в атмосфере с влажностью, поддерживаемой смесью вода/глицерин в соотношении 1/7.

Иммобилизация ДНК-зондов в ячейках из щеточных полимеров (рис. 5з). Растворы ДНК-зондов № 268 и № 269 с помощью робота-манипулятора капельно наносили на активированные ячейки из щеточных полимеров на алюминиевых подложках, инкубировали, отмывали от несвязавшихся компонентов. При микроскопическом контроле биочипов после нанесения ДНК-зондов в отраженном видимом свете видно, что все ячейки сохраняются на своих местах, картина аналогична представленной на рис. 6. На рис. 10 представлено изображение

ячеек биочипа в спектральных условиях, специфичных для красителя СуЗ после иммобилизации олигонуклеотидных зондов, меченных СуЗ. Показан график распределения сигналов вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении ряда 2 для зонда № 269. Снижение интенсивности флуоресценции по краям зоны регистрации связано с неравномерностью освещения поля зрения регистрирующего прибора.

Как следует из данных, представленных на рис. 10, края ячеек четко очерчены, ДНК-зонды не выявлены вне границ ячеек. Распределение сигналов в повторяющихся ячейках демонстрирует одинаковую дозировку растворов, нанесенных на заранее сформированную матрицу гидрофильных ячеек, расположенных на гидрофобной поверхности подложки. Гидрофобная поверхность вне границ гидрофильных ячеек является одним из ключевых факторов, приводящим к одинаковой дозировке растворов при их микрокапельном внесении в ячейки биочипа.

Среднее значение сигналов для рядов 1 и 3 зонда № 268 на канале СуЗ после вычета фона составляет 22650 о.е. Для зонда № 269 среднее значение сигналов для рядов 2 и 4 на канале СуЗ после вычета фона составляет 23150 о.е. Это означает, что количество зондов, иммобилизованных в ячейках, различается. Причины могут быть различными. В том числе, разной может быть степень доступности аминогрупп на С6-аминомодификаторе из-за разницы в образовании внутримолекулярных и межмолекулярных структур ДНК-зондами.

Как следует из полученных данных, ячейки каждого зонда на чипе достаточно однородные как внутри ряда, так и между рядами. Внутри ячеек из щеточных полимеров сигнал распределен равномерно, что свидетельствует о равномерном распределении ДНК-зондов. От чипа к чипу однородность ячеек также сохраняется. Незначительное снижение интенсивности флуоресценции по краям

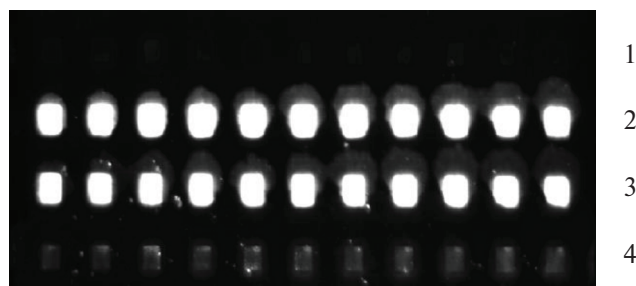


Рис. 9. Картина флуоресценции ячеек чипа на канале СуЗ с иммобилизованными ДНК-зондами при микрокапельном нанесении растворов, содержащих различные концентрации глицерина. Выдержка 100 мс. Буфер карбонатный, pH 9.0, 10% формамида. 1 – пустые ячейки; 2 – 5% глицерина; 3 – 10% глицерина; 4 – 20% глицерина.

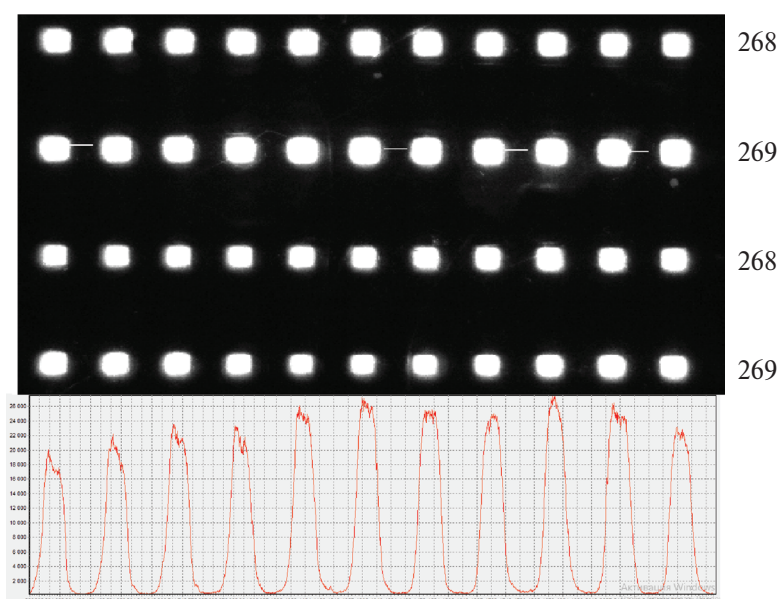


Рис. 10. Картина флуоресценции ячеек чипа на канале $Su3$ после иммобилизации олигонуклеотидных зондов, меченных $Su3$. Показан график распределения сигналов вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении ряда 2 для зонда № 269.

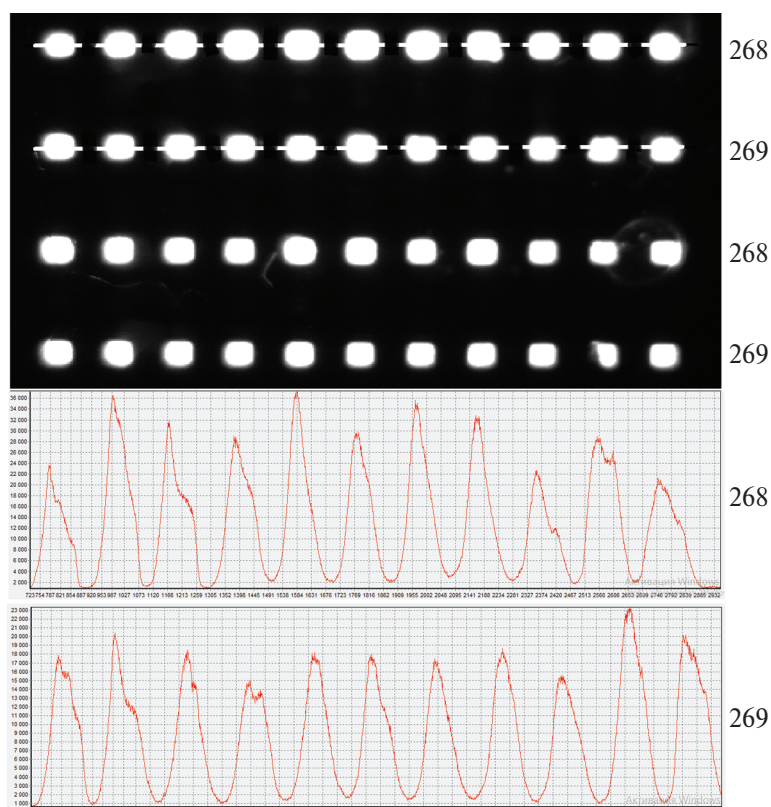


Рис. 11. Картина флуоресценции на канале $Su5$ ячеек из щеточных полимеров на поверхности алюминиевой подложки после гибридизации с мишенью, маркированной красителем $Su5$. Показаны графики распределения сигналов вдоль проведенной линии на флуоресцентном изображении ряда 1 зонда № 268 и ряда 2 зонда № 269.

зоны регистрации связано с неравномерностью освещения поля зрения регистрирующего прибора.

Гибридизация ДНК-мишени в щеточных ячейках. Раствор синтетической ДНК-мишени № 273 с красителем Cy5 на 3'-конце гибридизовали с иммобилизованными в ячейках ДНК-зондами, маркированными красителем Cy5 (рис. 5d).

При микроскопическом контроле в отраженном видимом свете видно, что все ячейки сохраняются на своих местах, полученная картина аналогична картине, представленной на рис. 6.

Изображение ячеек биочипа в свете их флуоресценции в спектральной области, специфичной для Cy3, после гибридизации ДНК-мишени идентично изображению, представленному на рис. 10, с полным сохранением интенсивности сигналов в индивидуальных ячейках биочипов. На рис. 11 в спектральной области, специфичной для красителя Cy5, показаны ячейки из щеточных полимеров на поверхности алюминиевой подложки после гибридизации с синтетической ДНК-мишенью № 273, маркированной красителем Cy5.

Среднее значение сигналов в рядах 1 и 3 зонда № 268 на канале Cy5 после вычета фона составляет 14900 о.е. В случае зонда № 269 среднее значение сигналов в рядах 2 и 4 на канале Cy5 после вычета фона составляет 8900 о.е. Дискриминационное отношение сигналов совершенных дуплексов к сигналам несовершенных дуплексов (зонд № 268/2699) на канале Cy5 после вычета фона составляет $(14900/8900)$ 1.67.

Гибридизационный сигнал зависит не только от нуклеотидной последовательности ДНК-зондов, но и от их количества в ячейке. Зонды в ячейках иммобилизованы сайт-специфично с аминокислотой C6-аминомодификатора, не затрагивая экзоциклические аминокислоты нуклеотидов. Иммобилизованные таким методом ДНК-зонды полностью сохраняют способность к комплементарному взаимодействию с ДНК-мишенями. Поэтому можно вычислить гибридизационный сигнал, приходящийся на единицу иммобилизованного в ячейке зонда, т.е. нормировать гибридизационный сигнал на сигнал иммобилизованного зонда. Дискриминационное отношение нормированных сигналов более точно определяет разницу между сигналами совершенных и несовершенных дуплексов. Нормированный сигнал для зонда № 268 составляет $(14900/22650)$ 0.658. Нормированный сигнал для зонда № 269 составляет $(8900/23150)$ 0.384. Дискриминационное отношение нормированных сигналов совершенных дуплексов (зонд № 268) к нормированному сигналу несовершенных дуплексов (зонд № 269) составляет $(0.658/0.384)$ 1.71.

Полученные значения дискриминационных отношений позволяют дискриминировать зонды, различающиеся заменой одного нуклеотида. Статистически значимыми принято считать различия зондов,

у которых дискриминационное отношение гибридизационных сигналов больше или равно 1.4 [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы получены следующие результаты.

Разработан метод прививки якорных аминокислот на поверхности подложек из алюминиевой фольги реакцией с АПТЭС с контролем концентрации аминокислот по связыванию с флуоресцентным красителем с применением цифровой флуоресцентной микроскопии.

Разработан метод покрытия поверхности алюминиевых подложек тонким прочным умеренно гидрофобным слоем ПВАц, полимерные макромолекулы которого перекрестно сшиты с образованием трехмерной сетки, прочно связанной с поверхностью подложки.

Разработан метод получения ячеек из щеточных полимеров на поверхности подложек фотоиндуцированной радикальной полимеризации “от поверхности” с формированием методом фотолитографии матрицы ячеек размером 200×200 мкм с шагом 600 мкм. Гидрофильные ячейки с четко очерченными границами регулярно расположены на гидрофобной поверхности. Полимерное покрытие с ячейками не растворяется и не отслаивается от подложки при нагревании в деионизированной воде и в ТЕ (Трис-EDTA) pH 8.0 при 95°C в течение 2 ч. На полимерных цепях расположены реактивные карбоксильные группы.

Анализ связывания с флуоресцентным красителем позволил оценить концентрацию химически доступных карбоксильных групп в ячейках биочипа (рис. 5b), которая составила 170 пмоль/см². Ранее на поверхности ПЭТ-подложек методом щелочного травления удалось получить карбоксильные группы с концентрацией только 8 пмоль/см² [23].

Подобран состав растворов ДНК-зондов и условия их микрокапельного нанесения на заранее сформированную матрицу гидрофильных ячеек, обеспечивающие одинаковую дозировку ДНК-зондов и ковалентную иммобилизацию в повторяющихся ячейках.

С использованием гибридизационного анализа с синтетической ДНК-мишенью, представляющей собой участок экзона 7 гена *ABO* человека, показано сохранение гибридизационной активности иммобилизованных ДНК-зондов.

Представленные методы могут быть использованы для разработки технологии параллельного множественного экспресс-микроанализа нуклеиновых кислот “лаборатория на чипе” для выявления соматических и инфекционных заболеваний человека.

Авторы выражают благодарность Р.А. Юрасову за помощь в использовании компьютерной программы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-14-00287-П).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Yershov G., Barsky V., Belgovskiy A., Kirillov E., Kreindlin E., Ivanov I., Parinov S., Guschin D., Drobishev A., Dubiley S., Mirzabekov A. (1996) DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 4913–4918.
doi: 10.1073/pnas.93.10.4913
- Beaudet A.L., Belmont J.W. (2008) Array-based DNA diagnostics: let the revolution begin. *Annu. Rev. Med.* **59**, 113–129.
doi: 10.1146/annurev.med.59.012907.101800
- Gryadunov D., Dementieva E., Mikhailovich V., Nasedkina T., Rubina A., Savvateeva E., Fesenko E., Chudinov A., Zimenkov D., Kolchinsky A., Zasedatelev A. (2011) Gel-based microarrays in clinical diagnostics in Russia. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* **11**, 839–853.
https://doi.org/10.1586/ERM.11.73
- Strizhkov B.N., Drobyshev A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. (2000) PCR amplification on a microarray of gel-immobilized oligonucleotides: detection of bacterial toxin- and drug-resistant genes and their mutations. *BioTechniques*. **29**, 844–857.
doi: 10.2144/00294rr01
- Tillib S.V., Strizhkov B.N., Mirzabekov A.D. (2001) Integration of multiple PCR amplifications and DNA mutation analyses by using oligonucleotide microchip. *Analyt. Biochemistry*. **292**, 155–160.
doi:10.1006/abio.2001.50821
- Pemov A., Modi H., Chandler D.P., Bavykin S. (2005) DNA analysis with multiplex microarray-enhanced PCR. *Nucl. Acids Res.* **33**, e11.
doi:10.1093/nar/gnh184
- Khodakov D.A., Zakharova N.V., Gryadunov D.A., Filatov F.P., Zasedatelev A.S., Mikhailovich V.M. (2008) An oligonucleotide microarray for multiplex real-time PCR identification of HIV-1, HBV, and HCV. *BioTechniques*. **44**, 241–248.
doi 10.2144/000112628
- Chudinov A.V., Kolganova N.A., Egorov A.E., Fesenko D.O., Kuznetsova V.E., Nasedkina T.V., Vasiliskov V.A., Zasedatelev A.S., Timofeev E.N. (2015) Bridge DNA amplification of cancer-associated genes on cross-linked agarose microbeads. *Microchim. Acta*. **182**, 557–463.
doi: 10.1007/s00604–014–1357–8.
- Лапа С.А., Клочихина Е.С., Мифтахов Р.А., Заседателев А.С., Чудинов А.В. (2021) Мультиплексная ПЦР на чипе с прямой детекцией удлинения иммобилизованного праймера. *Биоорганическая химия*. **47**, 652–656.
https://doi.org/10.31857/S0132342321050298
- Лапа С.А., Мифтахов Р.А., Клочихина Е.С., Ам-мур Ю.И., Благодатских С.А., Шершов В.Е., Заседателев А.С., Чудинов А.В. (2021) Разработка мультиплексной ОТ-ПЦР с иммобилизованными праймерами для идентификации возбудителей инфекционной пневмонии человека. *Молекулярная биология*. **55**, 944–955.
doi: 10.1134/S0026893321040063
- Lysov Y., Barsky V., Urasov D., Urasov R., Cherepanov A., Mamaev D., Yegorov Y., Chudinov A., Surzhikov S., Rubina A., Smoldovskaya O., Zasedatelev A. (2017) Microarray analyzer based on wide field fluorescent microscopy with laser illumination and a device for speckle suppression. *Biomed. Optics Express*. **8**, 4798–4810.
https://doi.org/10.1364/BOE.8.004798
- Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Emelyanova M.A., Guseinov T.O., Lapa S.A., Nasedkina T.V., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. (2017) Synthetic route to novel zwitterionic pentamethine indocyanine fluorophores with various substitutions. *Dyes Pigments*. **147**, 199–210.
http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.07.052
- Barsky V., Perov A., Tokalov S., Chudinov A., Kreindlin E., Sharonov A., Kotova E., Mirzabekov A. (2002) Fluorescence data analysis on gel-based biochips. *J. Biomol. Screening*. **7**, 247–257.
https://doi.org/10.1177/108705710200700308
- Мифтахов Р.А., Иконникова А.Ю., Василисков В.А., Лапа С.А., Левашова А.И., Кузнецова В.Е., Шершов В.Е., Заседателев А.С., Наседкина Т.В., Чудинов А.В. (2023) Биочип с ячейками из щеточных полимеров с реактивными карбоксильными группами для анализа ДНК. *Биоорганическая химия*. **49**, 641–648.
doi: 10.31857/S0132342323050044
- Lee J.G., Cheong K.H., Huh N., Kim S., Choi J.W., Ko C. (2006) Microchip-based one step DNA extraction and real-time PCR in one chamber for rapid pathogen identification. *Lab. Chip*. **6**, 886–895.
https://doi.org/10.1039/B515876A
- Sin E.J., Moon Y.S., Lee Y.K., Lim J.O., Huh J.S., Choi S.Y., Sohn Y.S. (2012) Surface modification of aluminum oxide for biosensing application. *Biomed. Engin: Applications, Basis, Commun.* **24**, 111–116.
doi: 10.1142/S1016237212500093
- Chai C., Lee J., Takhistove P. (2010) Direct detection of the biological toxin in acidic environment by electrochemical impedimetric immunosensor. *Sensors*. **10**, 11414–11427.
https://doi.org/10.3390/s101211414
- Spitsyn M.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Emelyanova M.A., Guseinov T.O., Lapa S.A., Nasedkina T.V., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. (2017) Synthetic route to novel zwitterionic pentamethine indocyanine fluorophores with various substitutions. *Dyes Pigments*. **147**, 199–210.
http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.07.052
- Schubert J., Chanana M. (2019) Coating matters: review on colloidal stability of nanoparticles with biocompatible coatings in biological media, living cells and organisms. *Curr. Med. Chem.* **25**(35), 4556–4586.
doi: 10.2174/0929867325666180601101859
- Sim Y.J., Seo E.K., Choi G.J., Yoon S.J., Jang J. (2009) UV-induced crosslinking of poly(vinyl acetate) films containing benzophenone. *J. Korean Soc. Dyers Finishers*. **21**(4), 33–38.

