

УДК 577.27

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

© 2024 г. А. Н. Уварова^{a,*}, Е. А. Ткаченко^{b,c}, Е. М. Стасевич^a, Э. А. Богомолова^{b,d},
Э. А. Жеремян^{b,c}, Д. В. Купраш^{a,c,d}, К. В. Корнеев^{a,e}

^aЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

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

^cБиологический факультет Московского государственного университета

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

^dМосковский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия

^eНациональный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 125167 Россия

*e-mail: uvarowww@gmail.com

Поступила в редакцию 27.09.2023 г.

После доработки 23.10.2023 г.

Принята к публикации 23.10.2023 г.

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

Ключевые слова: CD55/DAF, SNP, PU.1/SPI1, система комплемента

DOI: 10.31857/S0026898424020089, **EDN:** NIRUNT

ВВЕДЕНИЕ

Мембранный белок CD55, также известный как DAF (decay accelerating factor, фактор ускорения распада комплемента), является ингибитором системы комплемента, широко представленным на иммунных клетках, а также на клетках стромы, эпителия и эндоте-

лия [1]. Ген CD55 располагается на хромосоме 1 и имеет 23 охарактеризованных транскрипта, 10 из которых белоккодирующие по данным Ensembl [2]. Согласно FANTOM5 hg38 human promoterome (<https://fantom.gsc.riken.jp/zenbu/>) основной старт транскрипции располагается в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) первого

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

экзона, общего для всех белоккодирующих изоформ [3]. CD55 обнаруживается в растворимой форме, но наиболее он представлен в мембранной форме, содержащей С-концевой гликозилфосфатидилинозитольный якорь [4]. CD55 защищает собственные клетки от системы комплемента с помощью дестабилизации конвертаз C3 и C5 [5]. Система комплемента, являющаяся частью врожденной иммунной системы, состоит из каскада протеолитических взаимодействий, которые приводят к непосредственному уничтожению патогена/инфицированной клетки, а также к рекрутированию иммунных клеток, участвующих в реакции воспаления [6]. CD55, экспрессирующийся на моноцитах, также может участвовать в адаптивных иммунных реакциях, подавляя активность Т-клеток за счет взаимодействия с молекулой адгезии CD97 на их поверхности [7].

Врожденные нарушения экспрессии CD55 ассоциированы с развитием аутоиммунных заболеваний [8, 9], SHAPLE-синдрома (включает в себя гиперактивацию комплемента, ангиопатический тромбоз, энтеропатию с потерей белка) [10], пароксизмальной ночной гемоглобинурией [11]. Снижение экспрессии CD55 и последующая активация системы комплемента ассоциированы с микрососудистыми осложнениями на фоне сахарного диабета типа 2 [12, 13]. У пациентов с ишемической болезнью сердца наблюдалась более низкая экспрессия CD55 на поверхности моноцитов, чем у здоровых индивидов [14]. При многих онкологических заболеваниях (колоректальный рак, рак желудка, рак яичников, лейкоз и др.) уровень экспрессии CD55, наоборот, повышается, что приводит к снижению комплементзависимой противоопухолевой цитотоксичности [1]. CD55 может способствовать прогрессии энтеровирусных инфекций, поскольку он является клеточным рецептором для ряда энтеровирусов [15]. Вирус иммунодефицита человека типа 1 (HIV-1), Т-лимфотропный вирус человека типа 1 (HTLV-1), цитомегаловирус человека (HCMV) и некоторые другие вирусы могут включать в свои вирионы CD55 для уклонения от системы комплемента [16]. Показано также участие CD55 в проникновении в эритроциты малярийного плазмодия, однако при церебральной малярии, в развитии которой система комплемента играет важную роль, CD55, видимо, выполняет защитную функцию [17]. В целом из-за сложных взаимодействий компонентов системы комплемента с ее регуляторами, патогенами и эффекторными клетками при инфекциях тяжесть заболевания и смертность могут быть связаны как с избыточной, так и с недостаточной активацией системы комплемента. Так, при инфицировании вирусом гриппа типа А матриксный белок M1 блокирует взаимодействие между IgG и C1qA, тем

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

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

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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биоинформатическое определение границ промоторной области и поиск транскрипционного фактора, аллель-специфически связывающегося в области SNP. Область промотора *CD55* уточняли при помощи данных ENCODE [27], Roadmap [28] и ChromHMM [29], визуализированных в геномном браузере UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>), на основании эпигенетических признаков регуляторных областей: пиков ацетилирования Lys27 гистона H3 (H3K27Ac), моно- и триметилирования Lys4 гистона H3 (H3K4me1, H3K4me3), а также данных о чувствительности к DNКазе I и наличию сайтов посадки ТФ. Для поиска потенциальных ТФ, аллель-специфически связывающихся с областью вокруг rs2564978, использовали биоинформатический ресурс ADAstra (Allelic Dosage-corrected Allele-Specific human Transcription factor binding sites) [30] и параметры: FDR threshold = 0.05; ES threshold = 0. Этот ресурс содержит обширные данные об аллель-специ-

фическом связывании ТФ с полиморфизмами в разных типах клеток, базирующиеся на данных о предсказании мотива ТФ (НОСОМО-СО v11, SPRy-SARUS) и аллель-специфичных ChIP-Seq.

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

Культивирование клеток, трансфекция и люциферазный тест. Моноциты U937 культивировали в среде RPMI 1640 (“ПанЭко”, Россия) с добавлением 10% FBS (“Corning”, США), 2 мМ L-глутамин, 1 мМ пирувата натрия, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все – “ПанЭко”), 1% раствора заменимых аминокислот и 10 мМ HEPES (все – “Gibco”, США). Клетки активировали, добавляя в культуральную среду форбол-12-миристан-13-ацетат (PMA; “Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 1 мкг/мл и/или липополисахарид (ЛПС; *E. coli* O111:B4, L2630, “Sigma-Aldrich”) в концентрации 100 нг/мл за 24 ч до трансфекции плазмидами, в качестве контроля активации добавляли фосфатно-солевой буфер (PBS). Клетки трансфицировали с использованием системы для электропорации Neon Transfection System (“Thermo Scientific”, США). На одну точку брали 2.5 млн клеток, добавляли к ним 5 мкг тестируемых плазмид в сочетании с 0.5 мкг контрольного вектора pRL-CMV (“Promega”), экспрессирующего люциферазу *Renilla* под

сильным CMV-промотором. Клетки подвергали электропорации с параметрами: один импульс напряжением 1400 В и длительностью 30 мс. Через 24 ч после трансфекции клетки лизировали с использованием набора Dual-Luciferase Reporter Assay System (“Promega”) и измеряли сигнал от люцифераз *Firefly* и *Renilla* на люцинометре 20/20n (“Turner BioSystems”, США) согласно протоколу производителя.