doi:10.5764/TCF.2009.21.4.033

21. Qu B.J., Xu Y.H., Ding L.H., Ranby B. (2000) A new mechanism of benzophenone photoreduction in photoinitiated crosslinking of polyethylene and its model compounds. *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **38**(6), 999–1005. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0518\(20000315\)38:6<999::AID-POLA9>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0518(20000315)38:6<999::AID-POLA9>3.0.CO;2-1)
22. Ogiwara Y., Kanda M., Takumi M., Kubota H. (1981) Photosensitized grafting on polyolefin films in vapor and liquid phases. *J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed.* **19**, 457. <https://doi.org/10.1002/pol.1981.130190905>
23. Мифтахов Р.А., Лапа С.А., Шершов В.Е., Заседа-
тева О.А., Гусейнов Т.О., Спицын М.А., Кузнецова В.Е.,
Мамаев Д.Д., Лысов Ю.П., Барский В.Е., Тимофе-
ев Э.Н., Заседачев А.С., Чудинов А.В. (2018) Получе-
ние активных карбоксильных групп на поверхности по-
лиэтилентерефталатной пленки и количественный ана-
лиз этих групп с помощью цифровой люминесцентной
микроскопии. *Биофизика.* **63**, 661–668.
<https://doi.org/10.1134/S0006350918040127>
24. Sorokin N.V., Chechetkin V.R., Livshits M.A., Pan'kov S.V.,
Donnikov M.Y., Gryadunov D.A., Lapa S.A., Zasedate-
lev A.S. (2014) Discrimination between perfect and mis-
matched duplexes with oligonucleotide gel microchips: role
of thermodynamic and kinetic effects during hybridization.
J. Biomol. Struct. Dynamics. **22**, 725–734.
doi: 10.1080/07391102.2005.10507039

DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL MICROCHIPS ON AN ALUMINUM SUPPORT WITH CELLS MADE OF BRUSH POLYMERS

I. Yu. Shishkin¹, G. F. Shtylev¹, V. E. Barsky¹, S. A. Lapa¹, O. A. Zasedateleva¹,
V. E. Kuznetsova¹, V. E. Shershov¹, V. A. Vasiliskov¹, S. A. Polyakov¹, A. S. Zasedatelev¹,
A. V. Chudinov^{1, *}

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

*e-mail: chud@eimb.ru

A method has been developed for manufacturing biological microchips on an aluminum substrate with hydrophilic cells from brush copolymers with the formation of a matrix of cells using photolithography. The surface of aluminum substrates was previously coated with a thin, durable, moderately hydrophobic layer of cross-linked polymer to prevent contact with the aluminum surface of the components used in the analysis of nucleic acids. Aluminum biochip substrates have high thermal conductivity and low heat capacity, which is important for the development of methods for multiplex PCR analysis on a chip. Oligonucleotide probes were covalently immobilized in the cells of the biochip. The preservation of the hybridization activity of the immobilized DNA probes was demonstrated in a hybridization analysis with a synthetic DNA target representing a section of the sequence of the 7th exon of the human *ABO* gene. The developed methods can be used in the development of a technology for parallel multiple rapid microanalysis of nucleic acids “lab on a chip” for the detection of human somatic and infectious diseases

Keywords: biochips, brush polymers, immobilization of oligonucleotides, DNA hybridization analysis

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.112

СИНТЕЗ БИСБЕНЗОКСАЗОЛЬНОГО АНАЛОГА Hoechst 33258 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОГО GC-СЕЛЕКТИВНОГО ДНК-ЛИГАНДА

© 2024 г. А. Ф. Арутюнян^а, М. С. Аксенова^а, А. А. Костюков^б,
А. А. Стомахин^а, Д. Н. Калужный^а, А. Л. Жузе^{а, *}

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

^бИнститут биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук,
Москва, 119334 Россия

*e-mail: zhuze@eimb.ru

Поступила в редакцию 17.11.2023 г.

После доработки 20.12.2023 г.

Принята к публикации 20.12.2023 г.

Методом компьютерного моделирования получена структура потенциального GC-специфичного ДНК-лиганда, образующего в узкой бороздке комплекс, подобный комплексу Hoechst 33258 на АТ-богатых участках ДНК. На основе этой модели синтезирован бисбензоксазольный лиганд **MBoz₂A**. С использованием спектрофотометрических методов показано образование комплекса исследуемого соединения с ДНК различного нуклеотидного состава.

Ключевые слова: ДНК, узкобороздочный лиганд, сиквенс-специфичность, Hoechst 33258, бисбензоксазольная структура, спектрофотометрия, круговой дихроизм

DOI: 10.31857/S0026898424030123, EDN: JCCURC

ВВЕДЕНИЕ

Изучение низкомолекулярных лигандов ДНК остается крайне важным направлением молекулярной биологии, не теряющим свою актуальность на протяжении уже нескольких десятилетий.

Узкобороздочные лиганды, учитывая их способность обратимо и нековалентно связываться с В-формой дцДНК по узкой бороздке, не вызывая значительных пространственных изменений структуры ДНК, представляют значительный интерес [1]. Первыми представителями данного класса лигандов стали природные антибиотики нетропсин и дистамицин А, которые являются АТ-специфичными лигандами. Пирролкарбоксамидный фрагмент, содержащийся в структуре этих антибиотиков, образует водородные связи с аденином или тиминном в ДНК, обуславливая образование комплекса [2]. Подобным образом формируют комплекс и синтетические, широко применяемые в настоящее время в цитологических исследованиях узкобороздочные лиганды серии Hoechst и DAPI, содержащие в своей структуре бензимидазол или

индол, соответственно, выступающие в качестве пространственного аналога пирролкарбоксамидного фрагмента [3]. Такие лиганды, обладающие сопряженной ароматической структурой, являются флуоресцентными красителями, используемыми в качестве флуоресцентных маркеров ДНК.

На данный момент изучено большое количество узкобороздочных лигандов различной химической природы, однако почти все они относятся к АТ-специфичным соединениям. Создание универсальных GC-специфичных мотивов позволит сконструировать лиганды, направленные на определенные последовательности ДНК, что сделает такие молекулы крайне ценным инструментом в цитологических исследованиях, а также перспективным объектом для использования в качестве биологически активных соединений.

До сих пор основным достижением в области получения GC-специфичных лигандов остаются работы Р. Dervan и соавт. [4–7], посвященные синтезу полиамидных димерных соединений на основе модификации АТ-специфичных узкобороздочных антибиотиков нетропсина и дистамицина А, пирролкарбоксамидный фрагмент в которых заменен на метилимидазолкарбоксамидный. Эта структура способна образовывать водородную связь с атомом водорода аминогруппы гуанина.

Сокращения: дцДНК – двухцепочечная ДНК; HBTU – 2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионмгексафторфосфат; DIPEA – диизопропилэтиламин; DMAPA – N, N-диметиламинопропиламин; DMA – диметилацетамид; DMF – диметилформамид.

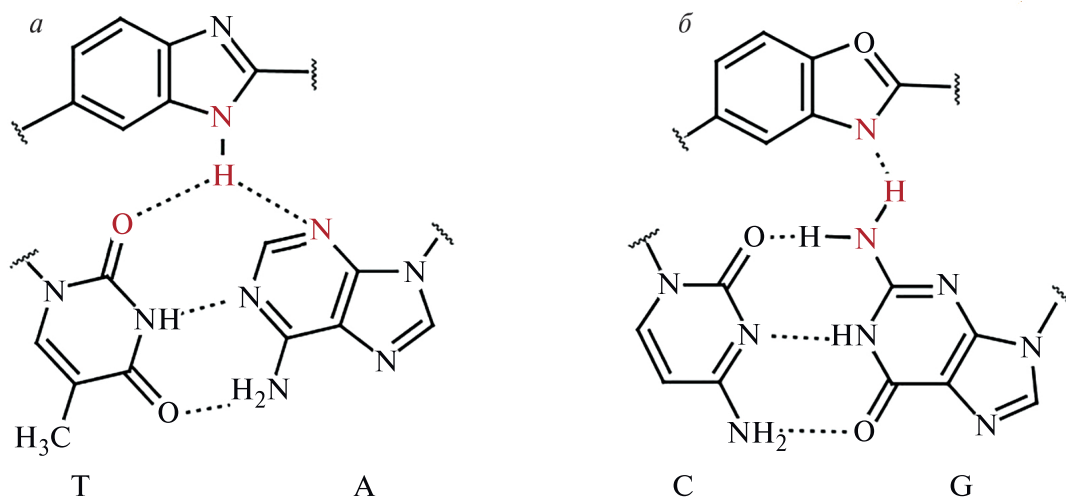


Рис. 1. Образование водородной связи между бензимидазолом и АТ-парой (а) и бензоксазолом и ГС-парой ДНК (б).

Другой подход разработан W. Wilson и соавт. [8–10], которые синтезировали полисопряженные структуры, содержащие N-метилбензимидазолтиофен (N-MeBT), где атом азота 1N бензимидазольного блока является акцептором водорода в образовании водородной связи с NH_2 -группой при втором атоме углерода гуанина в гуанин-цитозиновой паре, фланкированной АТ-парами. В случае дубликации N-MeBT или его комбинации с азабензимидазолом или N-алкилбензимидазолом полученные структуры могли связываться с двумя не соседними ГС-парами.

Для поиска новых ГС-специфичных лигандов было решено использовать бисбензимидазольную структуру АТ-специфичного узкобороздочного флуоресцентного красителя Hoechst 33258, превратив в его структуре атомы N1 бензимидазолов из доноров в акцепторы водородных связей.

В представленной работе описан синтез нового бисбензоксазольного лиганда **MBoz₂A** (рис. 1), являющегося, согласно компьютерной модели, потенциальным ГС-специфичным агентом, содержащим в своей структуре два бензоксазольных блока в качестве ГС-связывающих фрагментов (рис. 1), а также приведены спектрофлуориметрические данные, описывающие способность исследуемого соединения образовывать комплекс с ГС-богатыми последовательностями ДНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы. В работе использовали: НВТУ (2-(1Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионгексафторфосфат), ДМАРА (N,N-диметиламинопропиламин), 3-амино-4-гидроксibenзойную кислоту, 4-гидроксibenзальдегид, диацетоксийодбензол (“Alfa Aesar”, США); DIPEA (диизопропилэтиламин) (“Fluka”, Германия); дцДНК тимуса теленка, poly(dG-dC),

poly(dG-dC), poly(dA-dT) • (poly(dA-dT)) (“Sigma”, США); DMA (диметилацетамид), MeOH, гексан, DMF (N,N-диметилформамид), EtOAc (“Реахим”, Россия). Растворы веществ в органических растворителях сушили над Na_2SO_4 . Растворители упаривали на ротационном испарителе в вакууме водоструйного насоса, как правило, при 40–50°C. Вещества сушили в вакууме над P_2O_5 и NaOH. Температуры плавления определяли на термоплавильном столике “Voethius” (Германия). Гидрирование проводили над 10% Pd/C (“Merck”, Германия) при атмосферном давлении и комнатной температуре до прекращения поглощения водорода. Чистоту полученных соединений контролировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Kieselgel 60 F254 (“Merck”) в системах А, гексан-EtOAc (2: 1); Б, гексан-EtOAc-MeOH (2: 1: 0.25); В, гексан-EtOAc-NH₃*MeOH(10%)-AcOH (1: 1: 0.5: 0.5). Вещества на хроматограммах обнаруживали в УФ-свете по поглощению при 254 нм и/или по флуоресценции при 365 нм.

Спектры ¹H-ЯМР регистрировали на спектрометре Avance 3300 МГц (“Bruker”, Германия) в DMSO-*d*₆ (δ, м.д.; J, Гц) при 30°C; в качестве внутреннего стандарта использовали сигнал остаточных протонов растворителя. Атомы водорода бензоксазольных циклов и фенола обозначены как Ar.

Масс-спектры регистрировали методом MALDI-TOF на приборе 4800 Plus (“AB Sciex”, США) в режиме регистрации положительных ионов; матрица – 2,5-дигидроксibenзойная кислота; лазер Nd: YAG, 355 нм.

Докинг. Координаты атомов двухцепочечных вторичных структур ДНК d(A-T)₁₀ и d(G-C)₁₀ получены с использованием инструмента “DNA Sequence to Structure” <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/bdna.jsp>. Частичные заряды молекулы присваиваются в соответствии с зарядом

Гастайгера с помощью программного обеспечения Open Babel 3.1.1 [12]. Файл координат атомов лигандов создан строкой SMILE и каждому атому присвоены частичные заряды Amber99. Молекулярный докинг осуществляли с помощью системы Protein-Ligand ANT (PLANTS1.2) [13]. В качестве центра связывания был выбран центр ДНК-дуплекса. Нахождение оптимальной позы осуществлялось с параметрами Speed:1, aco_ants:20 и aco_sigma:3 в пределах радиуса сферы 20 Å. Определены 10 позиций и показаны лучшие.

УФ-флуоресценция. Спектры флуоресценции записывали на спектрофлуориметре Cary Eclipse ("Varian/Agilent", США) в диапазоне длин волн 300–600 нм при длине волны возбуждения 280 нм. Время жизни возбужденного состояния флуоресценции рассчитывали по кривым затухания флуоресценции, которые регистрировали на флуориметре EasyLifeV (OBV Corp., США) при возбуждении образцов импульсным светодиодом в длине волны 280 нм. Флуоресценция детектировалась с использованием оптического фильтра с пропусканием света длины волны более 310 нм.

Спектры кругового дихроизма (КД). Спектры КД регистрировали на CD-спектрометре Jasco-715 ("Jasco Inc.", Япония) с использованием кварцевой кюветы с длиной оптического пути 10 мм. Спектры получали при ширине полосы 1 нм [ДНК], 50 мкМ (п.н.).

Синтез метил-4-гидрокси-3-нитробензол-1-карбоксимидата (I). Через раствор 4-гидрокси-3-нитробензонитрила (5.70 г, 35 ммоль) в абс. метаноле (50 мл) при 0°C пропускали интенсивный ток сухого хлористого водорода. После полного насыщения реакционную смесь выдерживали в течение 4 суток при 4°C. Растворитель упаривали в вакууме, полученный белый осадок суспендировали в абс. метаноле (20 мл), фильтровали и высушивали над NaOH. Имидат (I), выход которого составил 6.50 г (91.3%), использовали в дальнейшем синтезе без дополнительной очистки.

Синтез 2-(4-гидрокси-3-нитрофенил)-1,3-бензоксазол-5-карбоновой кислоты (II). Раствор имидата (I) (5.07 г, 22 ммоль) и 3-амино-4-гидроксибензойной кислоты (3.52 г, 23 ммоль) в абс. метаноле (75 мл) кипятили при перемешивании в течение 1 ч. Полученную смесь охлаждали до комнатной температуры, выпавший осадок отфильтровывали, промывали метанолом (3 × 20 мл) и сушили на воздухе. По данным ТСХ, в системе А продукт гомогенен. Выход соединения (II) составил 5.75 г (76.7%), $T_{пл}$: 333°C. 1H -ЯМР (DMSO- d_6): δ 7.31 (1H, д, J = 8.50, H3), 7.82 (1H, д, J = 8.92, H6), 8.00 (1H, дд, J_1 = 8.50, J_2 = 1.81, H2), 8.21 (1H, д, J = 1.81, H1), 8.26 (1H, дд, J_1 = 8.92, J_2 = 2.23, H5), 8.56 (1H, д, J = 2.23, H4).

Синтез 2-(3-амино-4-гидроксифенил)-1,3-бензоксазол-5-карбоновой кислоты (III). Суспензию

0.39 г 10% Pd/C в 20 мл DMF перемешивали в течение 30 мин в атмосфере водорода, затем вносили соединение (II) (3.90 г, 13 ммоль). По данным ТСХ спустя 1.5 ч исходное соединение в суспензии отсутствовало. Катализатор отфильтровывали, раствор упаривали, остаток растирали со 100 мл воды. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой (3 × 20 мл) и высушивали на воздухе. По данным ТСХ, в системе А продукт гомогенен. Выход соединения (III) составил 3.36 г (95.8%). т. пл.: 260°C. 1H -ЯМР (DMSO- d_6): δ 6.85 (1H, д, J = 7.88, H6), 7.35 (1H, дд, J_1 = 7.88, J_2 = 2.25, H5), 7.50 (1H, д, J = 25, H4), 7.79 (1H, д, H3), 7.97 (1H, дд, J_1 = 8.73, J_2 = 1.67, H2), 8.56 (1H, д, J = 1.67, H1).

Синтез 2-[2-(4-гидроксифенил)-1,3-бензоксазол-5-ил]-1,3-бензоксазол-5-карбоновой кислоты (V). Соединение (III) (2.00 г, 7.4 ммоль) и 4-гидроксибензальдегид (0.93 г, 7.6 ммоль) растирали в керамической ступке до гомогенности. Для синтеза основания Шиффа (IV) полученную смесь спекали на масляной бане в порошок, затем растворяли его в 20 мл DMF и при добавляли перемешивании диацетоксийодбензол (2.70 г, 8.4 ммоль), растворенный в 20 мл DMF. Спустя 3 ч выпавший осадок отфильтровывали, промывали DMF (2 × 20 мл), метанолом (4 × 20 мл) и высушивали над P_2O_5 . По данным ТСХ, в системе Б продукт гомогенен. Выход соединения (V) составил 1.61 г (58.5%), т. пл. > 350°C. Масс-спектр: 372.68 [M]⁺, 373.71 [M+H]⁺, рассчитано: 372.07 (C₂₁H₁₂N₂O₅). 1H -ЯМР (DMSO- d_6): δ 6.97 (2H, д, J = 8.73, H8), 7.85 (1H, д, J = 8.52, H4), 7.89 (1H, д, J = 8.52, H1), 7.98–8.01 (3H, м, H4.7), 8.19 (1H, дд, J_1 = 1.62, J_2 = 52, H2), 8.27 (1H, д, J = 1.38, H6), 8.40 (1H, д, J = 1.47, H3).

Синтез N-[3-(диметиламино)пропил]-2-[2-(4-гидроксифенил)-1,3-бензоксазол-5-ил]-1,3-бензоксазол-5-карбоновой кислоты (MBoz₂A). К раствору соединения (V) (58 мг, 0.16 ммоль) в 20 мл DMA при перемешивании добавили DIPEA (0.026 мл, 0.15 ммоль), HBTU (56 мг, 0.15 ммоль) и N, N-диметиламинопропиламин (0.0157 мл, 0.13 ммоль). Спустя 3 ч раствор упаривали в вакууме, остаток растирали в метаноле и суспендировали на ультразвуковой бане. Осадок отфильтровывали, промывали метанолом (3 × 20 мл) и высушивали на воздухе. По данным ТСХ в системе В продукт гомогенен. Выход MBoz₂A составил 32 мг (54.9%), т. пл. > 350°C. Масс-спектр: 456.48 [M]⁺, рассчитано: 456.49 (C₂₆H₂₄N₄O₄). 1H -ЯМР (DMSO- d_6): δ 1.93 (2H, м, Hb), 2.81 (6H, с, Hd), 3.13 (4H, м, Ha, Hc), 7.01 (2H, д, J = 8.7, H8), 7.9–8.0 (3H, м, H5, H4, H1), 8.10 (2H, д, J = 8.7, H7), 8.26 (1H, дд, J_1 = 8.46, J_2 = 1.47, H2), 8.33 (1H, с, H6), 8.52 (1H, д, J = 1.08, H3), 8.73 (1H, м, NH), 10.44 (1H, уш.с, OH).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Компьютерное моделирование комплексов
Hoechst 33258 и MBoz₂A с последовательностью
d(A-T)₁₀ и d(G-C)₁₀ дцДНК*

На рис. 2 представлена компьютерная модель комплексов MBoz₂A и Hoechst 33258 с d(A-T)₁₀ и d(G-C)₁₀.

Результаты докинга подтвердили правильность предположения, выдвинутого при дизайне

соединения MBoz₂A, о возможности образования двух водородных связей между *sp*-гибридными атомами 1N оксазольного фрагмента и двумя аминогруппами гуанина при формировании комплекса в малой бороздке ДНК, содержащей альтернирующие GC-пары. Дополнительная водородная связь может образовываться между эндоциклическим атомом кислорода в сахарофосфатном остоле ДНК и протонированным атомом азота N, N-диметиламинопропильного фрагмента. Согласно докингу MBoz₂A на ДНК с альтернирующими AT-парами,

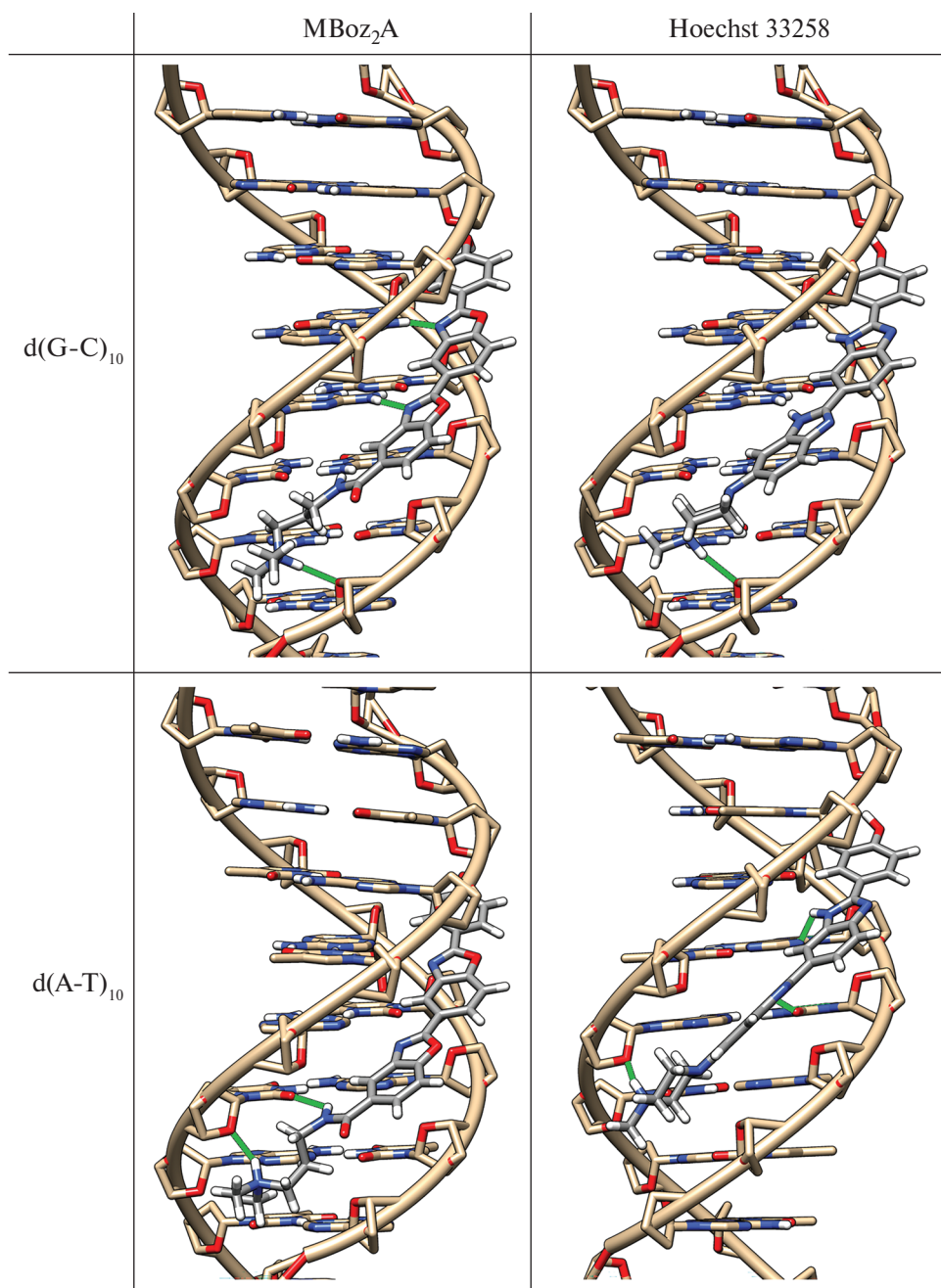


Рис. 2. Компьютерная модель комплексов MBoz₂A и Hoechst 33258 с d(A-T)₁₀ и d(G-C)₁₀. Атомы С (лиганда) – серый, С (ДНК) – золотистый, N – синий, O – красный, H – белый. Предсказанные водородные связи отмечены жирной зеленой линией.

наилучший комплекс располагался аналогично комплексу с $d(G-C)_{10}$, по всей видимости, за счет вклада гидрофобных взаимодействий. При локализации соединения в узкой бороздке АТ-дуплекса возможно образование двух водородных связей — между карбоксамидным атомом водорода и кетогруппой тимина. Аналогичное взаимодействие возможно также между эндоциклическим атомом кислорода в сахарофосфатном остоле ДНК и протонированным азотом N, N-диметиламинопропильного фрагмента. Как и предполагалось, не обнаружено возможности образования водородных связей бензоксазольных фрагментов соединения с АТ-нуклеотидами ДНК.

При докинге соединения Hoechst 33258 наилучший комплекс также находился в узкой бороздке ДНК. В случае АТ-дуплекса возможно образование трех водородных связей, две из которых — между бензомидазольными фрагментами и кетогруппой О6 тимина и имино-N3 аденина, а третья — между протонированным азотом пиперазина и кислородом дезоксирибозы. GC-дуплекс может формировать только одну водородную связь с дезоксирибозой. Предсказанный комплекс Hoechst 33258 хорошо соответствует структурным данным,

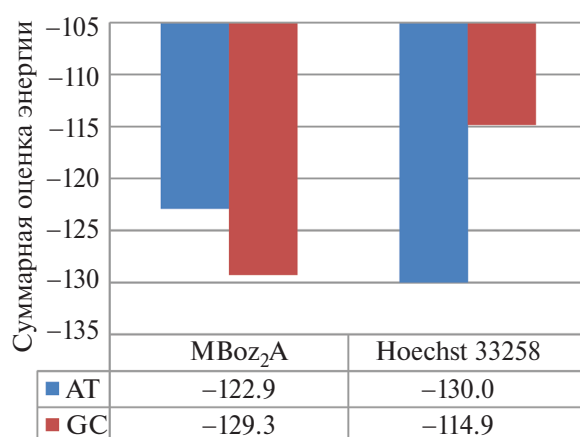


Рис. 3. Расчетные значения энергии комплексов MBoz₂A и Hoechst 33258 с $d(A-T)_{10}$ и $d(G-C)_{10}$.

полученным на АТ-богатых участках двойной спирали ДНК [14].

Согласно расчетным значениям (рис. 3), новый лиганд MBoz₂A предпочтительно образует комплексы с GC-последовательностями ДНК. Относительное расчетное значение энергии комплекса равно -129.3, что сопоставимо со значениями для

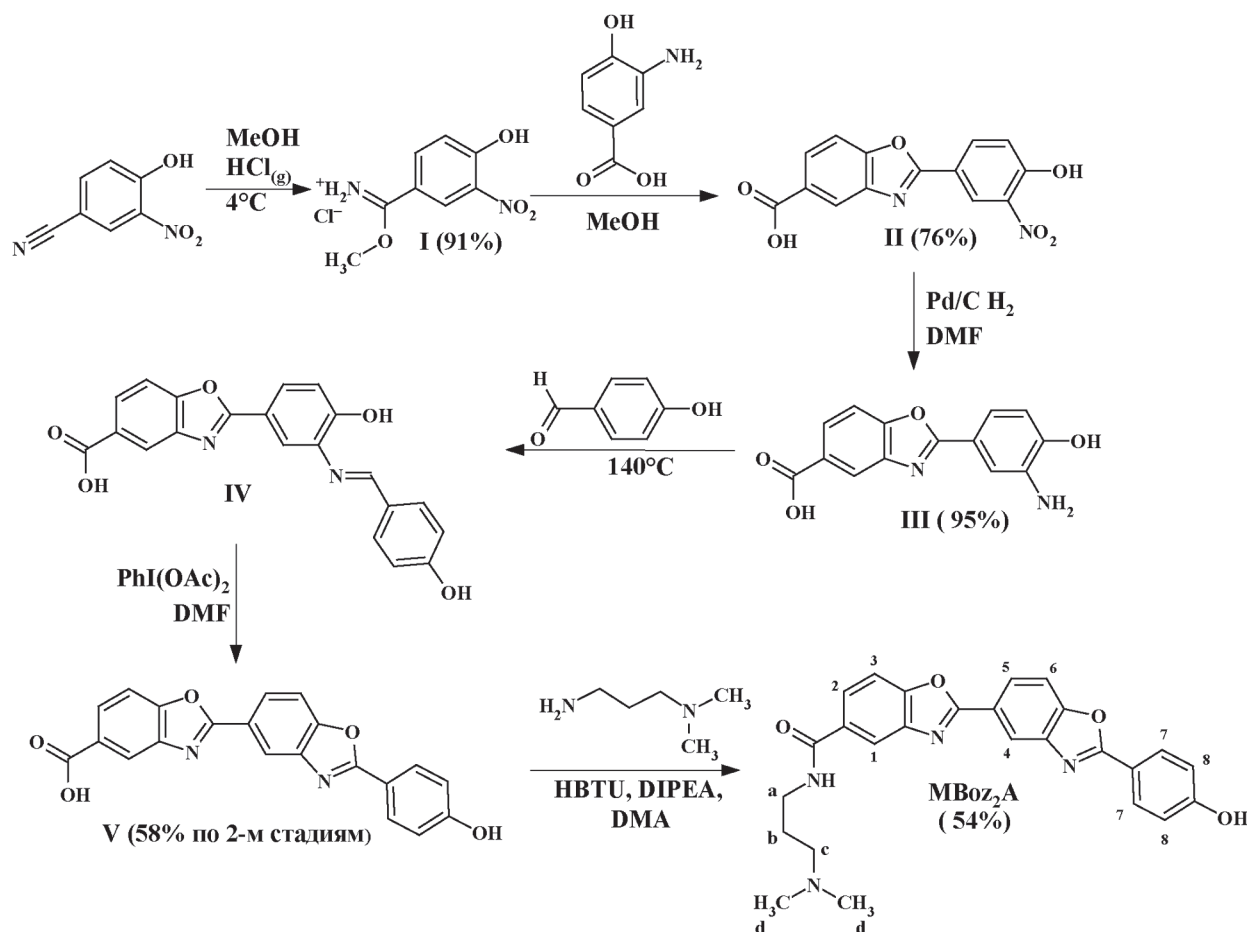


Рис. 4. Синтез MBoz₂A бисбензоксазольного аналога Hoechst 33258.

комплекса Hoechst 33258 на $d(A-T)_{10}$ (–130.0). Таким образом, данные компьютерного моделирования подтверждают наше предположение о способности $MBoz_2A$ образовывать комплекс с GC-богатыми последовательностями по узкой бороздке.

Синтез $MBoz_2A$

Мономерный бисбензоксазол $MBoz_2A$ был синтезирован из 4-гидрокси-3-нитробензонитрила, превращенного в реакции Пиннера в хлоргидрат иминоэфира (I), сконденсированного затем с 3-амино-4-гидроксибензойной кислотой.

Полученное нитросоединение (II) было восстановлено каталитическим гидрированием в амин (III). Конденсация амина (III) с 4-гидроксibenзальдегидом привела к образованию основания Шиффа (IV), которое окислили диацетоксидбензолом с образованием производного бисбензоксазола (V). Синтез целевого соединения $MBoz_2A$ был завершен в результате взаимодействия (V) с N,N-диметилпропиламином в присутствии конденсирующего агента HBTU. Структура синтезированных соединений подтверждена методами

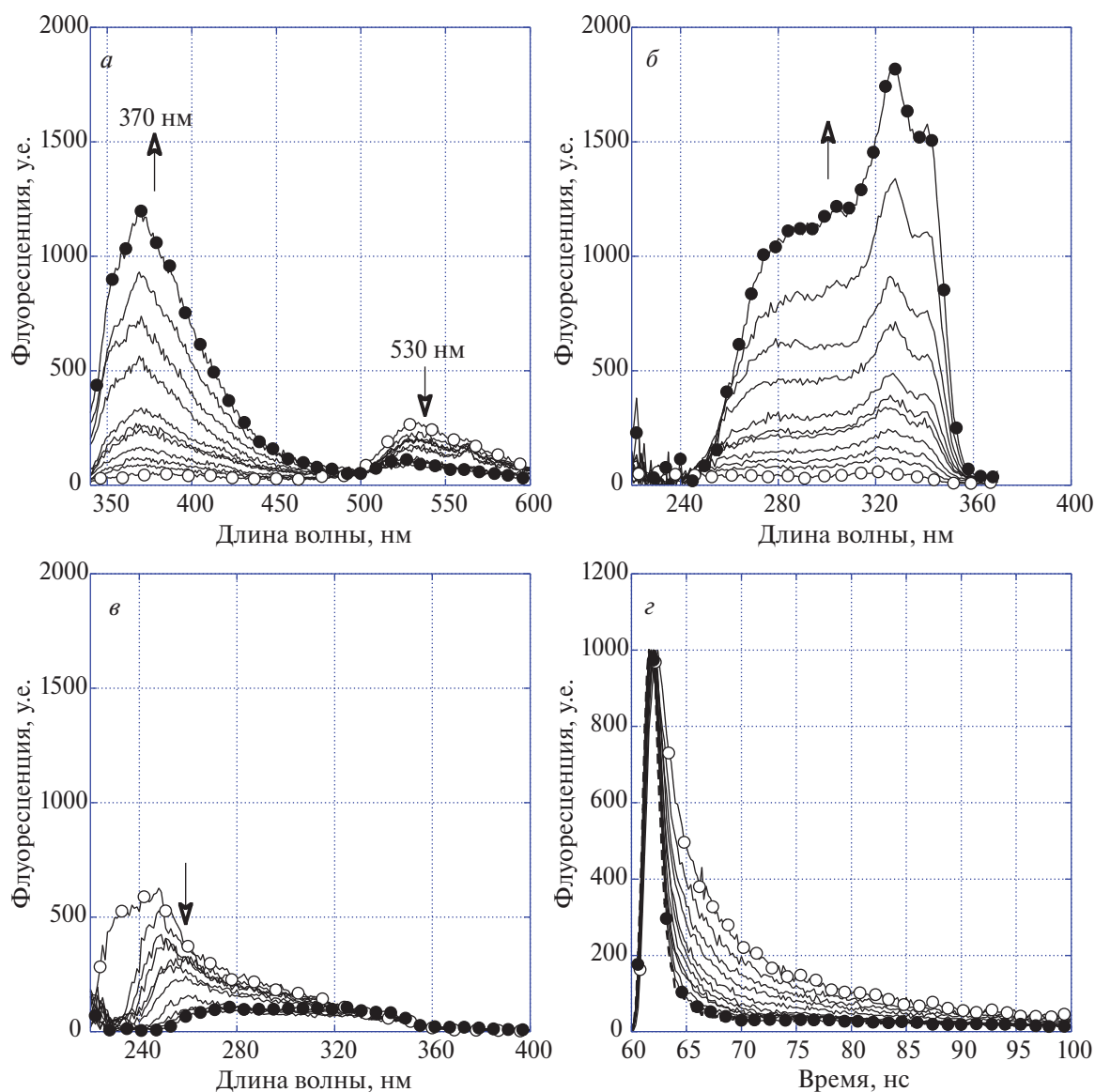


Рис. 5. Изменение флуоресценции $MBoz_2A$ в системе вода–ДМСО. а – Спектры флуоресценции при возбуждении на длине волны 280 нм; б – спектры возбуждения флуоресценции на длине волны 370 нм; в – спектры возбуждения флуоресценции на длине волны 530 нм; г – кривые затухания флуоресценции, регистрируемой через фильтр, пропускающий свет более 305 нм при возбуждении импульсным светодиодом с длиной волны 280 нм. Пустые кружки – вода, последующие спектры с шагом увеличения объемной доли ДМСО на 10%, полные кружки – 100% ДМСО. Стрелки указывают изменение интенсивности флуоресценции при увеличении доли ДМСО в растворе. $[MBoz_2A]$ 10 мкМ, ширина щели возбуждения флуоресценции 5 нм, кювета 2×10 мм, комнатная температура ($\sim 25^\circ C$).

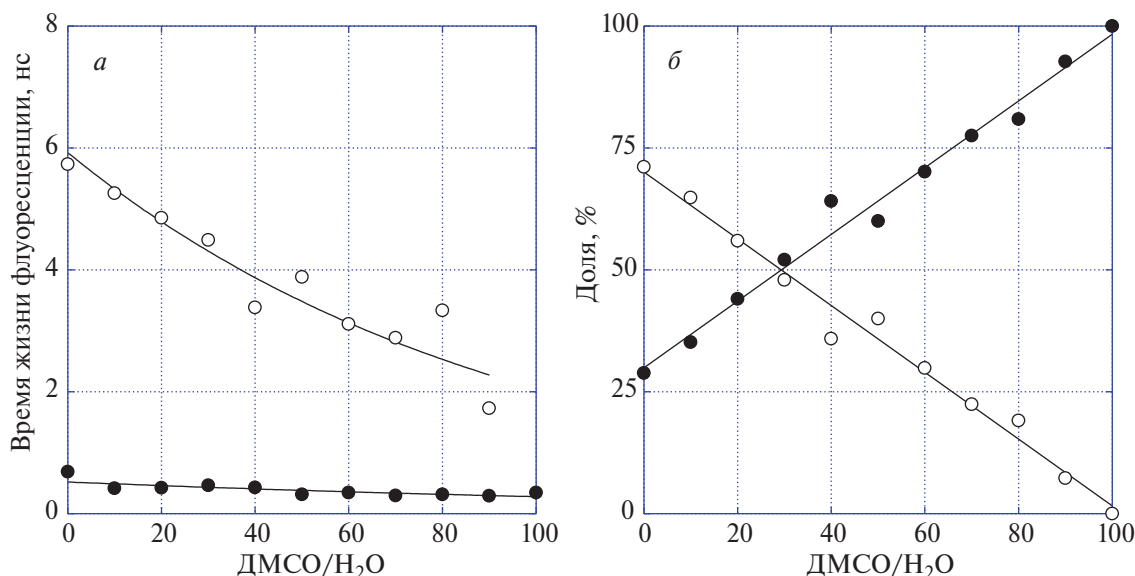


Рис. 6. Флуоресценция сольватных форм **MBoz₂A** в системе вода–ДМСО в зависимости от объемной доли ДМСО. *a* – Время жизни флуоресценции сольватных форм; *б* – доля вклада сольватных форм в общую флуоресценцию. Пустые кружки – сольватная форма с большим временем жизни флуоресценции (агрегат), полные кружки – сольватная форма с коротким временем жизни флуоресценции (мономер).