Генетический нокдаун *SP11* (PU.1), измерение экспрессии генов. Экспрессию гена *SP11* (PU.1) в клетках U937 подавляли методом РНК-интерференции с использованием малых интерферирующих РНК (siРНК), комплементарных кодирующим участкам генов. Для нокдауна *SP11* и в качестве контрольных scramble РНК использовали ранее опубликованные последовательности пар siРНК [32], синтезированные фирмой “ДНК-синтез” (Россия) (табл. 1). Для получения дуплекса siРНК эквимоллярные количества смысловых и антисмысловых олигонуклеотидов смешивали в буфере (10 мМ Трис, 20 мМ NaCl pH 8.0), нагревали раствор до 98 °С и медленно охлаждали до комнатной температуры. В первый день клетки U937 электропорировали дуплексами siРНК в количестве 500 пмоль на 2.5 млн клеток. Через 24 ч клетки U937 активировали PMA+ЛПС. На третий день клетки подвергали электропорации экспериментальными конструкциями и добавляли еще 300 пмоль того же дуплекса siРНК. На 4-й день измеряли активность люциферазы с помощью двойного люциферазного теста, а также отбирали часть клеток для выделения тотальной РНК и дальнейшего измерения экспрессии генов. Тотальную РНК выделяли с использованием реактива ExtractRNA (“Евроген”, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Обратную транскрипцию осуществляли с использованием праймеров олиго(dT)₁₈ и набора реактивов MMLV RT kit (“Евроген”) в соответствии с протоколом производителя. Количество полученной кДНК измеряли на приборе Real-time CFX96 Touch (“Bio-Rad”, США) с использованием готовой смеси qPCRMix-HS SYBR (“Евроген”) и специфических праймеров (табл. 1) по протоколу производителя.

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

Таблица 1. Олигонуклеотиды, используемые для проведения генетического нокдауна и измерения экспрессии мРНК

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Известно, что моноциты/макрофаги человека играют важную роль в противовирусном иммунном ответе [33], а уровень мРНК CD55 в моноцитах пациентов с генотипом rs2564978(TT), инфицированных вирусом, значительно снижен по сравнению с носителями С-аллеля [21]. Кроме того, согласно данным FANTOM5 (hg38, <https://fantom.gsc.riken.jp/zenbu/>), среди иммунных

клеток CD55 наиболее высоко экспрессируется в CD14⁺ моноцитах. Поэтому мы решили изучить влияние альтернативных аллелей rs2564978 на активность промотора CD55 в клеточной линии U937 (модель моноцитов человека).

Мы выбрали область промотора CD55 (chr1:207320724-207321763; GRCh38/hg38), включающую полиморфизм rs2564978, опираясь на эпигенетические маркеры активного хроматина в CD14⁺ моноцитах (высокие уровни модификации гистонов H3K4me3 и H3K27ac, сайты гиперчувствительности к ДНКазе I и кластеры сайтов связывания ТФ), а также на ранее опубликованные данные [21] (рис. 1). Геномный фрагмент, выбранный в качестве промотора для дальнейшего анализа, имеет общую длину около 1 т. п. н. и кодирует всю 5'-НТО CD55.

Затем мы клонировали в вектор pGL3-basic выбранную последовательность промотора CD55 с альтернативными вариантами полиморфизма rs2564978 (рис. 2a) и трансфицировали полученными репортерными конструкциями неактивированные (после добавления PBS) и стимулированные РМА или РМА+ЛПС клетки U937. Известно, что активация РМА стимулирует дифференцировку моноцитов U937 в макрофагоподобные клетки с M0-подобным фенотипом, тогда как стимуляция клеток РМА совместно с ЛПС поляризует их в M1-подобный фенотип [34, 35]. Экспрессия репортерного гена под контролем промотора CD55 существенно возрастала в клетках U937 после

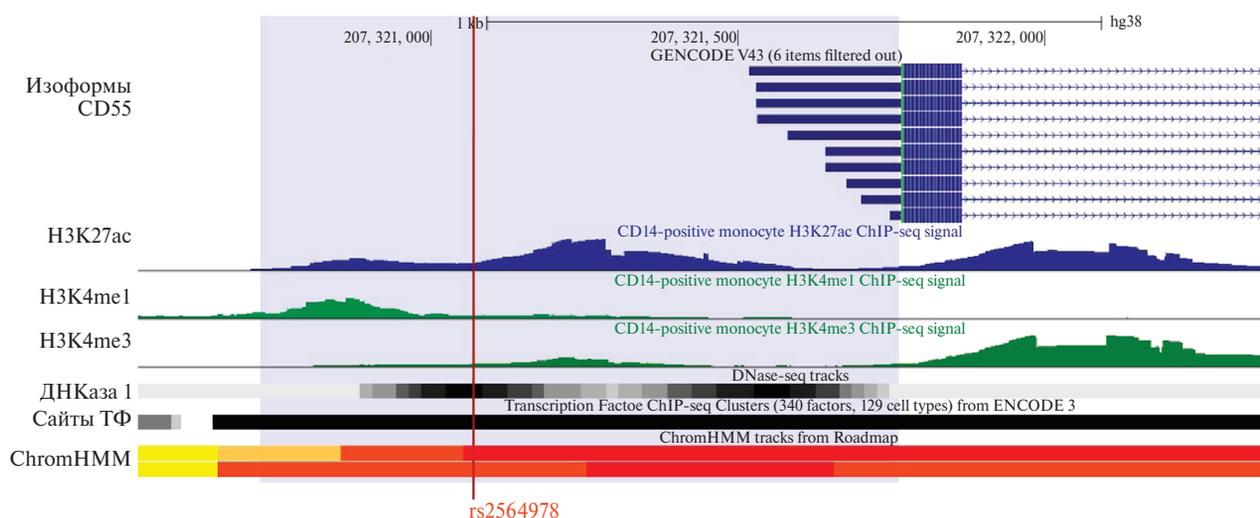


Рис. 1. Схематическое изображение расположения rs2564978 в промоторе гена CD55, визуализированное с помощью UCSC Genome Browser (GRCh38/hg38). Синим обозначена область промотора гена CD55. Красной вертикальной линией обозначено местонахождение однонуклеотидного полиморфизма rs2564978. Гистограммы показывают расположение модификаций гистонов, ассоциированных с активными регуляторными участками генома (моно/триметилирование H3K4, ацетилирование H3K27; Roadmap), в CD14⁺ моноцитах. Прямоугольниками отмечены кластеры гиперчувствительности к ДНКазе I в CD14⁺ моноцитах и сайты связывания транскрипционных факторов (ChIP-seq ENCODE). ChromHMM характеризует активность хроматина в нескольких субпопуляциях CD14⁺ моноцитов (по данным Roadmap): красным и оранжевым обозначены промотороподобные, желтым – энхансероподобные области.