¹H-ЯМР-спектроскопии и спектрометрии MALDI-TOF. Схема синтеза **MBoz₂A** представлена на рис. 4.

Физико-химические исследования

Физико-химические исследования **MBoz₂A**.

Определяли спектральные характеристики нового соединения **MBoz₂A** и изучали его склонность к агрегации в водных растворах. В концентрации до 10 мМ соединение показало приемлемую растворимость в ДМСО, но в воде в столь высоких концентрациях не растворялось. Поэтому с целью изучения состояния соединения в водных растворах были определены его спектральные свойства в относительно низкой концентрации – 10 мкМ в ДМСО и в растворах ДМСО–вода с разным соотношением компонентов.

Спектры флуоресценции соединения в ДМСО имеют максимум около 370 нм. При этом максимум возбуждения соответствует максимуму поглощения при 330 нм (рис. 5б, в, спектры, отмеченные темными кружками). Добавление воды к ДМСО приводило к падению полосы коротковолновой флуоресценции и появлению длинноволновой полосы с максимумом 530 нм (рис. 5а). Такое изменение спектров флуоресценции может свидетельствовать об образовании агрегатных комплексов при димеризации соединений или образовании ассоциатов более высокого порядка в водных растворах. Однако ДМСО поглощает УФ-излучение, поэтому в диапазоне возбуждения получены лишь искаженные спектры, показывающие смещение максимума возбуждения длинноволновой флуоресценции в более коротковолновую область по сравнению

с возбуждением коротковолновой флуоресценции (рис. 5в). В водном растворе с минимальной концентрацией ДМСО наблюдалось практически полное тушение коротковолновой флуоресценции и максимальная интенсивность длинноволновой. При этом максимум возбуждения длинноволновой флуоресценции при 530 нм сместился в 240 нм (рис. 5в, пустые символы).

В дополнение к спектральным характеристикам мы изучили затухание флуоресценции и время жизни возбужденного состояния. При возбуждении импульсным светодиодом при 280 нм общая флуоресценция регистрировалась при длинах волн выше 305 нм (рис. 5г). Наибольшее время затухания флуоресценции соединение имело в воде. При увеличении содержания ДМСО время затухания сокращалось. Кривые затухания аппроксимировали биэкспоненциальным законом и определили времена жизни возбужденного состояния двух компонент. В чистом ДМСО кривая затухания хорошо описывалась одной экспонентой с характерным временем около 0.5 нс. В присутствии воды в растворе появляется долгоживущая компонента, время жизни которой зависит от доли ДМСО в растворе (от 2 нс в 90% ДМСО до 6 нс в воде), причем доля короткоживущей компоненты уменьшается при наличии воды в растворе. С использованием более длинноволнового фильтра (> 475 нм) нами показано, что долгоживущая компонента соответствует длинноволновой полосе. Зависимость времени жизни длинноволновой компоненты от количества ДМСО в растворе можно объяснить тем, что ДМСО является динамическим тушителем с переносом электрона в возбужденном состоянии.

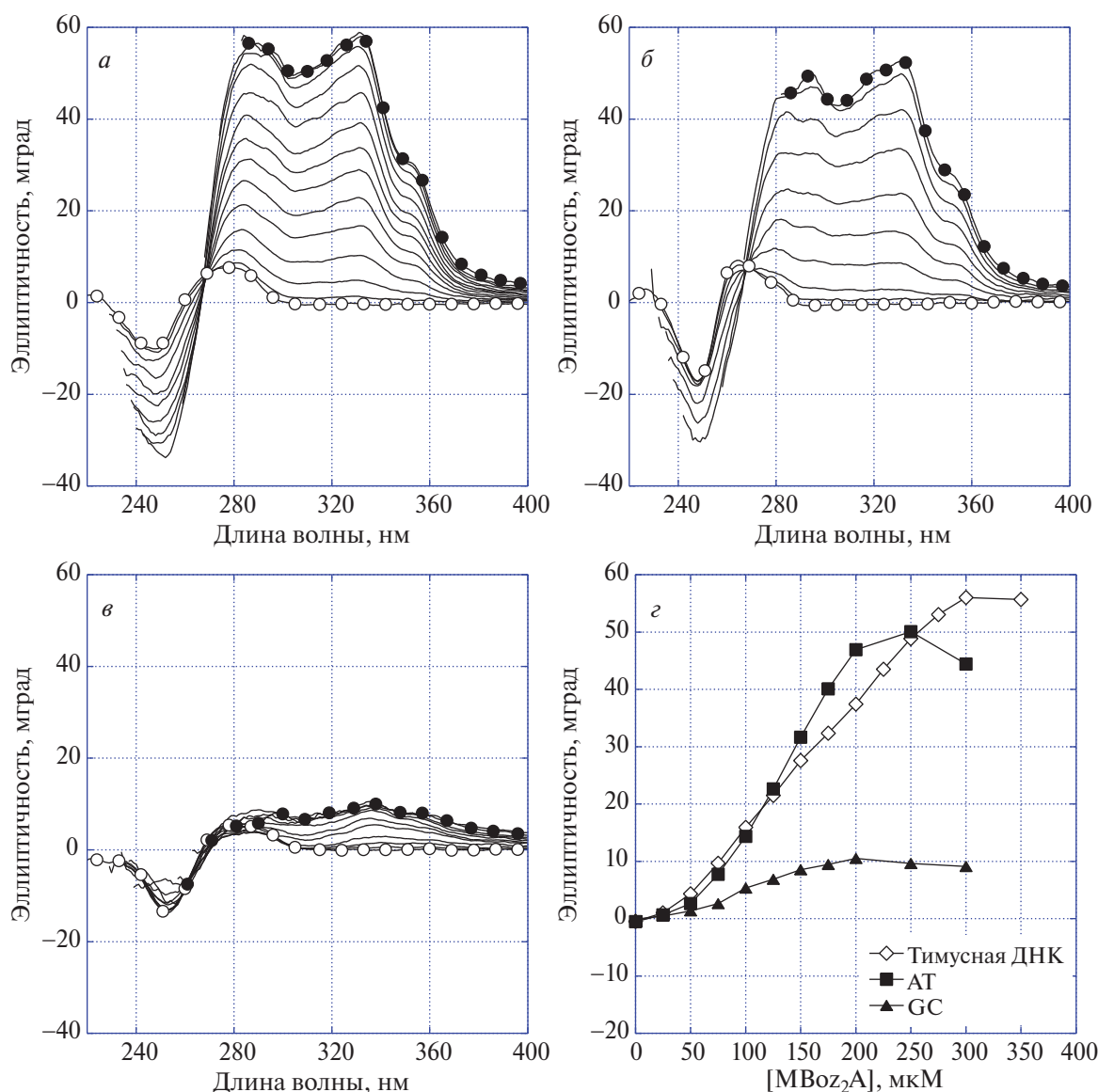


Рис. 7. Спектры кругового дихроизма **MBoz₂A** при образовании комплекса с ДНК разного нуклеотидного состава: ДНК тимуса теленка (а), poly(dA-dT) • poly(dA-dT) (б), poly(dG-dC) • poly(dG-dC) (в). Пустые кружки – ДНК в отсутствие лиганда, полные кружки – максимальная концентрация лиганда в растворе ДНК. Зависимость амплитуды сигнала кругового дихроизма при длине волны 330 нм от концентрации **MBoz₂A** (г). Пустые ромбы – ДНК тимуса теленка; закрашенные квадраты – poly(dA-dT) • poly(dA-dT); закрашенные треугольники – poly(dG-dC) • poly(dG-dC); [ДНК] 50 мкМ (п.н.) в 10 мМ Na-фосфатном буфере pH 7.0, 25°C.

Изучение изменений спектров флуоресценции и времен жизни возбужденного состояния позволяют нам предположить, что длинноволновая компонента флуоресценции соответствует ассоциатам соединения в водном окружении [15].

Изучение спектральных свойств **MBoz₂A в комплексе с ДНК различного нуклеотидного состава.** В водном растворе мы наблюдали небольшую концентрацию соединений в мономерном состоянии, способных взаимодействовать с ДНК по предложенному нами механизму. Для подтверждения нашей теории мы изучили изменение дихроизма

соединений в присутствии ДНК разного нуклеотидного состава (рис. 6).

Показано, что добавление **MBoz₂A** к 10 мкМ раствору синтетического альтернирующего дуплекса poly(dA-dT) • poly(dA-dT) (рис. 7б) и ДНК тимуса теленка (рис. 7а) приводит к появлению положительной полосы индуцированного дихроизма, что свидетельствует о взаимодействии исследуемого вещества с ДНК и об образовании неинтеркаляционного комплекса в одной из бороздок. Однако гиперинтенсивный рост индуцированного сигнала и изменение спектра дихроизма дДНК говорит об образовании комплексов,

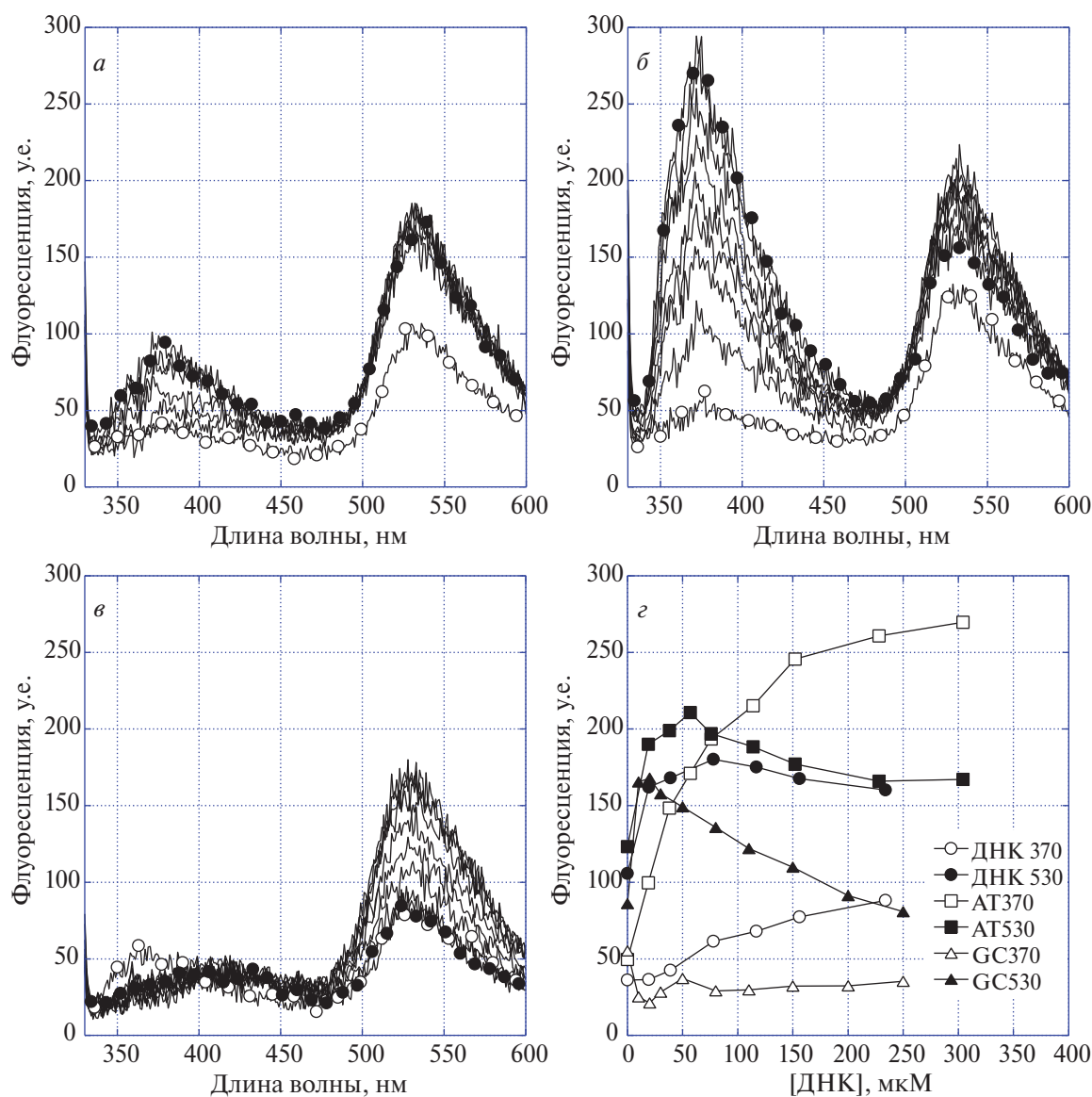


Рис. 8. Спектры флуоресценции MBoz_2A при образовании комплекса с ДНК различного нуклеотидного состава. ДНК тимуса телят (*a*); $\text{poly(dA-dT)} \cdot \text{poly(dA-dT)}$ (*б*); $\text{poly(dG-dC)} \cdot \text{poly(dG-dC)}$ (*в*). Пустые кружки – MBoz_2A в отсутствие ДНК, полные кружки – максимальная концентрация ДНК в растворе лиганда. Зависимость интенсивности флуоресценции MBoz_2A от концентрации ДНК (*г*). Пустые символы – флуоресценция на длине волны 370 нм; заполненные символы – флуоресценция при 530 нм; кружки – ДНК тимуса телят; квадраты – $\text{poly(dA-dT)} \cdot \text{poly(dA-dT)}$; треугольники – $\text{poly(dG-dC)} \cdot \text{poly(dG-dC)}$; $[\text{MBoz}_2\text{A}]$ 10 мкМ в 10 мМ Na-фосфатном буфере pH 7.0, 25°C.

характеризующихся одновременной локализацией на одном участке бороздки двух или трех молекул лиганда [16]; по-видимому, такое связывание обусловлено гидрофобными взаимодействиями. При добавлении $\text{poly(dG-dC)} \cdot \text{poly(dG-dC)}$ к 10 мкМ раствору MBoz_2A (рис. 7*в*) в КД-спектрах также наблюдается образование положительной полосы, однако в данном случае практически отсутствует искажение спектра ДНК и гиперинтенсивный рост максимума, что косвенно говорит о формировании комплекса мономерной молекулы по узкой бороздке. Однако заметное комплексообразование

отмечено только при большом избытке соединения, что свидетельствует о низкой константе связывания.

Дополнительно были изучены спектры эмиссии MBoz_2A в присутствии $\text{poly(dA-dT)} \cdot \text{poly(dA-dT)}$, $\text{poly(dG-dC)} \cdot \text{poly(dG-dC)}$ и дцДНК тимуса телят (рис. 8). При добавлении ДНК любого нуклеотидного состава изначально наблюдается рост интенсивности длинноволновой полосы, что соответствует агрегации большого количества соединения на ДНК; при дальнейшем увеличении концентрации ДНК и уменьшении соотношения лиганд/ДНК соединение перераспределяется

в специфичный комплекс и происходит разрушение агрегата, которое характеризуется уменьшением флуоресценции с максимумом при 530 нм. В случае $\text{poly(dA-dT)} \cdot \text{poly(dA-dT)}$ наблюдается разгорание флуоресценции, соответствующей росту количества молекул MBoz_2A в мономерном состоянии. По всей видимости, из-за большого избытка ДНК под действием гидрофобных сил образуется комплекс мономерной молекулы и ДНК, подобный смоделированному комплексу (рис. 2). В случае $\text{poly(dG-dC)} \cdot \text{poly(dG-dC)}$ наблюдается также дальнейшее тушение агрегированной компоненты, однако не происходит разгорание полосы, соответствующей мономерному состоянию лиганда. Полученные данные не противоречат модели связывания мономеров с ДНК различного нуклеотидного состава, предположенной в докинге, однако комплекс с GC-дуплексом не проявляет мономерной флуоресценции, так как известно, что гуаниновые основания являются тушителями флуоресцентных соединений различного типа [17]. При увеличении концентрации тимусной ДНК одновременно с падением длинноволнового сигнала наблюдается небольшое разгорание мономерной компоненты, что, как мы полагаем, свидетельствует об образовании двух типов связывания мономерной молекулы, аналогичных предсказанным путем компьютерного моделирования. Однако наблюдаемое разгорание полосы 370 нм значительно ниже, чем в случае $\text{poly(dA-dT)} \cdot \text{poly(dA-dT)}$, что говорит о повышенном сродстве полученного лиганда к GC-богатым участкам ДНК.

Изучение спектральных и кинетических характеристик взаимодействия узкобороздочного лиганда MBoz_2A с молекулами тимусной ДНК, $\text{poly(dA-dT)} \cdot \text{poly(dA-dT)}$ и $\text{poly(dG-dC)} \cdot \text{poly(dG-dC)}$ позволило по изменению интенсивности флуоресценции оценить константы комплексообразования. Для ДНК и $\text{poly(dA-dT)} \cdot \text{poly(dA-dT)}$ эти значения составили 2×10^4 и $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ соответственно. Оценить значение константы связывания с $\text{poly(dG-dC)} \cdot \text{poly(dG-dC)}$ не представляется возможным, ввиду падения интенсивности флуоресценции лиганда в присутствии $\text{poly(dG-dC)} \cdot \text{poly(dG-dC)}$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами разработан способ и осуществлен многоэтапный синтез перспективного по результатам эксперимента *in silico* GC-специфичного узкобороздочного лиганда MBoz_2A — бисбензоксазольного аналога широко известного флуоресцентного ДНК-лиганда Hoechst 33258.

Анализ полученных спектрофотометрических данных позволяет сделать вывод, что лиганд MBoz_2A , обладающий достаточно высокой гидрофобностью, в воде существует преимущественно в виде агрегированной формы. Согласно спектрам

флуоресценции и кругового дихроизма комплексов MBoz_2A с дцДНК различного нуклеотидного состава, MBoz_2A является ДНК-лигандом, обладает GC-специфичностью, но имеет очень низкую константу связывания.

Таким образом, бензоксазольный мотив можно рассматривать как потенциальный каркас для создания GC-специфичных лигандов. Однако для создания бензоксазольных лигандов, обладающих большей аффинностью, необходимо решить проблему, связанную с высокой склонностью бензоксазольных соединений к агрегации в водных растворах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 23-24-00082).

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Geierstanger B.H., Wemmer D.E. (1995) Complexes of the minor groove of DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Structure*. **24**, 463–493.
2. Krey A.K., Hahn F.E. (1970) Studies on the complex of distamycin A with calf thymus DNA. *FEBS Lett.* **10**, 175–178.
3. Harshman K.D., Dervan P.B. (1985) Molecular recognition of B-DNA by Hoechst 33258. *Nucl. Acids Res.* **13**, 4825–4835.
4. Dervan P.B. (2001) Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 2215–2235.
5. Dervan P.B., Buerli R.W. (1999) Sequence-specific DNA recognition by polyamides. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 688–693.
6. Wemmer D.E., Dervan P.B. (1997) Targeting the minor groove of DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 355–361.
7. Dervan P.B., Doss R.M., Marques M.A. (2005) Programmable DNA binding oligomers for control of transcription. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*. **5**, 373–387.
8. Guo P., Paul A., Kumar A., Farahat A.A., Kumar D., Wang S., Boykin D.W., Wilson D.W. (2016) The thiophene “sigma-hole” as a concept for preorganized, specific recognition of G·C base pairs in the DNA minor groove. *Chem. Eur. J.* **22**, 15404–15412.
9. Guo P., Farahat A.A., Paul A., Hanka N.K., Boykin D.V., Wilson W.D. (2018) Compound shape effects in minor groove binding affinity and specificity for mixed sequence DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 14761–14769.
10. Wilson W.D., Paul A. (2023) Compound shape and substituent effects in DNA minor groove interactions. In: *Handbook of Chemical Biology of Nucleic Acids*. Ed. Sugimoto N. Singapore: Springer, pp. 1–39.
11. Paul A., Nanjunda R., Wilson W.D. (2023) Binding to the DNA minor groove by heterocyclic dications from AT specific to GC recognition compounds. *Curr. Protocols*. **3**(4), e729.

12. O'Boyle N.M., Banck M., Craig A.J., Morley C., Vandermeersch T., Hutchison G.R. (2011) Open Babel: an open chemical toolbox. *J. Cheminformatics*. **3**, 1–14.
13. Korb O., Stützle T., Exner T.E. (2007) An ant colony optimization approach to flexible protein–ligand docking. *Swarm Intelligence*. **1**, 115134.
14. Teng M.K., Usman N., Frederick C.A., Wang A.H. (1988) The molecular structure of the complex of Hoechst 33258 and the DNA dodecamer d (CGCGAATTCGCG). *Nucl. Acids Res.* **16**, 2671–2690.
15. Finlay A.C., Hochstein F.A., Sobin B.A., Murphy F.X. (1951) Netropsin, a new antibiotic produced by a *Streptomyces*. *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 341–344.
16. Zasedatelev A.S., Borodulin V.B., Grokhovsky S.L., Nikitin A.M., Salmanova D.V., Zhuze A.L., Gursky G.V., Shafer R.H. (1995) Mono-, di- and trimeric binding of a bis-netropsin to DNA. *FEBS Lett.* **375**, 304–306.
17. Makarska-Bialokoz M. (2014) Fluorescence quenching effect of guanine interacting with water-soluble cationic porphyrin. *J. Luminescence*. **47**, 27–33.

SYNTHESIS OF A BISBENZOXAZOLE ANALOGUE OF Hoechst 33258 AS A POTENTIAL GC-SELECTIVE DNA LIGAND

A. F. Arutyunyan¹, M. S. Aksenova¹, A. A. Kostyukov²,
A. A. Stomakhin¹, D. N. Kaluzhny¹, A. L. Zhuze¹, *

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

²Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Science, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: zhuze@eimb.ru

Using a computer modelling approach we proposed the structure of a potential GC-specific DNA ligand, which could form a complex with DNA in the minor groove similar to that formed by Hoechst 33258 at DNA AT-enriched sites. According to this model MBoz₂A, a bisbenzoxazole ligand, was synthesized. The results of spectrophotometric methods supported the complex formation of the compound under study with DNA differed in the nucleotide composition.

Keywords: DNA, minor-groove ligand, sequence-specificity, Hoechst 33258, bisbenzoxazole structure, synthesis, spectrophotometry, circular dichroism

УДК 577.214.5

РЕВИЗИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ И АКТИВНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК

© 2024 г. Д. О. Кони́на^а, *, М. Ю. Скоблов^а^аЛаборатория функциональной геномики, Медико-генетический научный центр
им. акад. Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

*e-mail: darya.konina@phystech.edu

Поступила в редакцию 19.09.2023 г.

После доработки 10.12.2023 г.

Принята к публикации 17.12.2023 г.

Длинные некодирующие РНК (long non-coding RNA, lncРНК) участвуют в регуляции многих клеточных процессов, а их экспрессия характеризуется высокой тканеспецифичностью. В отличие от них белоккодирующие гены, в частности гены “домашнего хозяйства”, активно экспрессируются во всех тканях. Нами исследована функциональная значимость широкоэкспрессирующихся lncРНК. Мы проанализировали экспериментальные данные по скринингу lncРНК в клетках человека и выявили 18 некодирующих РНК, которые имели не только высокий уровень экспрессии, но и были функционально активны в большинстве тканей. Детальный анализ этих lncРНК показал, что они имеют широкий спектр молекулярных функций: от контроля повреждения кардиомиоцитов до переключения классов макрофагов. На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что большинство исследованных нами lncРНК кодирует небольшие, но функционально значимые пептиды. Среди 18 lncРНК высоким кодирующим потенциалом обладали NEAT1, SNHG1, SNHG7, SNHG12, SNHG15, SNHG16, MIR17HG, LINC00680, LINC00263 и LINC00339. Кроме того, обнаружено, что EPB41L4A-AS1, CRNDE, SNHG6, LINC00493 и LINC01420 могут функционировать как за счет первичной структуры РНК, так и за счет кодируемого ими функционального пептида.

Ключевые слова: CRISPR-интерференция, длинные некодирующие РНК, короткая открытая рамка считывания

DOI: 10.31857/S0026898424030137, EDN: JBZHXL

ВВЕДЕНИЕ

С открытием большого класса длинных некодирующих РНК (lncРНК) началась эпоха активного исследования их функций. В результате были идентифицированы и подробно изучены такие известные lncРНК, как XIST, MALAT1, HOTAIR, GAS5, HOTTIP, TERRA и FIRRE [1–3]. Из проведенных на сегодняшний день исследований известно, что lncРНК обладают способностью изменять архитектуру хроматина, регулировать сборку и функционирование бимолекулярных конденсатов, влиять на стабильность и процессинг мРНК, а также регулировать различные сигнальные пути

[4–6]. Описанные примеры демонстрируют широкий спектр молекулярных функций, связанных с участием lncРНК во многих ключевых клеточных процессах [7–10].

Согласно данным проекта GENCODE (версия 44) [11], в геноме человека аннотировано сравнимое число генов lncРНК (19928) и белоккодирующих генов (19393). Следовательно, кроме исследования функций конкретных lncРНК, необходимо проводить широкомасштабный функциональный анализ аннотированных транскриптов генов lncРНК.

Один из наиболее распространенных подходов — использование нокдаун библиотек генов с последующим анализом клеточного фенотипа. В крупномасштабных скринингах нокдаун проводят с использованием различных технологий. Так, для анализа роли 2231 lncРНК в процессе деления клеток HeLa использовали малые интерферирующие РНК (siРНК) [12], для выявления функционально значимых генов среди 285 lncРНК в дермальных фибробластах человека — антисмысловые олигонуклеотиды [13], а для изучения влияния 214 lncРНК на процессы деления и поддержания плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток

Сокращения: CRISPRi — CRISPR-интерференция; НК (housekeeping) — (ген) “домашнего хозяйства”; lncРНК — длинные некодирующие РНК; FPKM (fragments per kilobase per million mapped reads) — число фрагментов на 1 тыс. оснований транскрипта на 1 млн картированных прочтений; TPM (transcripts per million) — число транскриптов на миллион прочтений; TSS (transcription start site) — сайт начала транскрипции; КОРС — короткая открытая рамка считывания; shРНК — короткие шпилечные РНК; sgРНК — направляющие РНК; snoРНК — малые ядерные РНК; miРНК — микроРНК; БКГ — белоккодирующий ген.

мышей — короткие шпилечные РНК (shРНК) [14]. В результате этих исследований было получено множество функционально значимых транскриптов, управляющих процессами жизнедеятельности клеток. Тем не менее более подробное изучение молекулярных функций выявленных генов остается задачей для будущего рассмотрения.

В представленной работе проведен ретроспективный анализ данных крупномасштабного скрининга на основе CRISPR-интерференции (CRISPRi) [15]. Мы выявили и охарактеризовали активно экспрессирующиеся функциональные lncРНК, а затем проанализировали их молекулярные функции, основываясь на результатах работ, опубликованных за последние несколько лет. Мы также оценили кодирующий потенциал отобранных lncРНК-хитов. В результате выявлен широкий спектр молекулярных функций lncРНК, в том числе связанных с кодированием пептидов.

МЕТОДЫ

Методы анализа данных крупномасштабного скрининга. Для анализа результатов крупномасштабного скрининга аннотированных транскриптов использовали данные исследования функциональных локусов lncРНК в клетках человека с помощью метода CRISPRi [15]. Скрининг с использованием технологии CRISPRi проведен для 16401 lncРНК человека. Аннотации транскриптов lncРНК были взяты из Ensembl build 75 [16], MiTranscriptome [17], каталога lncРНК человека [18] и набора специфичных для мозга lncРНК [19].

Для отбора функционально значимых генов lncРНК использовали значения уровня экспрессии и количественного показателя нокдауна, которые были измерены S. Liu с соавт. [15] для 16401 lncРНК в клеточных линиях HEK293T, K562, MCF7, MDA-MB-231, HeLa и U87. Уровень экспрессии для каждой lncРНК определяли как среднее значение числа фрагментов на 1 тыс. оснований транскрипта на 1 млн картированных прочтений (fragments per kilobase per million mapped reads, FPKM) повторных образцов по данным РНК-секвенирования открытых источников данных: HEK293T (GSE56010), HeLa (GSE30567, GSE33480, GSE23316), K562 (GSE30567, GSE33480, GSE23316), MCF7 (GSE30567, GSE33480), MDAMB231 (GSE73526, GSE45732). Данные по РНК-секвенированию клеточной линии U87 были взяты из работы [15].

Количественный показатель нокдауна определял нормализацию обогащения направляющих РНК (single guide RNA, sgРНК) для таргетной lncРНК по общему числу удвоений клеток. Такой параметр был выбран для нормализации обогащения sgРНК в клеточных линиях с разной скоростью роста. Таким образом, количественный

показатель нокдауна отражает положительное или отрицательное влияние нокдауна гена на пролиферацию клеток.

Наиболее функционально значимыми считали lncРНК с высоким уровнем экспрессии, а также со значимым эффектом нокдауна во всех исследованных клеточных линиях. Для отбора наиболее функционально значимых lncРНК были построены распределения двух выбранных параметров lncРНК в клеточных линиях. Далее на основе наблюдаемого правостороннего распределения значений уровня экспрессии предполагали, что lncРНК высоко экспрессируется в выбранной клеточной линии, если ее измеренный уровень экспрессии превышает средний уровень экспрессии генов в соответствующей клеточной линии: выше — (1), ниже — (0). В то же время на основе симметричного распределения значений количественного показателя нокдауна мы предполагали, что нокдаун lncРНК оказывает значимый эффект на пролиферацию клеток в выбранной клеточной линии, если ее измеренный показатель нокдауна превышает стандартное отклонение этого параметра в соответствующей клеточной линии: выше — (1), ниже — (0). Таким образом, для каждой lncРНК оценили в общей сложности 12 параметров. Затем был определен “показатель значимости” lncРНК, который включал сумму значений 12 оцениваемых параметров. Полученное значение показателя значимости lncРНК отражает интегральную оценку как для количественного показателя нокдауна, так и для уровня экспрессии. Для lncРНК, оценка показателя значимости которых составила более 6, в соответствии с экспериментальными данными гарантирован наблюдаемый функционально значимый эффект нокдауна на пролиферацию клеток и высокий уровень экспрессии не менее чем в одной клеточной линии. Однако для исследования и последующего углубленного биоинформатического анализа мы выбрали более высокое пороговое значение, которое установили на уровне ≥ 8 , — для отбора lncРНК-хитов. Дополнительно учитывали, чтобы расстояние от сайта начала транскрипции (transcription start site, TSS) lncРНК до ближайшего TSS белоккодирующего гена было не менее 1000 п.н. (ввиду особенностей метода CRISPRi) и чтобы не было пересечений нуклеотидной последовательности lncРНК с экзонами белоккодирующих генов.

Биоинформатический анализ lncРНК-хитов. Для отобранных lncРНК-хитов провели биоинформатический анализ, включающий оценку уровня экспрессии в тканях человека, степень консервативности, степень изученности и кодирующий потенциал.

Уровень экспрессии lncРНК в тканях человека оценивали с использованием базы данных Genotype-Tissue Expression (GTEx v8) [20]. GTEx v8

содержит данные высокопроизводительного секвенирования для 54 образцов ткани от 948 доноров, сРНК-, ДНК- и иммунопреципитацией хроматина по крайней мере для 70 образцов на ткань. Для каждой lncРНК оценивали общую медиану по значениям экспрессии в единицах числа транскриптов на миллион прочтений (transcripts per million, TPM) в разных тканях человека.

В рамках анализа уровня экспрессии оценивали принадлежность гена lncРНК к генам “домашнего хозяйства” (housekeeping, НК), идентифицированных в рамках проекта FANTOM5 [21]: (0) – ген не относится к НК, (1) – ген относится к НК. Группа НК-генов идентифицирует группу генов, имеющих равномерный характер экспрессии среди 945 образцов клеток и тканей человека.

Степень консервативности lncРНК оценивали с использованием геномного браузера UCSC [22]. На треке phastCons100way показано множественное выравнивание 100 видов позвоночных и оценка степени консервативности с использованием метода phastCons из пакета PHAST для всех 100 видов. Множественные выравнивания были получены с использованием Multiz и других инструментов выравнивания геномной последовательности, доступных в UCSC браузере.

Анализ зависимости эффекта нокдауна lncРНК от типа клеток. Для определения функционально значимых lncРНК, нокдаун которых приводил к значимо различному влиянию на рост разного типа клеток, выбирали lncРНК с явно выраженным разнонаправленным эффектом нокдауна на рост клеток не менее чем в двух клеточных линиях.

Степень изученности lncРНК оценивали по числу статей, относящихся к lncРНК (этот параметр

определяли по ключевым словам в базе PubMed по состоянию на июль 2023 года) и опубликованных, начиная с 2017 года.

Оценка кодирующего потенциала lncРНК включала исследование общедоступных экспериментальных данных рибосомного профилирования с использованием веб-браузеров GWIPS-viz [23] и Trips-Viz [24] (обозначали как (0) – отсутствие взаимодействия с рибосомами, (1) – наличие взаимодействия с рибосомами). Также мы провели анализ данных базы LncPep (<http://www.shenglilabs.com/LncPep/>) [25] и CPC2.0 (<http://cpc2.gao-lab.org/>) [26] для оценки кодирующего потенциала методами CPC2 и CPAT, основанными на анализе нуклеотидной последовательности генов, а также наличия экспериментального подтверждения трансляции по данным рибосомного профилирования (число наборов данных). Дополнительно в рамках анализа кодирующего потенциала lncРНК учитывали наличие опубликованных результатов, которые подтверждают трансляцию пептида с выбранной lncРНК: (0) – соответствующих публикаций нет, (1) – такие публикации есть.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Необходимые для роста клеток высокоэкспрессирующиеся lncРНК: анализ данных CRISPRi

Для поиска новых потенциально значимых lncРНК мы провели анализ опубликованных данных крупномасштабного скрининга их генов. В анализ были включены данные CRISPRi-скрининга для 16401 lncРНК, полученные в 6 клеточных

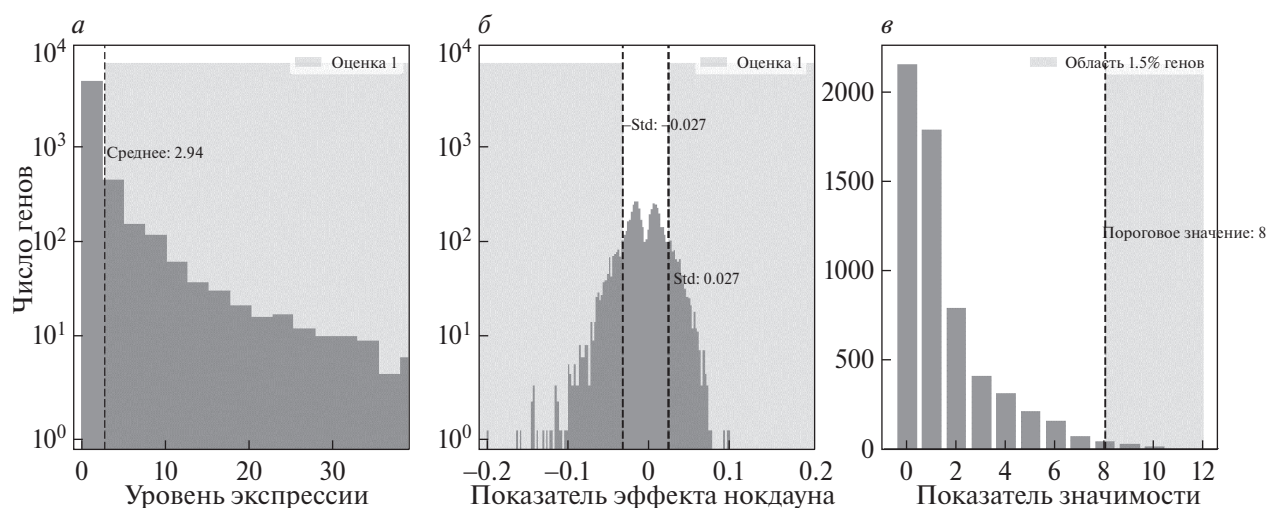


Рис. 1. Процесс отбора lncРНК. *а* – Анализ экспрессии lncРНК в клеточной линии HEK293T. Выделенная область представляет lncРНК со значимым уровнем экспрессии. *б* – Усредненные данные по показателю эффекта нокдауна lncРНК в клеточной линии HEK293T. Выделенная область включает lncРНК, нокдаун которых значимо влияет на пролиферацию клеток. *в* – Показатель значимости lncРНК. Выделенная область включает lncРНК, которые были выбраны для дальнейшего анализа.

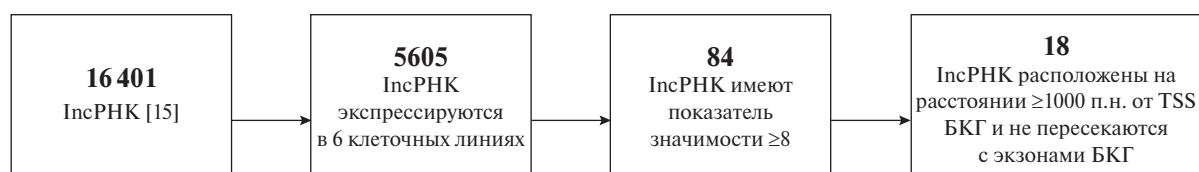


Рис. 2. Этапы отбора lncРНК с указанием критериев отбора и количества выбранных генов на каждом этапе. Обозначения: БКГ — белоккодирующие гены, TSS (transcription start site) — сайт начала транскрипции.