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

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

Разница в активности регуляторных элементов, содержащих альтернативные варианты SNP, может быть связана с аллель-зависимым связыванием конкретного ТФ в области SNP [36, 37]. Для поиска потенциального ТФ, аллель-специфически связывающегося с областью вокруг rs2564978, мы использовали биоинформатический ресурс ADASTRА, основанный

на метаанализе данных ChIP-Seq [30]. Согласно ADASTRА, для CD14⁺ моноцитов предсказано более эффективное связывание ТФ PU.1 с областью промотора *CD55*, содержащей мажорный rs2564978(С) аллель, но не минорный Т-вариант (рис. 3а). PU.1 кодируется геном *SP11* и является основным регулятором дифференцировки клеток миелоидного ряда [38]. Мы проанализировали изменение уровня транскрипции *SP11* в зависимости от активации моноцитов U937. Наибольший уровень экспрессии эндогенной мРНК *SP11* наблюдается при “поляризации” моноцитов U937 в макрофагоподобные клетки (рис. 3б), что согласуется с результатами репортерного анализа (рис. 2б).

Для подтверждения участия PU.1 в аллель-зависимой регуляции активности промотора *CD55* проведен siРНК-опосредованный генетический нокаун *SP11* в активированных клетках U937 – эффективность подавления транскрипции *SP11* превышала 90% (рис. 3в). Интересно, что при подавлении экспрессии PU.1 в активированных моноцитах нивелировалась разница в активности промоторов *CD55*, содержащих альтернативные аллели rs2564978 (рис. 3г), однако не наблюдалось статистиче-

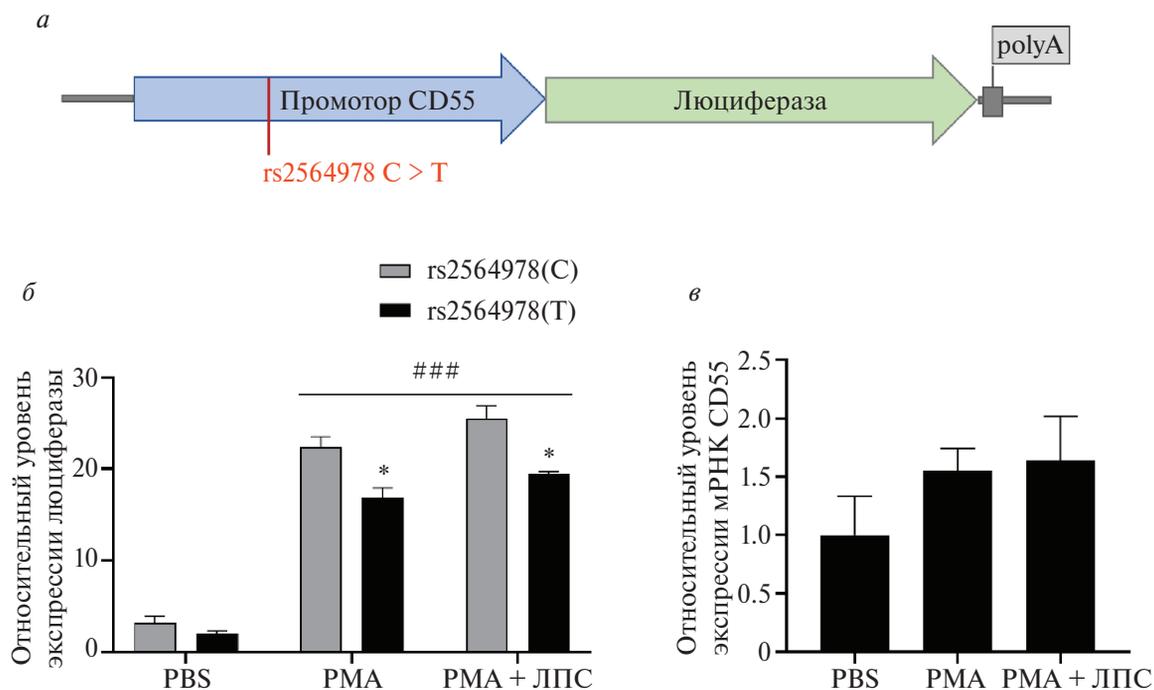


Рис. 2. Активность промотора гена *CD55* снижается в присутствии минорного rs2564978(Т) аллеля в клеточной модели макрофагов. а – Схема люциферазной репортерной конструкции рGL3-basic, содержащей промотор гена *CD55* с альтернативными аллелями rs2564978. б – Стимуляция моноцитов U937 с помощью РМА или РМА+ЛПС увеличивает аллель-зависимую разницу в активности промотора *CD55*. Экспрессия репортерной люциферазы была нормализована по экспрессии люциферазы внутреннего контроля (*Renilla*). в – Относительный уровень экспрессии мРНК *CD55* в неактивированных U937 (PBS) и после стимуляции РМА или РМА+ЛПС. На графиках представлены результаты трех экспериментов в виде средних значений \pm SEM. * $P < 0.05$ – различие между вариантами rs2564978(С) и rs2564978(Т), ### $P < 0.0001$ – различие между нестимулированными (PBS) и активированными клетками (непарный *t*-критерий Стьюдента).

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

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время благодаря полногеномным исследованиям (Genome-Wide Association Studies, GWAS) охарактеризовано множество ассоциаций SNP с различными заболеваниями, при этом примерно 95% клинически значимых SNP локализованы в некодирующих регуляторных областях генома [39]. Такое распределение может быть связано с изменением харак-

теристик регуляторных областей, окружающих SNP, с последующим влиянием на экспрессию генов, т. е. SNP играют роль eQTL (Expression Quantitative Trait Loci, локус количественного признака экспрессии) патогенетически важных генов [40]. В представленной работе используются генетические конструкции, содержащие промотор CD55 с инсерцией rs28371582(ins) размером 21 п. н., расположенной на 68 п. н. проксимальнее rs2564978. По данным LDpair Tool [41] в глобальной популяции rs2564978 и rs28371582 (также известные как rs3841376 или rs150046210) находятся в неравновесном сцеплении (linkage disequilibrium, LD), причем генотип rs2564978(C) преимущественно встречается вместе с rs28371582(ins), а генотип rs2564978(T) – с делецией rs28371582(del); исключением является африканская популяция.

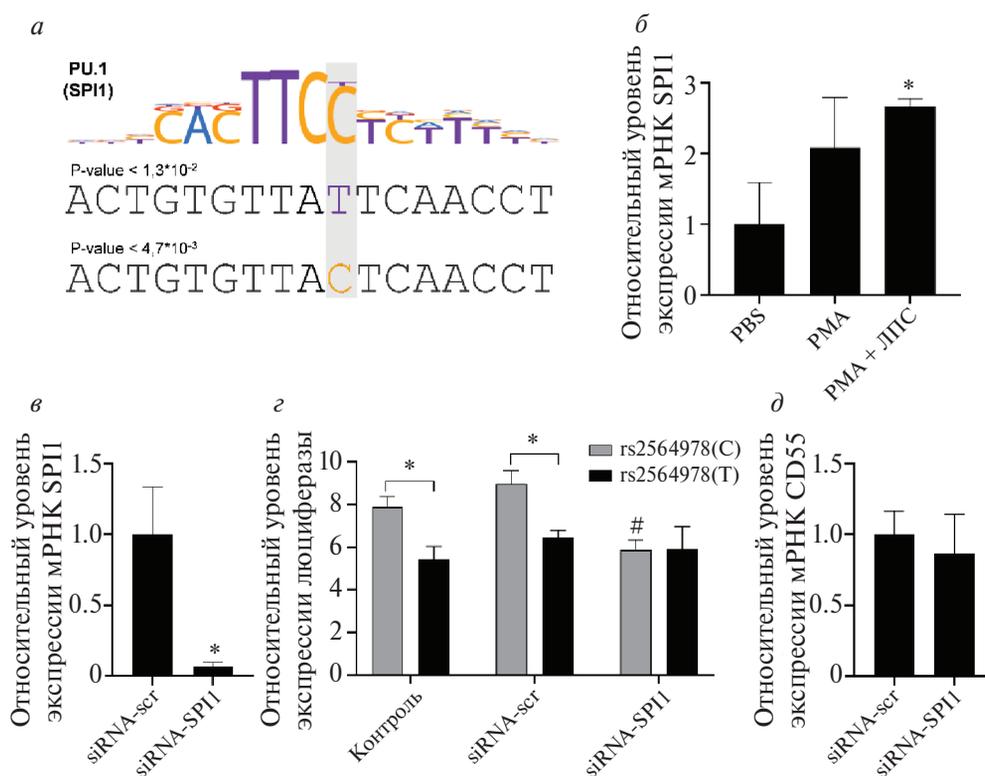


Рис. 3. Генетический нокаунт PU.1 (*SPI1*) в активированных моноцитах U937 снижает активность промотора *CD55*, содержащего мажорный rs2564978(C) аллель. **а** – Logo-диаграмма сайта связывания PU.1 (*SPI1*) из базы данных HOCOMOCO v11 и наложенные на нее последовательности промотора *CD55*, содержащие разные аллели rs2564978 (выделены цветом). Над последовательностями обозначены значения *P*-value мотивов, которые характеризуют предсказанную специфичность связывания PU.1 для альтернативных аллелей. **б** – Относительный уровень экспрессии мРНК *SPI1* в неактивированных U937 (PBS), в стимулированных PMA или PMA+ЛПС моноцитах U937. **P* < 0.05 – различие между уровнем экспрессии мРНК *SPI1* в PMA+ЛПС стимулированных моноцитах U937 и в неактивированных U937 (непарный *t*-критерий Стьюдента). **в** – Относительный уровень экспрессии мРНК *SPI1* в клетках U937 при нокауне *SPI1*. **P* < 0.05 (непарный *t*-критерий Стьюдента). **г** – Относительный уровень активности репортерной люциферазы под промотором *CD55* с разными вариантами rs2564978 при нокауне *SPI1* в активированных клетках линии U937. Нормирование по активности люциферазы внутреннего контроля. Контролем служили немодифицированные клетки (контроль) и трансфицированные неспецифической siРНК (siRNA-scr). **P* < 0.05 – различие между rs2564978(C) и rs2564978(T) вариантами (непарный *t*-критерий Стьюдента). #*P* < 0.05 – различие между вариантом rs2564978(C) при нокауне *SPI1*, контролем и siRNA-scr. **д** – Относительный уровень экспрессии мРНК *CD55* при нокауне *SPI1*. Представлены средние значения ± SEM, вычисленные по результатам трех экспериментов.

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

Вирус гриппа вызывает сезонные респираторные инфекции во многом благодаря быстрому распространению воздушно-капельным путем, а также присоединению вторичных бактериальных инфекций и суперинфекций [19, 43]. При инфицировании вирусом гриппа

на клетках экспонируются вирусные белки гемагглютинин и нейраминидаза – мощная сиалидаза, расщепляющая сиаловую кислоту в составе CD55. В результате нарушается ингибирование конвертазы С3 и происходит гиперактивация системы комплемента. Более того, присутствие гемагглютинина на клеточной мембране и распознавание десиаилированных поверхностных белков с помощью паттернраспознающих рецепторов может приводить к усиленной активации иммунного ответа и чрезмерному воспалению, способствуя повреждению тканей и ухудшая исход заболевания [6]. Таким образом, снижение количества ингибитора системы комплемента CD55 на поверхности макрофагов является возможным объяснением ассоциации rs2564978(T) с тяжелой формой гриппа А, причем ТФ PU.1 представляется молекулярным медиатором этого процесса (рис. 4).