линиях: HEK293T, K562, MCF7, MDA-MB-231, HeLa, U87 [15]. В отличие от S. Liu с соавт. [15], наша цель заключалась в выявлении универсальных lncРНК, обладающих значимым клеточным фенотипом независимо от типа клеток.

На начальном этапе обобщили экспериментальные данные и отметили, что во всех 6 клеточных линиях экспрессируется только 5605 lncРНК. Далее оценили уровень экспрессии и значимость эффекта нокдауна для отдельной lncРНК в каждой исследуемой клеточной линии. Таким образом, для каждой lncРНК в 6 клеточных линиях оценивали 12 параметров. Если значение признака для отдельной lncРНК превышало predetermined порог, то при оценке ему присваивалось значение 1, в противном случае — 0 (см. рис. 1а,б).

Далее суммировали оценки всех 12 признаков для каждой lncРНК в отдельности. Такую суммарную оценку обозначили как “показатель значимости”. Из исходного набора lncРНК найдено примерно 1.5% (84), для которых показатель значимости ≥ 8 (см. рис. 1в). При отборе генов также учитывали расстояние от TSS lncРНК до TSS ближайшего белоккодирующего гена (>1000 п.н.) и отсутствие перекрытия lncРНК с экзонами белоккодирующего гена. В результате выбрано 18 lncРНК-хитов (рис. 2, табл. 1): NEAT1, SNHG12, EPB41L4A-AS1, SNHG16, SNHG1, SNHG7, MIR17HG, SCARNA10, CRNDE, LINC00680, SNHG25, SNHG6, LINC00339, LINC00263, SNHG30, LINC00493, SNHG15 и LINC01420.

Характеристика lncРНК-хитов и их молекулярные фенотипы

С целью охарактеризовать хиты lncРНК мы провели их комплексный анализ по различным параметрам, включая уровень экспрессии в тканях человека, эволюционную консервативность последовательности, степень изученности и кодирующий потенциал. Обобщенные данные по характеристикам хитов lncРНК приведены в табл. 1.

Для выявленных генов проведен анализ уровня экспрессии в тканях человека с использованием данных проекта GTEx v8. Для каждой lncРНК оценивали общую медиану по значениям экспрессии в единицах TPM в разных тканях человека. Дополнительно учитывали принадлежность lncРНК-хита к группе генов НК, идентифицированным в рамках проекта FANTOM5 [21]. Также провели

поиск корреляции между показателями экспрессии и данными о зависимом от типа клеток влиянии нокдауна lncРНК на пролиферацию [15].

В целом, для выбранных lncРНК-хитов регистрировали высокий уровень экспрессии (общая медиана TPM) в тканях человека. Для lncРНК, таких как NEAT1, SNHG12, EPB41L4A-AS1, SNHG1, SNHG16, SNHG7, SNHG6, LINC00339, LINC00493, SNHG15 и LINC01420, максимальный уровень экспрессии (медиана TPM для одной ткани) соответствовал значениям, которые характерны для белоккодирующих генов. Для некоторых lncРНК, включая NEAT1, SNHG1 и SNHG6, выявлен высокий уровень экспрессии (более 50 TPM) во всех тканях GTEx v8.

Однако встречались lncРНК-хиты и с тканеспецифичным типом экспрессии — для них получены средние (10–50 TPM) или низкие (<10 TPM) значения уровня экспрессии. К ним относятся CRNDE, EPB41L4A-AS1, SNHG7, LINC00339, SNHG30 и MIR17HG. Заметим, что тканеспецифичные lncРНК экспрессируются на значимом уровне только в одной ткани. Особенно четко эта особенность проявилась в случае lncРНК CRNDE, для которой рассчитанный в GTEx v8 уровень экспрессии во всех проанализированных образцах тканей составлял 1.37 TPM, в то время как в семенниках был максимальным — 52.2 TPM.

Профиль равномерной экспрессии, характерный для НК-генов, как правило, не связан напрямую с высоким уровнем экспрессии. Например, NEAT1 характеризуется высоким уровнем экспрессии, но при этом не относится к НК-генам. Для lncРНК EPB41L4A-AS1, наоборот, выявлен средний уровень экспрессии, хотя ее ген принадлежит к НК. Сходный с генами НК профиль экспрессии во всех тканях наблюдали для LINC00680, SNHG12, SNHG16, SNHG25, LINC01420, LINC00493 и SCARNA10. Результаты проведенного нами анализа профилей экспрессии lncРНК-хитов подтвердили данные CRISPRi о наличии специфичных для типа клеток эффектов нокдауна в случае CRNDE, SNHG7, LINC00339 и SNHG30. Для LINC00493 раньше также экспериментально продемонстрировано наличие зависимости эффекта нокдауна от выбранного типа клеток [27]. Кроме того, при анализе данных CRISPRi для LINC00263, SCARNA10, SNHG6, SNHG25 и SNHG15 мы выявили специфичный для конкретного типа клеток эффект

Таблица 1. Характеристика lncРНК-хитов^а

Ген	Ensemble_ID	Уровень экспрессии (TPM)	НК	Зависимость от типа клеток	Консервативность (PhastCons)	Число публикаций (>2017)	Степень изученности	Молекулярные взаимодействия ^б
<i>NEAT1</i>	ENSG00000245532	210.55	0	0	0.05	1231	Высокая	РНК-белок, РНК-miРНК, РНК-мРНК, РНК-ДНК
<i>SNHG12</i>	ENSG00000197989	18.81	0	0	0.12	147	Средняя	РНК-miРНК
<i>EPB41L4A-AS1</i>	ENSG00000224032	35.99	1	0	0.07	28	Средняя	РНК-белок, РНК-miРНК, РНК-ДНК
<i>SNHG16</i>	ENSG00000163597	15.41	0	0	0.05	271	Высокая	РНК-белок, РНК-miРНК, РНК-ДНК
<i>SNHG1</i>	ENSG00000255717	61.92	0	0	0.17	300	Высокая	РНК-белок, РНК-miРНК, РНК-ДНК
<i>SNHG7</i>	ENSG00000233016	25.10	0	1	0.07	182	Средняя	РНК-белок, РНК-miРНК, РНК-мРНК, РНК-ДНК
<i>MIR17HG</i>	ENSG00000215417	0.58	0	0	0.27	119	Средняя	РНК-белок, РНК-miРНК, РНК-мРНК
<i>SCARNA10</i>	ENSG00000239002	—	—	1	0.59	8	Низкая	РНК-белок
<i>CRNDE</i>	ENSG00000245694	1.36	0	1	0.31	229	Высокая	РНК-белок, РНК-miРНК, РНК-ДНК
<i>LINC00680</i>	ENSG00000215190	4.86	0	0	0.19	10	Низкая	РНК-белок, РНК-miРНК, РНК-мРНК
<i>SHNG25</i>	ENSG00000266402	3.88	0	1	0.76	8	Низкая	РНК-белок, РНК-miРНК, РНК-snoРНК
<i>SNHG6</i>	ENSG00000245910	154.65	1	1	0.07	151	Средняя	РНК-белок, РНК-miРНК, РНК-ДНК
<i>LINC00339</i>	ENSG00000218510	13.23	1	1	0.06	37	Средняя	РНК-miРНК
<i>LINC00263</i>	ENSG00000235823	5.93	0	1	0.11	11	Низкая	РНК-белок, РНК-miРНК, РНК-ДНК
<i>SNHG30</i>	ENSG00000257270	11.40	0	1	0.15	2	Низкая	Не установлено
<i>LINC00493</i>	ENSG00000232388	37.94	1	1	0.10	3	Низкая	Не установлено
<i>SNHG15</i>	ENSG00000232956	12.01	0	1	0.04	109	Средняя	РНК-белок, РНК-miРНК, РНК-ДНК
<i>LINC01420</i>	ENSG00000204272	30.83	1	0	0.10	15	Низкая	РНК-белок, РНК-miРНК

^аЗдесь и далее: оттенки серого обозначают тепловую карту полученных значений характеристик lncРНК-хитов. Интервалы значений для выбора цвета зависят от характеристики; цвета выбраны от светло-серого до темно-серого — от наименьших значений к наибольшим.

^бОбозначения: miРНК — микроРНК; snoРНК — малая ядершковая РНК.

нокдауна, который предстоит дополнительно подтвердить экспериментально.

По результатам оценки степени консервативности lncРНК-хитов выявлена невысокая степень консервативности нуклеотидных последовательностей отобранных генов lncРНК, что соответствует данным по эволюции lncРНК [28]. Примечательно, что высокая степень консервативности последовательностей наблюдалась для SCARNA10 и SHNG25. Полученные результаты можно объяснить тем, что SCARNA10 происходит из интронной области белоккодирующего гена NCAPD2, а значительная часть нуклеотидной последовательности SHNG25 перекрывается с генами малых ядрышковых РНК (small nucleolar RNA, snoРНК): SNORD104 и SNORA50C. В общем случае для отобранных генов lncРНК замечено, что их экзонные последовательности более консервативны, чем интронные области. Такой паттерн характерен для генов семейства SNHG (SNHG12, SNHG1, SNHG16, SNHG6, SNHG30) и lncРНК MIR17HG, где высококонсервативные экзонные области способствуют последующей транскрипции snoРНК или микроРНК (miРНК). В случае SNHG15 область транскрипции SNORA9 включена в его третий интрон, что объясняет сравнительно меньшую степень консервативности гена. С другой стороны, lncРНК, такие как CRNDE, LINC00680, LINC00263 и LINC01420, нами были идентифицированы как консервативные гены (со средним показателем PhastCons > 0.10). Важно отметить, что эти гены не пересекаются с интронными последовательностями белоккодирующих генов или транскрипционными областями snoРНК или miРНК.

Мы также установили степень изученности lncРНК-хитов, используя для оценки характеристики число статей (поиск проведен по ключевым словам в PubMed), вышедших с момента публикации данных исследования CRISPRi [15]. По результатам проведенного анализа публикационной активности установлено, что, несмотря на появление новых технологий, позволяющих ученым исследовать потенциально значимые новые гены, в научном сообществе сохраняется тенденция к более глубокому изучению уже известных. В связи с этим большинство публикаций посвящено таким хорошо известным lncРНК, как NEAT1, SNHG1 и CRNDE, что привело к высокой степени их изученности (>200 публикаций). Первые публикации, посвященные среднеизученным генам (20–200 публикаций), появились в период 2013–2019 гг. К группе среднеизученных генов относятся EPB41L4A-AS1, LINC00339 и SNHG12. Гены SCARNA10, LINC00680, SHNG25, LINC00263, SNHG30, LINC01420 и LINC00493 образуют группу генов с относительно низкой степенью изученности (<20 публикаций). Тем не менее выявленный уровень публикационной активности подчеркивает

значимую роль этих lncРНК-хитов в регуляторном ландшафте генома.

Молекулярные партнеры и функции для lncРНК-хитов проанализированы нами по данным, опубликованным в научной литературе (табл. S1 Дополнительных материалов см. на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/3/supp_Konina_rus.pdf). В результате проведенного анализа установлено, что большинство отобранных lncРНК выполняют свои функции, действуя как “губки” для miРНК. В качестве примера можно привести NEAT1 [29], SNHG12 [30], SNHG16 [31], SNHG1 [32], SNHG7 [33], MIR17HG [34], CRNDE [35], SNHG6 [36], LINC00339 [37], LINC00263 [38] и LINC01420 [39]. Некоторые из выявленных lncРНК-хитов выступают в роли эпигенетических регуляторов, взаимодействуя с белками PRC2 или DNMT1/2 и образуя с генами-мишенями триплексы lncРНК-ДНК-РНК. Примером такого взаимодействия являются NEAT1 [40], SNHG1 [41], SNHG7 [42], CRNDE [43], SNHG6 [44] и SNHG15 [45].

Кроме того, можно выделить подгруппу lncРНК-хитов, которая взаимодействует с различными ферментами и факторами транскрипции, тем самым принимая активное участие в регуляции процессов транскрипции, процессинга и трансляции РНК и в то же время играя ключевую роль в активации сигнальных путей. К этой функциональной категории относятся NEAT1 [46], SNHG1 [47], SNHG7 [48], SCARNA10 [49], CRNDE [50], LINC00680 [51], SNHG6 [52] и LINC01420 [53]. Следует отметить NEAT1 и LINC01420, которые участвуют в образовании биомолекулярных конденсатов. NEAT1 связывается с белками параспеклов [54], а LINC01420 взаимодействует с белками Р-гранул [55]. К числу редких межмолекулярных взаимодействий, обнаруженных для lncРНК-хитов, относится образование дуплексов lncРНК-мРНК. Такие взаимодействия были обнаружены для LINC00680 [56], SNHG7 [57], NEAT1 [58] и MIR17HG [59].

Благодаря разнообразным взаимодействиям lncРНК-хиты участвуют в регуляции фундаментальных клеточных процессов и вносят вклад в развитие патогенеза заболеваний. Например, они вовлечены в онкологические, воспалительные и нейродегенеративные процессы, противовирусный ответ, развитие сердечно-сосудистых заболеваний и диабета.

*Высокий белоккодирующий потенциал
lncРНК-хитов: результаты рибосомного
профайлинга*

Поскольку lncРНК могут транслироваться в небольшие функциональные пептиды, мы решили провести оценку кодирующего потенциала исследуемых lncРНК-хитов. Для этого использовали

Таблица 2. Оценка белоккодирующего потенциала lncРНК-хитов

Ген	TRIPS/ GWIPS	ЭП ^а	Размер пептида (а.о.)	CPAT	CPC2	Ribo-Seq (число наборов)
<i>NEAT1</i>	1	0	106	0.76	0.59	4
<i>SNHG12</i>	1	0	76	0.08	0.07	5
<i>EPB41L4A-AS1</i>	1	1	120	0.26	0.17	8
<i>SNHG16</i>	1	1	55	0.12	0.03	46
<i>SNHG1</i>	1	0	83	0.03	0.06	56
<i>SNHG7</i>	1	0	51	0.08	0.20	54
<i>MIR17HG</i>	1	0	31	0.35	0.13	5
<i>SCARNA10</i>	1	0	35	—	0.05	11
<i>CRNDE</i>	1	1	84	0.18	0.35	11
<i>LINC00680</i>	1	0	40	0.13	0.04	44
<i>SNHG25</i>	0	0	57	0.01	0.17	0
<i>SNHG6</i>	1	1	40	0.02	0.02	156
<i>LINC00339</i>	1	0	38	0.37	0.02	58
<i>LINC00263</i>	1	0	123	0.27	0.70	51
<i>SNHG30</i>	1	0	50	0.01	0.02	46
<i>LINC00493</i>	1	1	95	0.30	0.40	110
<i>SNHG15</i>	1	0	49	0.13	0.17	58
<i>LINC01420</i>	1	1	68	—	0.04	—

^аЭкспериментальное подтверждение.

данные рибосомного профайлинга (ribosome profiling, Ribo-Seq), доступные в веб-браузерах GWIPS-viz [23] и Trips-Viz [24], и определяли возможность взаимодействия целевых lncРНК с рибосомами: (0) — нет взаимодействия, (1) — есть. Дополнительно для комплексной оценки возможности трансляции lncРНК-хитов использовали методы оценки белоккодирующего потенциала CPC2 и CPAT, а также сведения о числе наборов данных рибосомного профайлинга, подтверждающих трансляцию lncРНК, из баз данных LncRper (<http://www.shenglilabs.com/LncPep/>) [25] и CPC2 (<http://cpc2.gao-lab.org/>) [26]. Кроме того, провели анализ публикаций по lncРНК-хитам с целью выяснить, для каких из них получено экспериментальное подтверждение трансляции пептидов: (0) — релевантных публикаций нет, (1) — релевантные публикации есть. Результаты анализа представлены в табл. 2.

Анализ данных из GWIPS-viz и Trips-Viz показал, что большинство lncРНК-хитов, за исключением SNHG25, имеют выраженные пики сигнала взаимодействия с рибосомой. Эти пики свидетельствуют о накоплении рибосом на перспективных сайтах начала трансляции lncРНК. Кроме того, используя данные из вышеуказанных веб-браузеров, мы определили примерную длину возможных коротких открытых рамок считывания (кОРС). Так, для NEAT1, EPB41L4A-AS1, LINC00263 и LINC00493 были выявлены кодирующие области длиной около

300 н., а для MIR17HG, SCARNA10 и LINC00339 — примерно в три раза меньше (около 90 н.).

Информация из LncRper, отражающая число наборов данных рибосомного профилирования, в которых была обнаружена трансляция выбранной lncРНК, подтвердила результаты, полученные с помощью GWIPS-viz и Trips-Viz. Достоверное подтверждение трансляции, согласно данным LncRper, получено для SNHG6 и LINC00493 — 156 и 110 наборов данных соответственно. Для остальных lncРНК-хитов число наборов данных варьировалось от 4 до 60.

Заметим, что значения кодирующего потенциала, полученные методами CPC2 и CPAT по шкале от 0 до 1, для lncРНК-хитов были низкими. Наибольшие значения по CPAT составили 0.76 для NEAT1 и 0.37 для LINC00339, а по CPC2 — 0.69 для LINC00263 и 0.59 для NEAT1. Диапазон значений для остальных lncРНК варьировался от 0.005 до 0.3.

В результате проведенного нами анализа литературы выявлено, что для некоторых выбранных нами lncРНК-хитов есть экспериментальные доказательства трансляции. Это относится к EPB41L4A-AS1 [60], CRNDE [61], SNHG6 [62], LINC00493 [63] и LINC01420 [64], для которых описаны кОРС и трансляция с них пептидов.

Однако для подтверждения высокого кодирующего потенциала NEAT1, SNHG1, SNHG7, SNHG12, SNHG15, SNHG16, MIR17HG, LINC00680, LINC00263 и LINC00339, а также для

оценки вклада транслируемых и транскрибируемых последовательностей вышеуказанных lncРНК в наблюдаемые клеточные и молекулярные фенотипы необходимы дальнейшие экспериментальные исследования. Стоит заметить, что при оценке кодирующего потенциала lncРНК с использованием методов на основе моделей машинного обучения важно соблюдать осторожность, так как при обучении эти модели используют аннотации lncРНК в качестве отрицательных примеров, что может привести к неточностям в оценках, полученных методами CPAT и CPC2. Использование данных рибосомного профайлинга для предварительной оценки возможности трансляции новых lncРНК дает более точный результат, чем существующие программные инструменты на основе методов машинного обучения.

Функциональный анализ пептидов, транслируемых с lncРНК

В настоящее время исследование функций пептидов, транслируемых с lncРНК, — актуальная задача молекулярной биологии. Роль пептидов остается малоизученной. Мы проанализировали функции пептидов, транслируемых с lncРНК-хитов. При поиске соответствующих публикаций мы нашли экспериментальные данные, полученные

для EPB41L4A-AS1 [60], CRNDE [61], SNHG6 [62], LINC00493 [63] и LINC01420 [64]. Транслируемые с них пептиды имеют размер от 40 а.о. до 120 а.о. Их можно разделить на три группы: структурные (NBDY, CRNDEP) — участвующие в образовании биомолекулярных конденсатов; митохондриальные (TIGA1, SMIM26) — связанные с процессами в митохондриях; сигнальные (SNHG6 ORF#2) — вовлеченные в сигнальные пути.

Продемонстрировано, что NBDY участвует в формировании Р-телец, а CRNDEP — в образовании стрессовых гранул. Доказано, что TIGA1 и SMIM26 вовлечены соответственно в регуляцию стабильности микротрубочек и процесс митохондриального импорта глутатиона. Недавно был открыт пептид SNHG6 ORF#2 и подтверждена его функция в активации сигнального пути TGF-β/SMAD (табл. 3).

Установлено влияние CRNDEP, SMIM26, NBDY и SNHG6 ORF#2 на такие фундаментальные клеточные процессы, как миграция и пролиферация. Из этого следует, что трансляция пептидов может лежать в основе функций, ранее приписываемых соответствующим lncРНК. Функциональная оценка роли транслируемых и транскрибируемых последовательностей lncРНК требует экспериментального подтверждения.

Таблица 3. Функции пептидов, которые транслируются с коротких открытых рамок считывания lncРНК-хитов

lncРНК	Пептид	Функция	Источник
EPB41L4A-AS1	TIGA1	TIGA1 — митохондриальный пептид, выполняющий роль важнейшего посредника между микротрубочками и митохондриями. Его влияние на стабильность микротрубочек достигается за счет взаимодействия с α-тубулином. Истощение TIGA1 приводит к дестабилизации микротрубочек, что вызывает функциональное нарушение потенциал-зависимого анионного канала и провоцирует клеточный стресс. Описанный процесс, в свою очередь, активирует сигнальный путь p38 MAPK и усиливает накопление HIF-1α.	[60]
CRNDE	CRNDEP	CRNDEP участвует в клеточной пролиферации, поскольку его эндогенная экспрессия повышена в высокопролиферирующих тканях. Кроме того, при искусственной гиперэкспрессии CRNDEP может стимулировать образование стрессовых гранул.	[61]
SNHG6	SNHG6 ORF#1 и ORF#2	С предполагаемых открытых рамок считывания (ORF#1 и ORF#2) SNHG6 транслируются два пептида. Транслируемый пептид SNHG6 ORF#2 активирует путь TGF-β/SMAD и способствует миграции клеток и ЭМП в ЭСКЧ. Предполагается участие пептидов, кодируемых SNHG6, в развитии стромальных и эпителиальных клеток эндометрия и связанных с этим гинекологических заболеваний.	[62]
LINC00493	SMIM26	Митохондриальный пептид SMIM26, кодируемый LINC00493, выступает в качестве белка-супрессора опухолей, особенно раковых. SMIM26 образует комплекс с AGK-SLC25A11 для поддержания митохондриального импорта глутатиона и ингибирования метастазирования светлоклеточной почечно-клеточной карциномы, опосредованного активацией сигнального пути AGK/AKT.	[63]
LINC01420	NBDY	NBDY регулирует цитоплазматические рибонуклеопротеиновые гранулы, известные как Р-тела, и стабильность репортерных генов.	[64]

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Развитие исследований в области генома человека показало, что значительная часть транскриптов lncРНК играет гораздо большую роль в биологических процессах, чем считали ранее. В последние годы понимание регуляторной роли lncРНК в развитии организмов расширилось, в то время как функциональная значимость установлена менее чем для 10% транскриптов lncРНК.

В настоящее время для выявления функционально значимых lncРНК разработаны разные высокопроизводительные технологии. Нами проанализированы результаты одного из таких крупномасштабных скрининговых исследований, направленного на изучение функциональных локусов lncРНК в клетках человека.

На данный момент уже выявлено и детально изучено множество тканеспецифичных lncРНК. Эта особенность lncРНК косвенно свидетельствует об их важной роли в регуляции процессов и функций, характерных для клеток определенных тканей. В качестве примера можно привести MUNC, которая экспрессируется в мышечной ткани и участвует в дифференцировке клеток мышц [65], и PCGEM1, специфичную для ткани предстательной железы и ассоциированную с раком простаты [66]. Однако здесь мы сосредоточили внимание на широкоэкспрессирующихся lncРНК и их функциональных характеристиках, включая уровень экспрессии, степень консервативности и изученность. Кроме того, мы проанализировали взаимосвязь между показателями экспрессии и клеточными функциями, а также оценили кодирующий потенциал lncРНК.

Анализ экспериментальных данных, полученных в результате исследований функциональных локусов lncРНК на основе CRISPRi [15], позволил отобрать 18 lncРНК, включающих как малоизученные, так и хорошо известные гены. Мы подтвердили высокий уровень экспрессии отобранных lncРНК-хитов с помощью данных из GTEx v8. Более того, мы обнаружили отсутствие прямой корреляции между принадлежностью к группе НК-генов и высоким уровнем экспрессии. Еще одним важным наблюдением стало то, что выявленные эффекты нокдауна, специфичные для конкретного типа клеток, частично согласуются с данными по образцам тканей из GTEx v8.

Для отобранных lncРНК общая консервативность нуклеотидных последовательностей была невысокой, однако определены отдельные высококонсервативные участки, такие как сегменты экзонных последовательностей, области транскрипции snoРНК и miРНК. Ретроспективный анализ публикаций подтвердил функциональную значимость выбранных lncРНК.

Выявленные функции lncРНК-хитов согласуются с результатами оригинального комплексного

исследования, посвященного изучению связи между lncРНК, модифицирующими клеточный рост, и их роли в патогенезе онкологических заболеваний. Мы определили основные механизмы, с помощью которых lncРНК реализуют свои функции, включая конкурентное связывание с miРНК и участие в сигнальных путях. Заметим, что большинство выбранных генов входят в семейство генов-хозяев snoРНК (SNHG). У человека более 50% snoРНК происходят из генов-хозяев, причем около 80% из них относятся к семейству SNHG. В настоящее время это семейство насчитывает более 20 генов. Среди них наиболее изучены SNHG1, SNHG6 и SNHG7. По результатам многочисленных исследований установлено, что это онкогены, вовлеченные в канцерогенез многих типов злокачественных опухолей и патогенез различных заболеваний.

Результаты многих исследований подтверждают, что NEAT1 — функционально консервативная lncРНК, которая высоко экспрессирована в клетках и тканях млекопитающих. NEAT1 взаимодействует с различными молекулярными партнерами, включая белки, miРНК, mРНК и ДНК. Доказана ее функциональная значимость, в частности при различных онкологических заболеваниях, где NEAT1 участвует в ответе клеток на повреждение ДНК [29]. Имеются и данные о том, что NEAT1 влияет на развитие нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз и болезнь Паркинсона [67]. Кроме того, NEAT1 является глобальным регулятором, который действует путем активации врожденного иммунитета при вирусной инфекции [68]. NEAT1 считается перспективной терапевтической мишенью и диагностическим биомаркером. Клинические испытания lncРНК NEAT1 начались в 2021 году. Ее клиническая значимость для онкологии уже доказана — экспрессия NEAT1 коррелирует с ответом пациентов на анти-PD-1/PD-L1-терапию при меланоме и глиобластоме [69].

Другой пример — новая перспективная lncРНК LINC00339. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о ее повышенной экспрессии при эндометриозе, апоптозе кардиомиоцитов, остеопорозе и онкологии [37, 70, 71]. Кроме того, выявлена корреляция между LINC00339 и клиническими показателями у онкологических больных: стадией заболевания, наличием метастаз в лимфатические узлы, степенью патологии и др. Также доказано, что LINC00339 влияет на базовые клеточные процессы опухолевых клеток, такие как пролиферация, подвижность и инвазивность, способствуя росту опухоли. Спектр механизмов, обеспечивающих функционирование LINC00339, включает привлечение miРНК, взаимодействие с транскрипционными факторами, участие в сигнальных путях Wnt/ β -катенин, MAPK и RhoA. Значимые эффекты LINC00339 при различных заболеваниях свидетельствуют о возможности ее

использования в качестве диагностического маркера и терапевтической мишени [37].

В ходе анализа данных, полученных с помощью CRISPRi, мы также отобрали для дальнейших экспериментальных исследований ряд малоизученных lncPHK, таких как SCARNA10, LINC00680, SHNG25, LINC00263, SNHG30, LINC01420, LINC00493.

Еще одна актуальная задача молекулярной биологии — оценка белоккодирующего потенциала lncPHK. Исследования широкого спектра организмов выявили существование kOPC, кодируемых практически всеми классами PHK. Во многих работах продемонстрирована трансляция пептидов с kOPC, расположенных в mPHK, интронах пре-mPHK, lncPHK и даже в первичных транскриптах miPHK и рибосомной PHK. Наиболее перспективным источником таких рамок считывания считаются lncPHK. Проведенный нами анализ данных рибосомного профайлинга показал, что большинство lncPHK с высокой вероятностью транслирует небольшие пептиды. Рассчитанная нами длина kOPC lncPHK-хитов согласуется со средним значением в 24 кодона для lncPHK, исследованных J. Courso с соавт. [72]. Оценки, полученные на основе моделей CPAT и CPC2, как правило, носят случайный характер и могут быть ошибочными. Например, для LINC01420 с экспериментально подтвержденной трансляцией функционального пептида значение, полученное с помощью CPC2, составляло 0.04. Подобные результаты указывают на основную проблему моделей машинного обучения при выборе обучающего набора данных.

Для пяти lncPHK-хитов: EPB41L4A-AS1 [60], CRNDE [61], SNHG6 [62], LINC00493 [63] и LINC01420 [64] — мы нашли подробные описания функций транслируемых пептидов. Так, NBDY и CRNDEP участвуют в образовании биомолекулярных конденсатов, TIGA1 и SMIM26 связаны с митохондриальными процессами, а SNHG6 ORF#2 активирует сигнальный путь TGF- β /SMAD. Кроме того, большинство идентифицированных пептидов участвует в регуляции основных клеточных функций. Таким образом, в результате анализа уже опубликованных данных по трансляции lncPHK стало понятно, что назрела необходимость пересмотра их аннотации и функций в масштабе всего генома.

Нами выявлен ряд lncPHK с высокой вероятностью трансляции малых пептидов: NEAT1, SNHG1, SNHG7, SNHG12, SNHG15, SNHG16, MIR17HG, LINC00680, LINC00263 и LINC00339. Экспериментальное исследование их возможной трансляции позволит углубить наши знания о регуляторной сети генома.

Анализ истории версий GENCODE показывает, что аннотации генов человека постоянно обновлялись как для белоккодирующих генов, так и для lncPHK [73]. В настоящее время прежнее

преобладание числа белоккодирующих генов над общим числом генов lncPHK изменилось на обратное — преобладание lncPHK. Версия GENCODE26 (V26), выпущенная в год публикации данных крупномасштабного исследования [15], содержала в общей сложности 58219 аннотированных генов, из которых белоккодирующих было 19817 и lncPHK-кодирующих — 15787. Текущая версия GENCODE44 (V44), выпущенная в 2023 году, содержит в общей сложности 62700 аннотаций, из которых 19396 белоккодирующих и 19922 lncPHK. Выявленная корреляция между паттернами экспрессии lncPHK и их способностью кодировать пептиды расширяет наше понимание транскрипционного потенциала генома и его функциональных участков. Возможно, что в следующей версии аннотации генома человека число белоккодирующих генов снова превзойдет таковое для lncRNA. Не исключены изменения в номенклатуре типов транскриптов и генов.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для Медико-генетического научного центра.

В данной статье не содержится исследований с участием животных, выполненных кем-либо из авторов. В данной статье не содержится исследований с участием людей, выполненных кем-либо из авторов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Дополнительные материалы: Функции lncPHK-хитов (табл. S1, см на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2024/3/supp_Konina_rus.pdf).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mattick J.S., Amaral P.P., Carninci P., Carpenter S., Chang H.Y., Chen L.L., Chen R., Dean C., Dinger M.E., Fitzgerald K.A., Gingeras T.R., Guttman M., Hirose T., Huarte M., Johnson R., Kanduri C., Kapranov P., Lawrence J.B., Lee J.T., Mendell J.T., Mercer T.R., Moore K.J., Nakagawa S., Rinn J.L., Spector D.L., Ulitsky I., Wan Y., Wilusz J.E., Wu M. (2023) Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **24**, 430–447.
2. Wang K.C., Chang H.Y. (2011) Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol. Cell.* **43**, 904–914.
3. Ponting C.P., Haerty W. (2022) Genome-wide analysis of human long noncoding RNAs: a provocative review. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **23**, 153–172.
4. Garcia-Padilla C., Duenas A., Garcia-Lopez V., Aranea A., Franco D., Garcia-Martinez V., Lopez-Sanchez C. (2022) Molecular mechanisms of lncRNAs in the dependent regulation of cancer and their potential therapeutic use. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 764.