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

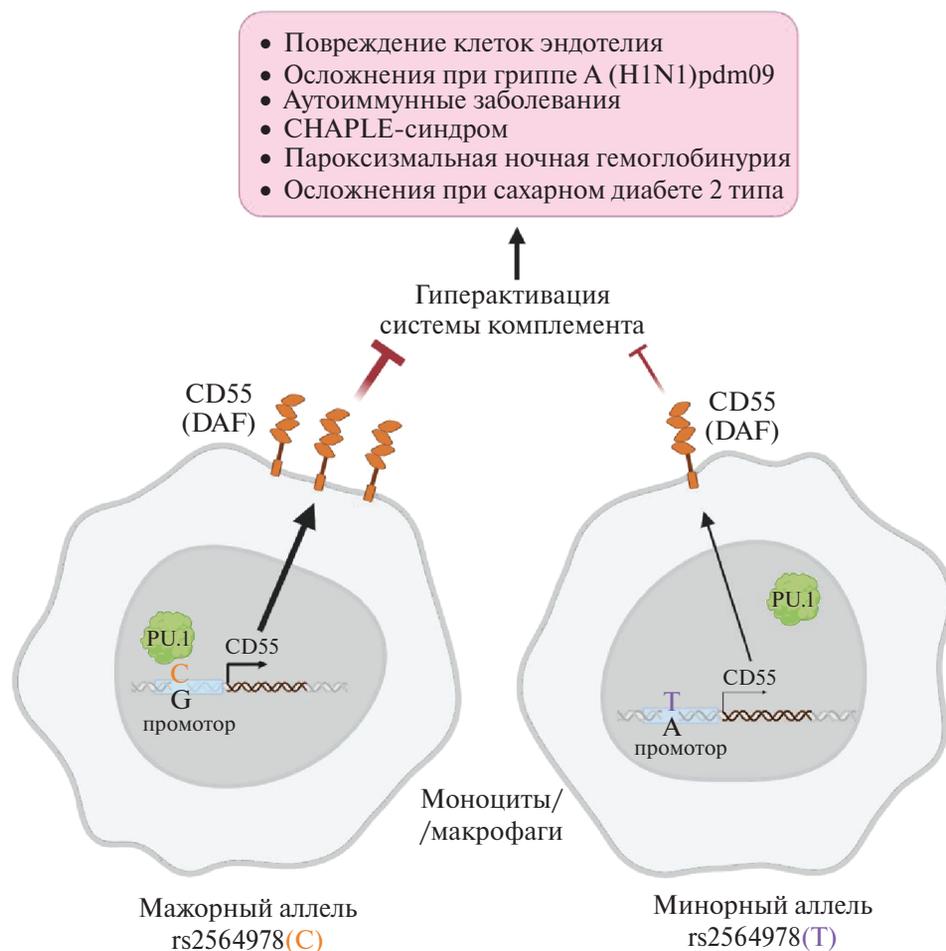


Рис. 4. Гипотетическая схема аллель-специфического влияния rs2564978 на развитие патологических осложнений, связанных с гиперактивацией системы комплемента (изображение сделано с помощью BioRender.com).

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

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

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

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

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

3. Forrest A.R.R., Kawaji H., Rehli M., Baillie J.K., De Hoon M.J.L., Haberle V., Lassmann T., Kulakovskiy I.V., Lizio M., Itoh M., Andersson R., Mungall C.J., Meehan T.F., Schmeier S., Bertin N., Jørgensen M., Dimont E., Arner E., Schmid C., Schaefer U., Medvedeva Y.A., Plessy C., Vitezic M., Severin J., Semple C.A., Ishizu Y., Young R.S., Francescato M., Altschuler I.A., Albanese D., Altschule G.M., Arakawa T., Archer J.A.C., 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.B., Edinger M., Ekwall K., Endoh M., Enomoto H., Fagiolini M., Fairbairn L., Fang H., Farach-Carson M.C., Faulkner G.J., Favorov A.V., Fisher M.E., Frith M.C., Fujita R., Fukuda S., Furlanello C., Furuno M., Furusawa J.I., Geijtenbeek T.B., Gibson A.P., Gingeras T., Goldowitz D., Gough J., Guhl S., Guler R., Gustincich S., Ha T.J., Hamaguchi M., Hara M., Harbers M., Harshbarger J., Hasegawa A., Hasegawa Y., Hashimoto T., Herlyn M., Hitchens K.J., Sui S.J.H., Hofmann O.M., Hoof I., Hori F., Huminiecki L., Iida K., Ikawa T., Jankovic B.R., Jia H., Joshi A., Jurman G., 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., Lenartsson A., Li K., Lilje B., Lipovich L., Mackay-sim A., Manabe R.I., Mar J.C., Marchand B., Mathelier A., Mejhert N., Meynert A., Mizuno Y., De Moraes D.A.L., Morikawa H., Morimoto M., Moro K., Motakis E., Motohashi H., Mummery C.L., Murata