5. Yoon J.H., Abdelmohsen K., Gorospe M. (2013) Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA. *J. Mol. Biol.* **425**, 3723–3730.
6. Karakas D., Ozpolat B. (2021) The role of LncRNAs in translation. *Noncoding RNA*. **7**, 16.
7. Stello L., Guo C.J., Chen L.L., Huarte M. (2021) Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **22**, 96–118.
8. Guh C.Y., Hsieh Y.H., Chu H.P. (2020) Functions and properties of nuclear lncRNAs—from systematically mapping the interactomes of lncRNAs. *J. Biomed. Sci.* **27**, 44.
9. Oo J.A., Brandes R.P., Leisegang M.S. (2022) Long non-coding RNAs: novel regulators of cellular physiology and function. *Pflugers Arch.* **474**, 191–204.
10. DiStefano J.K. (2018) The emerging role of long noncoding RNAs in human disease. *Methods Mol. Biol.* **1706**, 91–110.
11. Frankish A., Carbonell-Sala S., Diekhans M., Jungreis I., Loveland J.E., Mudge J.M., Sisu C., Wright J.C., Arnan C., Barnes I., Banerjee A., Bennett R., Berry A., Bignell A., Boix C., Calvet F., Cerdán-Vélez D., Cunningham F., Davidson C., Donaldson S., Dursun C., Fatima R., Giorgetti S., Giron C.G., Gonzalez J.M., Hardy M., Harrison P.W., Hourlier T., Hollis Z., Hunt T., James B., Jiang Y., Johnson R., Kay M., Lagarde J., Martin F.J., Gómez L.M., Nair S., Ni P., Pozo F., Ramalingam V., Ruffier M., Schmitt B.M., Schreiber J.M., Steed E., Suner M.M., Sumathipala D., Sycheva I., Uszczyńska-Ratajczak B., Wass E., Yang Y.T., Yates A., Zafrulla Z., Choudhary J.S., Gerstein M., Guigo R., Hubbard T.J.P., Kellis M., Kundraje A., Paten B., Tress M.L., Flicek P. (2023) GENCODE: reference annotation for the human and mouse genomes in 2023. *Nucleic Acids Res.* **51**, D942–D949.
12. Stojic L., Lun A.T.L., Mascalchi P., Ernst C., Redmond A.M., Mangei J., Barr A.R., Bousgouni V., Bakal C., Marion J.C., Odom D.T., Gergely F. (2020) A high-content RNAi screen reveals multiple roles for long noncoding RNAs in cell division. *Nat. Commun.* **11**, 1851.
13. Ramilowski J.A., Yip C.W., Agrawal S., Chang J.C., Ciani Y., Kulakovskiy I.V., Mendez M., Ooi J.L.C., Ouyang J.F., Parkinson N., Petri A., Roos L., Severin J., Yasuzawa K., Abugessaisa I., Akalin A., Antonov I.V., Arner E., Bonetti A., Bono H., Borsari B., Brombacher F., Cameron C.J., Cannistraci C.V., Cardenas R., Cardon M., Chang H., Dostie J., Ducoli L., Favorov A., Fort A., Garrido D., Gil N., Gimenez J., Guler R., Handoko L., Harshbarger J., Hasegawa A., Hasegawa Y., Hashimoto K., Hayatsu N., Heutink P., Hirose T., Imada E.L., Itoh M., Kaczkowski B., Kanhere A., Kawabata E., Kawaji H., Kawashima T., Kelly S.T., Kojima M., Kondo N., Koseki H., Kouno T., Kratz A., Kuroszka-Molárska M., Kwon A.T.J., Leek J., Lennartsson A., Lizio M., López-Redondo F., Luginbühl J., Maeda S., Makeev V.J., Marchionni L., Medvedeva Y.A., Minoda A., Müller F., Muñoz-Aguirre M., Murata M., Nishiyori H., Nitta K.R., Noguchi S., Noro Y., Nurtdinov R., Okazaki Y., Orlando V., Paquette D., Parr C.J.C., Rackham O.J.L., Rizzo P., Sánchez-Martínez D.F., Sandelin A., Sanjana P., Sempke C.A.M., Shibayama Y., Sivaraman D.M., Suzuki T., Szumowski S.C., Tagami M., Taylor M.S., Terao C., Thodberg M., Thongjuea S., Tripathi V., Ulitsky I., Verardo R., Vorontsov I.E., Yamamoto C., Young R.S., Baillie J.K., Forrest A.R.R., Guigó R., Hoffman M.M., Hon C.C., Kasukawa T., Kauppinen S., Kere J., Lenhard B., Schneider C., Suzuki H., Yagi K., de Hoon M.J.L., Shin J.W., Carninci P. (2020) Functional annotation of human long noncoding RNAs via molecular phenotyping. *Genome Res.* **30**, 1060–1072.
14. Guttman M., Donaghey J., Carey B.W., Garber M., Grenier J.K., Munson G., Young G., Lucas A.B., Ach R., Bruhn L., Yang X., Amit I., Meissner A., Regev A., Rinn J.L., Root D.E., Lander E.S. (2011) lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature*. **477**, 295–300.
15. Liu S.J., Horlbeck M.A., Cho S.W., Birk H.S., Malatesta M., He D., Attenello F.J., Villalta J.E., Cho M.Y., Chen Y., Mandegar M.A., Olvera M.P., Gilbert L.A., Conklin B.R., Chang H.Y., Weissman J.S., Lim D.A. (2017) CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells. *Science*. **355**, aah7111.
16. Yates A., Akanni W., Amode M.R., Barrell D., Billis K., Carvalho-Silva D., Cummins C., Clapham P., Fitzgerald S., Gil L., Girón C.G., Gordon L., Hourlier T., Hunt S.E., Janacek S.H., Johnson N., Juettemann T., Keenan S., Lavidas I., Martin F.J., Maurel T., McLaren W., Murphy D.N., Nag R., Nuhn M., Parker A., Patricio M., Pignatelli M., Rahtz M., Riat H.S., Sheppard D., Taylor K., Thormann A., Vullo A., Wilder S.P., Zadissa A., Birney E., Harrow J., Muffato M., Perry E., Ruffier M., Spudich G., Trevanion S.J., Cunningham F., Aken B.L., Zerbino D.R., Flicek P. (2016) Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res.* **44**, D710–D716.
17. Iyer M.K., Niknafs Y.S., Malik R., Singhal U., Sahu A., Hosono Y., Barrette T.R., Prensner J.R., Evans J.R., Zhao S., Poliakov A., Cao X., Dhanasekaran S.M., Wu Y.M., Robinson D.R., Beer D.G., Feng F.Y., Iyer H.K., Chinnaiyan A.M. (2015) The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat. Genet.* **47**, 199–208.
18. Cabili M.N., Trapnell C., Goff L., Koziol M., Tazon-Vega B., Regev A., Rinn J.L. (2011) Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev.* **25**, 1915–1927.
19. Liu S.J., Nowakowski T.J., Pollen A.A., Lui J.H., Horlbeck M.A., Attenello F.J., He D., Weissman J.S., Kriegstein A.R., Diaz A.A., Lim D.A. (2016) Single-cell analysis of long non-coding RNAs in the developing human neocortex. *Genome Biol.* **17**, 67.
20. Carithers L.J., Moore H.M. (2015) The genotype-tissue expression (GTEx) project. *Biopreserv. Biobank.* **13**, 307–308.
21. FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT); Forrest A.R., Kawaji H., Rehli M., Baillie J.K., de Hoon M.J., 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., Sempke C., Ishizu Y., Young R.S., Francescato M., Alam I., Albanese D., Altschuler G.M., Arakawa T., Archer J.A., Arner P., Babina M., Rennie S., Balwiercz 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., Drablos F., Edge A.S., Edinger M., Ekwall K., Endoh M., Enomoto H., Fagioli 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., Furlanetto C., Furino M., Furusawa J., 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., Ho Sui S.J., Hofmann O.M., Hoof I., Hori F., Huminiecki L., Iida K., Ikawa T., Jankovic B.R., Jia H., Joshi A., Jurman G., Kaczowski 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., Mar J.C., Marchand B., Mathelier A., Meijert N., Meynert A., Mizuno Y., de Lima Morais D.A., 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., Noma S., Noazaki T., Ogishima S., Ohkura N., Ohimiya 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., Ramiłowski 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., 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 M., Suzuki M., Suzuki N., Swoboda R.K., 't Hoen P.A.C., Tagami M., Takahashi N., Takai J., Tanaka H., Tatsukawa H., Tatum Z., Thompson M., Toyodo H., Toyoda T., Valen E., van de Wetering M., van den Berg L.M., Verado 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 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**, 462–470.
22. Nassar L.R., Barber G.P., Benet-Pages A., Casper J., Clawson H., Diekhans M., Fischer C., Gonzalez J.N., Hinrichs A.S., Lee B.T., Lee C.M., Muthuraman P., Nguy B., Pereira T., Nejad P., Perez G., Raney B.J., Schmelter D., Speir M.L., Wick B.D., Zweig A.S., Haussler D., Kuhn R.M., Haussler M., Kent W.J. (2023) The UCSC Genome Browser database: 2023 update. *Nucleic Acids Res.* **51**, D1188–D1195.
23. Michel A.M., Fox G., Kiran A.M., De Bo C., O'Connor P.B., Heaphy S.M., Mullan J.P., Donohue C.A., Higgins D.G., Baranov P.V. (2014) GWIPS-viz: development of a ribo-seq genome browser. *Nucleic Acids Res.* **42**, D859–D864.
24. Kiniry S.J., Judge C.E., Michel A.M., Baranov P.V. (2021) Trips-Viz: an environment for the analysis of public and user-generated ribosome profiling data. *Nucleic Acids Res.* **49**, W662–W670.
25. Liu T., Wu J., Wu Y., Hu W., Fang Z., Wang Z., Jiang C., Li S. (2022) LncPep: a resource of translational evidences for lncRNAs. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 795084.
26. Kang Y.J., Yang D.C., Kong L., Hou M., Meng Y.Q., Wei L., Gao G. (2017) CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Res.* **45**, W12–W16.
27. Konina D., Sparber P., Viakhireva I., Filatova A., Skoblov M. (2021) Investigation of LINC00493/SMIM26 gene suggests its dual functioning at mRNA and protein level. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 8477.
28. Uszczynska-Ratajczak B., Lagarde J., Frankish A., Guigo R., Johnson R. (2018) Towards a complete map of the human long non-coding RNA transcriptome. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 535–548.
29. Farzaneh M., Masoodi T., Ghaedrahmati F., Radoszkiewicz K., Anbiyaiee A., Sheykhi-Sabzehpoush M., Rad N.K., Uddin S., Jooybari S.P.M., Khoshnam S.E., Azizidoost S. (2023) An updated review of contribution of long noncoding RNA-NEAT1 to the progression of human cancers. *Pathol. Res. Pract.* **245**, 154380.
30. Wang X., Jiang Q., Zhang C., Yang Q., Wang L., Zhang J., Wang L., Chen X., Hou X., Han D., Wu J., Zhao S. (2021) Long noncoding RNA SNHG12 is a potential diagnostic and prognostic biomarker in various tumors. *Chin. Neurosurg J.* **7**, 37.
31. Gong C.Y., Tang R., Nan W., Zhou K.S., Zhang H.H. (2020) Role of SNHG16 in human cancer. *Clin. Chim. Acta.* **503**, 175–180.
32. Thin K.Z., Tu J.C., Raveendran S. (2019) Long non-coding SNHG1 in cancer. *Clin. Chim. Acta.* **494**, 38–47.
33. Bian Z., Ji W., Xu B., Huang W., Jiao J., Shao J., Zhang X. (2020) The role of long noncoding RNA SNHG7 in human cancers (Review). *Mol. Clin. Oncol.* **13**, 45.
34. Morelli E., Fulciniti M., Samur M.K., Ribeiro C.F., Wert-Lamas L., Henninger J.E., Gulla A., Aktas-Samur A., To-doerti K., Talluri S., Park W.D., Federico C., Scionti F., Amodio N., Bianchi G., Johnstone M., Liu N., Gramegna D., Maisano D., Russo N.A., Lin C., Tai Y.T., Neri A., Chauhan D., Hideshima T., Shammas M.A., Tassone P., Gryaznov S., Young R.A., Anderson K.C., Novina C.D., Loda M., Munshi N.C. (2023) A MIR17HG-derived long noncoding RNA provides an essential chromatin scaffold for protein interaction and myeloma growth. *Blood*. **141**, 391–405.
35. Ghafouri-Fard S., Safarzadeh A., Hussen B.M., Taheri M., Mokhtari M. (2023) Contribution of CRNDE lncRNA in the development of cancer and the underlying mechanisms. *Pathol. Res. Pract.* **244**, 154387.
36. Ghafouri-Fard S., Khoshbakht T., Taheri M., Shojaei S. (2021) A review on the role of small nucleolar RNA host gene 6 long non-coding RNAs in the carcinogenic processes. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 741684.
37. Wu Z., Zhang S., Guo W., He Y. (2022) LINC00339: an emerging major player in cancer and metabolic diseases. *Biomed. Pharmacother.* **149**, 112788.
38. Lee W.J., Shin C.H., Ji H., Jeong S.D., Park M.S., Won H.H., Pandey P.R., Tsitsipatis D., Gorospe M., Kim H.H. (2021) hnRNPK-regulated LINC00263 promotes malignant phenotypes through miR-147a/CAPN2. *Cell Death. Dis.* **12**, 290.
39. Cui H., Ruan M., Xu H., Qi J., Ruan L., Gao X., Sun X., Zhang S., Zuo R., Yin Y. (2021) LINC01420 serves as a novel prognostic biomarker and promotes cell proliferation, migration, and invasion by suppressing miR-149-5p in gastric cancer. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Exp.* **31**, 49–58.

40. Ma F., Lei Y.Y., Ding M.G., Luo L.H., Xie Y.C., Liu X.L. (2020) LncRNA NEAT1 interacted with DNMT1 to regulate malignant phenotype of cancer cell and cytotoxic T Cell infiltration via epigenetic inhibition of p53, cGAS, and STING in lung cancer. *Front. Genet.* **11**, 250.
41. Yu X., Song M.S., Rong P.Z., Chen X.J., Shi L., Wang C.H., Pang Q.J. (2022) LncRNA SNHG1 modulates adipogenic differentiation of BMSCs by promoting DNMT1 mediated Opg hypermethylation via interacting with PTBP1. *J. Cell. Mol. Med.* **26**, 60–74.
42. Zhang G.D., Gai P.Z., Liao G.Y., Li Y. (2019) LncRNA SNHG7 participates in osteosarcoma progression by down-regulating p53 via binding to DNMT1. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23**, 3602–3610.
43. Xie S.C., Zhang J.Q., Jiang X.L., Hua Y.Y., Xie S.W., Qin Y.A., Yang Y.J. (2020) LncRNA CRNDE facilitates epigenetic suppression of CELF2 and LATS2 to promote proliferation, migration and chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Cell Death. Dis.* **11**, 676.
44. Yang H., Jia W., Zhang D.P., Xu Y.X., Wang F., Wang N., Zhu D.F. (2022) Long non-coding RNAs and small nucleolar RNA host gene 6 contribute to the depression-like behavior of hypothyroid mice by promoting methylation of the brain-derived neuropathic factor promoter that is mediated by DNA methyltransferase 1. *J. Physiol. Pharmacol.* **73**(5). doi: 10.26402/jpp.2022.5.09
45. Ma Z., Huang H., Wang J., Zhou Y., Pu F., Zhao Q., Peng P., Hui B., Ji H., Wang K. (2017) Long non-coding RNA SNHG15 inhibits P15 and KLF2 expression to promote pancreatic cancer proliferation through EZH2-mediated H3K27me3. *Oncotarget.* **8**, 84153–84167.
46. Hu X., Li F., He J., Yang J., Jiang Y., Jiang M., Wei D., Chang L., Hejtmančík J.F., Hou L., Ma X. (2021) LncRNA NEAT1 recruits SFPQ to regulate MITF splicing and control RPE cell proliferation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **62**, 18.
47. Shen Y., Liu S., Fan J., Jin Y., Tian B., Zheng X., Fu H. (2017) Nuclear retention of the lncRNA SNHG1 by doxorubicin attenuates hnRNPC-p53 protein interactions. *EMBO Rep.* **18**, 536–548.
48. Zhang J., Zhang R., Ye Y. (2021) Long non-coding RNA (LncRNA) SNHG7/ Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 (EIF4G2) involves in the malignant events of ovarian cancer cells with paclitaxel resistant. *Bioengineered.* **12**, 10541–10552.
49. Wu Y., Sun Y., Xu B., Yang M., Wang X., Zhao X. (2023) SCARNA10 regulates p53 acetylation-dependent transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **669**, 38–45.
50. Zhang F., Wang H., Yu J., Yao X., Yang S., Li W., Xu L., Zhao L. (2021) LncRNA CRNDE attenuates chemoresistance in gastric cancer via SRSF6-regulated alternative splicing of PICALM. *Mol. Cancer.* **20**, 6.
51. Sun X., Wang R., Tan M., Tian X., Meng J. (2021) LncRNA LINC00680 promotes lung adenocarcinoma growth via binding to GATA6 and canceling GATA6-mediated suppression of SOX12 expression. *Exp. Cell. Res.* **405**, 112653.
52. Lan Z., Yao X., Sun K., Li A., Liu S., Wang X. (2020) The interaction between lncRNA SNHG6 and hnRNPA1 contributes to the growth of colorectal cancer by enhancing aerobic glycolysis through the regulation of alternative splicing of PKM. *Front. Oncol.* **10**, 363.
53. Zhai H., Zhang X., Sun X., Zhang D., Ma S. (2020) Long non-coding RNA LINC01420 contributes to pancreatic cancer progression through targeting KRAS proto-oncogene. *Dig. Dis. Sci.* **65**, 1042–1052.
54. Taiana E., Ronchetti D., Todoerti K., Nobili L., Tassone P., Amodio N., Neri A. (2020) LncRNA NEAT1 in paraspeckles: a structural scaffold for cellular DNA damage response systems? *Noncoding RNA.* **6**, 26.
55. Na Z., Luo Y., Schofield J.A., Smelyansky S., Khitun A., Muthukumar S., Valkov E., Simon M.D., Slavoff S.A. (2020) The NBDY microprotein regulates cellular RNA decapping. *Biochemistry.* **59**, 4131–4142.
56. Ren J., Li Y., Wuermanbieke S., Hu S., Huang G. (2022) N(6)-methyladenosine (m(6) A) methyltransferase METTL3-mediated LINC00680 accelerates osteoarthritis through m(6) A/SIRT1 manner. *Cell Death. Discov.* **8**, 240.
57. Jing L., Li S., Wang J., Zhang G. (2019) Long non-coding RNA small nucleolar RNA host gene 7 facilitates cardiac hypertrophy via stabilization of SDA1 domain containing 1 mRNA. *J. Cell. Biochem.* **120**, 15089–15097.
58. Feng Y., Gao L., Cui G., Cao Y. (2020) LncRNA NEAT1 facilitates pancreatic cancer growth and metastasis through stabilizing ELF3 mRNA. *Am.J. Cancer Res.* **10**, 237–248.
59. Wu X., Qiu L., Feng H., Zhang H., Yu H., Du Y., Wu H., Zhu S., Ruan Y., Jiang H. (2022) KHDRBS3 promotes paclitaxel resistance and induces glycolysis through modulated MIR17HG/CLDN6 signaling in epithelial ovarian cancer. *Life Sci.* **293**, 120328.
60. Liao M., Liao W., Xu N., Li B., Liu F., Zhang S., Wang Y., Wang S., Zhu Y., Chen D., Xie W., Jiang Y., Cao L., Yang B.B., Zhang Y. (2019) LncRNA EPB41L4A-AS1 regulates glycolysis and glutaminolysis by mediating nucleolar translocation of HDAC2. *EBioMedicine.* **41**, 200–213.
61. Szafron L.M., Balcerak A., Grzybowska E.A., Pienkowska-Grela B., Felisiak-Golabek A., Podgórska A., Kulesza M., Nowak N., Pomorski P., Wysocki J., Rubel T., Dansonka-Mieszkowska A., Konopka B., Lukasiak M., Kupryjanczyk J. (2015) The novel gene CRNDE encodes a nuclear peptide (CRNDEP) which is overexpressed in highly proliferating tissues. *PloS One.* **10**, e0127475.
62. Zou Q., Du X., Zhou L., Yao D., Dong Y., Jin J. (2023) A short peptide encoded by long non-coding RNA small nucleolar RNA host gene 6 promotes cell migration and epithelial-mesenchymal transition by activating transforming growth factor-beta/SMAD signaling pathway in human endometrial cells. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **49**, 232–242.
63. Yeasmin F., Imamachi N., Tanu T., Taniue K., Kawamura T., Yada T., Akimitsu N. (2021) Identification and annotation of short open reading frames (sORFs) in the initially annotated noncoding RNA LINC00493 from human cells. *J. Biochem.* **169**, 421–434.
64. D’Lima N.G., Ma J., Winkler L., Chu Q., Loh K.H., Corpuz E.O., Budnik B.A., Lykke-Andersen J., Saghatelian A., Slavoff S.A. (2017) A human microprotein that interacts with the mRNA decapping complex. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 174–180.
65. Mueller A.C., Cichewicz M.A., Dey B.K., Layer R., Reon B.J., Gagan J.R., Dutta A. (2015) MUNC, a long noncoding RNA that facilitates the function of MyoD in skeletal myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 498–513.
66. Srikanth V., Zou Z., Petrovics G., Xu L., Augustus M., Davis L., Livezey J.R., Connell T., Sesterhenn I.A., Yoshino K., Buzard G.S., Mostofi F.K., McLeod D.G.,

- Moul J.W., Srivastava S. (2000) PCGEM1, a prostate-specific gene, is overexpressed in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 12216–12221.
67. Li K., Wang Z. (2023) lncRNA NEAT1: key player in neurodegenerative diseases. *Ageing Res. Rev.* **86**, 101878.
68. Morchikh M., Cribier A., Raffel R., Amraoui S., Cau J., Severac D., Dubois E., Schwartz O., Bennasser Y., Benkirane M. (2017) HEXIM1 and NEAT1 long non-coding RNA form a multi-subunit complex that regulates DNA-mediated innate immune response. *Mol. Cell.* **67**, 387–399. e385.
69. Toker J., Iorgulescu J.B., Ling A.L., Villa G.R., Gadet J., Parida L., Getz G., Wu C.J., Reardon D.A., Chiocca E.A., Mineo M. (2023) Clinical importance of the lncRNA NEAT1 in cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **29**, 2226–2238.
70. Holdsworth-Carson S.J., Churchill M., Donoghue J.F., Mortlock S., Fung J.N., Slogett C., Chung J., Cann L., Teh W.T., Campbell K.R., Luwor R., Healey M., Montgomery G., Girling J.E., Rogers P.A.W. (2021) Elucidating the role of long intergenic non-coding RNA 339 in human endometrium and endometriosis. *Mol. Hum. Reprod.* **27**, gaab010.
71. Chen X.F., Zhu D.L., Yang M., Hu W.X., Duan Y.Y., Lu B.J., Rong Y., Dong S.S., Hao R.H., Chen J.B., Chen Y.X., Yao S., Thynn H.N., Guo Y., Yang T.L. (2018) An Osteoporosis Risk SNP at 1p36.12 acts as an allele-specific enhancer to modulate LINC00339 expression via long-range loop formation. *Am.J. Hum. Genet.* **102**, 776–793.
72. Couso J.P., Patraquim P. (2017) Classification and function of small open reading frames. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **18**, 575–589.
73. Jalali S., Gandhi S., Scaria V. (2016) Navigating the dynamic landscape of long noncoding RNA and protein-coding gene annotations in GENCODE. *Hum. Genomics*. **10**, 35.

REVISION OF FUNCTIONALLY RELEVANT AND WIDELY EXPRESSED LONG NON-CODING RNAs

D. O. Konina¹, *, M. Y. Skoblov¹

¹Laboratory of Functional Genomics, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia

*e-mail: darya.konina@phystech.edu

Long non-coding RNAs (lncRNAs) are involved in many cellular processes while displaying high tissue specificity. In contrast, protein-coding genes, including the category of housekeeping ones, exhibit broad expression patterns. The aim of this study was to highlight the functional importance of widely expressed lncRNAs. We analyzed experimental data from cell-growth screen of lncRNA loci in human cells, which allowed us to identify 18 lncRNA hits. Notably, these lncRNAs were not only widely expressed in most human tissues, but also played functional roles within them. Detail investigation revealed them encompass a variety of molecular functions, from cardiomyocyte damage controlling to macrophage class switching. Interestingly, experimental data highlighted the fact that a significant part of these lncRNAs encoded small but functional polypeptides. A set of lncRNAs, NEAT1, SNHG1, SNHG7, SNHG12, SNHG15, SNHG16, MIR17HG, LINC00680, LINC00263 and LINC00339, that were highly likely to be translated into small polypeptides was identified. Additionally, for EPB41L4A-AS1, CRNDE, SNHG6, LINC00493, and LINC01420, a dual function associated with both the RNA sequences and small proteins they encoded was established.

Keywords: CRISPRi, long non-coding RNA, short open reading frame