- M., Nagao-Sato S., Nakachi Y., Nakahara F., Nakamura T., Nakamura Y., Nakazato K., Van Nimwegen E., Ninomiya N., Nishiyori H., Noma S., Nozaki T., Ogishima S., Ohkura N., Ohmiya H., Ohno H., Ohshima M., Okada-Hatakeyama M., Okazaki Y., Orlando V., Ovchinnikov D.A., Pain A., Passier R., Patrikakis M., Persson H., Piazza S., Prendergast J.G.D., Rackham O.J.L., Ramilowski J.A., Rashid M., Ravasi T., Rizzu P., Roncador M., Roy S., Rye M.B., Saijyo E., Sajantila A., Saka A., Sakaguchi S., Sakai M., Sato H., Satoh H., Savvi S., Saxena A., Schneider C., Schultes E.A., Schulze-Tanzil G.G., Schwegmann A., Sengstag T., Sheng G., Shimoji H., Shimoni Y., Shin J.W., Simon C., Sugiyama D., Sugiyama T., Suzuki M., Suzuki N., Swoboda R.K., 'T Hoen P.A.C., Tagami M., Tagami N.T., Takai J., Tanaka H., Tatsukawa H., Tatum Z., Thompson M., Toyoda H., Toyoda T., Valen E., Van De Wetering M., Van Den Berg L.M., Verardo R., Vijayan D., Vorontsov I.E., Wasserman W.W., Watanabe S., Wells C.A., Winteringham L.N., Wolvetang E., Wood E.J., Yamaguchi Y., Yamamoto M., Yoneda M., Yonekura Y., Yoshida S., Zabierowski S.E., Zhang P.G., Zhao X., Zucchelli S., Summers K.M., Suzuki H., Daub C.O., Kawai J., Heutink P., Hide W., Freeman T.C., Lenhard B., Bajic L.V.B., Taylor M.S., Makeev V.J., Sandelin A., Hume D.A., Carninci P., Hayashizaki Y. (2014) A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature*. **507**(7493), 462–470.
4. Vainer E.D., Meir K., Furman M., Semenenko I., Konikoff F., Vainer G.W. (2013) Characterization of novel CD55 isoforms expression in normal and neoplastic tissues. *Tissue Antigens*. **82**(1), 26–34.
 5. Geller A., Yan J. (2019) The role of membrane bound complement regulatory proteins in tumor development and cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* **10**, 1074.
 6. Santos N.B., Vaz Da Silva Z.E., Gomes C., Reis C.A., Amorim M.J. (2021) Complement decay-accelerating factor is a modulator of influenza A virus lung immunopathology. *PLoS Pathog.* **17**(7), e1009381.
 7. Abbott R.J.M., Spendlove I., Roversi P., Fitzgibbon H., Knott V., Teriete P., McDonnell J.M., Handford P.A., Lea S.M. (2007) Structural and functional characterization of a novel T cell receptor co-regulatory protein complex, CD97-CD55. *J. Biol. Chem.* **282**(30), 22023–22032.
 8. Hamann J., Wishaupt J.O., Van Lier R.A.W., Smeets T.J.M., Breedveld F.C., Tak P.P. (1999) Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum.* **42**(4), 650–658.
 9. Miwa T., Maldonado M.A., Zhou L., Yamada K., Gilkeson G.S., Eisenberg R.A., Song W.C. (2007) Decay-accelerating factor ameliorates systemic autoimmune disease in MRL/lpr mice via both complement-dependent and -independent mechanisms. *Am. J. Pathol.* **170**(4), 1258–1266.
 10. Ozen A., Comrie W.A., Ardy R.C., Domínguez Conde C., Dalgic B., Beser Ö.F., Morawski A.R., Karakoc-Aydiner E., Tutar E., Baris S., Ozcay F., Serwas N.K., Zhang Y., Matthews H.F., Pittaluga S., Folio L.R., Unlusoy Aksu A., McElwee J.J., Krolo A., Kiykim A., Baris Z., Gulsan M., Ogulur I., Snapper S.B., Houwen R.H.J., Leavis H.L., Ertem D., Kain R., Sari S., Erkan T., Su H.C., Boztug K., Lenardo M.J. (2017) CD55 deficiency, early-onset protein-losing enteropathy, and thrombosis. *N. Engl. J. Med.* **377**(1), 52–61.
 11. Brodsky R.A. (2008) Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Rev.* **22**(2), 65–74.
 12. Ma X.W., Chang Z.W., Qin M.Z., Sun Y., Huang H.L., He Y. (2009) Decreased expression of complement regulatory proteins, CD55 and CD59, on peripheral blood leucocytes in patients with type 2 diabetes and macrovascular diseases. *Chin. Med. J.* **122**(18), 2123–2128.
 13. Zhang J., Gerhardinger C., Lorenzi M. (2002) Early complement activation and decreased levels of glycosylphosphatidylinositol-anchored complement inhibitors in human and experimental diabetic retinopathy. *Diabetes*. **51**(12), 3499–3504.
 14. Mishra N., Mohata M., Narang R., Lakshmy R., Hazarika A., Pandey R.M., Das N., Luthra K. (2019) Altered expression of complement regulatory proteins CD35, CD46, CD55, and CD59 on leukocyte subsets in individuals suffering from coronary artery disease. *Front. Immunol.* **10**, 2072.
 15. Bergelson J.M., Chan M., Solomon K.R., St. John N.F., Lin H., Finberg R.W. (1994) Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**(13), 6245–6248.
 16. Stoermer K.A., Morrison T.E. (2011) Complement and viral pathogenesis. *Viol. J.* **411**(2), 362–373.
 17. Biryukov S., Stoute J.A. (2014) Complement activation in malaria: friend or foe? *Trends Mol. Med.* **20**(5), 293–301.
 18. Zhang J., Li G., Liu X., Wang Z., Liu W., Ye X. (2009) Influenza A virus M1 blocks the classical complement pathway through interacting with C1qA. *J. Gen. Virol.* **90**(Pt. 11), 2751–2758.
 19. Nogales A., Dediego M.L. (2019) Host single nucleotide polymorphisms modulating influenza a virus disease in humans. *Pathogens*. **8**(4), 168.
 20. Lage S.L., Rocco J.M., Laidlaw E., Rupert A., Galindo F., Kellogg A., Kumar P., Poon R., Wortmann G.W., Lisco A., Manion M., Sereti I. (2022) Activation of complement components on circulating blood monocytes from COVID-19 patients. *Front. Immunol.* **13**, 815833.
 21. Zhou J., To K.K.W., Dong H., Cheng Z.S., Lau C.C.Y., Poon V.K.M., Fan Y.H., Song Y.Q., Tse H., Chan K.H., Zheng B.J., Zhao G.P., Yuen K.Y. (2012) A functional variation in CD55 increases the severity of 2009 pandemic H1N1 influenza a virus infection. *J. Infect. Dis.* **206**(4), 495–503.
 22. Chatzopoulou F., Gioula G., Kioumis I., Chatzidimitriou D., Exindari M. (2019) Identification of com-

- plement-related host genetic risk factors associated with influenza A(H1N1)pdm09 outcome: challenges ahead. *Med. Microbiol. Immunol.* **208**(5), 631–640.
23. Lee N., Cao B., Ke C., Lu H., Hu Y., Tam C.H.T., Ma R.C.W., Guan D., Zhu Z., Li H., Lin M., Wong R.Y.K., Yung I.M.H., Hung T.-N., Kwok K., Horby P., Hui D.S.C., Chan M.C.W., Chan P.K.S. (2017) Single-nucleotide polymorphisms of IFITM3, TLR3, CD55, and TLR4 and risk for severe outcomes in patients with influenza A (H7N9) and (H1N1) pdm09 in China: a multicentre cohort study. *Lancet.* **390**, S1.
 24. Zhang Y., Zhang Z., Cao L., Lin J., Yang Z., Zhang X. (2017) A common CD55 rs2564978 variant is associated with the susceptibility of non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* **8**(4), 6216–6221.
 25. Wu H.J., Gao H., Xie Y.N., Zhang Y.Y., Yang Z.B., Zhang X.M. (2018) A promoter polymorphism of CD55 effect on the risk of esophageal cancer. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese J. Preventive Med.]*. **52**(8), 822–826.
 26. Li M., Li Y.P., Deng H.L., Wang M.Q., Wang W.J., Wang J., Wu F.P., Dang S.S. (2020) Association of gene polymorphisms of CD55 with susceptibility to and severity of hand, foot, and mouth disease caused by enterovirus 71 in the Han Chinese population. *J. Med. Virol.* **92**(12), 3119–3124.
 27. Dunham I., Kundaje A., Aldred S.F., Collins P.J., Davis C.A., Doyle F., Epstein C.B., Frietze S., Harrow J., Kaul R., Khatun J., Lajoie B.R., Landt S.G., Lee B.K., Pauli F., Rosenbloom K.R., Sabo P., Safi A., Sanyal A., Shores N., Simon J.M., Song L., Trinklein N.D., Altshuler R.C., Birney E., Brown J.B., Cheng C., Djebali S., Dong X., Ernst J., Furey T.S., Gerstein M., Giardine B., Greven M., Hardison R.C., Harris R.S., Herrero J., Hoffman M.M., Iyer S., Kellis M., Kheradpour P., Lassmann T., Li Q., Lin X., Marinov G.K., Merkel A., Mortazavi A., Parker S.C.J., Reddy T.E., Rozowsky J., Schlesinger F., Thurman R.E., Wang J., Ward L.D., Whitfield T.W., Wilder S.P., Wu W., Xi H.S., Yip K.Y., Zhuang J., Bernstein B.E., Green E.D., Gunter C., Snyder M., Pazin M.J., Lowdon R.F., Dillon L.A.L., Adams L.B., Kelly C.J., Zhang J., Wexler J.R., Good P.J., Feingold E.A., Crawford G.E., Dekker J., Elnitski L., Farnham P.J., Giddings M.C., Gingeras T.R., Guigó R., Hubbard T.J., Kent W.J., Lieb J.D., Margulies E.H., Myers R.M., Stamatoyannopoulos J.A., Tenenbaum S.A., Weng Z., White K.P., Wold B., Yu Y., Wrobel J., Risk B.A., Gunawardena H.P., Kuiper H.C., Maier C.W., Xie L., Chen X., Mikkelson T.S., Gillespie S., Goren A., Ram O., Zhang X., Wang L., Issner R., Coyne M.J., Durham T., Ku M., Truong T., Eaton M.L., Dobin A., Tanzer A., Lagarde J., Lin W., Xue C., Williams B.A., Zaleski C., Röder M., Kokocinski F., Abdelhamid R.F., Alioto T., Antoshechkin I., Baer M.T., Batut P., Bell I., Bell K., Chakraborty S., Chrast J., Curado J., Derrien T., Drenkow J., Dumais E., Dumais J., Duttagupta R., Fastuca M., Fejes-Toth K., Ferreira P., Foissac S., Fullwood M.J., Gao H., Gonzalez D., Gordon A., Howald C., Jha S., Johnson R., Kapranov P., King B., Kingswood C., Li G., Luo O.J., Park E., Preall J.B., Presaud K., Ribeca P., Robyr D., Ruan X., Sammeth M., Sandhu K.S., Schaeffer L., See L.H., Shahab A., Skancke J., Suzuki A.M., Takahashi H., Tilgner H., Trout D., Walters N., Wang H., Hayashizaki Y., Raymond A., Antonarakis S.E., Hannon G.J., Ruan Y., Carninci P., Sloan C.A., Learned K., Malladi V.S., Wong M.C., Barber G.P., Cline M.S., Dreszer T.R., Heitner S.G., Karolchik D., Kirkup V.M., Meyer L.R., Long J.C., Maddren M., Raney B.J., Grassegger L.L., Giresi P.G., Battenhouse A., Sheffield N.C., Showers K.A., London D., Bhinge A.A., Shestak C., Schaner M.R., Kim S.K., Zhang Z.Z., Mieczkowska P.A., Mieczkowska J.O., Liu Z., McDaniel R.M., Ni Y., Rashid N.U., Kim M.J., Adar S., Zhang Z., Wang T., Winter D., Keefe D., Iyer V.R., Zheng M., Wang P., Gertz J., Vielmetter J., Partridge E.C., Varley K.E., Gasper C., Bansal A., Pepke S., Jain P., Amrhein H., Bowling K.M., Anaya M., Cross M.K., Muratet M.A., Newberry K.M., McCue K., Nesmith A.S., Fisher-Aylor K.I., Pusey B., DeSalvo G., Parker S.L., Balasubramanian S., Davis N.S., Meadows S.K., Eggleston T., Newberry J.S., Levy S.E., Absher D.M., Wong W.H., Blow M.J., Visel A., Pennachio L.A., Petrykowska H.M., Abyzov A., Aken B., Barrell D., Barson G., Berry A., Bignell A., Boychenko V., Bussotti G., Davidson C., Despacio-Reyes G., Diekhans M., Ezkurdia I., Frankish A., Gilbert J., Gonzalez J.M., Griffiths E., Harte R., Hendrix D.A., Hunt T., Jungreis I., Kay M., Khurana E., Leng J., Lin M.F., Loveland J., Lu Z., Manthavadi D., Mariotti M., Mudge J., Mukherjee G., Notredame C., Pei B., Rodriguez J.M., Saunders G., Sboner A., Searle S., Sisu C., Snow C., Steward C., Tapanari E., Tress M.L., Van Baren M.J., Washietl S., Wilmington L., Zadissa A., Zhang Z., Brent M., Haussler D., Valencia A., Addleman N., Alexander R.P., Auerbach R.K., Balasubramanian S., Bettinger P., Bhardwaj N., Boyle A.P., Cao A.R., Cayting P., Charos A., Cheng Y., Eastman C., Euskirchen G., Fleming J.D., Grubert F., Habegger L., Hariharan M., Harmanci A., Iyengar S., Jin V.X., Karczewski K.J., Kasowski M., Lacroute P., Lam H., Lamarre-Vincent N., Lian J., Lindahl-Allen M., Min R., Miotto B., Monahan H., Moqtaderi Z., Mu X.J., O'Geen H., Ouyang Z., Patacsil D., Raha D., Ramirez L., Reed B., Shi M., Slifer T., Witt H., Wu L., Xu X., Yan K.K., Yang X., Struhl K., Weissman S.M., Penalva L.O., Karmakar S., Bhanvadia R.R., Choudhury A., Domanus M., Ma L., Moran J., Victorsen A., Auer T., Centanin L., Eichenlaub M., Gruhl F., Heermann S., Hoeckendorf B., Inoue D., Kellner T., Kirchmaier S., Mueller C., Reinhardt R., Schertel L., Schneider S., Sinn R., Wittbrodt B., Wittbrodt J., Jain G., Balasundaram G., Bates D.L., Byron R., Canfield T.K., Diegel M.J., Dunn D., Ebersol A.K., Frum T., Garg K., Gist E., Hansen R.S., Boatman L., Haugen E., Humbert R., Johnson A.K., Johnson E.M., Kutayin T.V., Lee K., Lotakis D., Maurano M.T., Neph S.J., Neri F.V., Nguyen E.D., Qu H., Reynolds A.P., Roach V., Rynes E., Sanchez M.E., Sandstrom R.S., Shafer A.O., Stergachis A.B., Thomas S., Vernot B., Vierstra J., Vong S., Wang H., Weaver M.A., Yan Y.,

- Zhang M., Akey J.M., Bender M., Dorschner M.O., Groudine M., MacCoss M.J., Navas P., Stamatoyannopoulos G., Beal K., Brahma A., Flicek P., Johnson N., Lukk M., Luscombe N.M., Sobral D., Vaquerizas J.M., Batzoglou S., Sidow A., Hussami N., Kyriazopoulou-Panagiotopoulou S., Libbrecht M.W., Schaub M.A., Miller W., Bickel P.J., Banfai B., Boley N.P., Huang H., Li J.J., Noble W.S., Bilmes J.A., Buske O.J., Sahu A.D., Kharchenko P.V., Park P.J., Baker D., Taylor J., Loehovsky L. (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. **489**(7414), 57–74.
28. Kundaje A., Meuleman W., Ernst J., Bilenky M., Yen A., Heravi-Moussavi A., Kheradpour P., Zhang Z., Wang J., Ziller M.J., Amin V., Whitaker J.W., Schultz M.D., Ward L.D., Sarkar A., Quon G., Sandstrom R.S., Eaton M.L., Wu Y.-C., Pfennig A.R., Wang X., Claussnitzer M., Liu Y., Coarfa C., Harris R.A., Shores N., Epstein C.B., Gjoneska E., Leung D., Xie W., Hawkins R.D., Lister R., Hong C., Gascard P., Mungall A.J., Moore R., Chuah E., Tam A., Canfield T.K., Hansen R.S., Kaul R., Sabo P.J., Bansal M.S., Carles A., Dixon J.R., Farh K.-H., Feizi S., Karlic R., Kim A.-R., Kulkarni A., Li D., London R., Elliott G., Mercer T.R., Neph S.J., Onuchic V., Polak P., Rajagopal N., Ray P., Sallari R.C., Siebenthal K.T., Sinnott-Armstrong N.A., Stevens M., Thurman R.E., Wu J., Zhang B., Zhou X., Beaudet A.E., Boyer L.A., De Jager P.L., Farnham P.J., Fisher S.J., Haussler D., Jones S.J.M., Li W., Marra M.A., McManus M.T., Sunyaev S., Thomson J.A., Tlsty T.D., Tsai L.-H., Wang W., Waterland R.A., Zhang M.Q., Chadwick L.H., Bernstein B.E., Costello J.F., Ecker J.R., Hirst M., Meissner A., Milosavljevic A., Ren B., Stamatoyannopoulos J.A., Wang T., Kellis M. (2015) Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*. **518**(7539), 317–330.
29. Ernst J., Kellis M. (2017) Chromatin-state discovery and genome annotation with ChromHMM. *Nat. Protoc.* **12**(12), 2478–2492.
30. Abramov S., Boytsov A., Bykova D., Penzar D.D., Yevshin I., Kolmykov S.K., Fridman M.V., Favorov A.V., Vorontsov I.E., Baulin E., Kolpakov F., Makeev V.J., Kulakovskiy I.V. (2021) Landscape of allele-specific transcription factor binding in the human genome. *Nat. Commun.* **12**(1), 2751.
31. Ustiugova A.S., Korneev K.V., Kuprash D.V., Afanasyeva M.A. (2019) Functional SNPs in the human autoimmunity-associated locus 17q12-21. *Genes*. **10**(2), 77.
32. Schotte R., Nagasawa M., Weijer K., Spits H., Blom B. (2004) The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *J. Exp. Med.* **200**(11), 1503–1509.
33. Roberts N.J. (2020) Diverse and unexpected roles of human monocytes/macrophages in the immune response to influenza virus. *Viruses*. **12**(4), 379.
34. Nascimento C.R., Rodrigues Fernandes N.A., Gonzalez Maldonado L.A., Rossa Junior C. (2022) Comparison of monocytic cell lines U937 and THP-1 as macrophage models for in vitro studies. *Biochem. Biophys. Rep.* **32**, 101383.
35. Wang N., Liang H., Zen K. (2014) Molecular mechanisms that influence the macrophage M1-M2 polarization balance. *Front. Immunol.* **5**, 614.
36. Uvarova A.N., Stasevich E.M., Ustiugova A.S., Mitkin N.A., Zheremyan E.A., Sheetikov S.A., Zornikova K.V., Bogolyubova A.V., Rubtsov M.A., Kulakovskiy I.V., Kuprash D.V., Korneev K.V., Schwartz A.M. (2023) rs71327024 associated with COVID-19 hospitalization reduces CXCR6 promoter activity in human CD4+ T cells via disruption of c-Myb binding. *Int. J. Mol. Sci.* **24**(18), 13790.
37. Korneev K.V., Sviriaeva E.N., Mitkin N.A., Gorbacheva A.M., Uvarova A.N., Ustiugova A.S., Polanovsky O.L., Kulakovskiy I.V., Afanasyeva M.A., Schwartz A.M., Kuprash D.V. (2020) Minor C allele of the SNP rs7873784 associated with rheumatoid arthritis and type-2 diabetes mellitus binds PU.1 and enhances TLR4 expression. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* **1866**(3), 165626.
38. Fisher R.C., Scott E.W. (1998) Role of PU.1 in hematopoiesis. *Stem Cells*. **16** (1), 25–37.
39. Orozco G., Schoenfelder S., Walker N., Eyre S., Fraser P. (2022) 3D genome organization links non-coding disease-associated variants to genes. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 995388.
40. Johnston A.D., Simões-Pires C.A., Thompson T.V., Suzuki M., Grealley J.M. (2019) Functional genetic variants can mediate their regulatory effects through alteration of transcription factor binding. *Nat. Commun.* **10**(1), 3472.
41. Lin S.H., Thakur R., Machiela M.J. (2021) LDexpress: an online tool for integrating population-specific linkage disequilibrium patterns with tissue-specific expression data. *BMC Bioinform.* **22**(1), 608.
42. Kawai T., Takeshita S., Imoto Y., Matsumoto Y., Sakashita M., Suzuki D., Shibasaki M., Tamari M., Hirota T., Arinami T., Fujieda S., Noguchi E. (2009) Associations between decay-accelerating factor polymorphisms and allergic respiratory diseases. *Clin. Exp. Allergy*. **39**(10), 1508–1514.
43. Свиряева Е.Н., Корнеев К.В., Друцкая М.С., Купраш Д.В. (2016) Механизмы перестройки иммунного ответа при вирусно-бактериальных коинфекциях дыхательных путей (обзор). *Биохимия*. **81**(11), 1593–1603.
44. Perico L., Benigni A., Casiraghi F., Ng L.F.P., Renia L., Remuzzi G. (2021) Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat. Rev. Nephrol.* **17**(1), 46–64.
45. Latreille E., Lee W.L. (2021) Interactions of influenza and sars-cov-2 with the lung endothelium: Similarities, differences, and implications for therapy. *Viruses*. **13**(2), 161.
46. Aydin Ozgur B., Coskunpinar E., Bilgic Gazioglu S., Yilmaz A., Musteri Oltulu Y., Cakmakoglu B., Deniz G., Gurol A.O., Yilmaz M.T. (2020) Effects of complement regulators and chemokine receptors in type 2 diabetes. *Immunol. Invest.* **50**(5), 478–491.

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

**A. N. Uvarova^{1,*}, E. A. Tkachenko^{2,3}, E. M. Stasevich¹, E. A. Bogomolova^{2,4},
E. A. Zheremyan^{2,3}, D. V. Kuprash^{1,3,4}, K. V. Korneev^{1,5}**

¹*Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

²*Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

³*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

⁴*Moscow Institute of Physics and Technology, Department of Molecular and Biological Physics, Moscow, 141701 Russia*

⁵*National Research Center for Hematology, Moscow, 125167 Russia*

*e-mail: uvarowww@gmail.com

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

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